

Mechano-thermische Vakuum-Dampf-Vakuum-Entkeimung (mtVDV) am Beispiel bakterieller Sporen

DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
an der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Dipl.-Ing. (FH) Markus Lilie

geboren am 09. März 1980

in Wolfen

Juli 2009

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. Ralf Möller
Erstgutachter:	Prof. Dr. techn. Karl Friebs
Zweitgutachter:	Prof. Dr.-Ing. Ulrich Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2005 bis Mai 2009 am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld sowie im Labor für Verfahrenstechnik des Fachbereichs Life Science Technologies der Hochschule Ostwestfalen-Lippe.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ralf Möller für die Übernahme des Vorsitzes im Prüfungsausschuss. Prof. Dr. Karl Friehs danke ich für Betreuung als externer Doktorand und die Begutachtung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Müller für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Diskussionen und die großen Freiräume bei der Anfertigung dieser Arbeit. Aber auch für die gute finanzielle Unterstützung während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal bedanken.

Dr. Melanie Störmer (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) und Dr. Dejan Djuric (BASF, Ludwigshafen) danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Dipl.-Ing. Patrick Wilhelm möchte ich für die vielen Diskussionen und vor allem für die zahlreichen Umbau- und Programmierarbeiten danken, ohne die diese Arbeit so nicht hätte durchgeführt werden können. Vielen Dank für Deine Hilfe Patrick! Auch danke ich Frau Prof. Dr. Barbara Becker für die Möglichkeit, die mikrobiologischen Arbeiten in ihrem Labor durchzuführen.

Prof. Dr. Arno Kwade und seinen Mitarbeitern Dr. Ingo Kampen, M.Sc. Chem. Andreas Wargenau und Dipl.-Biotechnol. Judith Arfzen vom IPAT der TU Braunschweig sowie Prof. Dr. Dario Anselmetti und seinen Mitarbeitern Dr. Robert Ros und Dipl.-Phys. Volker Walhorn von der Universität Bielefeld möchte ich für die Unterstützung bei den AFM-Haftkraftmessungen danken. Für die Bildanalysen der mehr als 3.000 mikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Dipl.-Inform. Sebastian Burgemeister von der Universität Bielefeld bedanken.

Weiter möchte ich den zahlreichen ehemaligen Diplom- und Bachelorstudenten danken, die durch Ihre Abschlussarbeiten viel für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterer Dank gilt meinem Freundeskreis und hier vor allem der "Männertagsrunde". Auf das wir es noch viele weitere Jahre mit dem Fahrrad bis nach Burgkernitz schaffen.

Ein großer Dank geht an meine Eltern und Schwiegereltern für die große Unterstützung in all den Jahren. Ihr ward immer da, wenn ich Euch gebraucht habe.

Meine Frau Steffi verdient jedoch den größten Dank, hat sie mich doch in der gesamten Zeit am meisten unterstützt. Du warst immer mein Ruhepol und hast mir eine wundervolle Familie geschenkt!

*Die Arbeit ist oft unbequem,
die Faulheit ist es nicht, trotzdem:
der kleinste Ehrgeiz, hat man ihn,
ist stets der Faulheit vorzuziehn!*

Heinz Erhardt

Für meine Frau Steffi und meine Kinder Evi, Jasmin und Theo.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Theoretischer Hintergrund	6
2.1	Entkeimung von Lebensmitteln und Pharmaka - Notwendigkeit und Verfahrenseinteilung	6
2.2	Grundlagen der thermischen Inaktivierung	7
2.2.1	Verfahrensübersicht	7
2.2.2	Thermoresistenz bakterieller Sporen	9
2.2.3	Reaktionskinetische Modelle	11
2.3	Grundlagen mechanischer Entkeimungsverfahren	16
2.3.1	Verfahrensübersicht	16
2.3.2	Haftmechanismen	17
2.3.3	Besonderheiten der mikrobiellen Adhäsion	22
2.3.4	Hydrodynamische Kräfte beim einphasigen Überströmen	23
2.3.5	Effekte bei der Flash-Verdampfung	26
3	Material und Methoden	29
3.1	Aufbau der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur	29
3.2	Materialien	30
3.2.1	Chemikalien	30
3.2.2	Mikroorganismen	30
3.2.3	Modellglaträger	31
3.3	Versuchsdurchführungen	31
3.3.1	Betrieb der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur	31
3.3.2	Kultivierung von <i>B. megaterium</i> - und <i>B. licheniformis</i> -Sporen auf Agarplatten	32
3.3.3	Kultivierung von <i>B. megaterium</i> - und <i>B. licheniformis</i> -Sporen in Schüttelkolben	33
3.3.4	Bereitstellung und Einteilung der Sporensuspensionen	33
3.3.5	Dichtegradientenzentrifugation	34
3.3.6	Kapillarversuche	34
3.4	Analytische Methoden	35
3.4.1	Sporenzahlbestimmung	35
3.4.2	Ermittlung der relativen Sporenoberflächenhydrophobizität	35
3.4.3	Ermittlung der Oberflächenbelegung mittels Bildanalyse	35
3.4.4	Rasterkraftmikroskopie	36

3.5	Programmierung in Visual Basic zur Modellierung der thermischen Inaktivierung	37
4	Ergebnisse und Diskussion	39
4.1	Oberflächenentkeimung nach dem mtVDV-Verfahren mit Sporen von <i>Bacillus sp.</i>	39
4.1.1	Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Satt-dampftemperatur	39
4.1.2	Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Sporen-kultivierung	42
4.1.3	Bildanalytischer Nachweis der mechanischen Entkeimungs-effekte	45
4.2	Ermittelte modellspezifische Haftkräfte	50
4.2.1	Haftkräfte von <i>Bacillus sp.</i> -Sporen	50
4.2.2	Versuch der Korrelation der ermittelten Haftkräfte mit der Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung	56
4.3	Modellierung der thermischen Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung bei nicht-isothermer Prozessführung	59
4.3.1	Ermittelte reaktionskinetische Parameter	59
4.3.2	Modellierung der thermischen Inaktivierung auf Basis der Modellträgeroberflächentemperatur	65
4.4	Bewusste Beeinflussung der Haftkräfte und der thermischen Inak-tivierung durch Ionen	75
4.5	Notwendige Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten als Auslegungs-kriterium für eine industrielle Umsetzung	83
4.5.1	Erzielte Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten	83
4.5.2	Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Druck-erniedrigungsgeschwindigkeit	84
4.5.3	Betrachtung der Flash-Verdampfung	87
5	Zusammenfassung	91
6	Verzeichnisse	93
7	Visual Basic Code	104
8	Publikationen & Lebenslauf	111

1 Einleitung und Problemstellung

Für die Oberflächenentkeimung in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie, insbesondere für pflanzliche Materialien wie Gewürze und Arzneidrogen, wurden und werden zahlreiche Verfahren entwickelt und optimiert. Eines dieser Verfahren ist das so genannte Vakuum-Dampf-Vakuum-Verfahren (VDV-Verfahren). Dabei kommen den einzelnen Verfahrensabschnitten unterschiedliche Aufgaben zu. In einem ersten Vakuumschritt werden die Luft und ein Teil der Feuchtigkeit aus dem Behandlungsraum entfernt. Im sich nun anschließenden Bedampfungsschritt werden die Mikroorganismen thermisch inaktiviert. Im dritten Schritt wird der Behandlungsraum erneut evakuiert, um das Kondensat durch Wiederverdampfung zu entfernen und gleichzeitig das Produkt zu kühlen. Grundlegende Arbeiten zu diesem Entkeimungsverfahren wurden u.a. von Morgan und Kozempel durchgeführt [42, 43, 61]. Dabei wurde jedoch stets eine thermische Inaktivierung ("Abtötung") als einziger Entkeimungseffekt betrachtet.

Seit 1994 wird die Möglichkeit einer mechano-thermischen VDV-Entkeimung (mtVDV) diskutiert. Die ersten Hinweise zeigten sich im Rahmen eines FAH-Projekts (Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller), durchgeführt am Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e.V. während der Entwicklung eines hydrothermischen Entkeimungsverfahrens für Arzneipflanzen [101]. Eine für das Projekt entwickelte VDV-Entkeimungsanlage wurde mit einem großen Vakuumpuffertank ausgestattet, um so das Evakuieren des Behandlungsraum nach der Dampfbehandlung zu unterstützen, schnell zu kühlen (Verdampfungskühlung) und so die thermische Belastung des Produktes zu reduzieren. Der Temperatur-Zeit-Verlauf kommt so einem "Kasten-Profil" sehr nahe. Dabei wurden sehr hohe Keimzahlreduktionen ermittelt, z.B. für Sambucus (Holunder) 3-4 Dekaden bei einer Bedampfungszeit von lediglich 10s, die durch thermische Entkeimungseffekte ("Abtötung") allein, angesichts der fast ausschließlich vorhandenen hitze-resistenten bakteriellen Sporen, nicht erreicht werden können und so auf einen zweiten Entkeimungsmechanismus hindeuteten.

Es wurde postuliert, dass bei der mtVDV-Entkeimung neben der klassisch thermischen Inaktivierung ein Abreißen der an der Produktoberfläche befindlichen Mikroorganismen aufgrund einer Flash-Verdampfung des während der Bedampfung gebildeten Kondensates erfolgt. Dies wird durch ein schlagartiges Evakuieren des Behandlungsraumes ermöglicht. Durch die Kombination beider Entkeimungseffekte ist die Entwicklung eines produktschonenden Entkeimungsprozesses mit kurzen Bedampfungszeiten und niedrigen Dampftemperaturen möglich.

Der Verdacht der Existenz solcher mechanischen Entkeimungseffekte wurde durch weitere Untersuchungen durch Müller und Wilhelm [59] verstärkt. So konnten auf einseitig beimpften pflanzlichen Modellträgern (dünne Holzträger) nach einer mtVDV-Entkeimung auf beiden Sei-

ten Mikroorganismen nachgewiesen werden, was auf einen Transport der Mikroorganismen vom Modellträger in die Dampfphase schließen lässt. Des Weiteren wurden die Aktivierungsenergien auf Basis der Restkeimzahl auf den Modellträgern errechnet. Die dabei ermittelten Aktivierungsenergien von unter 20 kJ mol^{-1} , gerade für den schnellen Entkeimungsvorgang in den ersten 10 s (dem eine Verlangsamung folgte), deuten nicht-thermische Vorgänge an. Die Aktivierungsenergie bei einer rein thermischen Inaktivierung liegt nach Kessler [37] im Bereich von $200\text{-}400 \text{ kJ mol}^{-1}$.

In weiteren Arbeiten [46] konnte bei einer mtVDV-Entkeimung von mit *Bacillus subtilis*-Sporen beimpften Modellglaträgern eine sogenannte "Entkeimungsstufe" wiederholt nachgewiesen werden (Abb. 1.1). Während eine rein thermische Inaktivierung einen exponentiellen Anstieg der thermischen Inaktivierung mit der Dampftemperatur aufweist, wurde bei der mtVDV-Entkeimung eine sprunghafte Zunahme der Keimzahlreduktion innerhalb eines engen Temperaturintervalls ($110\text{-}115^\circ\text{C}$) ermittelt, was auf ein Überwinden der Haftkräfte (F_{adh}) ab einer bestimmten Temperatur zurückgeführt wurde. Insofern lässt sich eine "Stufentemperatur" ϑ_{St} definieren, bei der die sprunghafte Zunahme der Keimzahlreduktion einsetzt, hier etwa 110°C .

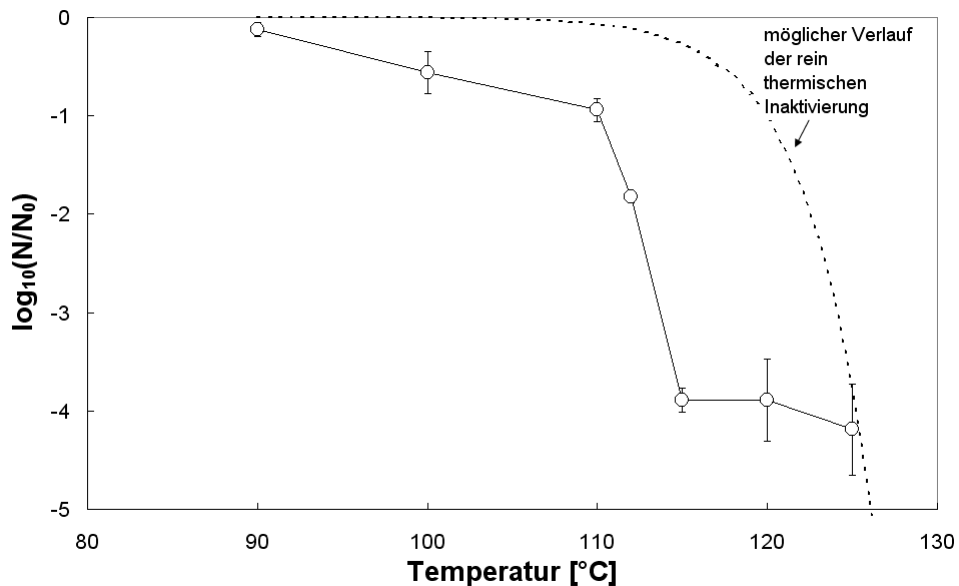


Abb. 1.1: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. subtilis*-Sporen belegten Modellglaträgern in Abhängigkeit von der Sattdampftemperatur, aus [46]. Ausgangs-keimzahl $N_0 \approx 10^9 \text{ cm}^{-2}$. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 120 \text{ s}$, 10 s , 80 s . Zusätzlich ist der mögliche Verlauf einer rein thermischen Inaktivierung dargestellt.

In Abb. 1.1 ist zudem eine mögliche Keimzahlreduktion für eine rein thermischen Inaktivierung eingezeichnet. Der Vergleich beider Kurven verdeutlicht, dass bei Stufenende (ca. 115°C) eine Keimzahlreduktion von etwa vier Dekaden bei einer Bedampfungszeit von 10 s unter Nut-

zung mechanischer Entkeimungseffekte erzielbar ist, wovon weniger als eine Dekade für einen möglichen thermische Effekt abzuziehen wäre. Letztlich sind die Anteile der mechanischen und thermischen Effekte an der Gesamtkeimzahlreduktion unbekannt.

Bei diesen Untersuchungen war neben den bakteriellen Sporen ein großer Anteil an Zelldebris (Fragmente der Sporenmutterzellen) auf den Modellglaträgern existent, so dass keine klar definierte Haftkraftsituation (Spore-Modellträgeroberfläche) vorlag, wie Abb. 1.2 zeigt. Die dort erkennbare Menge an Zelldebris entspricht nicht der Situation bei natürlich verkeimten Produkten/Pflanzen.

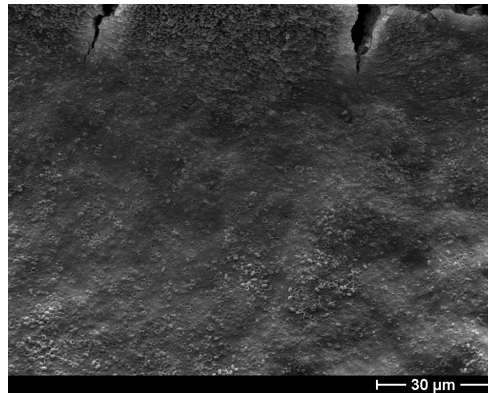


Abb. 1.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Sporen von *B. subtilis* beimpften Modellglaträgers. Erkennbar ist die Oberfläche einer Matrix aus Zelldebris mit eingeschlossenen Sporen, $N_0 \approx 10^9 \text{ cm}^{-2}$ [46].

Müller und Wilhelm [59] wiesen darauf hin, dass die bei der Flash-Verdampfung auftretenden ablösenden Kräfte (F_{det}) mit steigender Sattedampftemperatur und somit steigendem Druck im Behandlungsraum zunehmen müssten, weil die dann für die Druckerniedrigungsgeschwindigkeit verantwortliche Druckdifferenz ($\Delta p = p_D - p_{\text{Vakuum}}$) anwächst. Durch diese Abhängigkeit des Ausmaßes der mechanischen Entkeimungseffekte von der Sattedampftemperatur könnte sich ein systematischer Zusammenhang zwischen den zu überwindenden systemspezifischen Haftkräften und den während der Flash-Verdampfung auftretenden ablösenden Kräften ergeben. Die Abb. 1.3 zeigt diese mögliche Korrelation an drei Modellsystemen. Mit zunehmender Haftkraft steigt auch die benötigte Temperatur für das Einsetzen einer Keimzahlreduktion durch mechanische Effekte. Dabei wird von einer Haftkraftverteilung $q_0(F_{\text{adh}})$ ausgegangen. Die integrierten Kurven (Summenverteilung) dürften von daher qualitativ den Verläufen der Keimzahlreduktion über die (Sattedampf-)Temperatur entsprechen.

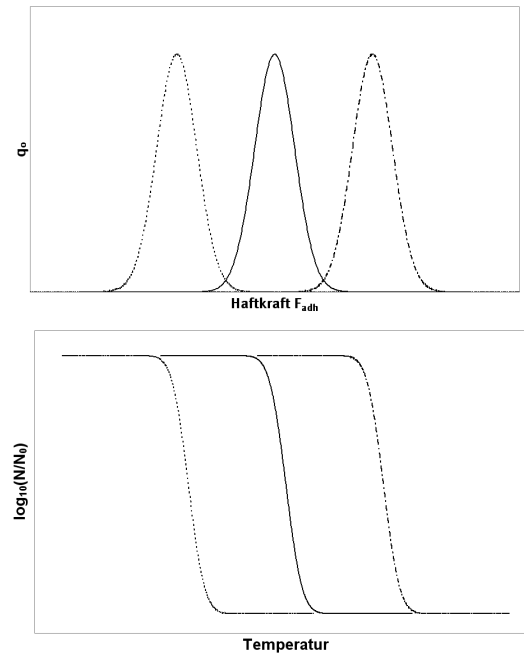


Abb. 1.3: Modellhafter Zusammenhang zwischen der Haftkraftverteilung $q_0(F_{adh})$ und der relativen Keimzahlreduktion N/N_0 bei einer rein mechanischen Entkeimung durch Flash-Verdampfung für drei Modellsysteme mit unterschiedlicher mittlerer Haftkraft.

Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wird durch Entkeimungsversuche mit Modellsystemen (Sporen von *Bacillus sp.* auf Modellglaträgern) die noch junge Methode der mtVDV-Entkeimung systematisch untersucht. Es sollen weitere Belege für die mechanischen Entkeimungseffekte nachgewiesen werden. In Verbindung mit mikrobiologischen Analysen wird mittels bildanalytischer Untersuchungen der Oberflächenbelegung beimpfter Modellsysteme vor und nach einer mtVDV-Entkeimung das Abtrennen der Sporen von der Modelträgeroberfläche durch die Flash-Verdampfung überprüft. Hierbei wird ein Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen der Sporen (auf festem/in flüssigem Nährmedium) auf die Keimzahlreduktion überprüft. Erstmals werden im Zusammenhang mit einer Oberflächenentkeimung Messungen mittels Rasterkraftmikroskopie (**A**tomic **F**orce **M**icroscopy) zur Haftkraftermittlung von *Bacillus*-Sporen durchgeführt. Dabei wird eine mögliche Korrelation zwischen der mittleren Haftkraft der verschiedenen Sporen und der Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung untersucht. Unterschiede im Ausmaß der Haftkraft in wässriger und gasförmiger Umgebung sollen ebenfalls durch die AFM-Messungen erkannt werden, da dies die unterschiedlichen Haftkraftsituationen vor und während der Bedampfungsphase widerspiegeln sollte. Ein Zusammenhang zwischen der Sporenoberflächenhydrophobizität und den festgestellten Haftkräften soll ebenfalls überprüft werden. Des Weiteren sollen die Haftkräfte durch die Zugabe von Salzen gezielt variiert werden.

Nachfolgend soll das Ausmaß der mechanischen Entkeimungseffekte im Verhältnis zu den thermischen Effekten ermittelt werden. Hierzu erfolgt eine Modellierung der rein thermischen Inaktivierung und ein Vergleich mit den Ergebnissen der experimentellen mtVDV-Entkeimung. Die für die Modellierung notwendigen reaktionskinetischen Daten werden durch Kapillarversuche ermittelt. Die thermische Belastung der Modellträgeroberfläche während einer mtVDV-Entkeimung wird durch direkte Messung der Oberflächentemperatur erfasst und in die Modellierung einbezogen. Die für bakterielle Sporen typische zeitliche Verzögerung der thermischen Inaktivierung wird für die Modellierung berücksichtigt.

Insgesamt soll die Arbeit auch dazu beitragen, weitere Auslegungshinweise hin zu einer industriellen Entkeimungsanlage nach dem mtVDV-Prinzip zu schaffen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Entkeimung von Lebensmitteln und Pharmaka - Notwendigkeit und Verfahrenseinteilung

In der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie sind Entkeimungsprozesse eine Notwendigkeit, um die Gesundheit des Endverbrauchers durch pathogene Mikroorganismen nicht zu gefährden. Dieser Umstand ist gesetzlich verankert. So findet sich im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) folgende Passage: “§5 Abs. 1: Es ist verboten, Lebensmittel für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass ihr Verzehr gesundheitsschädlich ... ist.” [2]. Im für die pharmazeutischen Industrie relevanten Arzneimittel-Gesetz (AMG) ist ein inhaltlich gleicher Passus vermerkt [1]: “§5 Abs. 1: Es ist verboten, bedenkliche Arzneimittel in Verkehr zu bringen.” Bei Zuwiderhandlung drohen Geldstrafen bis hin zu Freiheitsstrafen (AMG § 95 Abs.1).

Aber auch im Hinblick auf die Lagerstabilität ist eine Entkeimung oftmals unumgänglich, um einen mikrobiellen Verderb auszuschließen bzw. zu verzögern. Heute ist es Standard, dass Hersteller im Rahmen von Qualitätsmanagementsystemen (EN ISO 9001:2000, IFS, GMP-Richtlinien) die Entkeimungsprozesse validieren und so das Restrisiko einer (zu hohen) mikrobiellen Kontamination des Endproduktes nahezu ausschließen können.

Für die Auswahl des geeigneten Entkeimungsverfahrens bzw. der Prozessparameter ist es unabdingbar, den Keimstatus des zu entkeimenden Materials zu erheben, sei es nun pflanzlicher, tierischer oder nicht-organischer Natur (z.B. Operationsbesteck), da verschiedene Mikroorganismen unterschiedlich ausgeprägte Resistenzen aufweisen. So zeigen bakterielle Sporen, welche beispielsweise auf trockenen pflanzlichen Materialien wie Gewürzen und Arzneidroge den Großteil der Gesamtkeimzahl darstellen, eine deutlich größere Resistenz gegenüber Hitze als vegetative Zellen.

Grundsätzlich sollte unterschieden werden, ob die Mikroorganismen adhäsiv auf einem Feststoff gebunden (z.B. bei Gewürzen) oder in einer Flüssigkeit (z.B. Milch) submers vorliegen. Bestimmte Verfahren können nur für die Feststoff- oder Flüssigkeitsentkeimung Anwendung finden. Entkeimungsverfahren lassen sich nach Müller [58] aus verfahrenstechnischer Sicht aufgrund des Wirkprinzips in drei verschiedene Klassen unterteilen, wobei bei den physikalischen Verfahren eine weitere Abgrenzung möglich ist:

1. Chemische Entkeimungsverfahren
2. Physikalische Entkeimungsverfahren
 - (a) Thermische Verfahren
 - (b) Mechanische Verfahren
3. Kombinationsverfahren

Als chemische Entkeimungsverfahren (Zugabe von Agenzien) kommen vor allem Oxidierungsreaktionen durch Verwendung von Ozon oder Wasserstoffperoxid zum Einsatz, welche funktionelle Gruppen der Mikroorganismen zerstören oder inaktivieren [70]. Zu den thermischen Entkeimungsverfahren, welche auf molekularer Ebene wirken, zählen (Satt-)Dampfverfahren, Verfahren mit elektromagnetischen Strahlen, die dielektrische Erwärmung/Hochfrequenzerhitzung, sowie die konduktive und induktive Erhitzung, welche vorrangig zu einer Inaktivierung von Enzymen (Proteindenaturierung) führen [21, 58]. Mechanische Entkeimungsverfahren wiederum nutzen Kräfte und bewirken die Zerstörung der Mikroorganismenstruktur oder ein Abtrennen der Mikroorganismen von einer Oberfläche durch Druck- und/oder Scherkräfte. Zu nennen wären hier das Abspülen ("einphasiges Überströmen") [9] und das Zentrifugationsverfahren, wie in der Milchindustrie üblich ("Bactofuge", Abzentrifugieren einer Bakterienfraktion). Zu den noch relativ neuen Entkeimungsverfahren zählen die Behandlung mit hohen hydrostatischen Drücken (HHP, High Hydrostatic Pressure) sowie die Behandlung in einem gepulsten elektrischen Feld (PEF, Pulsed Electric Field) [50, 92]. Letztgenannte Verfahren schädigen Enzyme und die Zellmembran bzw. bewirken Strukturveränderungen [19] und stellen so Grenzfälle zwischen thermischen und mechanischen Verfahren dar. Ebenso das mtVDV-Verfahren aufgrund der möglichen Kombination aus thermischen (Inaktivierung) und mechanischen Entkeimungseffekten (Abtrennen von einer Oberfläche). Kombinationsverfahren ergeben sich aus der Verknüpfung bzw. Verschaltung mehrerer Verfahren. In der Literatur finden sich Verfahren wie die HHP-Behandlung mit vorgeschalteter CO₂ Zugabe, die PEF-Behandlung mit Einsatz von Ultraschall oder die Alkohol-Wasserdampfbehandlung [72, 75].

2.2 Grundlagen der thermischen Inaktivierung

2.2.1 Verfahrensübersicht

Während die UV-Bestrahlung vorrangig eine Schädigung der DNA zur Folge hat [6], bewirken thermische Verfahren im Allgemeinen eine irreversible Denaturierung von Enzymen und

Strukturproteinen, was zum Zelltot führt [90]. Dabei zeigen sich nach Fox und Eder [27] deutliche Unterschiede bei Anwendung von trockener und feuchter Hitze. Mikroorganismen zeigen i.d.R. eine höhere Resistenz gegenüber trockener Hitze, was zu längeren Prozesszeiten bzw. höheren Prozesstemperaturen im Vergleich zur Anwendung von feuchter Hitze führt. Über den a_w -Wert (frei verfügbares Wasser bzw. örtliche relative Feuchte) kann eine Aussage über die Feuchtebedingungen erfolgen. Fox und Eder ermittelten für Sporen von *B. subtilis* eine dezimale Reduktionszeit D von 0,5 min bei 121°C in feuchter Hitze (hoher a_w -Wert). Bei trockener Hitze (kleiner a_w -Wert) beträgt die dezimale Reduktionszeit selbst bei 152°C noch über 10min. Zur Definition der dezimalen Reduktionszeit s. Gl. 1, Kap. 2.2.3. Im Folgenden werden einige thermische Entkeimungsverfahren kurz beschrieben.

Bei **(Satt-)Dampfverfahren** wird das Produkt von außen erwärmt. Aufgrund des Temperaturunterschieds zwischen Produkt und Dampf kondensiert der Dampf auf der Produktoberfläche und kann so seine Verdampfungsenthalpie an das Produkt übertragen. Bei Sattdampfverfahren erfolgt zunächst ein Evakuieren des Behandlungsraumes, so dass dieser nach der Sattdampfbeaufschlagung vollständig mit Wasserdampf gesättigt ist, was den Wärmeübergang auf das Produkt verbessert. Über den Sattdampfdruck kann die Temperatur genau eingestellt werden. So ist es möglich, das Produkt unter subatmosphärischen Bedingungen (Sattdampfdruck kleiner 10^5 Pa) bei Temperaturen von unter 100°C zu behandeln. In der Industrie werden in der Regel Vakuum-Dampf-Vakuum-Verfahren (VDV-Verfahren) eingesetzt, bei welchen der Behandlungsraum zunächst evakuiert, dann mit Sattdampf beaufschlagt und anschließend erneut evakuiert wird. Der zweite Evakuierungsvorgang (Nachvakuum) dient hier zum schnellen Abkühlen und Trocknen des Produktes.

Im Gegensatz zu den (Satt-)Dampfverfahren wird bei den folgenden Verfahren das Produkt nicht von außen erwärmt, sondern die Wärme entsteht im Produkt selbst.

Bei **Mikrowellenverfahren** werden die Wassermoleküle, welche Dipole darstellen, durch Mikrowellen hoher Frequenz (900-2450 MHz) in Schwingung versetzt und erwärmen so das Produkt durch molekulare Reibung. Mikrowellen besitzen jedoch nur eine geringe Eindringtiefe, was zu einer ungleichmäßigen Wärmeverteilung im Produkt führen kann. Eine gleichmäßige Erwärmung lässt sich nur bei Produkten mit geringer Schichtdicke erreichen.

Bei der **Dielektrischen Erwärmung/Hochfrequenzerhitzung** wird das Produkt zwischen zwei Kondensatorplatten eingebracht, an welche eine Spannung angelegt wird. Nach Dehne et al. [21] liegen die Frequenzen zwischen 13,56-27,92 MHz und sind somit etwa um den Faktor 100 kleiner als bei den Mikrowellenverfahren. Aufgrund der größeren Wellenlänge ist auch die Erwärmung großvolumiger Produkte möglich.

Aufgrund der Bewegung von Ionenströmen durch Anlegen eines elektrischen Stroms am Produkt erfolgt eine **Ohm'sche/Konduktive Erhitzung**. Der Effekt des elektrischen Widerstands innerhalb eines leitenden Materials führt zu einer direkten Umwandlung von elektrischer Energie in Wärmeenergie und ermöglicht nach Dehne et al. [21] eine rasche und gleichmäßige Erwärmung des Produkts.

Für eine **Induktive Erhitzung** ist ein direkter Kontakt zwischen Produkt und Elektroden nicht nötig, da die elektrische Energie nach dem Prinzip eines Transformators magnetisch eingekoppelt wird. Dabei wird das zu behandelnde, elektrisch leitfähige Produkt in nichtleitenden Rohren in zwei Teilwicklungen (Sekundärwicklung) um einen magnetischen Eisenkern geführt. Durch die kupferne Primärwicklung wird in den Rohren eine Wechselspannung induziert. Da beide Teilwicklungen elektrisch in Reihe geschaltet sind, stellt sich ein geschlossener Stromkreis ein und führt so zu einer Erwärmung des Produkts.

Die noch relativ neuen Verfahren (emerging technologies) **High Hydrostatic Pressure (HHP) Verfahren** und **Pulsed Electric Field (PEF) Verfahren** werden in der Literatur auch als nicht-thermische Verfahren (non-thermal processing technologies) aufgeführt [29]. HHP-Verfahren sind Höchstdruckverfahren mit Drücken von bis über 1 GPa und finden beispielsweise in der Keimzahlreduktion von Fruchtsäften oder Fleischprodukten Anwendung [71]. Nach Knorr [39] können HHP-Verfahren nicht-kovalente Bindungen beeinflussen und führen so nach Datta und Deeth [19] zu einer Strukturveränderung von sekundär und tertiär gebundenen Molekülen, also Enzymen und Strukturproteinen. Mitunter zeigt sich bei vegetativen Zellen und insbesondere bei bakteriellen Sporen eine hohe Druckresistenz. Bakterielle Sporen weisen eine weitere Besonderheit auf. So können diese nach Shigeta et al. [83] durch die Druckbehandlung vom ruhenden in den aktivierten Zustand übergehen. Beim PEF-Verfahren, welches bisher noch keine kommerzielle Anwendung findet, wird das Produkt einem gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt, was vermutlich zu strukturellen Änderungen in der Zellmembran, der so genannten Elektroporation, führen kann. Ist diese irreversibel führt dies zum Zelltod. Eine eindeutige Zuordnung der HHP- und PEF-Verfahren zu den thermischen Entkeimungsverfahren ist nicht gegeben, da insbesondere beim HHP-Verfahren Kräfte wirken. Dennoch verursachen beide Vorgänge auf molekularer Ebene, was sie so, trotz der üblichen Bezeichnung als "non-thermal processing technologies", am ehesten zu den thermischen Entkeimungsverfahren zählen lässt.

2.2.2 Thermoresistenz bakterieller Sporen

Für einen Entkeimungsprozess stellen bakterielle Sporen, welche besonders auf trockenen pflanzlichen Materialien wie Gewürzen und Drogen vorherrschen, eine besondere Herausforderung dar.

Bakterielle Sporen entwickeln sich bei ungünstigen Umweltbedingungen in der vegetativen Mutterzelle und stellen eine Überdauerungsform dar. Das frühe Stadium der sich entwickelnden Spore wird als Vorspore bezeichnet. In Abb. 2.1 ist der vollständige Vorgang der Sporenbildung nach Müller und Weber [56] sowie der mehrschichtige Aufbau einer Spore schematisch dargestellt (Abb. 2.1e). *Bacillus cereus* und einige andere Spezies bilden zusätzlich noch eine weitere Sporenhülle, das so genannte Exosporium. Durch Lysis der Mutterzelle wird die Spore aus dieser entlassen. Die Fragmente der Mutterzelle werden als Zelldebris bezeichnet.

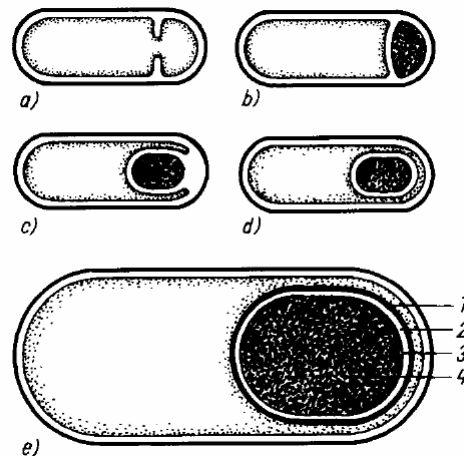


Abb. 2.1: Schema der Sporenbildung nach Müller und Weber [56]. a: Beginn der Protoplastteilung, b: Sporulationssepte geschlossen, c: Umhüllung des Sporenprotoplasten, d: Bildung der Sporenwand, des Cortex und der äußeren Sporenhülle, e: Sporangium (Mutterzelle) mit reifer Spore (1: äußere Sporenhülle, 2: Cortex, 3: Sporenzellwand, 4: Sporenprotoplast).

Während vegetative Zellen auch bei Temperaturen von weniger als 80°C bei kurzen Behandlungszeiten thermisch inaktiviert werden können, ist dies bei bakteriellen Sporen nicht der Fall. So wurde von Serp et al. [81] für bakteriellen Sporen von *Geobacillus stearothermophilus* eine dezimale Reduktionszeit bei 121,1°C in demineralisiertem Wasser von $D_{121,1C}=3,6$ min ermittelt.

Nach Popham et al. [70] zeigen bakterielle Sporen eine erhöhte Resistenz gegenüber:

- Hitze
- Chemikalien wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Ethylenoxid
- UV-Strahlung

Zum einen ist dies auf den mehrschichtigen Aufbau der Sporen zurückzuführen (Abb. 2.2), welcher nach Waites [95] die Diffusion von Chemikalien beeinflussen kann. Zum anderen auf den

geringen Wassergehalt und den hohen Gehalt an Dipicolinsäure. Mit Abnahme des Wassergehalts erhöht sich nach Sapru und Labuza [77] die thermische Resistenz der bakteriellen Sporen durch Erhöhung der Glasübergangstemperatur. Unterhalb der Glasübergangstemperatur ist der Sporenprotoplast in einem amorphen, glasartigen Zustand. Die hohe Viskosität geht mit einer Reduktion der Brown'schen Molekularbewegung und damit einer Reduktion der Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen einher. Dipicolinsäure kommt bei vegetativen Zellen nicht vor und ist ausschließlich im Sporenprotoplast enthalten. Etwa 5-15% des Trockenstoffs einer Spore stellt die Dipicolinsäure dar, welche als Calcium-Salz vorliegt (Ca-Dipicolinat). Nach Müller und Weber [57] wird angenommen, dass das Ca-Dipicolinat einen Calciumpuffer darstellt. Den Calciumionen kommen nach Müller und Weber eine größere Bedeutung für die Hitzeresistenz zu als der Dipicolinsäure.

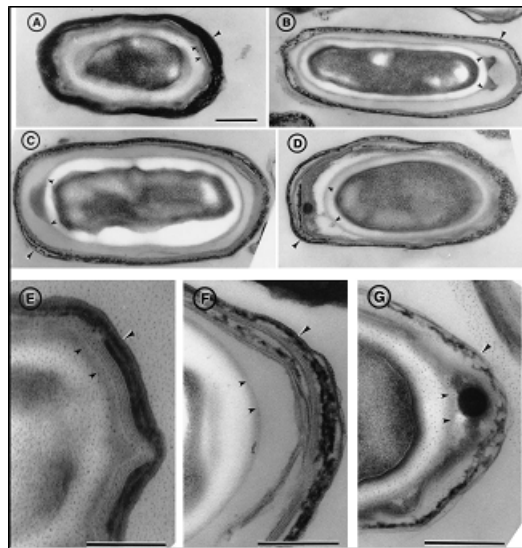


Abb. 2.2: Elektronenmikroskopie von Wildtyp (A,E) und *tasA* mutanten *B. subtilis*-Sporen (B-D,F,G). Die großen Pfeilspitzen zeigen die Struktur der äußeren Membran. Die kleineren Pfeilspitzen deuten die Grenze zwischen dem Cortex und der inneren Membran an, welche wahrscheinlich von der äußeren Membran der Vorspore herrührt. Randmaßstab: 0,2 μm [82].

2.2.3 Reaktionskinetische Modelle

Das in der Praxis weit verbreitete, aber nur sehr eingeschränkt gültige D- und z-Werte-Modell, wird immer häufiger durch systemspezifische Modellierungsansätze ersetzt, welche die thermische Inaktivierung äußerst genau beschreiben. Dabei werden die Ansätze aber oftmals recht komplex und müssen somit ihre Praxistauglichkeit erst noch beweisen. Als D-Wert (Dezimale Reduktionszeit) wird die Zeit bezeichnet, welche benötigt wird, um die vorhandene Keimzahl N bei konstanter Temperatur auf ein Zehntel zu reduzieren (Gl. 1) [84]. Der z-Wert gibt die

nötige Temperaturänderung wieder, um den D-Wert auf ein Zehntel zu reduzieren bzw. zu erhöhen (Gl. 2).

$$D = \frac{t_1 - t_2}{\log_{10} N_{t_2} - \log_{10} N_{t_1}} \quad (1)$$

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log_{10} D_{T_2} - \log_{10} D_{T_1}} \quad (2)$$

In Abb. 2.3 sind die am häufigsten angetroffenen Überlebenskurven von Mikroorganismen bei der thermischen Inaktivierung dargestellt. Das D- und z-Werte-Modell ist in der Lage, halb-logarithmische Überlebenskurven (2.3 Typ A) darzustellen und findet vor allem bei Reinkulturen von vegetativen Mikroorganismen Anwendung [69]. Im Allgemeinen weisen Überlebenskurven von bakteriellen Sporen aber eine zeitlich verzögerte Inaktivierung, eine so genannte Lag-Zeit, auf (Abb. 2.3 Typ B). Während dieser Lag-Zeit wird die Keimzahl nur unwesentlich reduziert (Schultercharakteristik). Dies liegt darin begründet, dass bakterielle Sporen vor der eigentlichen Inaktivierung von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand übergehen (Hitzeaktivierung). Die Steigung der Überlebenskurve stellt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k dar. Bei Populationen, welche sich aus verschiedenen Mikroorganismen mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zusammensetzen (verschiedene Stämme, Sporen und vegetative Zellen) sind Überlebenskurven mit Tailing (Abb. 2.3 Typ C,D) bzw. mit Schultercharakteristik und Tailing (Abb. 2.3 Typ E,F) anzutreffen.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die thermische Inaktivierung von einer Vielzahl an Parametern abhängt, welche bisher noch nicht in einem allgemein gültigen Modellierungsansatz zusammengefasst werden konnten. Dabei lassen sich nach Atrith und Foster [4], Beaman et al. [7, 8], Condon et al. [18], Fernandez et al. [26], Gonzalez et al. [28], Leguerinel und Mafart [44] und Mazas et al. [51] intrinsische und extrinsische Inaktivierungsparameter unterscheiden:

1. Intrinsische Parameter

- (a) Mikroorganismus
- (b) Zellstatus (vegetative Zelle, ruhende oder aktivierte Spore)
- (c) Wassergehalt
- (d) Vorgeschichte des Mikroorganismus (Kultivierungs-/Sporulationsbedingungen)

2. Extrinsische Parameter

- (a) pH-Wert
- (b) Temperatur
- (c) Ionenstärke

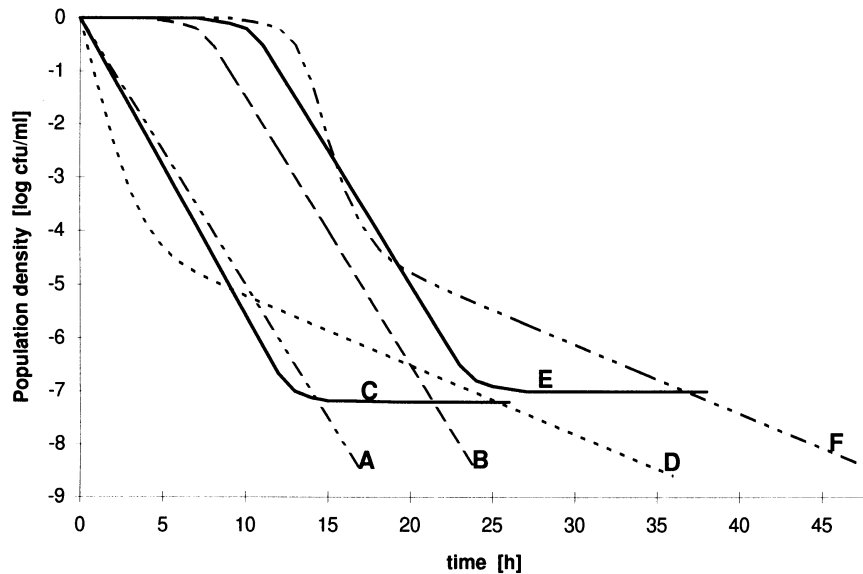


Abb. 2.3: Graphische Darstellung von sechs verschiedenen Überlebenskurven. A: Lineare Überlebenskurve, B: Überlebenskurve mit Schultercharakteristik, C,D: Überlebenskurven mit abnehmender Steigung (Tailing), E,F: Überlebenskurven mit Schultercharakteristik und Tailing [99].

Grundsätzlich lassen sich die Modelle für Überlebenskurven von Mikroorganismen in vitalistische und nicht-vitalistische Modelle unterscheiden. Modelle mit vitalistischem Ansatz gehen von einer Resistenzverteilung (z.B. durch eine Agglomeration von Mikroorganismen) innerhalb einer Population aus. Der vitalistische Gedanke führt zu empirischen Modellen mit probabilistischen/stochastischen Ansätzen ohne einen reaktionskinetischen Hintergrund. In nicht-vitalistischen Modellen hingegen weisen alle Mikroorganismen einer Population die gleiche Resistenz auf und lassen somit die Erstellung von mechanistischen/deterministischen Modellen mit reaktionskinetischem Hintergrund zu. Tab. 2.1 gibt einen Überblick über häufig verwendete Modelle für Überlebenskurven. Aufgrund der unterschiedlichen Nomenklatur in den Literaturstellen sind im Sinne der Übersichtlichkeit einzelne Modelle modifiziert dargestellt.

Die nicht-vitalistischen Modelle von Whiting & Buchanan und Baranyi & Roberts sind in der Lage, die für bakterielle Sporen typischen Überlebenskurven mit Lag-Zeit (t_{lag}) abzubilden. Bei anderen Modellen ist dies ebenfalls möglich, jedoch kann in den Modellen von Whiting &

Tab. 2.1: Modelle für Überlebenskurven nach Xiong et al. [98, 99]. A: Vitalistische Modelle, B: Nicht-Vitalistische Modelle. N_i =Keimzahl der Population i zur Zeit t ; N_0 =Ausgangskeimzahl; N_e =Endkeimzahl, k_i =Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Population i , f_i Anteil der Population i an der Gesamtkeimzahl; $t_{lag,i}$ =Lag-Zeit der Population i ; $t_{1/2}$ = t bei $N=\frac{1}{2}N_0$; $C=(\log N_0-\log N_e)$; D =Desinfektionsmittelkonzentration; b,n,m =temperaturabhängige Koeffizienten.

Ansatz	Modell	Mathematische Formel	Quelle
A	Weibull-Verteilung	$N = N_0 e^{-bt^n}$	[68, 69]
	Hom	$N = N_0 e^{-kD^n t^m}$	[31]
	Gompertz (modifiziert)	$\log N = \log N_0 - C e^{-k_{max}(t-t_{k_{max}})}$ $\log N = \log N_0 + \left(C e^{-e^{k_{max} t_{k_{max}}}} - C e^{-e^{-k_{max}(t-t_{k_{max}})}} \right)$	[48, 49]
	Cole (modifiziert)	$\log N = \log N_0 + \frac{\log N_e - \log N_0}{1 + e^{4k_{max}(t_{k_{max}} - \log t) / (\log N_e - \log N_0)}}$	[17]
B	Reaktion erster Ordnung	$N = N_0 e^{-kt}$	
	Cerf	$N = N_0 (f_1 e^{-k_1 t} + (1 - f_1) e^{-k_2 t})$	[14]
	Kamau	Für lineare Überlebenskurven: $N = N_0 \left(\frac{2}{1 + e^{kt}} \right)$ Für Überlebenskurven mit einer Lag-Phase:	[36]
	Membre	$\log N = \log N_0 + \log (1 + e^{-kt_{1/2}} - \log (1 + e^{-kt_{1/2}}))$ $\log N = (1 + \log N_0) - e^{kt}$	[52]
	Whiting & Buchanan	$\log N = \log N_0 + \log \left[\frac{f_1 (1 + e^{-k_1 t_{lag1}})}{1 + e^{k_1 (t - t_{lag1})}} + \frac{f_2 (1 + e^{-k_2 t_{lag2}})}{1 + e^{k_2 (t - t_{lag2})}} \right]$	[97]
	Baranyi & Roberts	$\ln N = \ln N_0 - kA(t)$ $A(t) = t + \frac{1}{k} \ln (e^{-kt} + e^{-kt_{lag}} - e^{-kt - kt_{lag}})$	[5]

Buchanan und Baranyi & Roberts die Lag-Zeit explizit bestimmt werden. Als genaue Lag-Zeit wird dabei die Zeit betrachtet, bei der die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k die Hälfte des Maximalwertes erreicht hat (Gl. 3).

$$t_{lag} = t_{(k=0,5k_{max})} \quad (3)$$

Unter Verwendung experimentell ermittelter Lag-Zeiten für Mikroorganismen in Lebensmitteln entwickelte Davey [20] ein Modell für die Vorhersage von Lag-Zeiten (Gl. 4), worin C_0 , C_1 und C_2 Konstanten und T die absolute Temperatur darstellen. Die so ermittelten Lag-Zeiten können dann für eine Modellierung der thermischen Inaktivierung herangezogen werden, wobei die Modellansätze aus Tab. 2.1 verwendet werden können.

$$\ln\left(\frac{1}{t_{lag}}\right) = C_0 + \left(\frac{C_1}{T}\right) + \left(\frac{C_2}{T^2}\right) \quad (4)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k ist temperaturabhängig und ergibt sich aus dem linearen Teil der Überlebenskurve (Abb. 2.3) nach einer Reaktion 1. Ordnung (Gln. 5 u. 6):

$$\frac{dN}{dt} = -k(T) N \quad (5)$$

$$\ln N = \ln N_0 - k(T) t \quad (6)$$

Mit Kenntnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Temperaturen können mit Hilfe des Arrhenius-Ansatzes die reaktionskinetischen Parameter Frequenzfaktor k_0 und Aktivierungsenergie E_A ermittelt werden. Diese ermöglichen eine Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur (Gl. 7):

$$k(T) = k_0 e^{\left(\frac{-E_A}{RT}\right)} \quad (7)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k und die Aktivierungsenergie E_A gehen auch aus dem o.g. D- und z-Wert Modell hervor (Gln. 8 u. 9):

$$k(T) = \frac{\ln 10}{D_T} \quad (8)$$

$$E_A = \frac{\ln 10 RT}{z} \quad (9)$$

Ein Vorteil des Modells von Baranyi & Roberts (Gl. 10) ist, dass auch eine Reaktion erster Ordnung ohne Lag-Zeit abgebildet werden kann, was bei dem Modell von Whiting & Buchanan nur näherungsweise möglich ist. Setzt man in Gl. 11 $t_{lag} = 0$ ergibt sich mit Gl. 10 die Gleichung für eine Reaktion erster Ordnung (Gl. 6).

$$\ln N = \ln N_0 - kA(t) \quad (10)$$

mit:

$$A(t) = t + \frac{1}{k} \ln(e^{-kt} + e^{-kt_{lag}} - e^{-kt-kt_{lag}}) \longrightarrow A(t)_{t_{lag}=0} = t \quad (11)$$

2.3 Grundlagen mechanischer Entkeimungsverfahren

2.3.1 Verfahrensübersicht

Bei den mechanischen Entkeimungsverfahren ist zu unterscheiden, ob die Mikroorganismen mechanisch zerstört oder von der Produktoberfläche mechanisch abgetrennt werden. Die mechanische Festigkeit von Mikroorganismen kann mitunter sehr groß sein, was ein mechanisches Zerstören der Mikroorganismen erschwert. So ermittelten Algie und Lindsay [3] für das Hüllmaterial von *G. stearothermophilus*-Sporen eine Bruchkraft von etwa 10^9 N m^{-2} . Für das mechanische Abtrennen der Mikroorganismen von der Produktoberfläche müssen wiederum die Haftkräfte überwunden werden.

Das Abtrennen von Partikeln, also auch von Mikroorganismen, von einer Oberfläche durch **einphasiges Überströmen** ist nach Cleaver und Yates [16] stark abhängig von der Partikelgröße, da mit abnehmender Partikelgröße auch die vom Fluidstrom angeströmte Fläche abnimmt. Des Weiteren führt die Wandreibung zwischen dem überströmenden Fluid und der Produktoberfläche zu geringen Scherkräften in Wandnähe (Kap. 2.3.4). Die Scherkräfte wirken vornehmlich tangential zur Produktoberfläche. Anwendung findet das einphasige Überströmen in der CIP-Technologie (Cleaning In Place). Blel et al. [9] konnten in experimentellen Untersuchungen am Beispiel von *Bacillus*-Sporen zeigen, dass insbesondere die Geometrie einer CIP-Anlage Einfluss auf die hydrodynamischen Kräfte und somit auf das mechanische Abtrennen von Partikeln nimmt.

Nach Scherba et al. [79] wird bei **Ultraschallverfahren** (Schallfrequenz $20\text{-}10^7 \text{ kHz}$), welche z.B. für die Reinigung von Operationsbesteck zum Einsatz kommen, die Kavitation als Hauptmechanismus für die Entkeimung angesehen. In einem flüssigen Medium verursacht Ultraschall Kavitationsblasen, welche beim Kollabieren hydrodynamische Schockwellen und somit intensive Druckschläge zur Folge haben. Diese Druckschläge werden für die mechanische Zellschädigung verantwortlich gemacht. Nach Mermillod-Blondin et al. [53] kann Ultraschall auch ein Ablösen von Mikroorganismen insbesondere von Biofilmen von einer Oberfläche bewirken. Eine Effizienzsteigerung von Ultraschallverfahren (Sonication) ist nach Pagán et al. [67] bei hoher Temperatur (Thermosonication), unter erhöhtem Druck (Manosonication) bzw. bei hoher Temperatur und erhöhtem Druck (Manothermosonication) möglich. Bakterielle Sporen weisen eine hohe Resistenz gegenüber Ultraschallverfahren auf (geringe Zellschädigung). Raso et al. [73] ermittelten für Sporen von *B. subtilis* bei einer Ultraschallbehandlung für 12 min (Schallfrequenz=20 kHz, Amplitude=117 μm) bei 70°C unter Umgebungsdruck eine Keimzahlreduktion von weniger als einer Dekade.

Zentrifugationsverfahren werden seit Jahrzehnten zur Keimreduktion von flüssigen Medien, insbesondere zum Entfernen von Sporen aus Milch, eingesetzt [85]. Aufgrund der höheren Dichte der Mikroorganismen gegenüber der Flüssigkeit können diese im Zentrifugalfeld abgetrennt werden. Die thermische Belastung bei der so genannten "Bactofugation" ist nach Kosikowski und Fox [41] niedriger als bei der Pasteurisation, was hitzeinduzierte Aromaveränderungen reduziert. Nach Stack und Sillen [88] beträgt die Gesamtkeimzahlreduktion bei der Bactofugation von Milch i.d.R. etwa 1 Dekade. Zentrifugationsverfahren können im wissenschaftlichen Bereich auch zur Ermittlung der Trennkräfte von auf einer Oberfläche adhären Mikroorganismen herangezogen werden. Durch Variation der Versuchsanordnung können die Zentrifugalkräfte dabei normal oder tangential zur Oberfläche wirken. So untersuchte Weigl mit einer Ultrazentrifuge die Trennkräfte zwischen Hefen und Edelstahl in wässriger Umgebung [96].

Ein interessantes Verfahren ist die **Heißluftbehandlung** nach Bültermann [10]. Hier wird das zu behandelnde Produkt für wenige Sekunden einem Heißluftstrom von bis zu 560°C ausgesetzt und anschließend extrem schnell in Flüssigstickstoff abgekühlt. Auf Basis der veröffentlichten Entkeimungsergebnisse ist eine Auswertung hinsichtlich der Aktivierungsenergien möglich. Die ermittelten Aktivierungsenergien liegen bei etwa 10 kJ mol⁻¹ und lassen so, trotz der sehr hohen Temperaturen, mechanische Effekte, wie etwa Trocknungsrisse in der Zellmembran oder im ganzen Sporenkörper, vermuten. Wie in Kap. 1 erwähnt, weisen thermische Inaktivierungsvorgänge Aktivierungsenergien im Bereich von 200-400 kJ mol⁻¹ auf. Also kann man dieses Hochtemperaturverfahren interessanterweise als mechanisches Verfahren bezeichnen.

2.3.2 Haftmechanismen

Generell lässt sich nach Rumpf [76] und Schubert [80] die Anhaftung zwischen Feststoffen in zwei Klassen unterteilen, welchen dann einzelne Haftkraftmechanismen zugeordnet werden:

1. Anhaftung mit stofflicher Verbindung
 - (a) Sinter-/Schmelzbrücken
 - (b) Auskristallisierte Feststoffe, Ausgehärtete Bindemittel
 - (c) Adsorptionsschichten
 - (d) Bewegliche Flüssigkeitsbrücken/Kapillarkräfte

2. Anhaftung ohne stoffliche Verbindung

- (a) Van-der-Waals-Kräfte
- (b) Elektrostatische Wechselwirkungen
- (c) Hydrophobe Wechselwirkungen/Säure-Base-Wechselwirkungen
- (d) Formschlüssige Verbindungen

Nach Oliveira [63] und Visser [94] sind bei der Adhäsion von Mikroorganismen Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Kapillarkräfte von Bedeutung. Die einzelnen Wechselwirkungsmechanismen werden im Folgenden kurz beschrieben.

Van-der-Waals-Kräfte

Die Van-der-Waals-Kräfte entstehen durch kurzlebige Dipole von Atomen. Dabei weist eine Seite des Atoms eine etwas stärkere negative Ladung auf als die andere (asymmetrische Ladungsverteilung). Nähern sich Atome an und erfolgt in beiden Atomen die Ladungsverschiebung synchron, dann wirken ab einem bestimmten Abstand Anziehungskräfte. Besitzt zur Zeit der Annäherung nur ein Atom eine Ladungsverschiebung (Dipol), so kann es bei einem anderen Atom eine Ladungsverschiebung induzieren, so dass wiederum der positiv polarisierte Teil des einen Atoms den negativen Teil des anderen Atoms anzieht (Abb. 2.4).

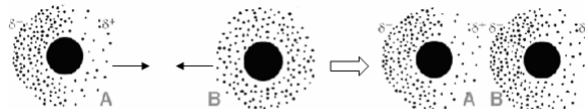


Abb. 2.4: Induktion eines Dipols und Wirkung der Van-der-Waals-Kräfte. Links: Annäherung eines Atoms mit asymmetrischer Ladungsverteilung (A) an ein Atom mit symmetrischer Ladungsverteilung (B). Rechts: Dipolinduktion [87].

Nach Oliveira [63] ist die Ausprägung der Van-der-Waals-Kräfte stark abhängig von der Geometrie und den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Wechselwirkungspartner. Zwischen einem sphärischen Partikel (1), stellvertretend für eine bakterielle Spore, und einer Platte (2) in einem Medium (3) ergibt sich eine van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie V_{vdw} nach Gl. 12. Darin sind A_{132} die Hamakerkonstante, r der Partikelradius und H der kleinste Abstand.

$$V_{vdw} = -\frac{A_{132}r}{6H} \quad (12)$$

Die Hamakerkonstante A_{132} berechnet sich nach Gl. 13, wobei A_{11} die Hamakerkonstante des Stoffes 1, A_{22} die Hamakerkonstante des Stoffes 2 und A_{33} die Hamakerkonstante des umgebenden Mediums darstellen.

$$A_{132} = \left(\sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{33}} \right) \left(\sqrt{A_{22}} - \sqrt{A_{33}} \right) \quad (13)$$

Gegenüber Luft nimmt die Hamakerkonstante nach Visser [94] in wässriger Umgebung wesentlich kleinere Werte an, was zu einer geringeren Wechselwirkungsenergie und somit auch zu geringeren Haftkräften führt. In der Literatur [11] wird eine Reduktion der Van-der-Waals-Kraft in wässriger Umgebung auf etwa ein Zehntel gegenüber der Haftkraft an Luft angegeben. Die Kondensatfilmbildung während der Dampfphase der mtVDV-Behandlung führt somit zu einer niedrigeren Gesamthaftkraft durch Reduktion der Van-der-Waals-Kräfte.

Hydrophobe Wechselwirkungen

Eine große Bedeutung bei der mikrobiellen Adhäsion wird von Husmark [33] und Rönner [74] den hydrophoben Wechselwirkungen zugeschrieben. Der hydrophobe Effekt wird als eine durch die Entropie geregelte anziehende Wechselwirkung zwischen zwei unpolaren, hydrophoben, von Wasser oder wässrigen Lösungen umgebenen Oberflächen, beschrieben. Die umgebenden Wassermoleküle können keine Wasserstoffbrückenbindungen mit den unpolaren, hydrophoben Oberflächen ausbilden. Die unpolaren Wechselwirkungspartner verursachen eine Umlagerung der Wassermoleküle, um die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zu maximieren. Die Abb. 2.5 zeigt das Modell des hydrophoben Effekts am Beispiel einer Spore auf einer hydrophoben Oberfläche in wässriger Umgebung. Haftet die hydrophobe Spore auf der hydrophoben Oberfläche, werden einige der strukturiert vorliegenden Wassermoleküle ausgegrenzt, was die Entropie des Systems erhöht.

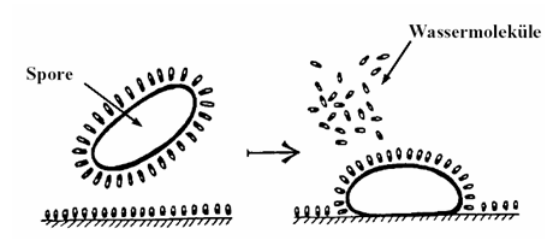


Abb. 2.5: Modell des hydrophoben Effekts am Beispiel einer Spore auf einer hydrophoben Oberfläche in wässriger Umgebung [33].

Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen mikrobiellen Sporen und festen Oberflächen sind nach Husmark [33] abhängig von den hydrophoben Eigenschaften der Wechselwirkungspartner

und von verschiedenen Bedingungen der umgebenden Phase wie Polarität und Temperatur. Nimmt beispielsweise die Polarität der umgebenden Phase ab, werden die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen gestört und dadurch die hydrophoben Wechselwirkungen limitiert [34]. Da sich bei Abwesenheit von Wasser offenbar keine hydrophoben Wechselwirkungen ausbilden können, sollte das bei der Bedampfungsphase der mtVDV-Entkeimung gebildete Kondensat zu einer Haftkrafteerhöhung führen.

Elektrostatische Wechselwirkungen

Die elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen nach Oliveira [63] im Wesentlichen auf der Ausbildung der elektrischen Doppelschicht und werden deshalb auch als "elektrische Doppelschicht Wechselwirkung" bezeichnet [30]. Die elektrische Doppelschicht bildet sich, da suspendierte Partikel generell die Neigung besitzen, durch Adsorption von Ionen aus der Umgebung eine elektrische Oberflächenladung auszubilden. In der elektrischen Doppelschicht wird die Oberflächenladung durch eine entsprechende, aber entgegengesetzt geladene Anzahl an Ladungsträgern, die sich in der Umgebung der Oberflächenladung anreichern, kompensiert. Der Aufbau der Doppelschicht kann wie folgt beschrieben werden: Ein Teil der Gegenionen ist mehr oder weniger fest an der Partikeloberfläche angeordnet und bildet mit den zwischen den Ionen befindlichen Wassermolekülen die sogenannte Stern-Schicht aus. Die restlichen Gegenionen sind nicht fest mit der Oberfläche verbunden, sondern in Folge der temperaturabhängigen Molekularbewegung in einer diffusen Schicht verteilt (Abb. 2.6).

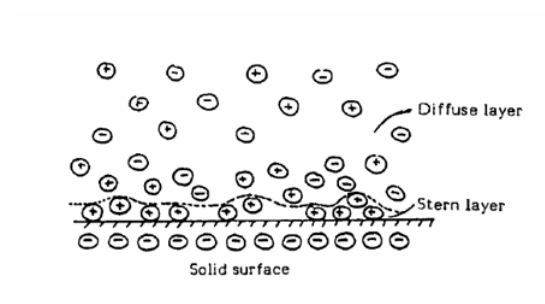


Abb. 2.6: Ionenverteilung nahe einer elektrisch geladenen Oberfläche [33].

Die meisten Mikroorganismen und festen Oberflächen sind in wässriger Umgebung negativ geladen, was, aufgrund der Wechselwirkung zwischen den überlappenden elektrischen Doppelschichten, i.d.R. zu Abstoßungskräften zwischen den Wechselwirkungspartnern führt. Das Ausmaß der ausgebildeten elektrischen Doppelschicht wird nach Hermansson [30] und Oliveira [63] u.a. durch die Ionenstärke des umgebenden Mediums beeinflusst. Mit steigender Ionenkonzentration nimmt die Dicke der elektrischen Doppelschicht ab.

Nach Visser [94] werden die an Luft schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen durch Feuchtigkeit weiter reduziert. Somit sollte die Kondensatfilmbildung während der Bedamp-

fungsphase der mtVDV-Entkeimung durch Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkungen zu einer Reduktion der Gesamthafkraft führen.

Flüssigkeitsbrücken

Vor der mtVDV-Entkeimung liegen die Mikroorganismen auf der zu entkeimenden Oberfläche in gasförmiger Umgebung vor. Der Einfluss der Flüssigkeitsbrücken am Ausmaß der Gesamthafkraft zwischen Wechselwirkungspartnern in gasförmiger Umgebung bedarf nach Visser [94] besonderer Berücksichtigung. Die Haftkräfte beruhen zum einen auf der Randkraft, die wegen der Oberflächenspannung an der Berührungslinie der Flüssigkeitsbrücke wirkt, und zum anderen auf dem Kapillardruck im Inneren der Flüssigkeitsbrücke. Ist die Oberfläche der Flüssigkeitsbrücke stark gekrümmt (Abb. 2.7), herrscht im Inneren ein kapillarer Unterdruck und die Partikel werden zueinander hingezogen.

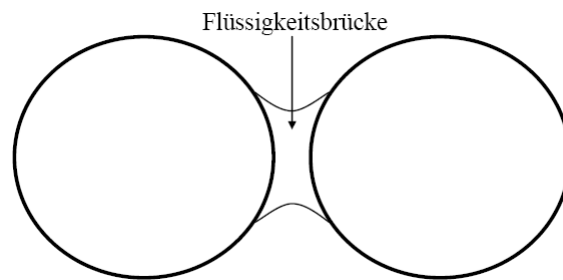


Abb. 2.7: Flüssigkeitsbrücke zwischen zwei sphärischen Partikeln [89].

Der dabei entstehende kapillare Unterdruck p_{Kap} kann mit Kenntnis der Oberflächenspannung γ und des Randwinkels σ näherungsweise nach Gl. 14 ermittelt werden:

$$p_{Kap} = \frac{4\gamma \cos \sigma}{d_{Kap}} \quad (14)$$

Die Kondensatfilmbildung während der Druckphase der mtVDV-Entkeimung (Kap. 2.3.5) dürfte somit durch Eliminierung der Kapillarkräfte zu einer deutlichen Reduktion der Gesamthafkraft führen (Abb. 2.8).

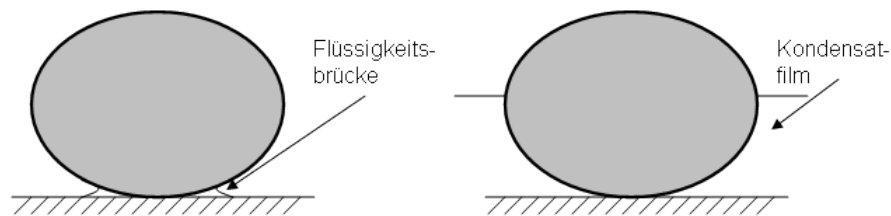


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Reduktion der Kapillarkräfte während der Druckphase der mtVDV-Entkeimung. Links: Spore auf fester Oberfläche mit stark gekrümmter Flüssigkeitsbrücke. Rechts: In Kondensatfilm eingebettete Spore.

2.3.3 Besonderheiten der mikrobiellen Adhäsion

Die mikrobielle Adhäsion zeigt einige Besonderheiten. So stellten Rönner et al. [74] Unterschiede bei der Adhäsion von vegetativen Zellen und Sporen fest. Dabei zeigten Sporen stets eine größere Adhäsion, sowohl an hydrophobem als auch an hydrophilem Glas. Die komplexe und mitunter sehr heterogene Oberflächenchemie/-morphologie der Mikroorganismen, gezeigt in Abb. 2.9, kann auch innerhalb einer Mikroorganismenpopulation zu einer Variation der Haftkraft führen. Während des Auskeimens von ruhenden Sporen kommt es zur Veränderung der Oberflächenchemie/-morphologie, wie Abb. 2.9 zeigt. Nach Dufrêne et al. [24] weisen auskeimende Sporen von *Phanerochaete chrysosporium* eine größere Haftkraft auf als ruhende Sporen (Tab. 2.2).

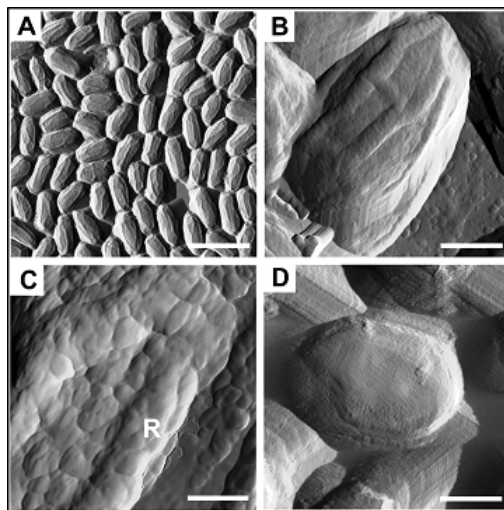


Abb. 2.9: AFM-Analyse von *B. subtilis*-Sporen. Im Abbildungsteil D wurde die Spore zum Auskeimen gebracht. Randmaßstab: 2.25µm (A), 375nm (B), 125nm (C), 583nm (D). Das "R" in Abbildungsteil C kennzeichnet eine Erhöhung [15].

Einige Sporen besitzen ein Exosporium, bestehend aus Glycoproteinen, welches nach Chada et al. [15] zu deutlich größeren Haftkräften führen kann. Es wird angenommen, dass das Exosporium bakterieller Sporen die Besiedlung freier Oberflächen für eine folgende Biofilmbildung begünstigt. Die Elastizitätsunterschiede von verschiedenen Mikroorganismen nach Velegol und Logan [93] können ebenfalls zu verschiedenen Haftkräften und auch zu einem unterschiedlichen Verhalten von adsorbierten Mikroorganismen in einer Scherströmung (Ausrichtung in der Scherströmung) führen. Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist, dass die Adhäsion von Mikroorganismen deren thermische Resistenz erhöhen kann. So wurde von Simmonds et al. [86] eine Erhöhung der dezimalen Reduktionszeit von an Edelstahl adsorbierten *G. stearothermophilus*-Sporen gegenüber frei suspendierten Sporen von 1,95 min auf 5,12 min bei 110°C ermittelt.

Mittels Rasterkraftmikroskopie (**A**tomic **F**orce **M**icroscopy) wurden bereits Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Haftkräfte auf verschiedenen Oberflächen untersucht. Bisher beschränkten sich die AFM-Haftkraftmessungen jedoch vornehmlich auf vegetative Zellen, so dass nur wenige Daten für bakteriellen Sporen zur Verfügung stehen. In Tab. 2.2 sind einige Literaturbeispiele aufgeführt. Das Prinzip von AFM-Haftkraftmessungen ist in Kap. 3.4.4 näher beschrieben.

Tab. 2.2: Mittlere Haftkräfte verschiedener Mikroorganismen in wässriger Umgebung.

Organismus	Oberfläche	Mittlere Haftkraft [nN]	Quelle
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cantilever		[24]
	ruhende Sporen	≈0	
	keimende Sporen	9±2	
<i>Bacillus mycoides</i> Sporen	Glas (hydrophil)	7,4±3,7	[12]
	Glas (hydrophob)	49,5±14,4	
<i>Bacillus coagulans</i> E38-66	Cantilever	≈0	[25]
<i>Escherichia coli</i> D21f2	Glas (hydrophil)	≈0	[65]
	Glas (hydrophob)	26	
<i>Escherichia coli</i> D21	Glas (hydrophil)	≈0	
	Glas (hydrophob)	10	

2.3.4 Hydrodynamische Kräfte beim einphasigen Überströmen

Grobe Verunreinigungen auf Oberflächen lassen sich oftmals durch einphasiges Überströmen entfernen. Dabei müssen die Haftkräfte zwischen den Verunreinigungen und der zu reinigenden Oberfläche überwunden werden. Der Einfluss der Oberflächenstruktur auf die Haftkräfte bzw. auf die Reinigbarkeit technischer Oberflächen durch einphasiges Überströmen wurde jüngst

durch Bobe [11] systematisch untersucht. Ein Einfluss der Oberflächenrauheit auf die Einzelpartikelablösung wurde von Bobe nicht festgestellt.

Die auf ein Partikel wirkenden Scherkräfte nehmen mit der Partikelgröße und der damit verbundenen kleineren Angriffsfläche ab. Aufgrund des kleinen Geschwindigkeitsgradienten wirken im wandnahen Bereich einer Rohrströmung nur geringe Schubspannungen auf ein an die Rohrwandung adsorbiertes Partikel. Der Geschwindigkeitsgradient im wandnahen Bereich der viskosen Unterschicht verläuft linear (Abb. 2.10), da nur die Viskositätskräfte wirken [16, 32, 94]. Es handelt sich um eine laminare Strömung ("laminare Unterschicht", Prandtlsche Grenzschicht). Auf ein adhäriertes Partikel wirken im Strömungsfeld neben der Haftkraft F_H/F_{adh} die Auftriebs- ($F_{Auftrieb}$), die Gewichtskraft (F_G) und die hydrodynamische Kraft (F_{Kanal}), was in Abb. 2.10 dargestellt ist. $F_{Gleichgewicht}$ stellt die Gleichgewichtskraft dar.

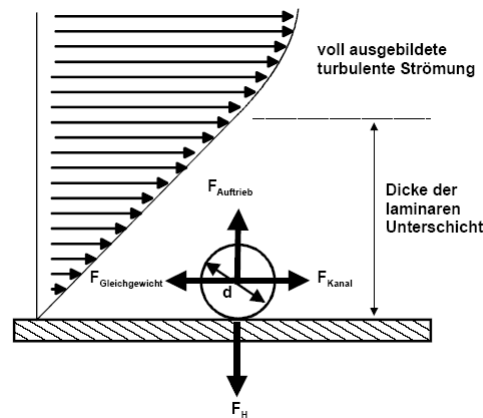


Abb. 2.10: Kräfte auf ein Partikel im Strömungsfeld [96].

Auf ein Partikel des Durchmessers d_p wirkt in der laminaren Unterschicht die hydrodynamische Kraft F_{Kanal} durch Wandschubspannung τ_w nach Gl. 15 [38, 64, 100]:

$$F_{Kanal} = 8d_p^2\tau_w \quad (15)$$

Die dabei wirkende Schubspannung ergibt sich aus der Wandschubgeschwindigkeit v_τ und der Dichte des strömenden Fluides ρ_{Fluid} nach Gl. 16:

$$\tau_w = v_\tau^2\rho_{Fluid} \quad (16)$$

Die Wandschubgeschwindigkeit (Gl. 17) lässt sich mit Kenntnis der Rohrreibungszahl λ_R nach dem Gesetz von Blasius (Gl. 18) sowie der mittleren Strömungsgeschwindigkeit v_m ermitteln.

Das Gesetz von Blasius gilt für den idealen Fall einer hydraulisch glatten Rohrwand und turbulenter Strömung.

$$v_\tau = \sqrt{\frac{\lambda_R}{8}} v_m \quad (17)$$

$$\lambda_R = 0.3164 Re^{-0,25} \quad (18)$$

Unter Verwendung der Gln. 15-18 ergibt sich die hydrodynamische Kraft auf ein Partikel des Durchmessers d_p nach Gl. 19:

$$F_{Kanal} = d_p^2 \lambda_R v_m^2 \rho_{Fluid} \quad (19)$$

Die so ermittelte hydrodynamische Kraft wirkt auf ein Partikel in der laminaren Unterschicht (Abb. 2.10). Die Dicke der laminaren Unterschicht δ_s bestimmt sich nach Gl. 20:

$$\delta_s = \nu \sqrt{\frac{\rho_{Fluid}}{\tau_w}} \quad (20)$$

Die für eine Rohrströmung charakteristische dimensionslose Kennzahl ist die Reynolds-Zahl (Re) nach Gl. 21. Laminare Strömungen weisen eine Re-Zahl von <2320 auf. Bei Re-Zahlen >2320 ist die Strömung turbulent.

$$Re = \frac{v_m d_R}{\nu} \quad (21)$$

Die auf an der Wandung eines Rohres ($d_R=0,1$ m) adhären Partikel wirkenden hydrodynamischen Kräfte durch strömendes Wasser bei 20°C , sowie die Dicke der laminaren Unterschicht in Abhängigkeit von der Re-Zahl, sind in Abb. 2.11 dargestellt. Es zeigt sich, dass auf ein kugelförmiges Partikel mit einem Durchmesser von $d_p=1 \mu\text{m}$, was etwa der Größe einer bakteriellen Spore entspricht, bei einer Re-Zahl von ca. 10^5 ($v_m=1 \text{ m s}^{-1}$) eine hydrodynamische Kraft von weniger als 20 pN wirkt. Diese sehr kleine hydrodynamischen Kraft kann bei Vorliegen einer entsprechenden Haftkraft, die im ein- oder zweistelligen nN-Bereich liegen kann (vgl. Tab. 2.2), keine Ablösung begründen.

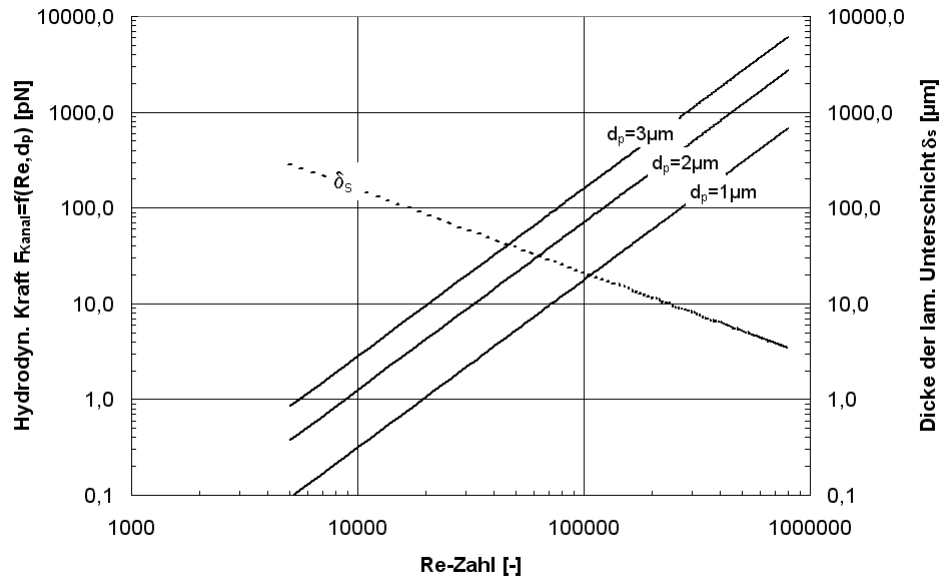


Abb. 2.11: Berechnete hydrodynamische Kräfte beim einphasigen Überströmen (Wasser, 20°C) eines an einer Rohrwandung ($d_R=0,1$ m) adhärenen Partikels.

2.3.5 Effekte bei der Flash-Verdampfung

Grundlegende Studien zur Entkeimung durch eine VDV-Behandlung wurden u.a. durch Kozempel und Morgan durchgeführt [42, 43, 60, 61]. Dabei wurde jedoch ausschließlich eine Keimzahlreduktion aufgrund thermischer Inaktivierung während der Dampfbehandlung betrachtet. Das Vorvakuum dient dazu, die Luft und auch einen Teil der Feuchtigkeit aus dem Prozessraum und aus dem Produkt zu entfernen, um den Dampfeintritt in poröse Strukturen des Produktes zu verbessern. Dies führt zu einer höheren Wärmeübertragung während der Dampfbehandlung und somit zu einer höheren Keimzahlreduktion aufgrund thermischer Inaktivierung. Das sich an die Dampfbehandlung anschließende Nachvakuum soll die Wiederverdampfung des während der Dampfbehandlung gebildeten Kondensates erhöhen und eine schnellere Produktkühlung bewirken. Die Möglichkeit des Abreißen der oberflächlich vorliegenden Mikroorganismen während der Wiederverdampfung des Kondensates wurde nicht betrachtet.

Der Dampf kondensiert aufgrund der Temperaturdifferenz ΔT zwischen Dampf und Produkt und bildet so einen mehr oder weniger gleichmäßig verteilten Kondensatfilm auf der zu entkeimenden Produktoberfläche aus, was vermutlich eine Mindestbedampfungszeit erfordert. Wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, werden durch den Kondensatfilm die Kapillar- und van-der-Waals-Kräfte und folglich die Gesamthaftkraft zwischen den Mikroorganismen und der Produktoberfläche reduziert.

Der entscheidende Prozessschritt der mtVDV-Entkeimung ist eine Flash-Verdampfung (intensive Wiederverdampfung des Kondensatfilms) durch schlagartiges Anlegen eines Vakuums, was ein Abreißen der Mikroorganismen bewirken kann. Im Gegensatz zum einphasigen Überströmen wirken die ablösenden Kräfte nicht tangential, sondern normal zur Oberfläche. Auch sind durch den Phasenwechsel deutlich größere ablösende Kräfte als beim einphasigen Überströmen zu erwarten. Das Prinzip der mtVDV-Entkeimung durch Flash-Verdampfung ist in Abb. 2.12 wiedergegeben. Leider ist es nicht möglich, eine "Abreißkraft" für diesen Vorgang zu bestimmen, die die entsprechende Haftkraft überwindet.

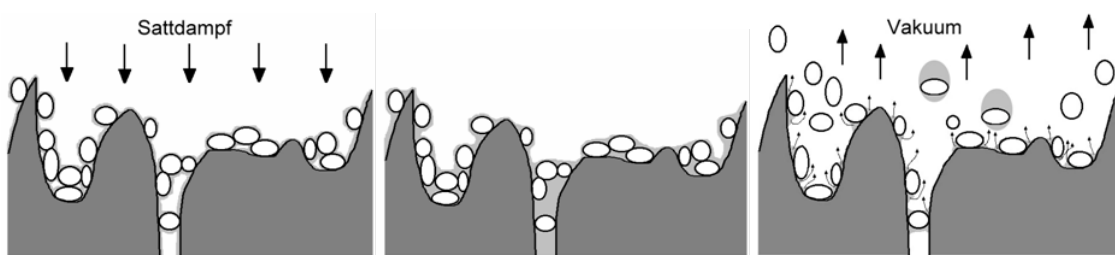


Abb. 2.12: Prinzip der mtVDV-Entkeimung. Links: Nach Anlegen eines Vorvakuums erfolgt die Bedampfung. Mitte: Kondensatbildung auf der Produktoberfläche während der Bedampfung. Rechts: Die Flash-Verdampfung durch schlagartiges Evakuieren des Behandlungsraumes bewirkt ein Abreißen der Partikel von der Produktoberfläche.

Die oberflächennah vorhandene Wärmemenge wird für die Wiederverdampfung des gebildeten Kondensates eingesetzt. Nur durch sehr kurze Dampfbearbeitungszeiten ist es möglich, das gebildete Kondensat nahezu vollständig durch eine Flash-Verdampfung von der Produktoberfläche zu entfernen. Lange Bedampfungszeiten führen zu einer erhöhten Wärmeleitung in das Produktinnere, so dass die bei der Kondensatfilmbildung freiwerdende Verdampfungsenthalpie nicht mehr oberflächennah für die Flash-Verdampfung zu Verfügung steht. Ein Teil des Kondensates wird aufgrund der Wärmeleitung im Vergleich zu einer Flash-Verdampfung relativ langsam wiederverdampfen. Die dabei an den Mikroorganismen angreifenden, ablösenden Kräfte sind jedoch nur sehr gering.

Die Flash-Verdampfung erfolgt durch ein schlagartiges Anlegen eines Vakuums mit hohen Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten. Durch die schnelle Drucksenkung stellt das Kondensat eine überhitzte Flüssigkeit dar, da Dampfdruck und Umgebungsdruck nicht mehr im thermodynamischen Gleichgewicht stehen. Der Temperaturverlauf im Wasserfilm während der Flash-Verdampfung lässt sich vereinfacht mit Hilfe der durch Miyatake et al. [54, 55] eingeführten dimensionslosen Temperatur NEF (Non-Equilibrium Fraction, Gl. 22) darstellen. Dabei ist $T(t)$ die Temperatur des Wasserfilms zum Zeitpunkt t , T_0 die Temperatur zu Beginn der Flash-Verdampfung und T_e die Gleichgewichtstemperatur nach der Flash-Verdampfung.

$$NEF = \frac{T(t) - T_e}{T_0 - T_e} \quad (22)$$

In Abb. 2.13 ist die dimensionslose Temperatur eines Wasserfilms während einer Flash-Verdampfung wiedergegeben. Miyatake et al. unterteilten die Flash-Verdampfung in zwei Abschnitte. Dem ersten Abschnitt mit einer intensiven Verdampfung und der damit verbundenen rapiden Temperaturabsenkung (große Steigung) folgt ein zweiter Abschnitt mit einer geringeren Verdampfungsintensität, was sich in einer Verlangsamung der Temperaturabnahme (kleine Steigung) widerspiegelt. Die Zeit t^* trennt beide Verdampfungsabschnitte und wird als "Flash-Zeit" bezeichnet.

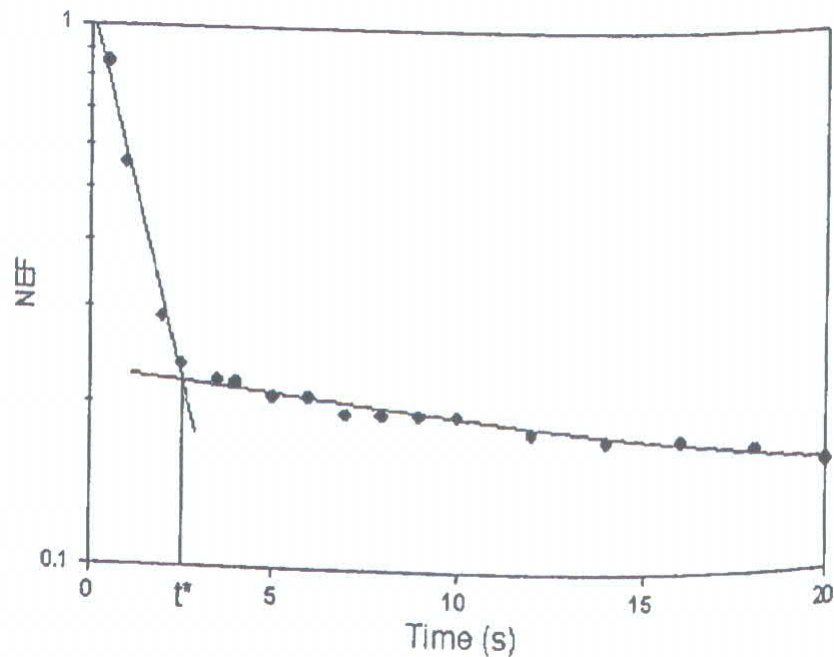


Abb. 2.13: Darstellung der dimensionlosen Temperatur NEF (Non-Equilibrium Fraction) eines Wasserfilms während einer Flash-Verdampfung. Die Zeit t^* (Flash-Zeit) kennzeichnet die Dauer der intensiven Verdampfung auf welche eine ruhige Verdampfung folgt, aus [78].

3 Material und Methoden

3.1 Aufbau der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur

Die wesentlichen Versuche wurden in einer flexiblen Laborentkeimungsapparatur durchgeführt. Der Aufbau besteht aus einem 0,7 L Behandlungsraum und einem 8 L Vakuumpuffertank. Beide Behälter sind zylindrisch und aus nichtrostendem Stahl 1.4301 und in der Abb. 3.1 dargestellt. Die Verbindung der einzelnen Apparatekomponenten erfolgt über Rohrleitungen mit einem Innendurchmesser von 0,5 Zoll. Ein Thermoelement und ein Druckaufnehmer im Behandlungsraum ermöglichen die Aufnahme von Temperatur und Druck durch ein Messwerterfassungssystem (DASYLab V.7.00.00, Messfrequenz 1 kHz). Für einzelne Versuchsteile wurden auf dem Modellträger zwei Thermoelemente mit dünnem Fühlerdurchmesser (NiCr-Ni Typ K, RM-Typ AL-KB-0.25-300-K, Rössel Messtechnik, Werne) durch thermostabile Klebepads (Thermo-Pads, Mawitherm Temperatur-Prozesstechnik GmbH, Monheim) fixiert, um so den Temperaturverlauf auf der Modellträgeroberfläche während der mtVDV-Entkeimung zu erhalten. Dampfbehandlungs- und Evakuierungszeiten werden durch elektronisch gesteuerte pneumatische Schrägsitzventile (Bürkert Fluid Control Systems, Ingelfingen) vor und hinter dem Behandlungsraum reguliert. Das Evakuieren des Behandlungsraums erfolgt durch einen Wasserringverdichter mit Gasstrahler (LEMA 25 AZ, Sterling SIHI GmbH, Itzehoe, $p_{\min} \approx 4000$ Pa). Um die Druckerniedrigung während des Evakuierens zu unterstützen, wurde ein Rohrbündelwärmeübertrager zwischen Vakuumpuffertank und Wasserringverdichter installiert, um aus dem Behandlungsraum entzogene Dämpfe zu kondensieren. Der Wärmeübertrager (Bitzer, Sindelfingen, Deutschland) arbeitet mit Wasser (3,8 L, 5-10°C) und hat eine Kapazität von 0,4 L. Die Abb. 3.1 zeigt ein einfaches Verfahrensfliessbild der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur.

Zusammengefasst besteht die verwendete mtVDV-Laborentkeimungsapparatur aus folgenden vier Grundeinheiten:

- A) Dampfeinheit (Dampferzeuger, Speisewassertank, Speisewasserpumpe, Kondensatabscheider)
- B) Autoklaveinheit (Behandlungsraum, elektronisch gesteuerte Ventile, Messsensoren)
- C) Vakuumeinheit (Vakuumpuffertank, Wärmeübertrager, Verdichter)
- D) Rechneinheit

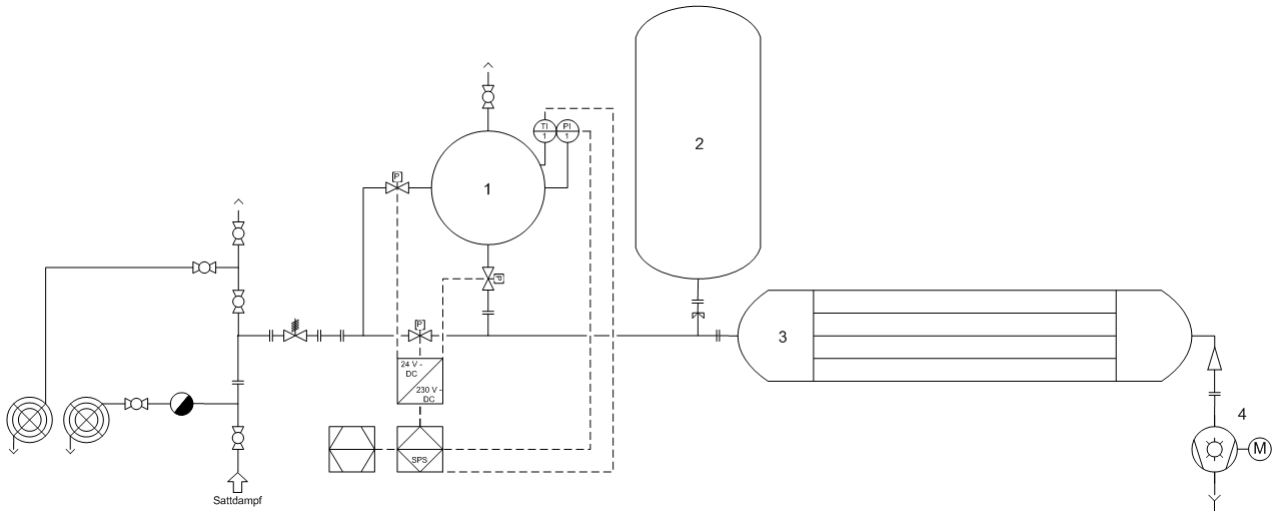


Abb. 3.1: Einfaches Verfahrensfliessbild der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur. 1) Behandlungsraum 2) Vakuumpuffertank 3) Wärmeübertrager 4) Verdichter.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Zur Herstellung von Lösungen wurde stets destilliertes Wasser verwendet. Neben den in Kap. 3.3 aufgeführten Nährmedien kamen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Agar-Agar	Oxoid
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat p.A.	Merck
Natriumchlorid	Oxoid
n-Hexan	Roth
Nycoprep TM Universal	PROGEN Biotechnik
Pepton aus Casein	Merck

3.2.2 Mikroorganismen

Bakterien der Gattung *Bacillus* sind gram-positive, endosporenbildene Stäbchen. Die vegetativen Zellen sind beweglich und wachsen fakultativ anaerob.

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden *Bacillus licheniformis* DSM13 und *Bacillus megaterium* DSM3641 von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen. Von *Bacillus subtilis* und *Geobacillus stearothermophilus* (ehemals *Bacillus stearothermophilus*) sind kommerzielle Sporensuspensionen erhältlich

und wurden von VWR (Darmstadt) bezogen. Sporen von *G. stearotherophilus* finden aufgrund der sehr hohen Thermoresistenz oftmals Verwendung als Bioindikator für thermische Entkeimungsverfahren.

3.2.3 Modellglasträger

Als Modell für eine zu entkeimende Oberfläche wurden unbeschichtete Objektträger aus Kalk-Natron-Glas (Diagonal, Deutschland) mit den Abmessungen 76x26x1 mm verwendet. Der arithmetische Mittenrauwert R_a beträgt weniger als 0,01 μm , die größte Höhe des Rauheitsprofils R_z etwa 0,15 μm . Die Objektträger wurde bereits bei früheren Untersuchungen erfolgreich eingesetzt [46].

3.3 Versuchsdurchführungen

3.3.1 Betrieb der mtVDV-Laborentkeimungsapparatur

Die Modellträger wurden in Spiritus eingelegt, um Fette/Öle zu entfernen, und anschließend luftgetrocknet. Auf die Modellträger wurden anschließend 100 μL einer der u.g. Sporensuspensionen auf einer Fläche von etwa 5 cm^2 aufgebracht, in einen Exsikkator überführt und dort für 24 h bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck zum Trocknen belassen. Die beimpften, trockenen Modellträger wurden im Behandlungsraum fixiert, wobei die beimpfte Seite der Modellträger stets der Dampfeinlassöffnung abgewandt war (Abb. 3.2).

Müller und Wilhelm [59] konnten in einer ähnlichen mtVDV-Entkeimungsanlage am Beispiel von mit bakteriellen Sporen beimpften pflanzlichen Modellträgern zeigen, dass die mechanischen Entkeimungseffekte bis zu einer Bedampfungszeit von etwa 10 s offensichtlich für einen großen Anteil an der Gesamtentkeimung verantwortlich zeichnen. Eine Verlängerung der Bedampfungszeit führt nach Müller und Wilhelm offenbar lediglich zu einer Vergrößerung der schwächeren thermischen Effekte. Aus diesem Grund wurde für die mtVDV-Entkeimungsversuche eine Bedampfungszeit von 10 s festgelegt. Für einzelne Versuche beträgt die Bedampfungszeit 30 s. Der vollständige mtVDV-Entkeimungsvorgang verläuft nach folgendem Schema:

Aufheizen: Dampfzufuhr in die Rohrleitungen und anschließendes Evakuieren (10 s)

Vakuüm1: Vorvakuumphase im Behandlungsraum (45 s)

Druck: Sattedampfzufuhr (10 s, bei einzelnen Versuchen 30 s)

Vakuüm2: Nachvakuumphase im Behandlungsraum (80 s)

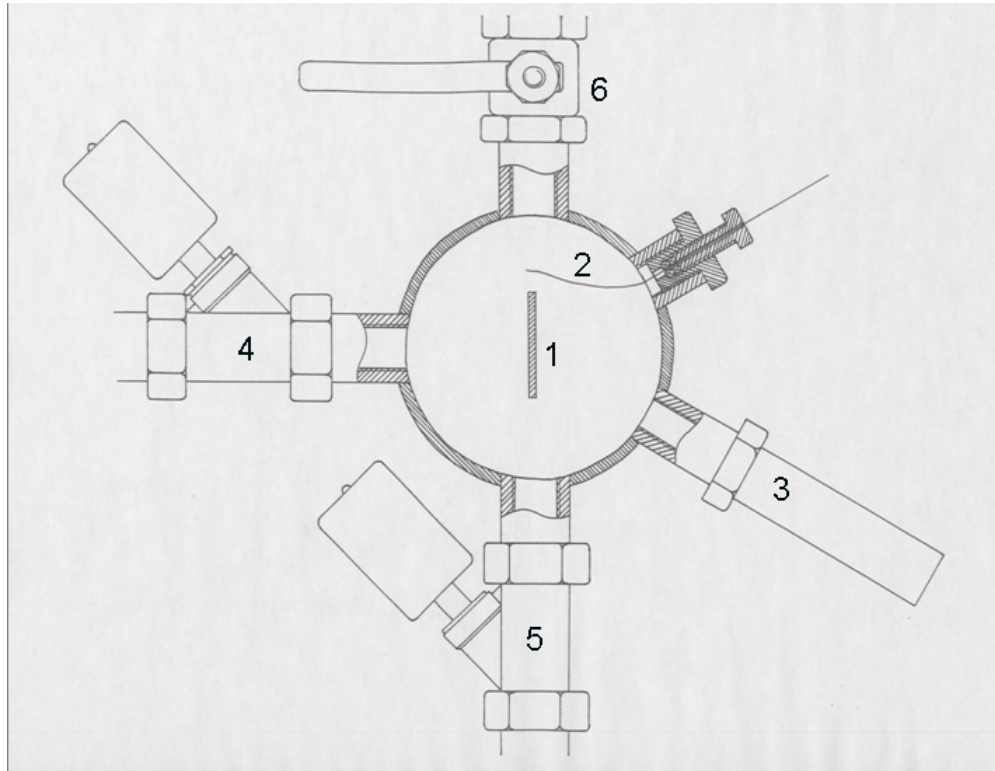


Abb. 3.2: Skizze der Autoklaveinheit. 1) Modellträger; 2) Thermoelement; 3) Druckaufnehmer 4) Dampfeinlassventil 5) Dampfauslassventil 6) Kugelhahn.

Nach dem Entkeimungsvorgang wurde jeder Modellträger in 100 mL Verdünnungsflüssigkeit ($0,75 \text{ g L}^{-1}$ Agar Agar, 1 g L^{-1} Pepton aus Casein) in einem Stomacherbeutel überführt und für jeweils 30 s auf jeder Seite manuell behandelt, um die anhaftenden Sporen abzulösen. Der Stomacherbeutel wurde weiter für 30 s manuell gewalkt, um eine gleichmäßige Verteilung der abgelösten Sporen in der Verdünnungsflüssigkeit zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl N_0 wurden beimpfte, nicht entkeimte Modellträger verwendet.

3.3.2 Kultivierung von *B. megaterium*- und *B. licheniformis*-Sporen auf Agarplatten

Die Kultivierung von *B. licheniformis* DSM13 und *B. megaterium* DSM3641 erfolgte auf Standard-I-Nähragar pH7 (VWR, Darmstadt) unter Zusatz von 10 ppm Mangan(II)-sulfat-1-hydrat (Tab. 3.1) für 7-14 d (Sporulation von über 90%) bei 30°C (DSM3641) bzw. 37°C (DSM13). Anschließend wurde der Zellrasen in sterilem destilliertem Wasser suspendiert.

3.3.3 Kultivierung von *B. megaterium*- und *B. licheniformis*-Sporen in Schüttelkolben

Neben der Kultivierung auf Agarplatten erfolgte eine Anzucht von *B. licheniformis* DSM13 und *B. megaterium* DSM3641 in Standard-I-Nährbouillon (pH7, VWR, Darmstadt) unter Zusatz von 10 ppm Mangan(II)-sulfat-1-hydrat (Tab. 3.1) im Schüttelkolben (250 mL) in einem Rundschüttler (120 Umin^{-1} , CERTOMATR, BBraun Sartorius, Göttingen) mit Inkubationshaube (CERTOMATHK, BBraun Sartorius, Göttingen) innerhalb von 7 d bei 30°C (DSM3641) bzw. 37°C (DSM13).

Tab. 3.1: Sporulationsmedienzusammensetzung

Komponente	Standard -I-Nährbouillon	Standard-I-Nähragar
Pepton	15 g L ⁻¹	15 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3 g L ⁻¹	3 g L ⁻¹
NaCl	6 g L ⁻¹	6 g L ⁻¹
D(+)-Glucose	1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat*	10 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
Agar-Agar	-	12 g L ⁻¹

*dient zur Unterstützung der Sporulation

3.3.4 Bereitstellung und Einteilung der Sporensuspensionen

Die Sporensuspensionen wurden durch dreimaliges Zentrifugieren bei 1800 g für 30 min bei 7°C gewaschen, wobei der Zentrifugationsüberstand verworfen und das Präzipitat jeweils in sterilem destilliertem Wasser resuspendiert wurde. Vereinzelt erfolgte ein Austausch der Suspensionsflüssigkeit mit einem Phosphat-Puffer (pH7, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Ionenstärke $0,15 \text{ mol L}^{-1}$) bzw. mit NaCl-Lösungen der Ionenstärken 0,01, 0,10 und $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Die Sporensuspensionen wurden bis zum Gebrauch bei $+7^\circ\text{C}$ gelagert. Die Sporenkonzentration betrug für *B. subtilis* etwa 10^6 - 10^7 mL^{-1} , für *B. megaterium* und *G. stearothermophilus* etwa 10^7 - 10^8 mL^{-1} und für *B. licheniformis* etwa 10^8 - 10^9 mL^{-1} . Die verschiedenen Typen der Sporensuspensionen resultieren aus den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (3.2). Typ I-Sporen wurden auf festem, Typ II-Sporen in flüssigem Nährmedium kultiviert. Über die Kultivierungsbedingungen der kommerziell verfügbaren Sporensuspensionen von *B. subtilis* und *G. stearothermophilus* sind keine Angaben (k.A.) verfügbar. Diese Sporen stellen den Typ III dar.

Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Sporentypen

Typ	Kultivierung	Bemerkungen
I	Agarplatte	
II	Schüttelkolben	
III	k.A.	kommerzielle Sporensuspension

3.3.5 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Aufreinigung der Sporensuspensionen von *B. megaterium* mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde ein kommerzielles Gradientenmedium verwendet [47, 62, 91]. NycoprepTM Universal ist eine 60%ige sterile Lösung von Nycodenz (5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-triiodo-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)isophtalamide) mit einer Dichte von $1,310 \text{ g mL}^{-1}$ (20°C). Diskontinuierliche Gradienten mit Dichteinkrementen von $0,01 \text{ g mL}^{-1}$ wurden durch Verdünnung von NycoprepTM Universal mit destilliertem Wasser hergestellt. Mittels einer sterilen Spritze und einer Kanüle wurden die jeweiligen Verdünnungen von NycoprepTM Universal in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht. Dabei wurde die Verdünnung mit der geringsten Dichte vorgelegt und die folgenden Verdünnungen mit aufsteigender Dichte mittels Kanüle auf den Boden des Zentrifugenröhrchens zugeführt. Anschließend wurde die oberste Schicht des Gradienten (10 Schichten zu 1 mL) mit etwa 1 mL Sporensuspension überschichtet und für 2 h bei 5000 g zentrifugiert. Dabei trennen sich die Sporen aufgrund ihrer hohen Trockendichte von der Zelldebris.

3.3.6 Kapillarversuche

Die Ermittlung der reaktionskinetischen Parameter (k_0 , E_A , t_{lag}) für die thermische Inaktivierung der bakteriellen Sporen erfolgte durch Kapillarversuche nach Leguerinel [44]. Je $10 \mu\text{L}$ Sporensuspension wurde mittels steriler Spritze in eine Glaskapillare eingefüllt (Schmelzpunktbestimmungsröhrchen $80 \times 1,5 \text{ mm}$, Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland). Die Kapillaren wurden anschließend in einer Gasflamme beidseitig verschlossen und in ein beheiztes Ölbad eingebracht (Haake D3, $\pm 0,1^\circ\text{C}$, ThermoElectron GmbH, Dreieich, Deutschland, Heizöl: Labothermol K, Neolab, Heidelberg, Deutschland). Nach der Erhitzung für definierte Zeiträume wurden die Kapillaren in einem Eiswasserbad abgekühlt, in Seifenlösung gewaschen und mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Öffnen der Kapillaren wurde deren Inhalt mittels steriler Spritze und Verdünnungsflüssigkeit (1 g L^{-1} Pepton aus Casein, $0,75 \text{ g L}^{-1}$ Agar Agar, pH7) seriell verdünnt. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Überlebendkeimzahl $N(t)$. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Lag-Zeiten wurden mit der

nicht-kommerziellen und frei verfügbaren Internetanwendung "Combase-DMFit" des Institute of Food Research (Norwich, UK) überprüft [35].

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Sporezahlbestimmung

Die Sporezahlbestimmung erfolgte auf S-I-Nähragar mittels Tropfplattenverfahren. Die Sporezahl N wurde nach Inkubation für 48 h bei 30°C (*B. megaterium*, *B. subtilis*), 37°C (*B. licheniformis*) und 55°C (*G. stearothermophilus*) ermittelt.

3.4.2 Ermittlung der relativen Sporeoberflächenhydrophobizität

Die Oberflächenhydrophobizität der bakteriellen Sporen wurde nach der MATH-Methode (**M**icrobial **A**dhesion **T**o **H**ydrocarbons) von Koshikawa et al. [40] mit geringfügigen Änderungen durchgeführt. 3mL Sporensuspension wurden mit 1mL n-Hexan für 15s bei Raumtemperatur mittels eines Vortex Mixers (Heidolph Reax 2000, Stufe 9) intensiv vereinigt. Anschließend erfolgte die Phasentrennung der wässrigen und der organischen Phase für 15 min. Die Absorption (A_{600nm} , 1,0 cm) der wässrigen Phase wurde vor und nach der Behandlung mittels eines Photometers (Shimadzu UV-VIS Spectralphotometer UVmini 1240) ermittelt. Die Absorption der Ausgangssporensuspensionen ($A_{0,600nm}$) lag zwischen 0,26-0,52. Der hydrophobe Charakter der bakteriellen Sporen zeigt sich als Affinität für unpolare Lösungsmittel. Der prozentuale Anteil an Sporen, welche am hydrophoben Lösungsmittel gebunden hatten, wurde ausgedrückt nach Gl. 23. Die Ermittlung der relativen Oberflächenhydrophobizität erfolgte als Doppelbestimmung.

$$\left(1 - \frac{A_{600nm}}{A_{0,600nm}}\right) \cdot 100 \quad (23)$$

3.4.3 Ermittlung der Oberflächenbelegung mittels Bildanalyse

Von den für die Bildanalyse verwendeten Modellträgern wurden von zehn verschiedenen Positionen lichtmikroskopische Aufnahmen im Hellfeld bei 200facher Vergrößerung vor und nach einer mtVDV-Entkeimung erstellt. Die Aufnahmen wurden mittels eines Medianfilters geglättet und nach dem Schwellwertverfahren von Otsu [66] in Bereiche mit und ohne Sporen segmentiert.

3.4.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (**A**tomic **F**orce **M**icroscopy) basiert auf der Wechselwirkung zwischen einer Blattfeder (Cantilever) und einer Probe, was zu einer Auslenkung des Cantilevers führt. Die Auslenkung des Cantilevers wird mittels Lasertechnik gemessen und kann mit Kenntnis der Federkonstanten C des Cantilevers in eine Kraft umgerechnet werden [13, 22, 25].

Die Immobilisierung der Probe kann u.a. chemisch erfolgen (Glutaraldehyd & Polyethylenimin, Klebstoffe) oder aber auch durch Immobilisierung in einer Membran [12, 23, 65, 93]. Letzteres benötigt keine chemischen Zusätze. Eine chemische Immobilisierung kann u. U. die Probeneigenschaften beeinflussen. So bewirkt der Einsatz von Glutaraldehyd nach Velegol und Logan [93] eine deutliche Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Probe (E-Modul).

Die Untersuchungen zur Ermittlung der Haftkräfte der bakteriellen Sporen mit Mikroglaskugeln (stellvertretend für die Modellglasträger) wurden mit einem XEP-100 Rasterkraftmikroskop (Park Systems) durchgeführt. Die Immobilisierung der Sporen erfolgte mittels einer Polycarbonatmembran (0,6 μm Isopore DTTP, Millipore GmbH, Schwalbach). An einen Cantilever ohne Spitze (MikroMasch CSC12 tipless noAL Type E, $C_s \approx 0,03 \text{ N m}^{-1}$, Anfatec Instruments AG, Oelsnitz) wurde mittels UV-aktivierbarem Klebstoff (Delo-Katiobond 4552, 1K-Epoxy) eine Mikroglaskugel (Borosilikatglas, 3-10 μm , Polysciences Europe GmbH, Eppelheim) immobilisiert. Hierzu wurde ein Tropfen des Klebstoffes auf einem Glasträger aufgebracht und die Spitze des Cantilevers mit Klebstoff benetzt. Anschließend wurde der Klebstoff für 60 s vorgehärtet. Mittels eines Mikromanipulators wurde der Cantilever über einer Mikroglaskugel positioniert und mit dieser in Kontakt gebracht. Durch eine UV-Lichtbehandlung für weitere 180 s erfolgte ein Aushärten des Klebstoffes und eine Immobilisierung der Mikroglaskugel am Cantilever. Ein so vorbereiteter Cantilever ist in Abb. 3.3 dargestellt.

Die Sporen wurden durch Scannen der Membranoberfläche im Tapping-Modus lokalisiert und anschließend im Contact-Modus Kraft-Weg-Kurven auf der Sporenoberfläche aufgenommen (mind. zwei Kraft-Weg-Kurven pro Spore). Für die verschiedenen *Bacillus*-Sporen wurden jeweils mind. 35 Sporen hinsichtlich ihrer Haftkraft mit einer Mikroglaskugel untersucht.

Um die Reduktion der Haftkräfte in wässriger Umgebung zu untersuchen, wurde ein MFP-3D-Bio Rasterkraftmikroskop (Asylum Research, Santa Barbara, USA) verwendet. Für AFM-Messungen an Luft (gasförmiger Umgebung) wurden Si-Cantilever ($C_s \approx 10\text{-}20 \text{ N m}^{-1}$, BudgetSensors BS-Tap 300AL, Innovative Solutions Bulgaria Ltd., BG) für Messungen in destilliertem Wasser (wässrige Umgebung) SiN-Cantilever ($C_s \approx 0,08 \text{ N m}^{-1}$, Olympus TR400 PSA, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim) verwendet. Beide Cantilevertypen besitzen eine Spitze.

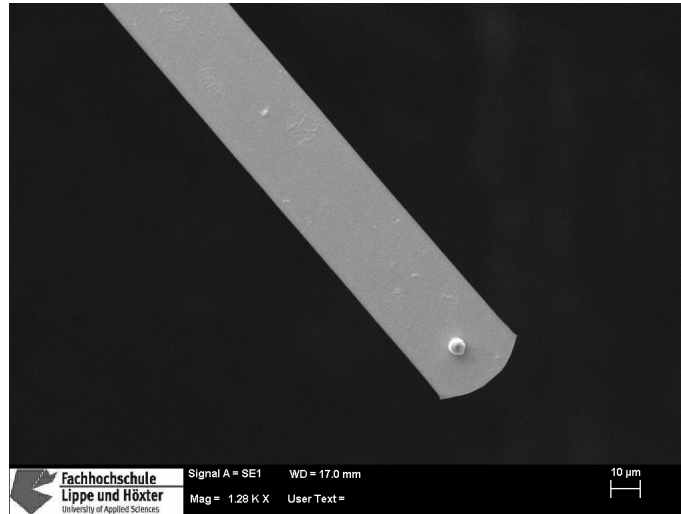


Abb. 3.3: REM-Aufnahme eines Cantilevers mit angeklebter Mikroglasskugel.

Die Immobilisierung der Sporen erfolgte ebenfalls in einer Polycarbonatmembran. Vor der Haftkraftmessung wurden die Membranen im Tapping Mode gescannt und anschließend mindestens fünf Sporen für die Haftkraftmessungen ausgewählt.

3.5 Programmierung in Visual Basic zur Modellierung der thermischen Inaktivierung

Die Modellierung der thermischen Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung soll aufzeigen, ob die erzielte Gesamtkeimzahlreduktion größer ist als die zu erwartende rein thermische Inaktivierung. Für die nicht-isotherme, dynamische Modellierung sollen folgende Bedingungen gelten:

Die thermische Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung

1. erfolgt nach dem Modell von Baranyi & Roberts (Gln. 10 u. 11)
2. entspricht der in den Kapillaren (submers), d.h. Frequenzfaktor k_0 , Aktivierungsenergien E_A und Lag-Zeiten t_{lag} sind identisch
3. erfolgt bei Temperaturen oberhalb von 60°C
4. im Messintervall i erfolgt bei der gemittelten Temperatur des Messintervalls (Messfrequenz = 1 kHz)

5. beginnt für das Messintervall i mit der Restkeimzahl des vorherigen Messintervalls Intervalls $i-1$ (Gl. 24)

$$N_{0,i} = N_{i-1} \quad (24)$$

6. berücksichtigt die Lag-Zeit wie folgt: Die Zeitdifferenz Δt vom ersten Überschreiten von 60°C bis zur Startzeit des Messintervalls i wird von der errechneten Lag-Zeit des Messintervalls i subtrahiert (Gl. 25):

$$t_{lag,i} = t_{lag}(T_i) - \Delta t \quad (25)$$

Durch Bedingung 6 werden alle Messintervalle vor der Klasse i , welche eine Temperatur oberhalb der maximalen Wachstumstemperatur aufweisen, so betrachtet, als ob sie die Temperatur des Messintervalls i aufweisen. Dies führt, insbesondere während der Aufheizphase des Glasträgers zu Beginn der Dampfphase des mtVDV-Prozesses, zu einer tendenziell höher berechneten thermischen Inaktivierung als sie tatsächlich ist. Diese Bedingung führt folglich dazu, dass die thermischen Entkeimungseffekte in einem mtVDV-Prozess etwas überschätzt und somit die mechanischen Entkeimungseffekte etwas unterschätzt werden, zumal die zu erwartende Erhöhung der thermischen Resistenz durch Adhäsion der Sporen auf der Glasträgeroberfläche (Kap. 2.3.3) bei der Modellierung keine Berücksichtigung finden kann. Das vollständige Visual Basic Modul zur Modellierung der thermischen Inaktivierung für die nicht-isotherme mtVDV-Entkeimung findet sich in Kap. 7.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Oberflächenentkeimung nach dem mtVDV-Verfahren mit Sporen von *Bacillus sp.*

4.1.1 Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Sattdampftemperatur

Durch die mtVDV-Entkeimung von mit *Bacillus sp.*-Sporen beimpften Modellträgern wurde die Gesamtkeimzahlreduktion durch thermische und mechanische Entkeimungseffekte in Abhängigkeit von der Sattdampftemperatur ermittelt. Dabei wurden auch die Bedingungen der Sporenkultivierung (auf festem/Typ I bzw. in flüssigem Nährmedium/TypII) hinsichtlich eines Einflusses auf die Gesamtkeimzahlreduktion untersucht (Kap. 4.1.2). Anhand der Versuche sollten Hinweise auf die Haftkräfte zwischen den Sporen und der Modellträgeroberfläche erhalten werden, um diese mit Bildanalysen (Kap. 4.1.3) und AFM-Haftkraftmessungen (Kap. 4.2.2) zu korrelieren. Des Weiteren dienen die gewonnenen Daten in Verbindung mit der Modellierung der thermischen Inaktivierung für eine Abschätzung des Ausmaßes der mechanischen Entkeimungseffekte (Kap. 4.3.2).

Die Abbn. 4.1 u. 4.2 zeigen die erzielten relativen Keimzahlreduktionen für die untersuchten Modellsysteme durch eine mtVDV-Entkeimung bei unterschiedlichen Sattdampftemperaturen. Alle mtVDV-Entkeimungsergebnisse wurden auf die mittlere Temperatur im Behandlungsraum $>80^{\circ}\text{C}$ während der Bedampfungsphase bezogen. Die Einteilung der Sporen in Typ I-III bezieht sich auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen nach Kap. 3.3.4. Sporen von Typ I wurden auf festem Nährmedium kultiviert. Über die Kultivierungsbedingungen der kommerziell bezogenen Sporensuspensionen (Typ III) sind keine Angaben erhältlich.

Die höchsten Keimzahlreduktionen im unteren Temperaturbereich ($<110^{\circ}\text{C}$) wurden für mit Sporen von *B. megaterium* Typ I belegte Modellträger ermittelt. Eine Keimzahlreduktion um etwa zwei Dekaden bei einer Bedampfungszeit t_D von lediglich 10 s wurde für Sporen von *B. megaterium* Typ I bei einer Temperatur von etwa 100°C , für Sporen von *B. licheniformis* Typ I und *B. subtilis* Typ III von etwa 110°C und für *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III von ca. 130°C erzielt.

von 10^3 Sporen/Träger unterschritten wurde. Auch wird sich die Haftkraftverteilung innerhalb einer Mikroorganismenpopulation auf die relative Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Temperatur auswirken. So sollte eine enge Haftkraftverteilung zu einer sprunghaften Keimzahlreduktion ab einer bestimmten Temperatur führen, da in einem engen Temperaturbereich die Haftkräfte durch die mit der Temperatur zunehmenden ablösenden Kräfte überwunden werden können (Kap. 1). Eine breite Haftkraftverteilung hingegen wird vermutlich dazu führen, dass über einen breiten Temperaturbereich hinweg die Haftkräfte durch die ablösenden Kräfte überwunden werden (Abb. 4.3). Insofern ist tatsächlich anzunehmen, dass der Zusammenhang $\log_{10}(N/N_0)=f(\text{Temperatur})$ indirekt die Summenverteilungskurve der Verteilungsdichtefunktion $q_0(F_{adh})$ darstellt.

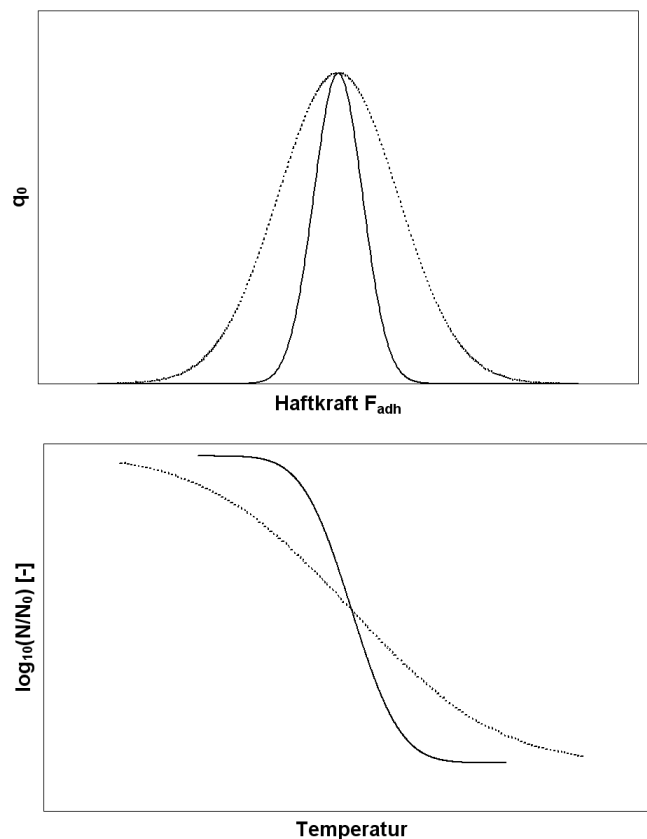


Abb. 4.3: Modellhafter Zusammenhang zwischen der Haftkraftverteilungsdichte $q_0(F_{adh})$ und der relativen Keimzahlreduktion N/N_0 bei einer rein mechanischen Entkeimung durch Flash-Verdampfung für zwei Modellsysteme mit unterschiedlich breiter Haftkraftverteilung.

Es zeigt sich, dass für mit Sporen von *B. megaterium* Typ I, *B. licheniformis* Typ I und *B. subtilis* Typ III beimpfte Modellträger die relative Keimzahlreduktion mit steigender Temperatur stetig zunimmt, während für mit Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III beimpfte Modellträger eine starke Zunahme der Keimzahlreduktion bei Temperaturen ab ca. 130°C zu verzeichnen

ist. Dies kann auf ein schlagartiges Einsetzen der mechanischen Entkeimungseffekte durch ein Überwinden der Haftkräfte und somit auf eine enge Haftkraftverteilung hindeuten (Abb. 4.3). Auch bei der bekannt hohen thermischen Resistenz von *G. stearothermophilus*-Sporen ist hier wichtig zu überprüfen, dass die thermischen Entkeimungseffekte nicht überwiegen. Dies erfolgt in Kap. 4.3.2.

4.1.2 Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Sporenkultivierung

Bei früheren Untersuchungen [46] war neben den bakteriellen Sporen ein großer Anteil an Zelldebris (Fragmente der Sporenmutterzellen) auf der zu entkeimenden Modellträgeroberfläche existent (Abb. 1.2). Somit war eine klare Haftkraftsituation, d.h. Spore auf Modellträger, nicht gegeben. Die Sporen waren eher in die auf der Modellträgeroberfläche adhärenen Zelldebris eingebettet. Es ist möglich, dass sich bei unterschiedlicher Sporenkultivierung der Anteil der Zelldebris in der für die mtVDV-Entkeimungsversuche verwendeten Sporensuspensionen unterscheidet. Dies könnte sich in einer unterschiedlichen Keimzahlreduktion, aufgrund unterschiedlicher Haftkräfte, widerspiegeln. Dies wurde für Sporen von *B. megaterium* und *B. licheniformis* untersucht.

Eine Kultivierung auf festem Nährmedium zeigte gegenüber einer Kultivierung in flüssigem Nährmedium keinen deutlichen Unterschied im Anteil der Zelldebris. Die während der Kultivierung entstehende Zelldebris wurde mittels der in Kap. 3.3.4 beschriebenen Waschprozedur reduziert. Eine vollständige Abtrennung der Zelldebris aus den Sporensuspensionen konnte nicht erreicht werden, wie Abb. 4.4 am Beispiel einer Sporensuspension von *B. megaterium* Typ I zeigt. Es ist jedoch deutlich weniger Zelldebris existent als bei früheren Untersuchungen (vgl. Abb. 1.2).

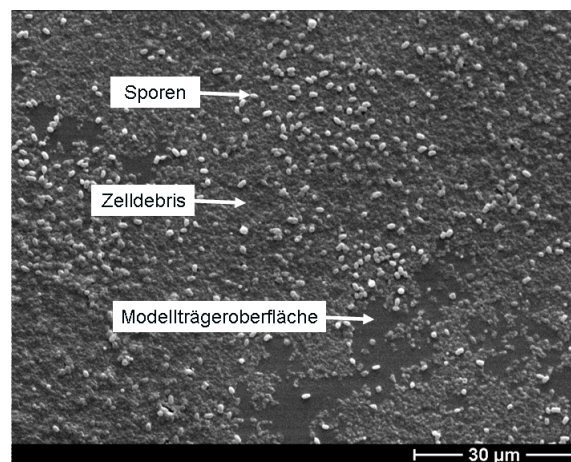


Abb. 4.4: REM-Aufnahme einer *B. megaterium*-Sporensuspension Typ I nach dem Aufbringen auf einen Modellglaträger.

Durch Dichtegradientenzentrifugation erfolgte am Beispiel einer Sporensuspension von *B. megaterium* Typ II die Trennung der Sporen von der Zelldebris (Abb. 4.5). Deutlich ist der nicht unbeträchtliche Anteil von Zelldebris in der Sporensuspension erkennbar. Die Existenz der Zelldebris kann eine Ursache für eine breite Haftkraftverteilung der Sporen auf der Modellträgeroberfläche sein, da nicht auszuschließen ist, dass einige Sporen auf der Modellträgeroberfläche mit der Zelldebris wechselwirken. Eine breite Haftkraftverteilung würde zu einer "Abflachung" der in Abb. 4.3 dargestellten Entkeimungsstufe führen.

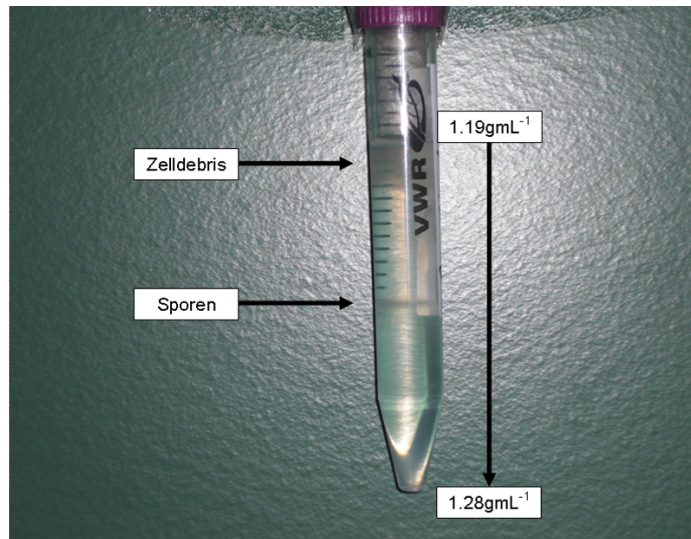


Abb. 4.5: Nycodenz-Dichtegradient mit einer in Zelldebris und Sporen aufgetrennten Sporensuspension von *B. megaterium* Typ II (5000 g, 2 h).

Eine selektive Entnahme der Sporen aus dem Dichtegradienten ist möglich, jedoch ist nicht bekannt, inwieweit Nycodenz (eine Substanz in Nycoprep zur Erzielung eines Dichtegradienten, Kap. 3.3.5) die Oberflächenchemie bakterieller Sporen und somit die Haftkräfte beeinflusst. Auch muss die Anwesenheit von Nycodenz in der für die mtVDV-Entkeimung verwendeten Sporensuspension ausgeschlossen werden, da Nycodenz nach dem Aufbringen der Sporensuspension auf der Modellträgeroberfläche verbleibt und so zu undefinierten Versuchsbedingungen führt.

Bei der mtVDV-Entkeimung von *B. megaterium*- (Abb. 4.6) bzw. *B. lichenormis*-Sporen (Abb. 4.7) konnte allerdings kein Unterschied bei der Verwendung von Sporensuspensionen von Typ I bzw. II ermittelt werden. Sowohl die mechanischen als auch die thermischen Entkeimungseffekte sind somit offenbar bei beiden Sporensuspensionstypen im Ausmaß vergleichbar.

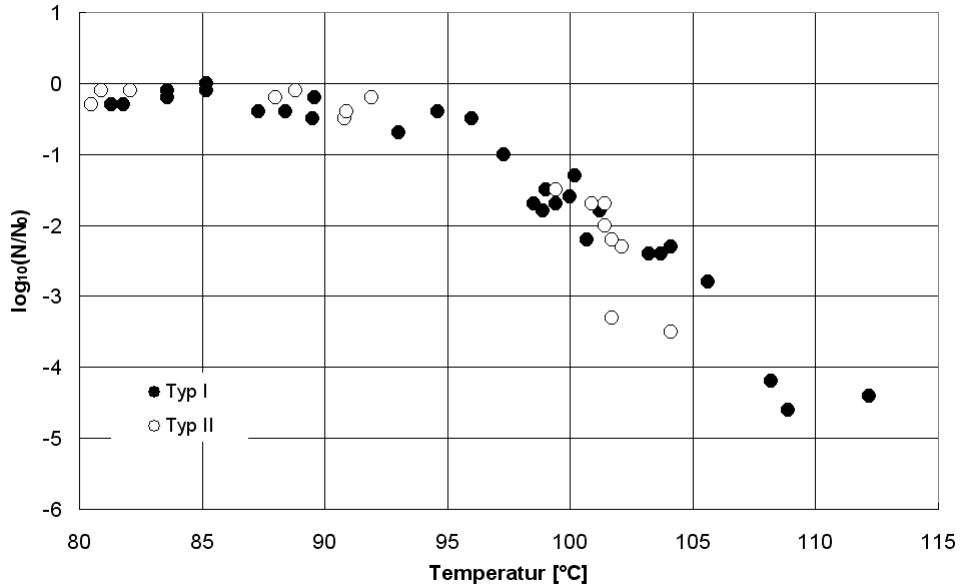


Abb. 4.6: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. megaterium*-Sporen Typ I und Typ II belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$. Typ I: Kultivierung der Sporen auf Nähragar, Typ II: Kultivierung der Sporen in Nährbouillon.

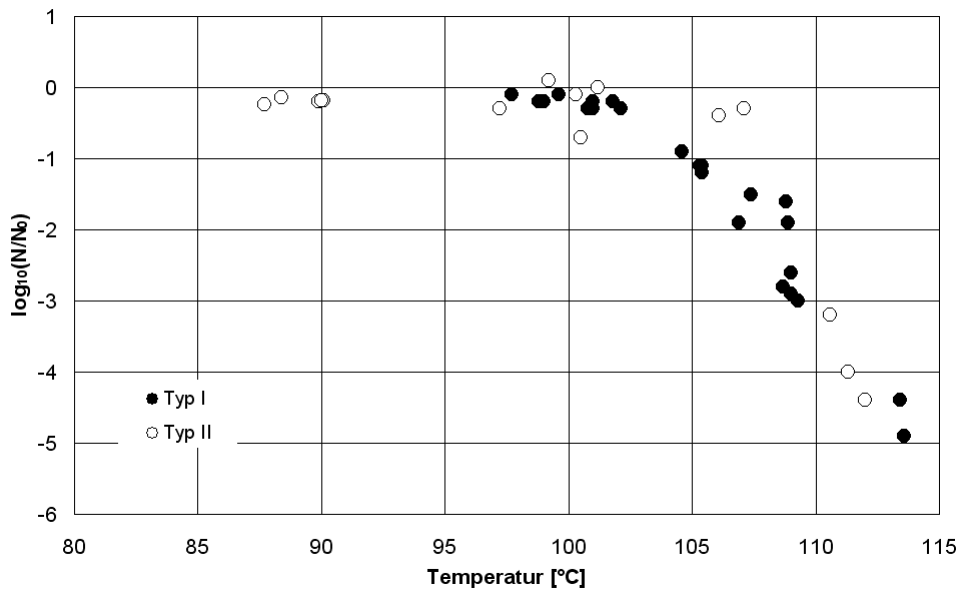


Abb. 4.7: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. licheniformis*-Sporen Typ I und Typ II belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^8 \text{ cm}^{-2}$. Typ I: Kultivierung der Sporen auf Nähragar, Typ II: Kultivierung der Sporen in Nährbouillon.

4.1.3 Bildanalytischer Nachweis der mechanischen Entkeimungseffekte

Die mechanischen Entkeimungseffekte, d.h. das Abtrennen der bakteriellen Sporen von der Modellträgeroberfläche, wurden mittels Bildanalyse untersucht. Hierzu wurden mikroskopische Aufnahmen der Modellträger vor und nach einer mtVDV-Entkeimung angefertigt und die jeweilige prozentuale Oberflächenbelegung (OFB) ausgewertet. Die Originalaufnahme wurde zunächst durch automatisches Herausfiltern von Fehlerpixeln geglättet (Reduzierung des Bildrauschens) und anschließend in Bereiche mit und ohne Sporen unterteilt. Dazu wurde ein fester Schwellenwert für die Graustufen festgelegt. Oberhalb des Schwellenwertes wird die Oberfläche als "mit Sporen belegt" gewertet, unterhalb des Schwellenwertes als "freie Modellträgeroberfläche". Der Vorgang der Auswertung ist beispielhaft in Abb. 4.8 für einen unbehandelten Modellträger beimpft mit Sporen von *B. megaterium* Typ I dargestellt.

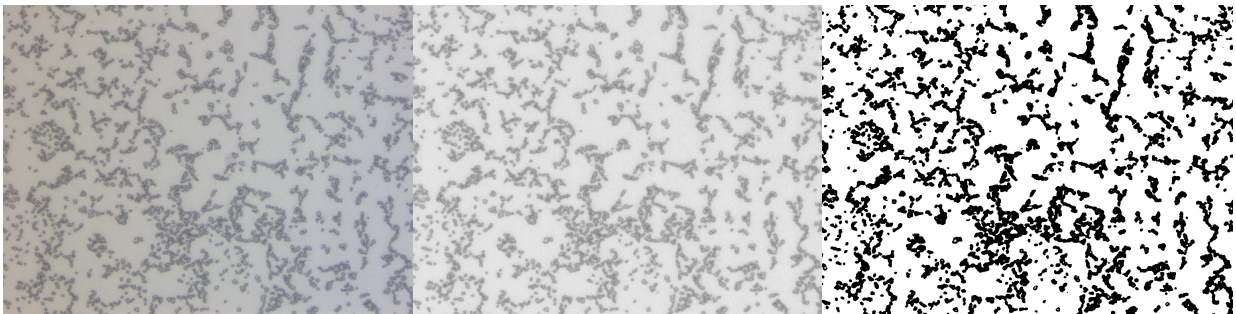


Abb. 4.8: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit *B. megaterium*-Sporen Typ I belegten Modellträgers bei 200facher Vergrößerung. Links: Originalaufnahme, Mitte: Geglättete Version, Rechts: Segmentierte Version. Die Oberflächenbelegung OFB beträgt ca. 0,24 bzw. 24%. Dunkle Bildanteile: Mit Sporen belegt. Helle Bildanteile: Freie Modellträgeroberfläche.

Für natürlich verkeimte Produkte, wie Arzneidrogen, kann davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen vereinzelt vorliegen. Ausgehend von einer Spore mit einer Grundfläche von etwa $1 \times 1 \mu\text{m}$ können auf einer Fläche von 1 cm^2 etwa 10^8 Sporen platziert werden. Auch bei etwas unterschiedlicher Größe der *Bacillus sp.*-Sporen sollten diese bei einer Ausgangskeimzahl N_0 von etwa 10^6 cm^{-2} (*B. subtilis*) bis 10^8 (*B. licheniformis*) in einer Schicht auf den beimpften Modellträgern vorliegen. Dies wird durch Auswertung der Oberflächenbelegung bestätigt. So beträgt die mittlere Oberflächenbelegung der beimpften Modellträger vor der mtVDV-Entkeimung (OFB_0) etwa 0,25 für *B. megaterium*, 0,65 für *B. licheniformis*, 0,1 für *B. subtilis* und 0,35 für *G. stearothermophilus*.

Die Abbn. 4.8 und 4.9 zeigen, dass im Vergleich zu früheren Untersuchungen ([46], Kap. 1, Abb. 1.2) deutlich weniger Zelldebris (Fragmente der Sporenmutterzellen) auf der Modellträgeroberfläche vorliegt. Auch ist die Oberflächenbelegung wie erwartet einschichtig. Alle Sporen

liegen nebeneinander auf der Modellträgeroberfläche vor. Es ist aber auch erkennbar, dass nicht alle Sporen vereinzelt sind. Offenbar bilden sich während des Trocknens der auf die Modellträger aufgetragenen Sporensuspension (Kap. 3.3.1) einschichtige Sporenagglomerate. Aufgrund der möglichen Wechselwirkungen der Sporen innerhalb eines Agglomerates ist es denkbar, dass sich die für das Abtrennen einer Spore zu überwindende Haftkraft, vergrößert.

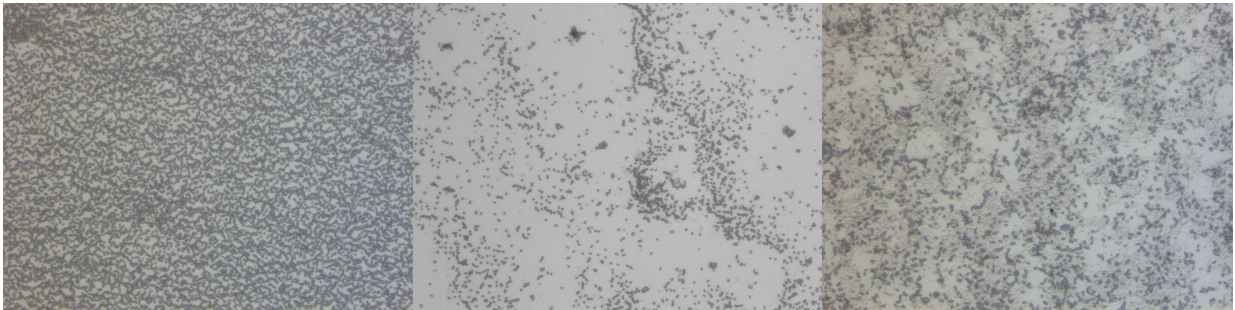


Abb. 4.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit *Bacillus*-Sporen belegten Modellträgern bei 200facher Vergrößerung. Links: *B. licheniformis*-Sporen Typ I ($\text{OFB}_0 \approx 0,68$ bzw. 68%), Mitte: *B. subtilis* Sporen-Typ III ($\text{OFB}_0 \approx 0,13$ bzw. 13%), Rechts: *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III ($\text{OFB}_0 \approx 0,40$ bzw. 40%).

Alle untersuchten Modellträger weisen nach einer mtVDV-Entkeimung eine Reduktion der Oberflächenbelegung auf. Bei Sporen von *B. megaterium* (Abb. 4.10) deutet sich eine Zunahme der Reduktion der Oberflächenbelegung bei Temperaturen von über 120°C trotz starker Streuung an. Eine deutliche Zunahme der Reduktion der Oberflächenbelegung in einem engen Temperaturbereich kann für Sporen von *B. licheniformis* (Abb. 4.11) im untersuchten Temperaturbereich ($90\text{-}130^\circ\text{C}$) nicht festgestellt werden. Ein Einfluss der Kultivierungsbedingungen ist nicht festzustellen.

Eine Zunahme der Reduktion der Oberflächenbelegung in einem engen Temperaturbereich konnte auch für Sporen von *B. subtilis* (Abb. 4.12) nicht belegt werden. Die Aussagekraft der bildanalytischen Untersuchungen mit Sporen von *B. subtilis* wird jedoch durch die sehr geringen Oberflächenbelegung der Modellträger vor der mtVDV-Entkeimung ($N_0 \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$ bzw. $\text{OFB}_0 \approx 0,10$) limitiert (Abb. 4.9). Eine Reduktion der Oberflächenbelegung um z.B. eine halbe Dekade würde einer Oberflächenbelegung von etwa $0,02\text{-}0,03$ bzw. 2-3% nach der mtVDV-Entkeimung entsprechen. Aufgrund von Schwankungen in der Oberflächenbelegung, lässt diese geringe Oberflächenbelegung vor der mtVDV-Entkeimung, auch nach Auswertung von zehn Aufnahmen an unterschiedlichen Positionen eines Modellträgers, keine eindeutigen Aussagen zu.

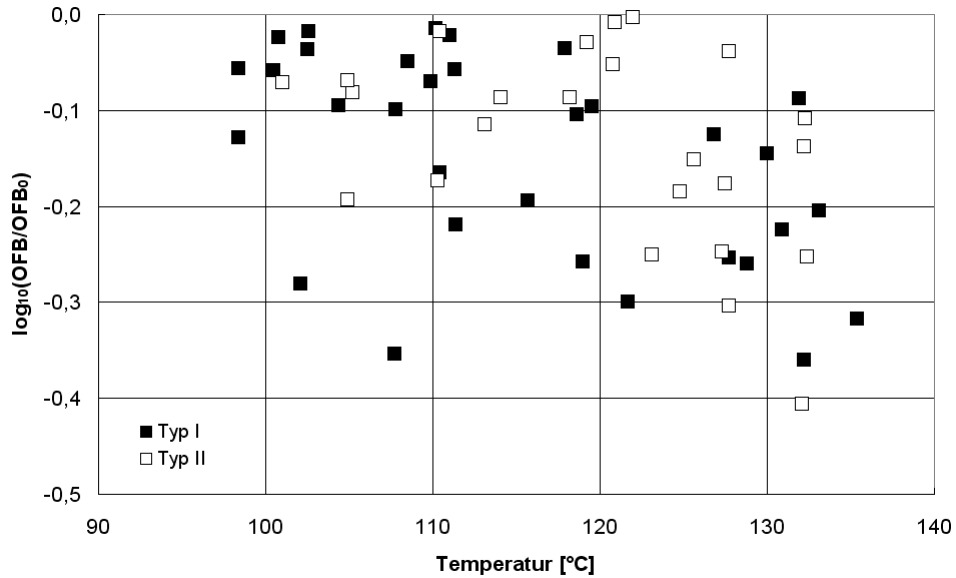


Abb. 4.10: Relative Reduktion der Oberflächenbelegung (OFB/OFB_0) durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. megaterium*-Sporen Typ I und Typ II belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$, $OFB_0 \approx 0,25$. Typ I: Kultivierung der Sporen auf Nähragar, Typ II: Kultivierung der Sporen in Nährbouillon.

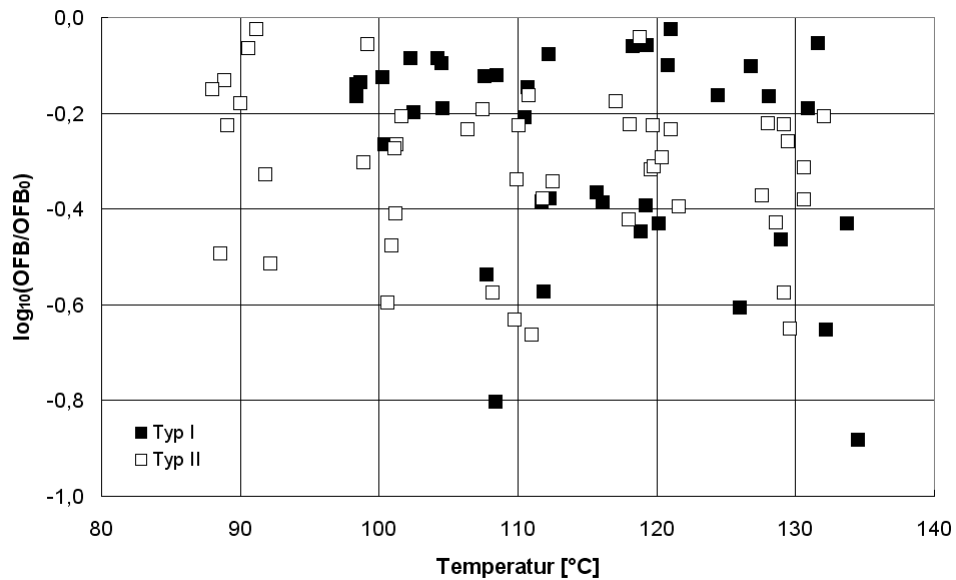


Abb. 4.11: Relative Reduktion der Oberflächenbelegung (OFB/OFB_0) durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. licheniformis*-Sporen Typ I und Typ II belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^8 \text{ cm}^{-2}$, $OFB_0 \approx 0,65$. Typ I: Kultivierung der Sporen auf Nähragar, Typ II: Kultivierung der Sporen in Nährbouillon.

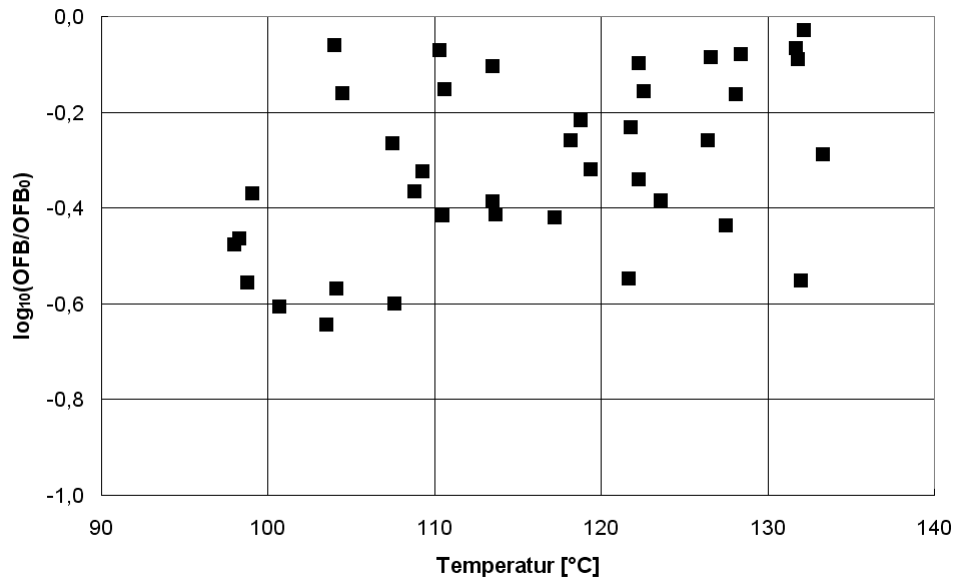


Abb. 4.12: Relative Reduktion der Oberflächenbelegung (OFB/OFB_0) durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. subtilis*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$, $OFB_0 \approx 0,10$.

Für Modellträger mit Sporen von *G. stearothermophilus* nimmt die Reduktion der Oberflächenbelegung bei Temperaturen über 130°C deutlich zu (Abb. 4.13). Dies deutet wiederum auf eine enge Haftkraftverteilung von *G. stearothermophilus*-Sporen (vgl. Kap. 4.1.1). Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der relativen Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung mit der Reduktion der Oberflächenbelegung. Diese Resultate zeigen die Existenz mechanischer Entkeimungseffekte bei der mtVDV-Entkeimung von *G. stearothermophilus*-Sporen bei Temperaturen über 130°C .

Es ist möglich, dass die aufgrund der Kondensatfilmbildung einsetzende Haftkraftreduktion (Kap. 2.3.5) nach einer Bedampfungszeit von 10 s noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Aus diesem Grund wurde am Beispiel von *G. stearothermophilus* eine Verlängerung der Bedampfungszeit auf 30 s bildanalytisch untersucht (Abb. 4.14). Eine weitere Reduktion der Oberflächenbelegung bei verdreifachter Bedampfungszeit wurde hier nicht festgestellt. Weitere Ausführungen zur Kinetik der Kondensatfilmbildung und einer möglichen Mindestbedampfungszeit erfolgen in Kap. 4.2.2.

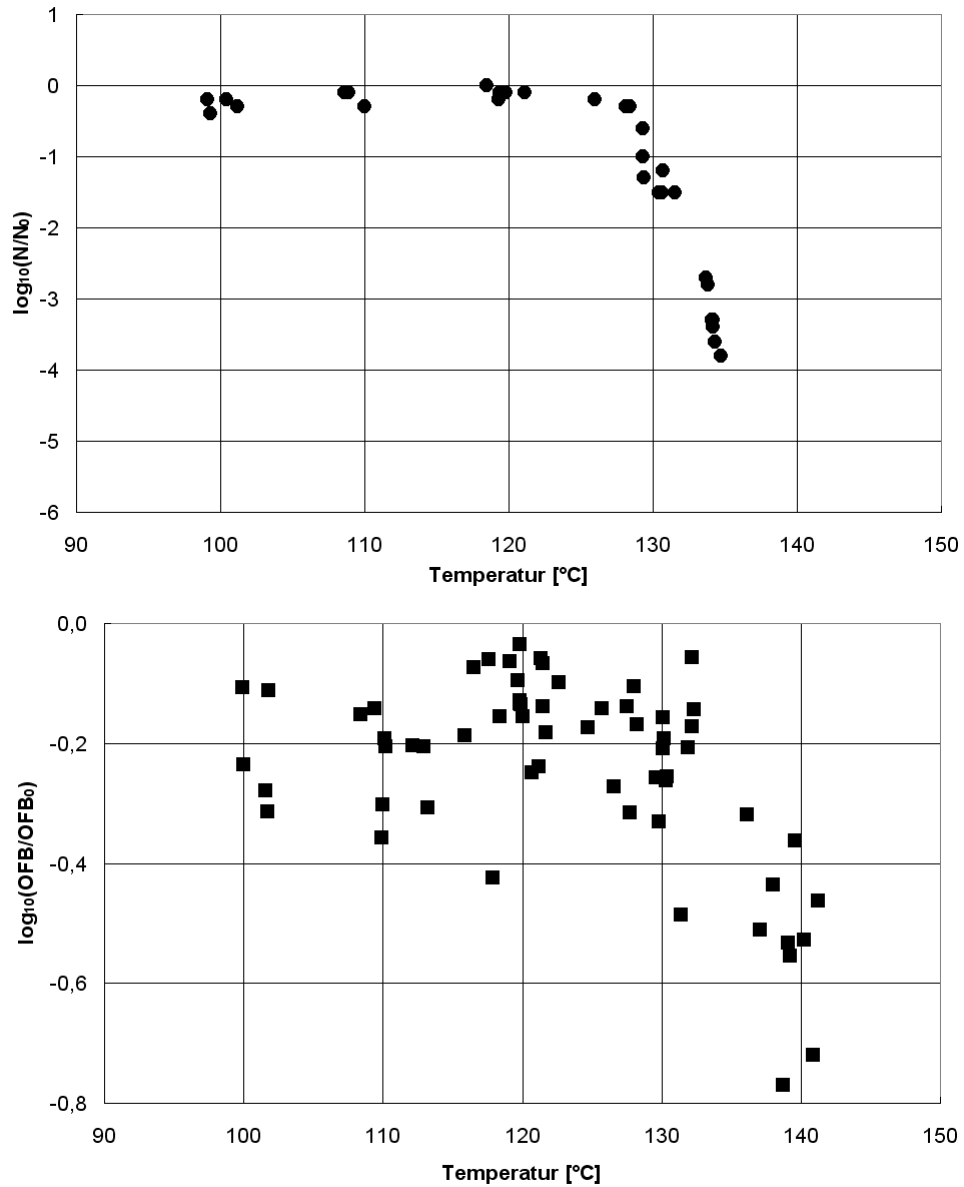


Abb. 4.13: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 (Ausschnitt aus Abb. 4.2) und relative Reduktion der Oberflächenbelegung (OFB/OFB_0) durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45$ s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7$ cm⁻², $OFB_0 \approx 0,35$.

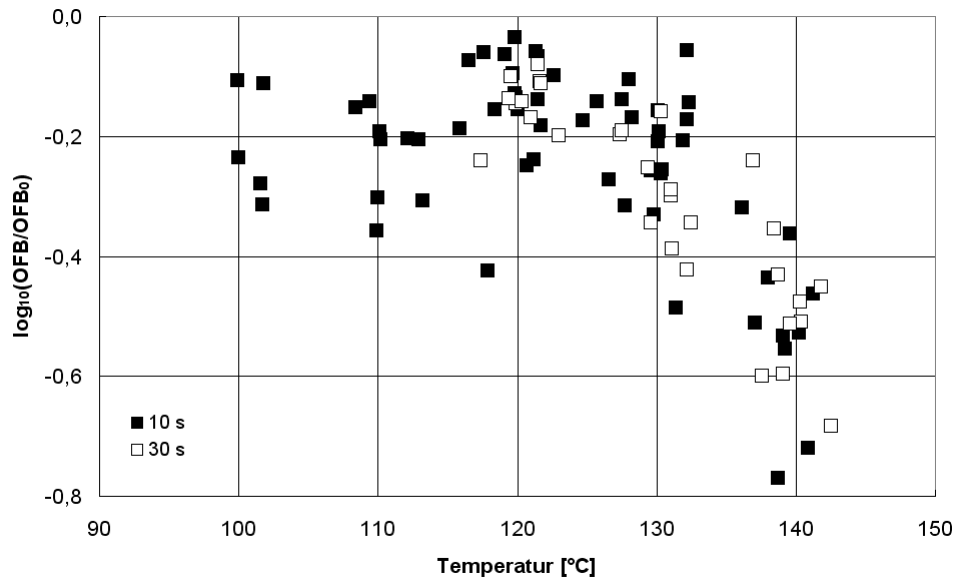


Abb. 4.14: Relative Reduktion der Oberflächenbelegung (OFB/OFB_0) durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *G. stearotherophilus*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und der Bedampfungszeit. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45$ s, 10 s/30 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7$ cm⁻², $OFB_0 \approx 0,35$.

4.2 Ermittelte modellspezifische Haftkräfte

4.2.1 Haftkräfte von *Bacillus sp.*-Sporen

Das Abtrennen der Mikroorganismen von der Produktoberfläche durch die Flash-Verdampfung erfolgt nach einem kurzzeitigen Bedampfungsverfahren. Hierbei bildet sich auf der Produktoberfläche ein Kondensatfilm aus, in welchem die Mikroorganismen mehr oder weniger eingebettet sind. Somit sollten die in gasförmiger Umgebung existierenden Kapillarkräfte größtenteils eliminiert und die Van-der-Waals-Kräfte reduziert sein (Kap. 2.3.2). Für ein Abtrennen der Mikroorganismen sollte folglich in wässriger Umgebung eine deutlich geringere Trennkraft benötigt werden als in gasförmiger Umgebung, was die mtVDV-Entkeimung vermutlich erst ermöglicht.

Um diese Haftkraftreduktion darzustellen, wurden die Haftkräfte zwischen einer Cantileverspitze und der Sporenoberfläche in gasförmiger und wässriger Umgebung gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Haftkräfte in wässriger Umgebung mindestens um den Faktor 10^3 geringer sind als in gasförmiger Umgebung (Tab. 4.1). Für die Messungen mussten unterschiedliche Cantilever verwendet werden, da aufgrund der deutlich höheren Haftkräfte in gasförmiger Umgebung Cantilever mit hoher Federkonstante benötigt wurden. Die Oberflächenchemie der Cantilever unterscheidet sich hierbei. Die große Haftkraftreduktion in wässriger Umgebung ist

aber dennoch anschaulich belegt. Der Faktor 10^3 zwischen den Haftkräften in wässriger und gasförmiger Umgebung wird durch die Arbeit von Weigl [96] bestätigt. Weigl untersuchte die Haftkräfte von Glaskugeln mit einem Durchmesser von 2-40 μm auf Edelstahl unter Verwendung einer Ultrazentrifuge. Weigl ermittelte eine Reduktion der Trennkräfte von etwa 4 μN in gasförmiger Umgebung auf etwa 20 nN in wässriger Umgebung.

Tab. 4.1: Mittlere Haftkräfte zwischen einem Cantilever und Sporen von *Bacillus sp.* in Luft und in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur.

Sporen von	$\overline{F}_{\text{adh}}$ in Luft [nN] (Si-Cantilever)	$\overline{F}_{\text{adh}}$ in destilliertem Wasser [nN] (SiN-Cantilever)
<i>B. megaterium</i> Typ I	10	≈ 0
<i>B. licheniformis</i> Typ I	16	≈ 0
<i>B. subtilis</i> Typ III	18	≈ 0
<i>G. stearothermophilus</i> Typ III	21	≈ 0

Die Haftkraftreduktion kann nicht ausschließlich auf die Reduktion der Van-der-Waals-Kräfte zurückgeführt werden. Nach Bobe [11] sinken die Van-der-Waals-Kräfte in wässriger Umgebung in etwa um den Faktor 10. Somit sind weitere Mechanismen, wie die Reduktion der Kapillarkräfte, für die geringen Haftkräfte in wässriger Umgebung verantwortlich. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Kondensatfilmbildung für die Haftkraftreduktion während der Bedampfungsphase der mtVDV-Entkeimung.

Im Folgenden wurden die Haftkräfte der verschiedenen *Bacillus*-Sporen mit einer Mikroglasskugel (stellvertretend für die Modellträgeroberfläche) durch AFM-Messungen in wässriger Umgebung ermittelt. Zunächst wurden die Sporen auf bzw. in einer Polycarbonatmembran immobilisiert (Abb. 4.15). Für alle Sporen zeigte sich dabei eine ausreichend starke Fixierung für die durchzuführenden Haftkraftmessungen.

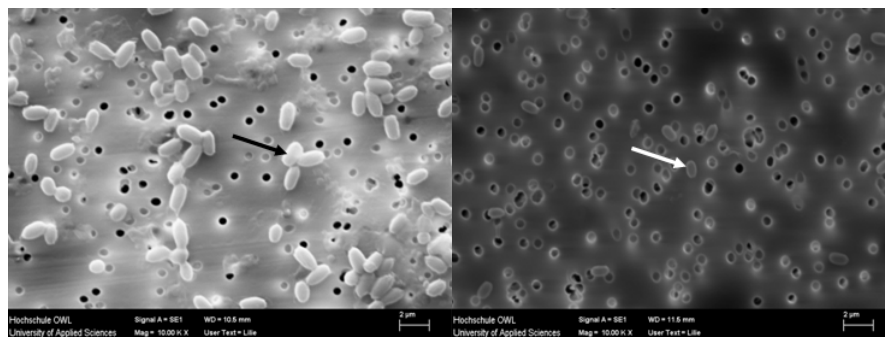


Abb. 4.15: REM-Aufnahmen von *B. megaterium*-Typ I- (links) und *B. subtilis*-Sporen Typ III (rechts) auf einer Polycarbonatmembran. Je eine Spore wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Durch ein Scannen der Membranoberfläche wurden die einzelnen Sporen lokalisiert und anschließend Kraft-Weg-Kurven zwischen der am Cantilever fixierten Mikrogaskugel (Borosilikatglas, $d \approx 6 \mu\text{m}$) und der Sporenoberfläche aufgenommen. Die Abb. 4.16 zeigt die Kraft-Weg-Kurven für eine Spore von *B. megaterium* Typ I und *B. subtilis* Typ III. Während für die Spore von *B. megaterium* Typ I keine Haftkraft ermittelt werden konnte, ergibt sich für die Spore von *B. subtilis* Typ III eine Haftkraft von etwa 4 nN. Im dargestellten Beispiel für *B. subtilis* Typ III erfolgt ein plötzliches Abreißen der Mikrogaskugel von der Sporenoberfläche bei etwa $0,1 \mu\text{m}$ (Retractkurve).

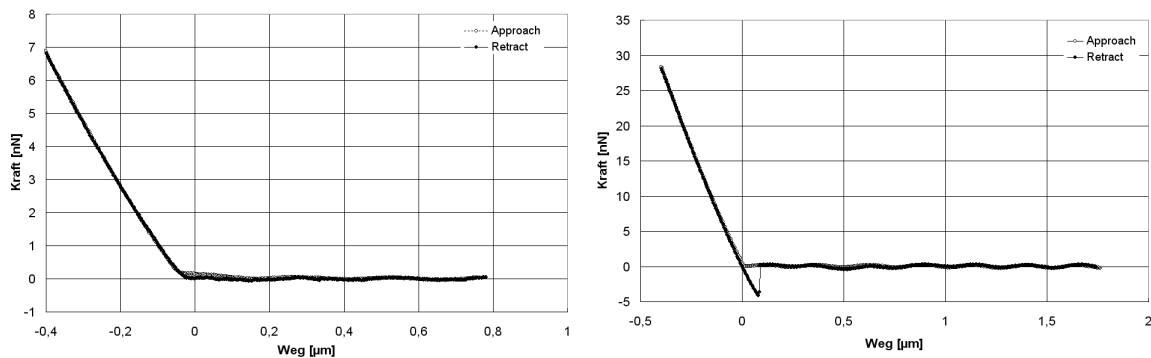


Abb. 4.16: Kraft-Weg-Kurven für die AFM-Haftkraftmessungen zwischen einer Spore von *B. megaterium* Typ I (links) / *B. subtilis* Typ III (rechts) und einer Mikrogaskugel in wässriger Umgebung.

Aus den durchgeführten Haftkraftmessungen ergeben sich die in Tab. 4.2 zusammengefassten mittleren Haftkräfte \overline{F}_{adh} für die verschiedenen Sporen von *Bacillus* sp. Die gemessenen Haftkräfte betragen zwischen 0 nN und 26,2 nN und liegen damit im Bereich der in der Literatur aufgeführten AFM-Haftkraftdaten in wässriger Umgebung (Tab. 2.2) [12, 23, 65].

Tab. 4.2: Mittlere und maximale Haftkräfte zwischen einer Mikrogaskugel ($d \approx 6 \mu\text{m}$) und *Bacillus* sp.-Sporen in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Pro Sporenbildner wurden mind. 35 Sporen untersucht.

Sporen von	\overline{F}_{adh} [nN]	$F_{adh,max}$ [nN]
<i>B. megaterium</i> Typ I	<0,3	0,6
<i>B. licheniformis</i> Typ I	≈ 1	9,8
<i>B. subtilis</i> Typ III	≈ 6	26,2
<i>G. stearothermophilus</i> Typ III	<0,3	1,3

Die Abbn. 4.17 und 4.18 zeigen die Haftkraftverteilungsdichtekurven für Sporen von *B. licheniformis* Typ I und *B. subtilis* Typ III. Eine Normalverteilung der Haftkräfte ist in beiden Fällen nicht gegeben. Für Sporen von *B. subtilis* Typ III deutet sich eine breitere Haftkraftverteilung

als für Sporen von *B. lichenormis* Typ I an. Die mtVDV-Entkeimungsversuche deuten diese Unterschiede in der Haftkraftverteilung ebenfalls an (Abb. 4.19). Nach Abb. 4.3 sollte sich eine breite Haftkraftverteilung in einer geringen Zunahme der relativen Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Temperatur widerspiegeln.

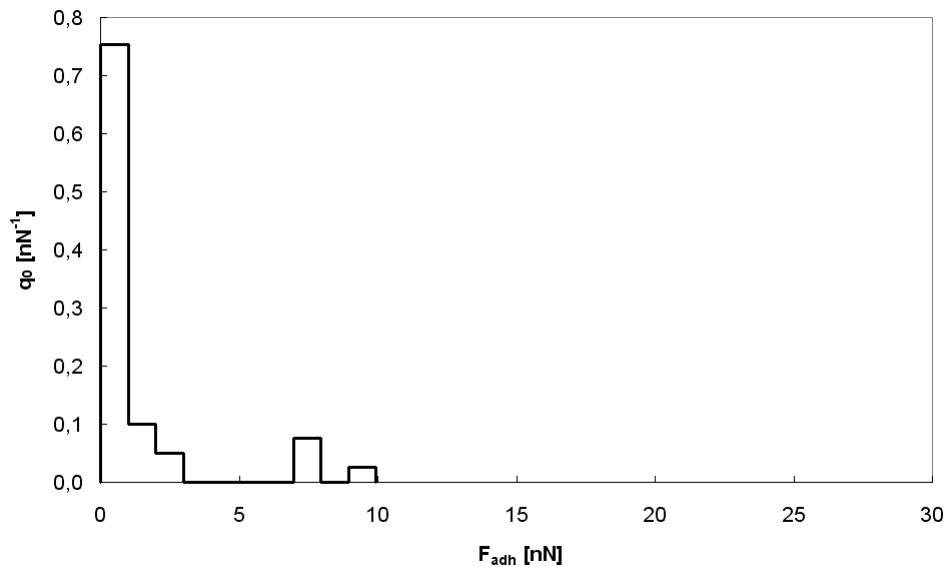


Abb. 4.17: Haftkraftverteilungsdichtekurve der Wechselwirkung zwischen einer Mikroglasskugel ($d \approx 6 \mu\text{m}$) und Sporen von *B. licheniformis* Typ I in wässriger Umgebung, ($\overline{F}_{adh} \approx 1 \text{ nN}$, $n=40$).

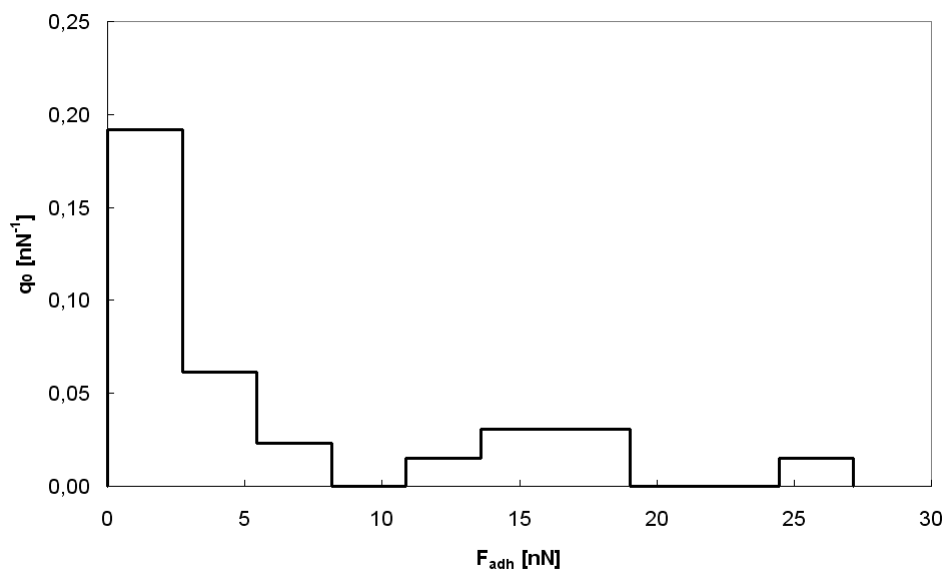


Abb. 4.18: Haftkraftverteilungsdichtekurve der Wechselwirkung zwischen einer Mikroglasskugel ($d \approx 6 \mu\text{m}$) und Sporen von *B. subtilis* Typ III in wässriger Umgebung, ($\overline{F}_{adh} \approx 6 \text{ nN}$, $n=48$).

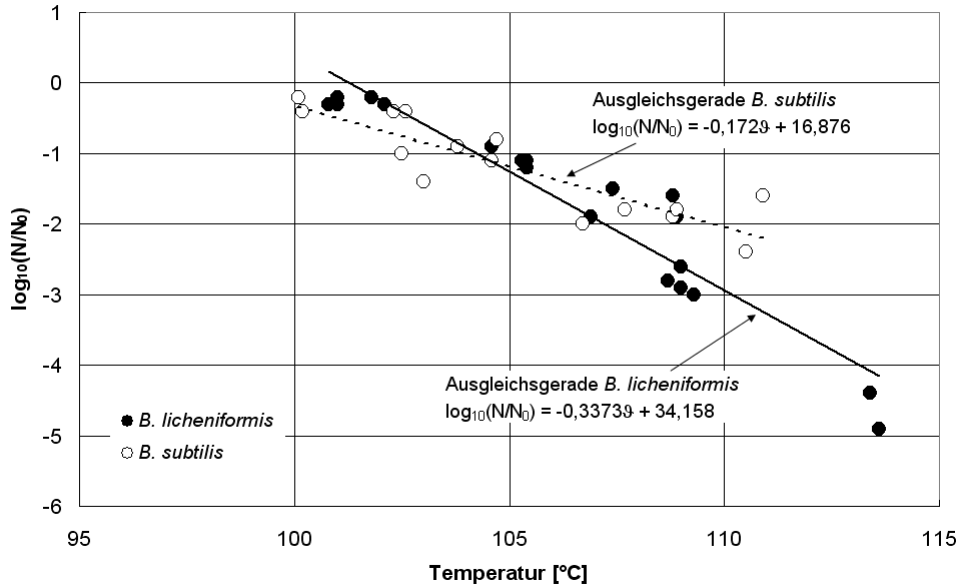


Abb. 4.19: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. licheniformis*-Sporen Typ I und *B. subtilis*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase (Ausschnitt aus den Abbn. 4.1 u. 4.2). t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45$ s, 10 s, 80 s. $N_0, B. subtilis} \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$, $N_0, B. licheniformis} \approx 10^8 \text{ cm}^{-2}$.

Auch die Sporenmorphologie wird über die möglichen Kontaktstellen die Haftkraft beeinflussen. Beispielhaft sei hier der AFM-Scan von *B. licheniformis* Typ I Sporen gezeigt, aus welchem die inhomogene Oberflächenstruktur der Sporen hervorgeht (Abb. 4.20). Diese Inhomogenität, welche ebenfalls in Abb. 2.9 erkennbar ist, kann zu einer breiten Haftkraftverteilung führen.

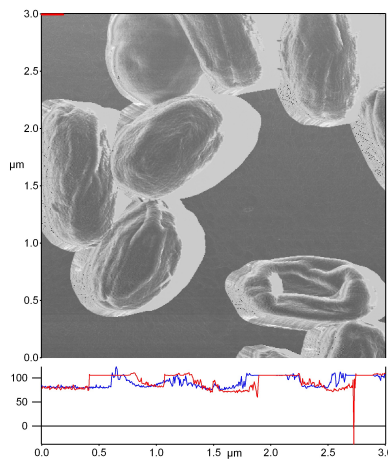


Abb. 4.20: AFM-Scan einer Spore von *B. licheniformis* Typ I in gasförmiger Umgebung.

Beim Annähern der Mikrogaskugel an die Sporenoberfläche existieren mitunter Anziehungskräfte. Diese bewirken, dass sich die Gaskugel und somit auch der Cantilever zur Probe hin

bewegt. Man spricht hier von einem so genannten "Jump in Contact" (Abb. 4.21). Es wurde vereinzelt festgestellt, dass sich die Kurven für das Annähern bzw. Wegziehen des Cantilevers (Approach-/Retractkurve) im Kontaktbereich der Mikroglasskugel mit den Sporen (Weg im negativen Bereich) unterscheiden können (Abb. 4.22). Diese Hysterese kann auf eine Deformation der Spore zurückgeführt werden.

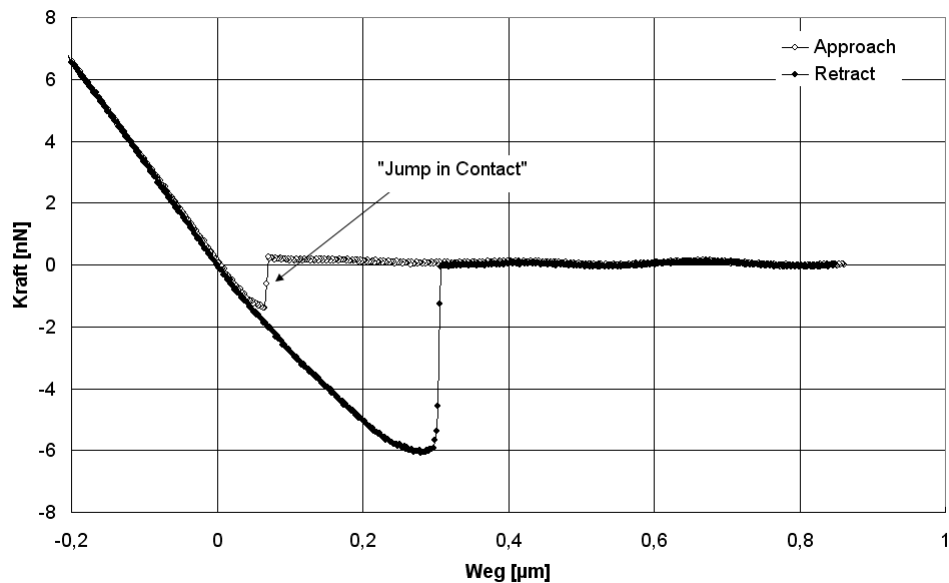


Abb. 4.21: Kraft-Weg-Kurve mit "Jump in Contact" bei der AFM-Haftkraftmessung zwischen einer Spore von *B. subtilis* Typ III und einer Mikroglasskugel in wässriger Umgebung.

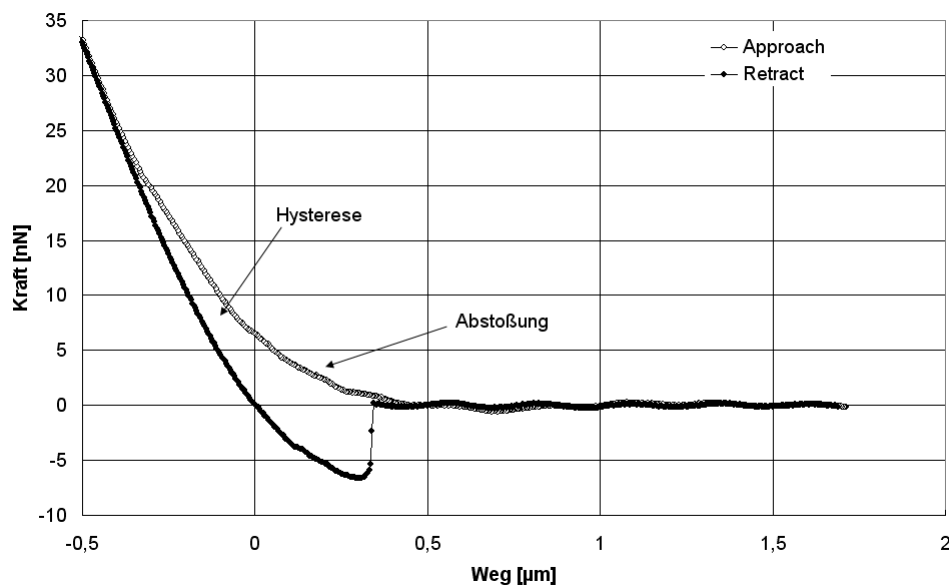


Abb. 4.22: Kraft-Weg-Kurve mit Hysterese und Abstoßungskräften bei der AFM-Haftkraftmessung zwischen einer Spore von *B. subtilis* Typ III und einer Mikroglasskugel in wässriger Umgebung.

Es bleibt festzuhalten, dass sich die Haftkräfte nicht nur speziesspezifisch, sondern auch stamm-spezifisch unterscheiden können. Die vereinzelt festgestellte Hysterese der Kraft-Weg-Kurven deutet auf Inhomogenitäten hinsichtlich der Elastizität/dem Deformationsverhalten von Sporen eines Stammes.

4.2.2 Versuch der Korrelation der ermittelten Haftkräfte mit der Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung

Es wurde in Kap. 1 angeregt, eine Korrelation der Ergebnisse der mtVDV-Entkeimung mit den modellspezifischen Haftkräften durchzuführen, d.h zu untersuchen, ob Modellsysteme mit einer niedrigen mittleren Haftkraft eine größere relative Keimzahlreduktion bei niedrigen Temperaturen aufweisen als Modellsysteme mit höherer mittlerer Haftkraft.

Die vorliegenden Daten der Haftkraftmessungen zwischen Sporen von *Bacillus-sp.* und einer Mikroglasskugel in wässriger Umgebung (Tab. 4.2) lassen vermuten, dass mechanische Entkeimungseffekte für Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III ($\overline{F}_{adh} < 0,3$ nN) bei einer niedrigeren Temperatur auftreten als für Sporen von *B. subtilis* Typ III ($\overline{F}_{adh} \approx 6$ nN). Auf Basis der mikrobiologischen Analysen der mtVDV-Entkeimung kann die vermutete Korrelation nicht bestätigt werden. Bei der mtVDV-Entkeimung zeigen sich für Sporen von *B. subtilis* Typ III bereits bei Temperaturen oberhalb von 105°C eine relative Keimzahlreduktion von über einer Dekade, während dies bei Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III erst bei Temperaturen von etwa 130°C der Fall ist. Die mikrobiologischen Analysen geben aber die relative Gesamtkeimzahlreduktion durch mechanische und thermische Entkeimungseffekte wieder. Die im Vergleich zu Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III geringere thermische Resistenz der Sporen von *B. megaterium* Typ I, *B. licheniformis* Typ I und *B. subtilis* Typ III (Kap. 3.2.2) führt aber offenbar dazu, dass bei niedrigen Temperaturen die thermischen Entkeimungseffekte ein deutlich größeres Ausmaß aufweisen als die mechanischen Entkeimungseffekte und diese dadurch überlagert werden.

Die bildanalytischen Untersuchungen geben ebenfalls einen Hinweis auf die temperaturabhängigen mechanischen Entkeimungseffekte, da thermische Entkeimungseffekte nicht angezeigt werden. Bei den bildanalytischen Untersuchungen deuten sich größere Haftkräfte von *B. licheniformis*-Sporen Typ I und *B. subtilis*-Sporen Typ III auf Modellträgern an als für Sporen von *B. megaterium* Typ I und *G. stearothermophilus* Typ III (Abbn. 4.10-4.13). Diese Reihenfolge zeigt eine gute Übereinstimmung mit den mittels AFM-Technik gemessenen Haftkräften.

Ein tendenzieller Zusammenhang der Haftkraft und der Sporenoberflächenhydrophobizität, wie bei Rönner et al. [74], ist nicht gegeben. Sporen von *B. megaterium* Typ I weisen im Vergleich zu Sporen von *B. licheniformis* Typ I, *B. subtilis* Typ III und *G. stearothermophilus* Typ III

eine hohe Sporenoberflächenhydrophobizität auf (Abb. 4.23), jedoch nicht die größte mittlere Haftkraft. Ein Zusammenhang zwischen Haftkraft und Sporenoberflächenhydrophobizität zeigt sich offenbar erst bei sehr hydrophoben Oberflächen, wie sie beispielsweise bei Rönner et al. (hydrophobes Glas) verwendet wurden.

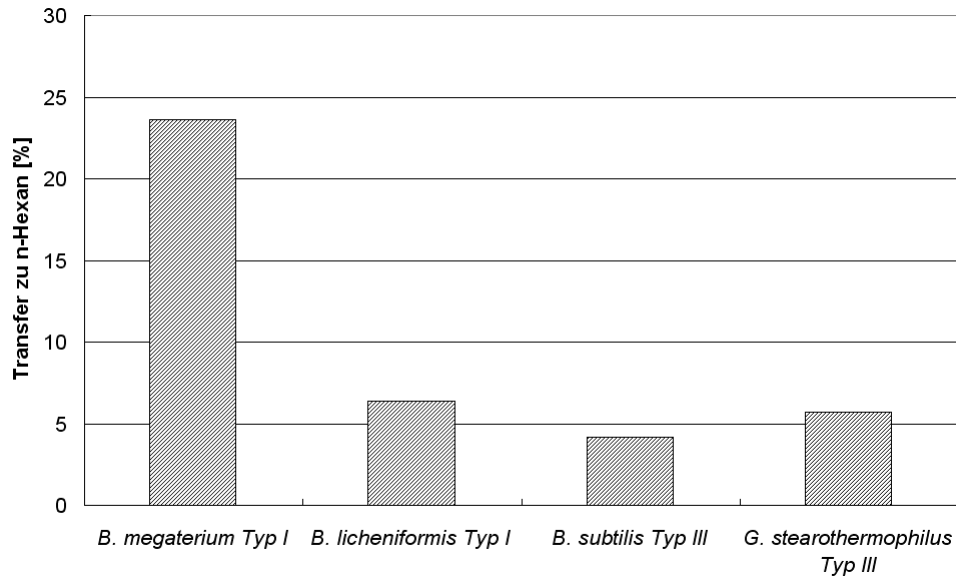


Abb. 4.23: Sporenoberflächenhydrophobizität bakterieller Sporen von *Bacillus* sp. ausgedrückt als Transfer zu n-Hexan.

Es ist anzunehmen, dass die mittels AFM-Technik ermittelten Haftkräfte nicht exakt denselben Haftkräften der Mikroorganismen auf den Modellträgern während der mtVDV-Entkeimung entsprechen. In der AFM-Technik werden vorrangig Wechselwirkungen ohne stoffliche Verbindung (Kap. 2.3.2) zwischen zwei Oberflächen erfasst. Nach dem Aufbringen der Sporensuspension auf die Modellträgeroberfläche vor der eigentlichen mtVDV-Entkeimung kann beispielsweise das Antrocknen von Proteinen zu einer stofflichen Verbindung und so zu deutlich größeren Haftkräften führen. Insbesondere die in den Sporensuspensionen existente Zelldebris kann solche Feststoffbrücken verursachen. Zum anderen bestehen die Modellträger aus Kalk-Natron- und die für die AFM-Messungen verwendeten Mikroglaskugeln aus Borosilikatglas. Demnach unterscheidet sich deren Oberflächenchemie. Dennoch sind AFM-Haftkraftmessungen eine gute Methode, um deutliche Haftkraftunterschiede bei unterschiedlichen Mikroorganismen aufzuzeigen und so Rückschlüsse auf die zu erwartenden mechanischen Entkeimungseffekte während einer mtVDV-Entkeimung ziehen zu können.

Wie in Kap. 4.1.3 erwähnt, ist nicht auszuschließen, dass die Reduktion der Haftkräfte aufgrund der Kondensatbildung während der kurzen Bedampfungsphase noch nicht abgeschlossen ist. Es

ist möglich, dass, wie in Abb. 4.24 dargestellt, eine modellspezifische Mindestbedampfungszeit existiert, um die Haftkraftreduktion abzuschließen.

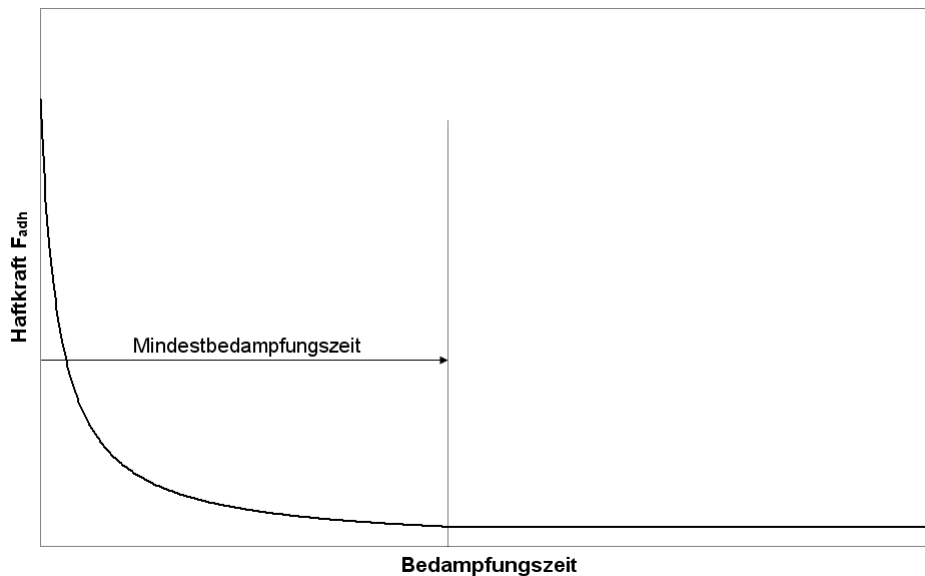


Abb. 4.24: Mögliche Kinetik der Haftkraftreduktion während der Bedampfungsphase der mtVDV-Entkeimung.

Einen Hinweis darauf, dass die Haftkraftreduktion noch nicht vollständig abgeschlossen ist, zeigen die AFM-Haftkraftmessungen in gasförmiger Umgebung (Tab. 4.1). Auf Basis der mikrobiologischen Ergebnisse der mtVDV-Entkeimung kann eine Temperatur festgelegt werden, bei welcher die Keimzahlreduktion einsetzt bzw. eine entsprechende Keimzahlreduktion vorliegt (vgl. Stufentemperatur ϑ_{St} , Kap. 1). Eine Keimzahlreduktion um zwei Dekaden wurde für *B. megaterium*-Sporen bei etwa 100°C, für *B. licheniformis*- und *B. subtilis*-Sporen bei etwa 110°C und für Sporen von *G. stearothermophilus* bei etwa 130°C ermittelt. Diese Reihenfolge wird gut durch die AFM-Haftkraftmessungen in gasförmiger Umgebung wiedergegeben, wie Abb. 4.25 zeigt. Mit zunehmender mittlerer Haftkraft nimmt die Stufentemperatur zu.

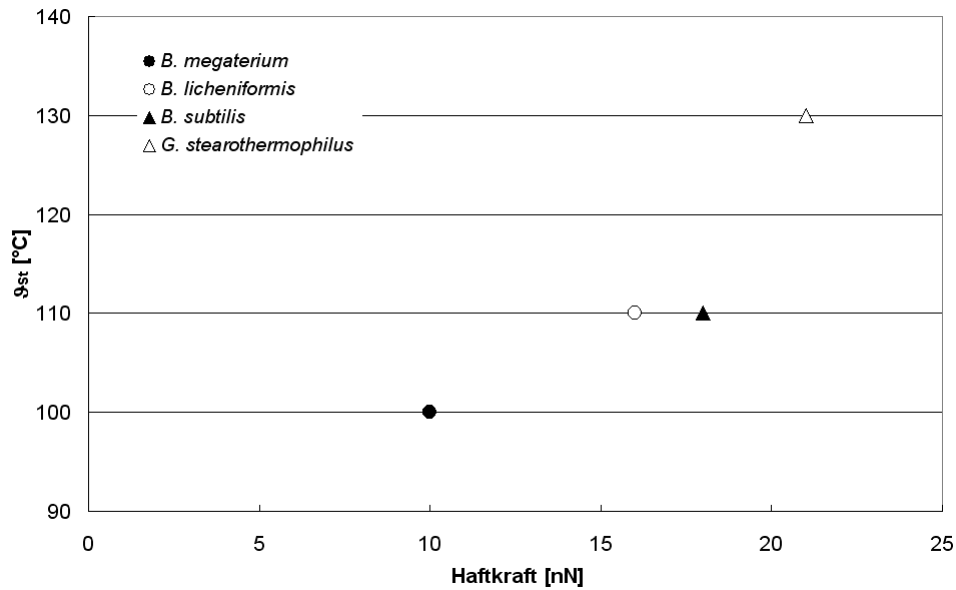


Abb. 4.25: Gemeinsame Darstellung der notwendigen mittleren Behandlungsraumtemperatur (Stufentemperatur ϑ_{st}) während der Bedampfungsphase für eine Keimzahlreduktion von mit *Bacillus sp.*-Sporen belegten Modellträgern um zwei Dekaden (t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s) und der mittleren Haftkraft zwischen einer Si-Cantileverspitze und *Bacillus sp.*-Sporen in gasförmiger Umgebung (Luft).

Die Kinetik der Kondensatfilmbildung bei Produkten mit stark strukturierter Oberfläche und insbesondere bei Schüttungen kann sich deutlich von der bei einer glatten Modellträgeroberfläche unterscheiden. Der von der Porosität beeinflusste Dampfzutritt ins Innere einer Schüttung kann zu einer Mindestbedampfungszeit führen. Bei eigenen Versuchen erforderte das Beispiel "ganzer schwarzer Pfeffer" einer Schütthöhe von 25 mm eine Mindestbedampfungszeit von 10 s [45]. Eine Verlängerung der Bedampfungszeit auf bis zu 20 s zeigte auch hier keine nennenswerte Zunahme der Keimzahlreduktion, was für sich genommen bereits ein starker Beleg für mechanische Entkeimungseffekte ist.

4.3 Modellierung der thermischen Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung bei nicht-isothermer Prozessführung

4.3.1 Ermittelte reaktionskinetische Parameter

Durch Modellierung der thermischen Inaktivierung während der mtVDV-Entkeimung sollte das Ausmaß der darüber hinaus auf tretenden mechanischen Entkeimungseffekte ermittelt werden. Die für die Modellierung benötigten reaktionskinetischen Parameter der thermischen Inaktivierung wurden durch Überlebenskurven aus Kapillarversuchen ermittelt. Die Abbn. 4.26 u. 4.27

zeigen je eine gemessene und eine nach Gl. 10 modellierte Überlebenskurve von *B. subtilis*- und *G. stearothermophilus*-Sporen (beide Typ III) in destilliertem Wasser bei 105°C bzw. 130°C. Bei beiden Überlebenskurven zeigt sich die für bakterielle Sporen typische zeitliche Verzögerung der thermischen Inaktivierung (Lag-Zeit t_{lag} , Kap. 2.2.3).

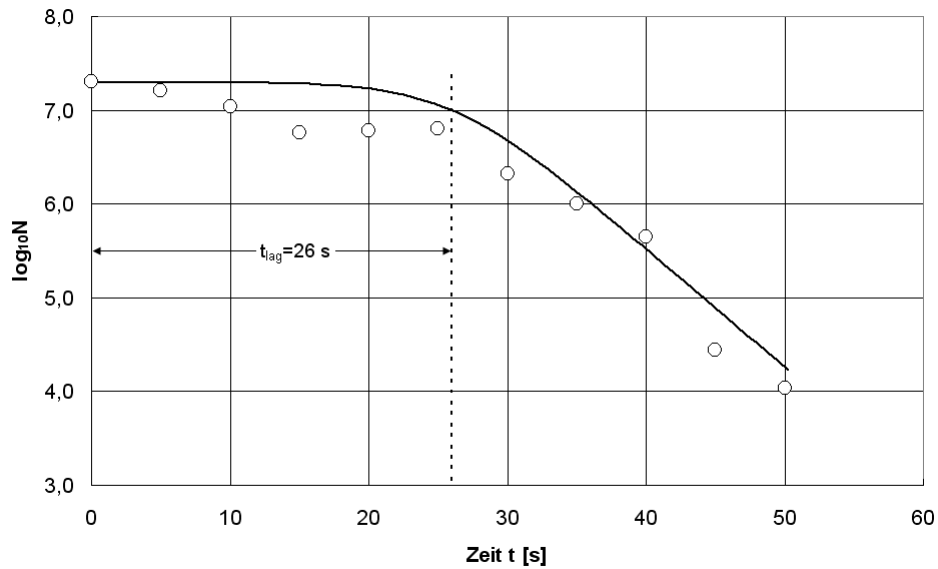


Abb. 4.26: Überlebenskurve $N(t)$ im Kapillarversuch mit *B. subtilis*-Sporen Typ III in destilliertem Wasser bei 105°C.

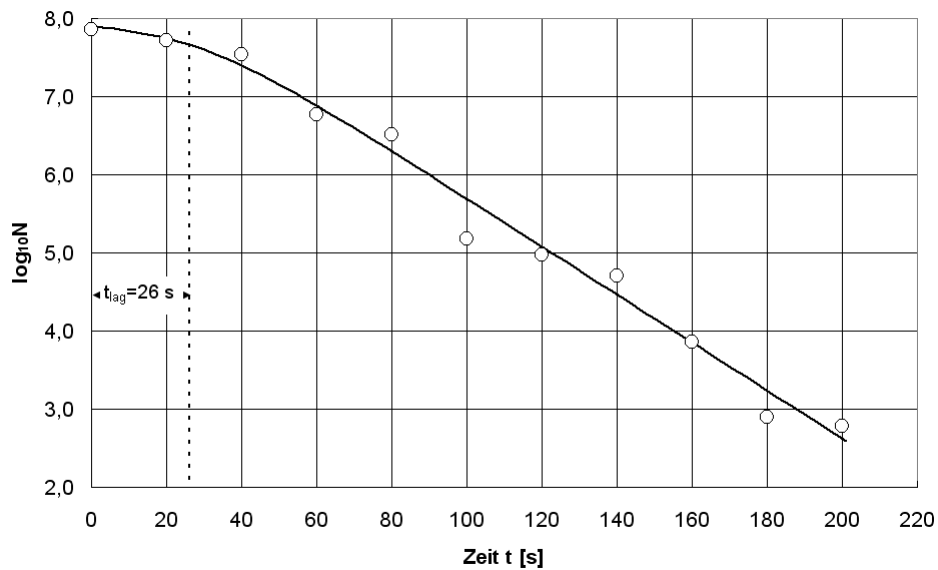


Abb. 4.27: Überlebenskurve $N(t)$ im Kapillarversuch mit *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III in destilliertem Wasser bei 130°C.

Anhand der ermittelten Überlebenskurven ergeben sich unter Verwendung der Gln. 10 u. 11 die temperaturabhängigen Lag-Zeiten der thermischen Inaktivierung, welche in Tab. 4.3 zusammengefasst dargestellt sind. Die experimentell ermittelten Lag-Zeiten unterliegen starken Schwankungen. Auch wurde nicht bei jedem Kapillarversuch eine Lag-Zeit festgestellt. Bezieht man die gemessenen Lag-Zeiten auf die jeweilige Inaktivierungstemperatur, zeigt sich bei allen untersuchten bakteriellen Sporen eine näherungsweise exponentielle Abnahme der Lag-Zeiten mit steigender Inaktivierungstemperatur (Abbn. 4.28 u. 4.29).

Tab. 4.3: Übersicht der durch Kapillarversuche ermittelten temperaturabhängigen Lag-Zeiten t_{lag} . ("-" bedeutet, keine Lag-Zeit festzustellen)

<i>B. megaterium</i> Typ I		<i>B. licheniformis</i> Typ I	
Temperatur [°C]	t_{lag} [s]	Temperatur [°C]	t_{lag} [s]
85	-/343/270/0	95	133/66/-/-
90	-/-/159/46	100	-/-/-/34
95	-/-/32/-	105	-/3/16
100	-/-/5/-	110	-/3/15/8
<i>B. subtilis</i> Typ III		<i>G. stearothermophilus</i> Typ III	
Temperatur [°C]	t_{lag} [s]	Temperatur [°C]	t_{lag} [s]
95	-/59/36	120	86/1060/660
100	45/40/13	125	37/222/57
105	9/26/6	130	23/-/26/94
110	5/16/6	135	-/28/5/-

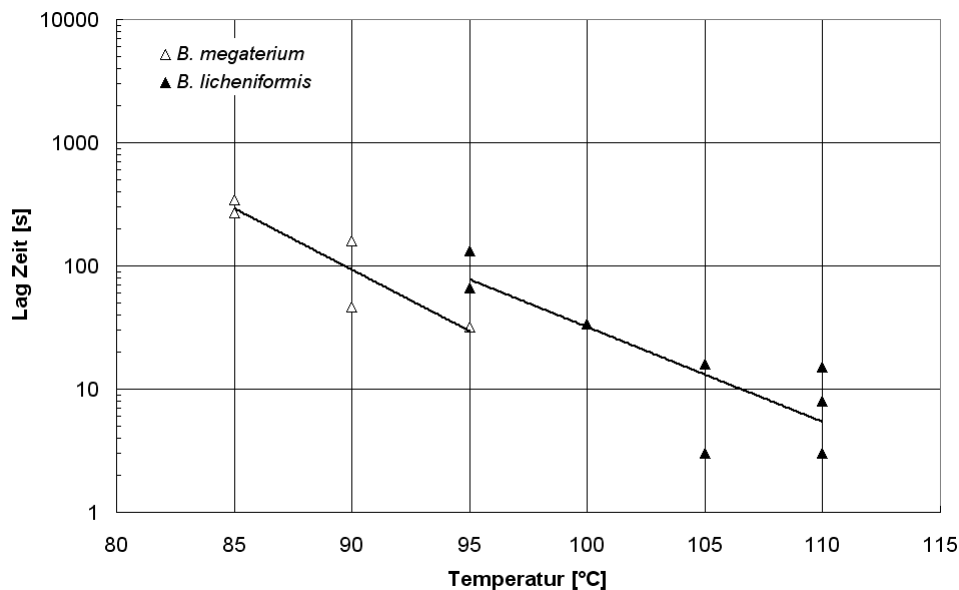


Abb. 4.28: Lag-Zeiten von *B. megaterium*- und *B. licheniformis*-Sporen (beide Typ I) bei der thermischen Inaktivierung in destilliertem Wasser.

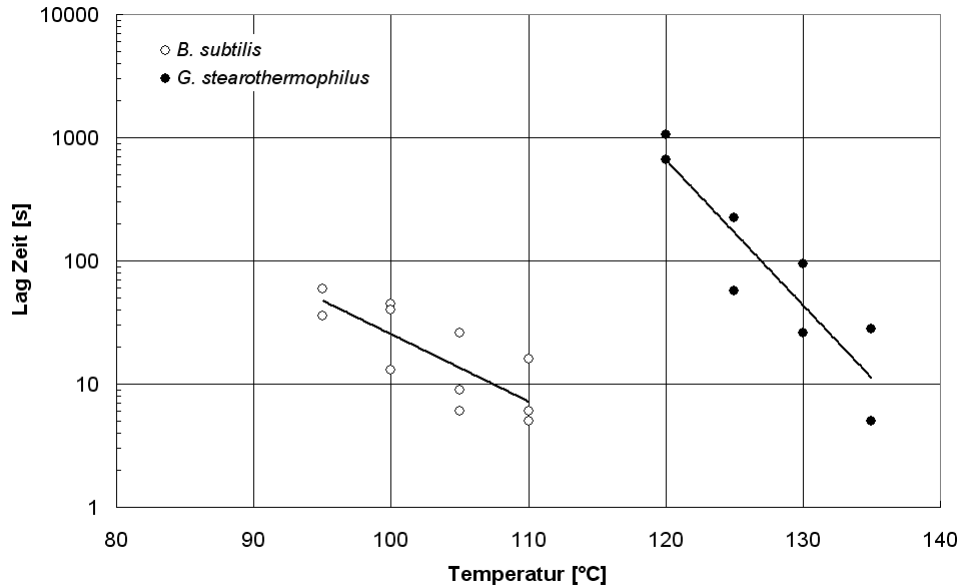


Abb. 4.29: Lag-Zeiten von *B. subtilis*- und *G. stearothermophilus*-Sporen (beide Typ III) bei der thermischen Inaktivierung in destilliertem Wasser.

Nach Gl. 26 lassen sich die temperaturabhängigen Lag-Zeiten berechnen. Die Parameter a und b für die untersuchten Sporen von *Bacillus sp.* sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

$$t_{lag}(\vartheta) = ae^{b\vartheta} \quad (26)$$

Tab. 4.4: Parameter für die Ermittlung der Lag-Zeiten der thermischen Inaktivierung in destilliertem Wasser für Sporen von *Bacillus sp.* nach einer mathematischen Anpassung.

Sporen von	a [s]	b [°C ⁻¹]
<i>B. megaterium</i> Typ I	$9 \cdot 10^{10}$	-0,2293
<i>B. licheniformis</i> Typ I	$2 \cdot 10^9$	-0,1776
<i>B. subtilis</i> Typ III	$7 \cdot 10^6$	-0,1257
<i>G. stearothermophilus</i> Typ III	$1 \cdot 10^{17}$	-0,2719

Aus dem linearen Abschnitt der Überlebenskurven wurden die temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten $k(T)$ nach einer Reaktion erster Ordnung ermittelt. Die Abb. 4.30-4.33 zeigen die Arrheniusdiagramme $\ln k = f(T^{-1})$ der thermischen Inaktivierung für die untersuchten Sporen von *Bacillus sp.* aus denen die Parameter Frequenzfaktor k_0 (Achsenabschnitt) und Aktivierungsenergie E_A ermittelt werden.

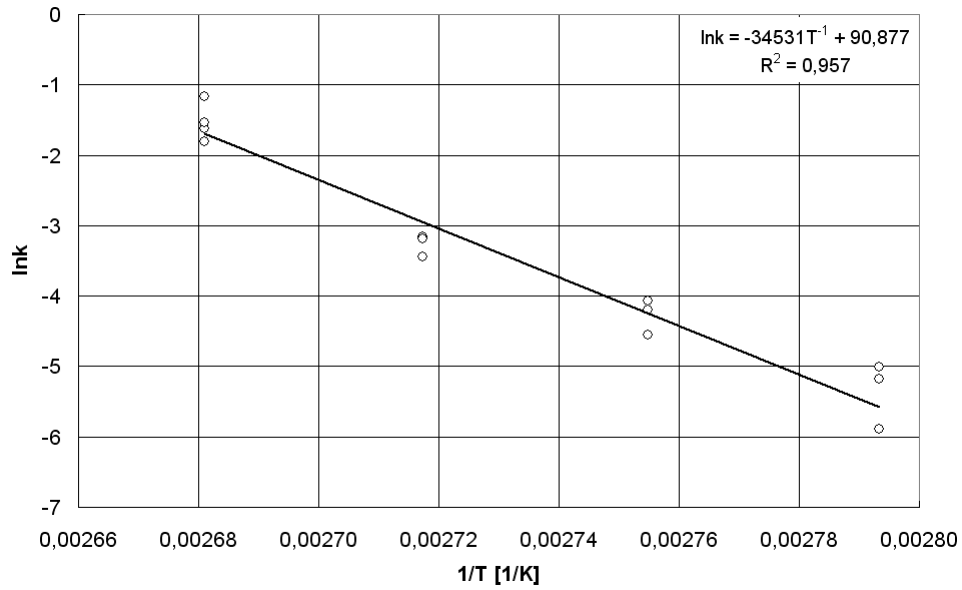


Abb. 4.30: Arrheniusdiagramm $\ln k=f(T^{-1})$ der thermischen Inaktivierung von *B. megaterium*-Sporen Typ I in destilliertem Wasser.

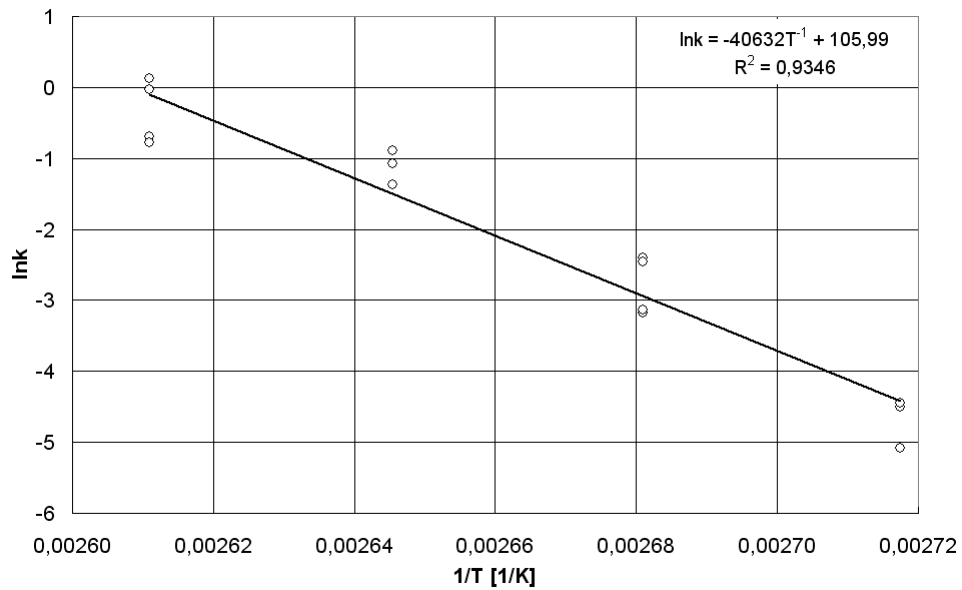


Abb. 4.31: Arrheniusdiagramm $\ln k=f(T^{-1})$ der thermischen Inaktivierung von *B. licheniformis*-Sporen Typ I in destilliertem Wasser.

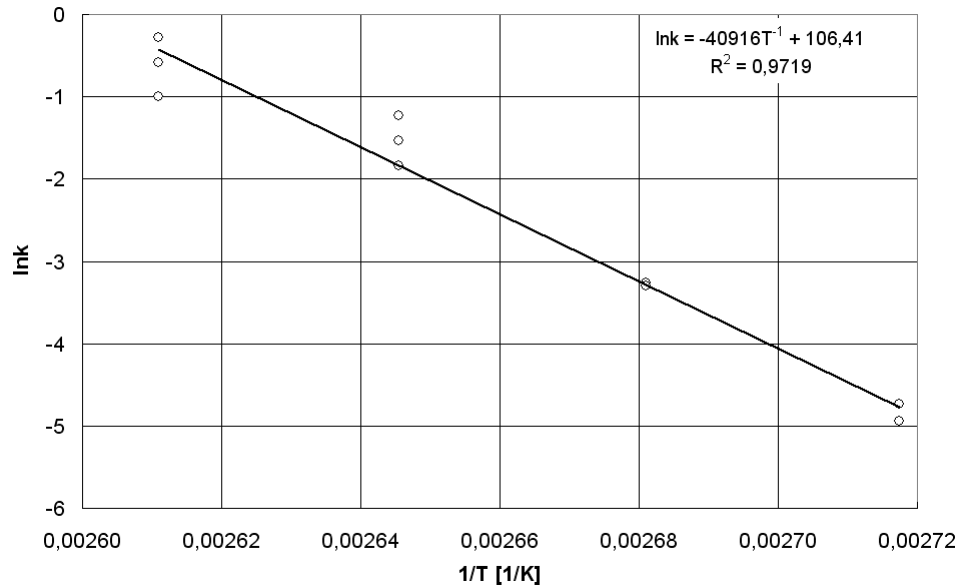


Abb. 4.32: Arrheniusdiagramm $\ln k=f(T^{-1})$ der thermischen Inaktivierung von *B. subtilis*-Sporen Typ III in destilliertem Wasser.

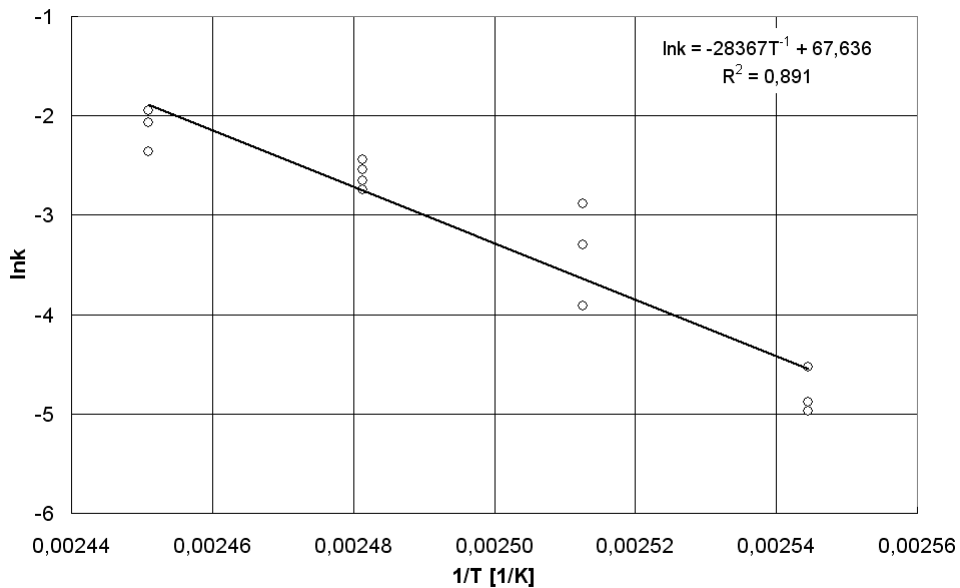


Abb. 4.33: Arrheniusdiagramm $\ln k=f(T^{-1})$ der thermischen Inaktivierung von *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III in destilliertem Wasser.

In Tab. 4.5 sind die gemäß Gl. 7 ermittelten reaktionskinetischen Parameter k_0 und E_A der thermischen Inaktivierung zusammengefasst. Die ermittelten Aktivierungsenergien liegen im für eine thermischen Inaktivierung erwarteten Bereich von 200-400 kJ mol⁻¹ [37].

Tab. 4.5: Reaktionskinetische Parameter Aktivierungsenergie E_A und Frequenzfaktor k_0 der thermischen Inaktivierung von *Bacillus sp.*-Sporen in destilliertem Wasser im linearen Abschnitt der Überlebenskurven.

Sporen von	E_A [kJ mol ⁻¹]	k_0 [s ⁻¹]
<i>B. megaterium</i> Typ I	287	$2,93 \cdot 10^{39}$
<i>B. licheniformis</i> Typ I	338	$1,07 \cdot 10^{46}$
<i>B. subtilis</i> Typ III	340	$1,63 \cdot 10^{46}$
<i>G. stearothermophilus</i> Typ III	236	$2,36 \cdot 10^{29}$

4.3.2 Modellierung der thermischen Inaktivierung auf Basis der Modellträgeroberflächentemperatur

Die mit den reaktionskinetischen Parametern der Tabn. 4.4 u. 4.5 ermittelte relative Keimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Temperatur unter isothermen Bedingungen und einer Inaktivierungszeit von 10 s (entspricht der reinen Bedampfungszeit während einer mtVDV-Entkeimung) ist in Abb. 4.34 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass Sporen von *B. megaterium* die niedrigste und Sporen von *G. stearothermophilus* die höchste thermische Resistenz aufweisen. Die thermische Resistenz von *B. licheniformis*- und *B. subtilis*- Sporen ist ähnlich.

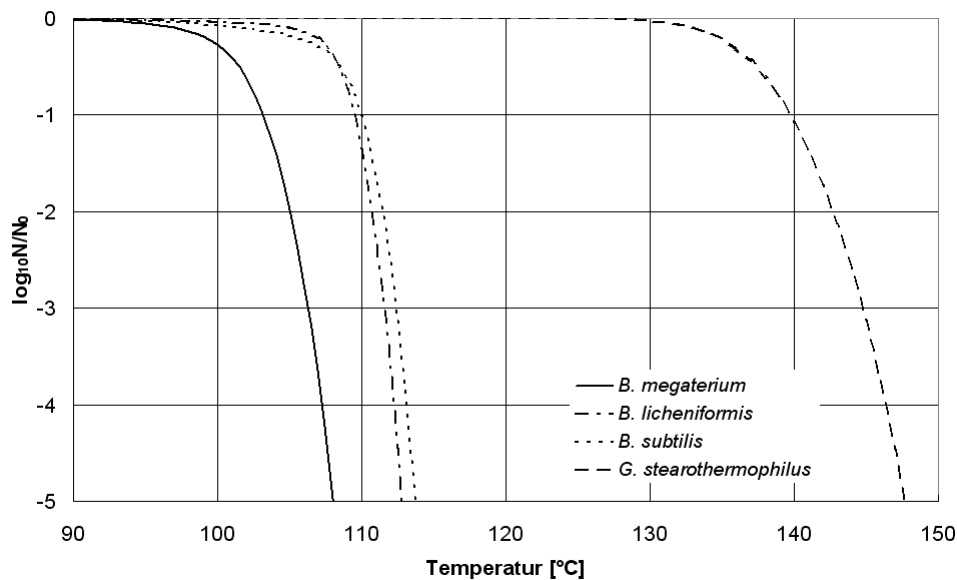


Abb. 4.34: Vergleich der auf Basis der reaktionskinetischen Parameter berechneten thermischen Inaktivierung N/N_0 von *Bacillus sp.*-Sporen nach 10 s in destilliertem Wasser unter isothermen Bedingungen (Berechnung nach dem Modell von Baranyi&Roberts).

Die thermische Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung verläuft jedoch unter nicht-isothermen Bedingungen, was in der folgenden Modellierung berücksichtigt wurde. Hierzu wurden zwei Thermoelemente auf der Modellträgeroberfläche sowie ein Thermoelement im Behandlungsraum fixiert. Für verschiedene Satttdampftemperaturen wurden bei einer Bedampfungszeit von 10 s Temperatur-Zeit-Protokolle aufgezeichnet. Mit Hilfe dieser Temperatur-Zeit-Protokolle sowie den reaktionskinetischen Parametern aus den Kapillarversuchen erfolgt die Modellierung der zu erwartenden thermischen Inaktivierung während der mtVDV-Entkeimung. Die Abb. 4.35 zeigt exemplarisch Temperatur-Zeit- sowie Druck-Zeit-Profile bei einer Satttdampf Temperatur von 135°C. Während des Vorvakuums zeigen alle Temperatursensoren erwartungsgemäß annähernd die gleiche Temperatur. Deutliche Unterschiede zeigen sich während der Druckphase. Der Temperatursensor im Behandlungsraum strebt relativ schnell gegen 135°C. Die beiden auf der Modellträgeroberfläche fixierten Temperatursensoren zeigen einen deutlich langsameren Anstieg der Oberflächentemperatur, was u.a. auf die Wärmeleitung in das Innere des Glasträgers zurückzuführen ist. Das Aufheizen des Modellträgers ist im gewählten Beispiel nach etwa 5 s Bedampfungszeit beendet.

Die Temperaturabnahme zu Beginn des Nachvakuums verläuft bei allen Temperatursensoren annähernd identisch. Bereits nach ein bis zwei Sekunden Nachvakuum hat die Glasoberfläche aufgrund des Kühleffekts durch Wiederverdampfung des Kondensates eine Temperatur von weniger als 60°C angenommen. Dies ist im Hinblick auf eine Produktschonung von temperaturempfindlichen Produkten äußerst günstig. Des Weiteren ist in Abb. 4.35 die für die Bedampfungszeit gemittelte Temperatur eingezeichnet. Diese stellt das arithmetische Mittel der Behandlungsraumtemperaturen dar, wobei nur Temperaturen >80°C berücksichtigt wurden. Unterhalb von 80°C kann die thermische Inaktivierung von bakteriellen Sporen als vernachlässigbar klein betrachtet werden.

Die auf Basis der Temperatur-Zeit-Protokolle der Modellträgeroberfläche und unter Verwendung der reaktionskinetischen Parameter aus den Kapillarversuchen ermittelte rein thermische Inaktivierung ist in Abb. 4.36 beispielhaft für eine mtVDV-Entkeimung von *B. licheniformis*-Sporen Typ I wiedergegeben. Die Keimzahlreduktion wird für jedes Messzeitintervall nach den in Kap. 3.5 formulierten Bedingungen berechnet. Die während der mtVDV-Entkeimung gewählte Messwertfrequenz von 1 kHz entspricht einer Intervallbreite von 1ms. Die maximale Temperatur der Modellträgeroberfläche sowie der Behandlungsraumtemperatur beträgt 112,4°C, die gemittelte Behandlungsraumtemperatur beträgt 110°C. Hierbei wurde eine Keimzahlreduktion von $1,0 \cdot 10^7$ auf $4,6 \cdot 10^2$ Sporen/Träger berechnet, was einer relativen Keimzahlreduktion von ca. 4,3 Dekaden entspricht.

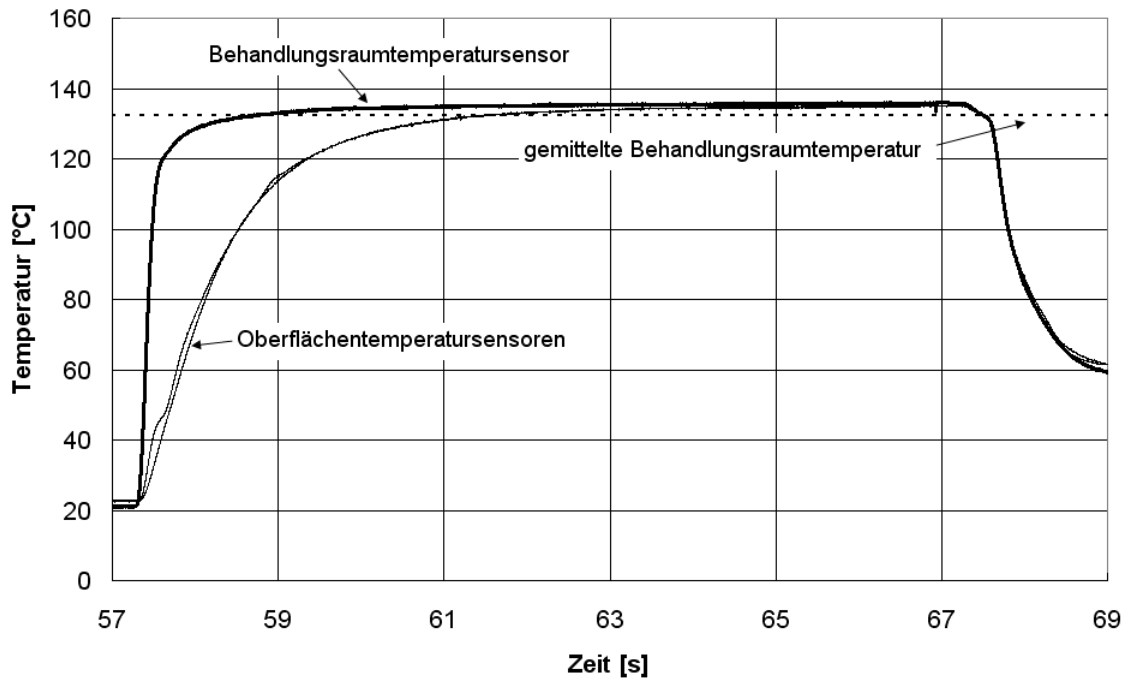


Abb. 4.35: Temperatur-Zeit- bzw. Druck-Zeit-Profil einer mtVDV-Behandlung bei einer mittleren Behandlungsraumtemperatur von 132°C ($\vartheta_{\text{Sattdampf}}=135^\circ\text{C}$). t_{VV} , t_{D} , $t_{\text{NV}}=45$ s, 10 s, 80 s.

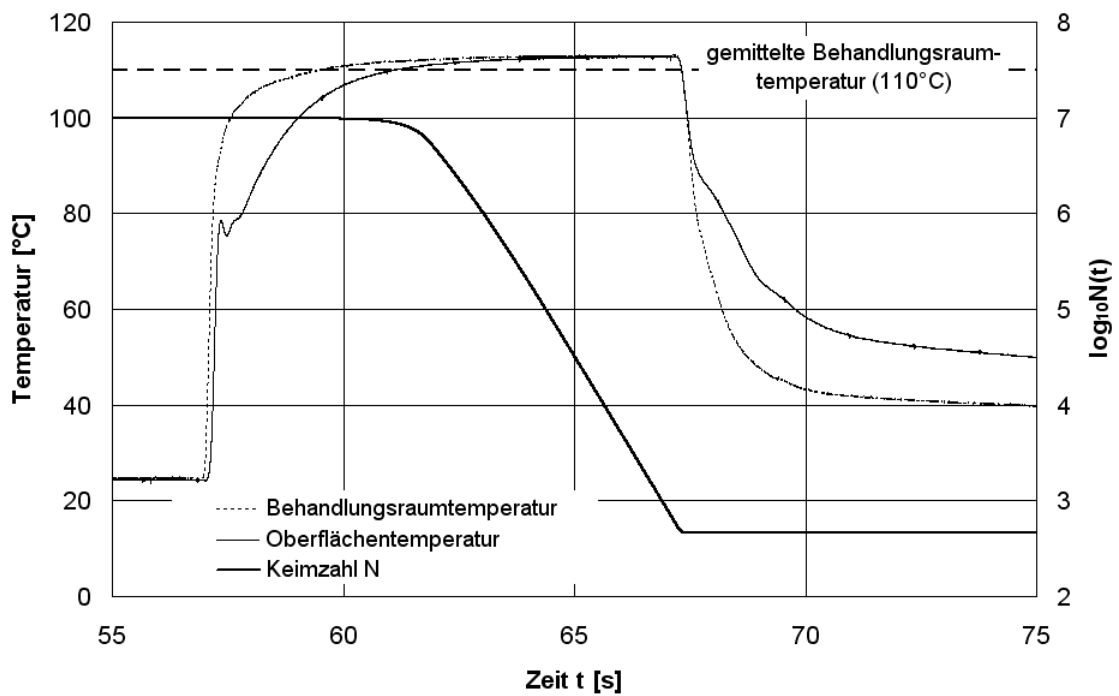


Abb. 4.36: Temperatur-Zeit- bzw. Keimzahl-Zeit-Profile einer mtVDV-Entkeimung von Modellträgern mit Sporen von *B. licheniformis* Typ I bei 110°C. Ausschnitt (55.-75. Sekunde). t_{VV} , t_{D} , $t_{\text{NV}}=45$ s, 10 s, 80 s.

Die Abbn. 4.37-4.40 zeigen die modellierte thermische Inaktivierung während der mtVDV-Entkeimung mit und ohne Berücksichtigung der Lag-Zeiten nach dem nicht-isothermen Ansatz. Wie die mtVDV-Entkeimungsergebnisse wird auch die modellierte thermische Inaktivierung auf die mittlere Temperatur $\vartheta > 80^\circ\text{C}$ im Behandlungsraum während der Bedampfungsphase bezogen. Im Gegensatz zur isothermen Modellierung werden beim nicht-isothermen Ansatz auch Temperaturen oberhalb der mittleren Behandlungsraumtemperatur berücksichtigt. Da die thermische Inaktivierung exponentiell mit der Temperatur steigt, ist deren Ausmaß unter nicht-isothermen Bedingungen größer als unter isothermen Bedingungen (vgl. Abb. 4.34). Einen deutlichen Einfluss auf die modellierte thermische Inaktivierung zeigt die Lag-Zeit lediglich bei Sporen von *B. licheniformis* Typ I und *G. stearothermophilus* Typ III. Die Lag-Zeiten bei Sporen von *B. megaterium* Typ I und *B. subtilis* Typ III sind offenbar so klein, dass sie das Ausmaß der thermischen Inaktivierung während der mtVDV-Entkeimung nur unwesentlich beeinflussen.

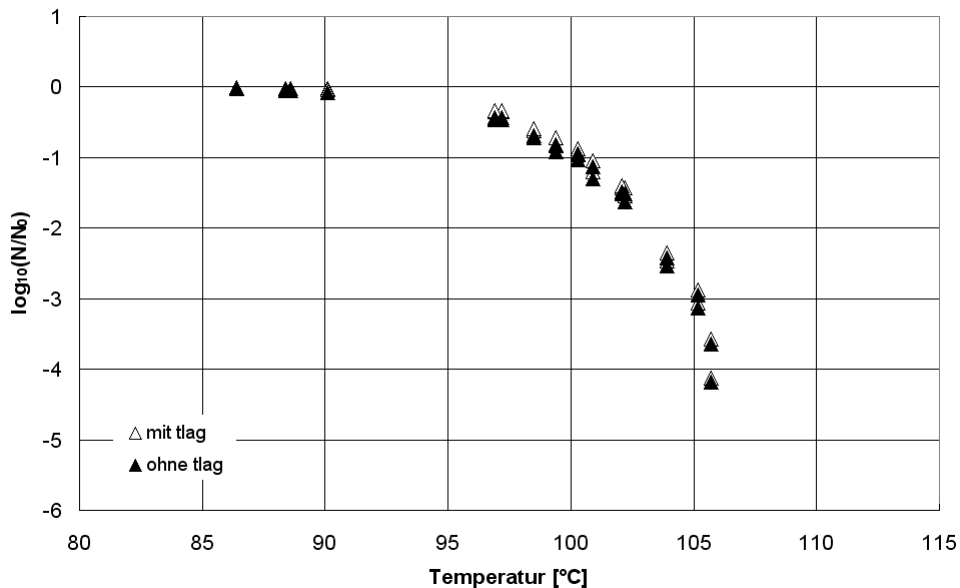


Abb. 4.37: Mit und ohne Lag-Zeit modellierte thermische Inaktivierung (nicht-isothermer Ansatz) für *B. megaterium*-Sporen Typ I auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

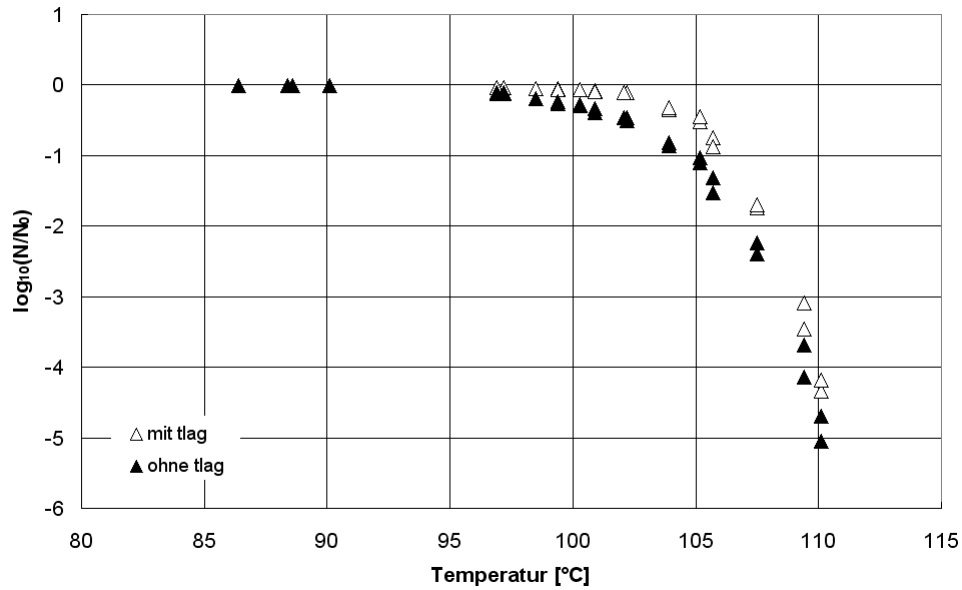


Abb. 4.38: Mit und ohne Lag-Zeit modellierte thermische Inaktivierung (nicht-isothermer Ansatz) für *B. licheniformis*-Sporen Typ I auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

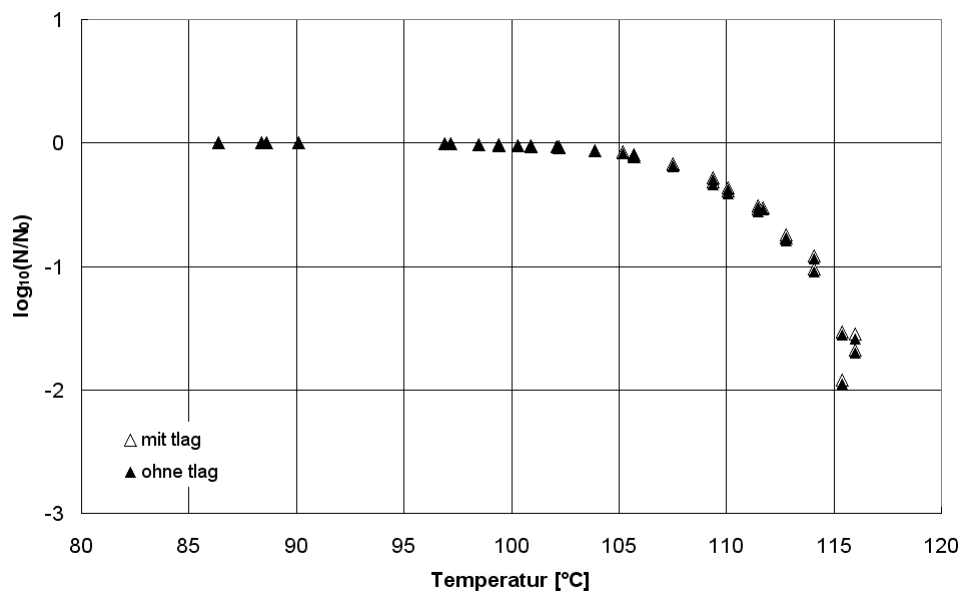


Abb. 4.39: Mit und ohne Lag-Zeit modellierte thermische Inaktivierung (nicht-isothermer Ansatz) für *B. subtilis*-Sporen Typ III auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

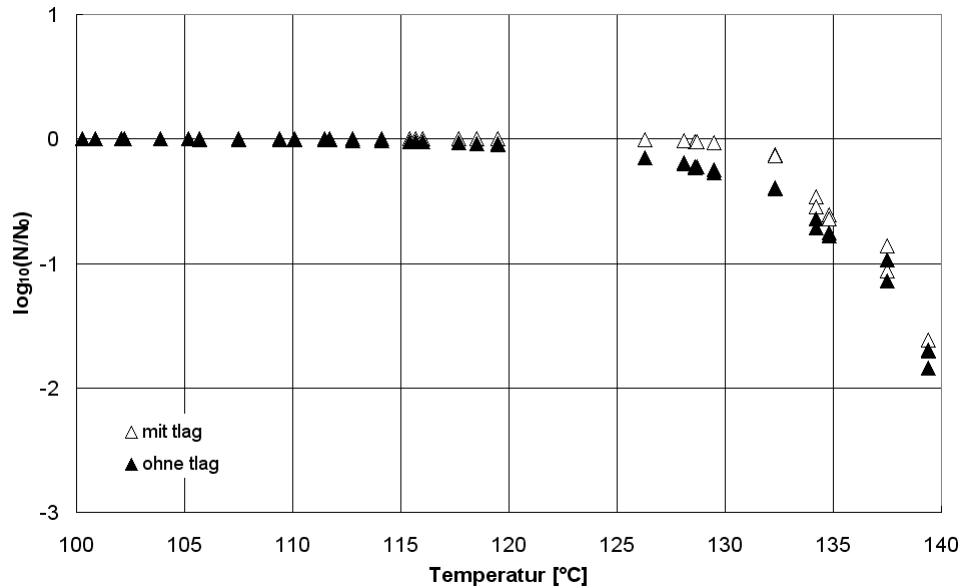


Abb. 4.40: Mit und ohne Lag-Zeit modellierte thermische Inaktivierung (nicht-isothermer Ansatz) für *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsräumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

In den Abbn. 4.41-4.44 ist die modellierte rein thermische Inaktivierung mit berücksichtigter Lag-Zeit während der mtVDV-Entkeimung zusammen mit der experimentell ermittelten relativen Gesamtkeimzahlreduktion dargestellt. Dabei deuten sich bei Sporen von *B. megaterium* mechanische Entkeimungseffekte (Differenz zwischen der Gesamtkeimzahlreduktion und der rein thermischen Inaktivierung) für Temperaturen bis ca. 100°C an (Abb. 4.41). Offenbar werden aufgrund der geringen thermischen Resistenz bei höheren Temperaturen die mechanischen Entkeimungseffekte durch stark ausgeprägte thermische Entkeimungseffekte überlagert.

Für Sporen von *B. licheniformis* Typ I zeigt sich eine große Übereinstimmung der Gesamtkeimzahlreduktion mit der modellierten rein thermischen Inaktivierung (Abb. 4.42). Dies lässt darauf schließen, dass die mechanischen Entkeimungseffekte im Verhältnis zu den thermischen Entkeimungseffekten deutlich geringer sind. Offenbar können die Haftkräfte zwischen den Sporen und der Modellträgeroberfläche bei den gewählten Bedingungen ($\vartheta < 115^\circ\text{C}$) noch nicht in einem wesentlichen Maße überwunden werden.

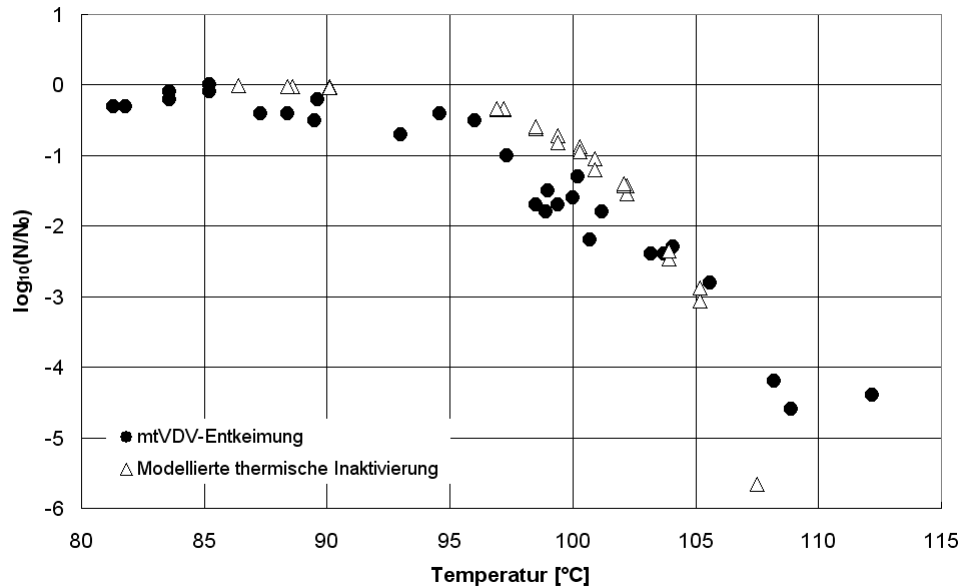


Abb. 4.41: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 nach einer mtVDV-Entkeimung und modellierte thermische Inaktivierung für *B. megaterium*-Sporen Typ I auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$.

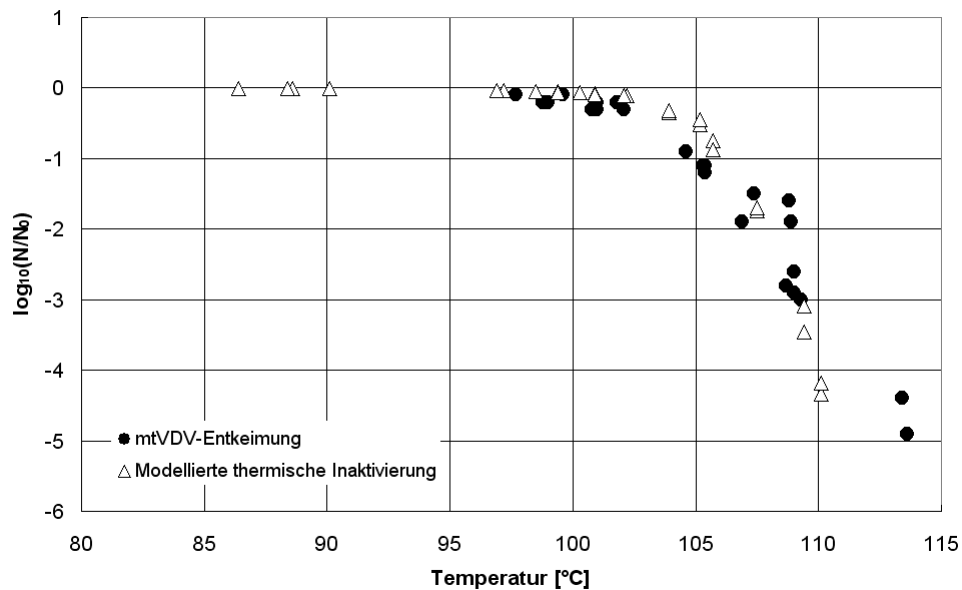


Abb. 4.42: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 nach einer mtVDV-Entkeimung und modellierte thermische Inaktivierung für *B. licheniformis*-Sporen Typ I auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^8 \text{ cm}^{-2}$.

Anders verhält es sich bei den Modellträgern mit Sporen von *B. subtilis* Typ III und *G. stearothermophilus* Typ III (Abbn. 4.43 u. 4.44). Hier zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen der experimentell ermittelten relativen Gesamtkeimzahlreduktion durch die mtVDV-Entkeimung und der modellierten rein thermischen Inaktivierung. Diese Unterschiede können als das Ausmaß der mechanischen Entkeimungseffekte (ME) angesehen werden. So ist beispielsweise die relative Gesamtkeimzahlreduktion für Sporen von *B. subtilis* Typ III bei ca. 110°C um mehr als eine Dekade größer als die modellierte rein thermische Inaktivierung. Bei Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III beträgt der Unterschied zwischen der relativen Gesamtentkeimung und der rein thermischen Inaktivierung bei ca. 135°C sogar mehr als zwei Dekaden. Offenbar können hier die systemspezifischen Haftkräfte durch die ablösenden Kräfte während der Flash-Verdampfung überwunden werden und führen so zu deutlichen mechanischen Entkeimungseffekten.

Für Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III korrelieren diese Ergebnisse mit den bildanalytischen Untersuchungen (Kap. 4.1.3) und den gemessenen Haftkräften (Kap. 4.2.2), jedoch nicht für Sporen von *B. subtilis* Typ III. Ein bildanalytischer Nachweis der Abtrennung von der Modellträgeroberfläche ist für *B. subtilis*-Sporen Typ III allerdings nicht gegeben (Kap. 4.1.3). Auch weist die im Vergleich zu *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III deutlich höhere mittlere Haftkraft von *B. subtilis* Sporen Typ III eher darauf hin, dass die mechanischen Entkeimungseffekte erst bei sehr hohen Sattedampftemperaturen einsetzen können.

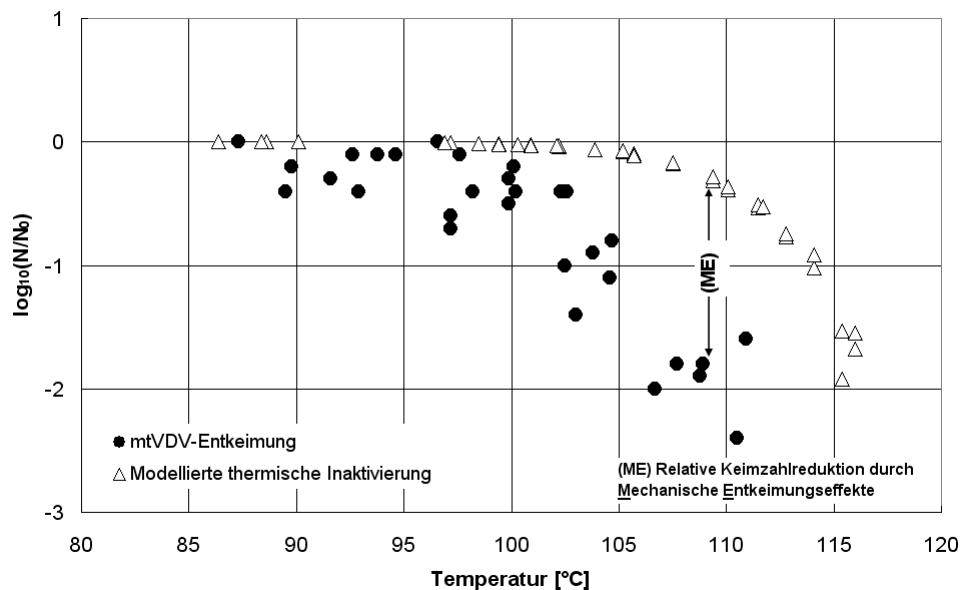


Abb. 4.43: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung und modellierte thermische Inaktivierung für *B. subtilis*-Sporen Typ III auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$.

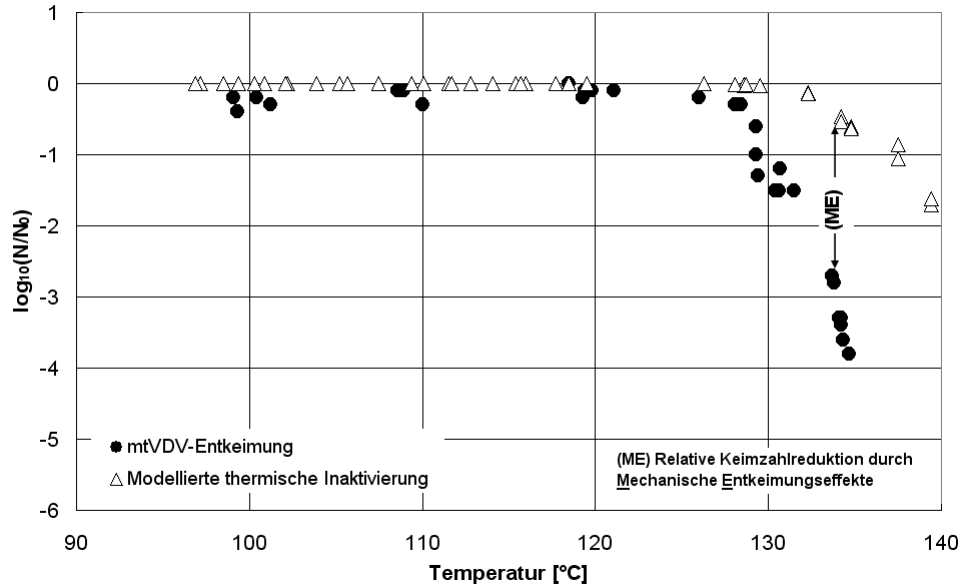


Abb. 4.44: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung und modellierte thermische Inaktivierung für *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$.

Vereinzelt ist für Sporen von *B. megaterium* Typ I (4.41) und *B. licheniformis* Typ I (Abb. 4.42) die experimentell ermittelte Keimzahlreduktion kleiner als die modellierte rein thermische Inaktivierung. Selbst bei Abwesenheit von mechanischen Entkeimungseffekten muss dann die thermische Inaktivierung die experimentell ermittelte Keimzahlreduktion wiedergeben.

Das Ergebnis der Modellierung der thermischen Inaktivierung hängt von zahlreichen Einflussgrößen ab (Abb. 4.45). Es werden physikalische, biologische und mathematische Einflüsse unterschieden. Bei den physikalischen Einflüssen sind beispielsweise der Wärmeübergang und die Wärmeleitung ins Innere des Modellträgers während der Bedampfungsphase der mtVDV-Entkeimung zu nennen. Durch Messung der Modellträgeroberflächentemperatur während der mtVDV-Entkeimung ist eine wesentliche physikalische Einflussgröße erkannt und berücksichtigt worden. Die für bakterielle Sporen typische zeitliche Verzögerung der thermischen Inaktivierung (Lag-Zeit) sowie der instationäre Temperaturverlauf wurden durch Verwendung des Inaktivierungsmodells von Baranyi & Roberts berücksichtigt. Die biologischen Einflussgrößen Adhäsion und insbesondere der a_w -Wert auf den Modellträgern (Kap. 2.3.3) konnten bisher nicht einbezogen werden. Vor der Bedampfungsphase liegen die Sporen in einer trockenen Umgebung auf der Modellträgeroberfläche vor (kleiner a_w -Wert). Durch Sattedampfzufuhr in den Behandlungsraum und der damit verbundenen Kondensatbildung (hoher a_w -Wert) kann der Wassergehalt der Sporen steigen, was sich in einer Änderung der thermischen Resistenz widerspiegeln sollte (Kap. 2.2.1).

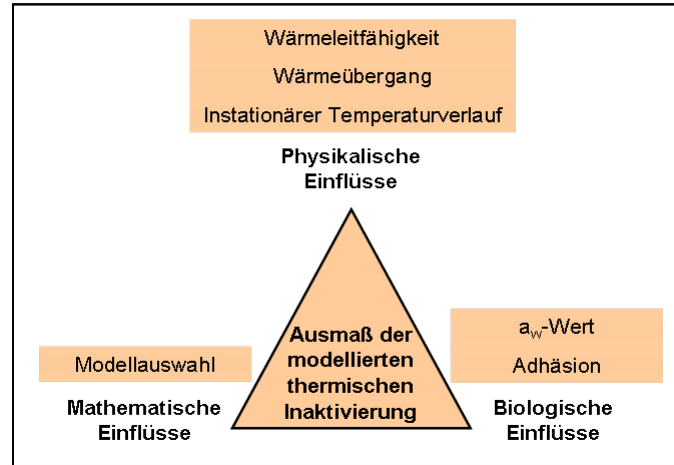


Abb. 4.45: Einflussgrößen auf das modellierte Ausmaß der thermischen Inaktivierung während einer mtVDV-Entkeimung.

Es ist somit anzunehmen, dass das Ausmaß der thermischen Inaktivierung mit den zur Verfügung stehenden reaktionskinetischen Parametern aus den Kapillarversuchen (Sporen sind in destilliertem Wasser suspendiert, hoher a_w -Wert) und den in Kap. 3.5 definierten Randbedingungen zu hoch ist. Durch die Einführung von "Korrekturfaktoren" gemäß Gl. 27 wäre es mitunter möglich, das Ausmaß der bisherigen Modellierung ($N_{modelliert}$) noch weiter an die realen Bedingungen (N_{real}) während der mtVDV-Entkeimung anzupassen. Ob und wie solche, eventuell temperaturabhängigen, Faktoren z.B. für den a_w -Wert (f_{a_w}) oder für die Adhäsion ($f_{a_{adh}}$) experimentell zu ermitteln sind, ist derzeit nicht geklärt.

$$N_{real} = f_{a_w} \cdot f_{a_{adh}} \cdot N_{modelliert} \quad (27)$$

Es bleibt festzustellen, dass eine mtVDV-Entkeimung für eine bestimmte Keimzahlreduktion bei einer niedrigeren Temperatur oder kürzeren Bedampfungszeit durchgeführt werden könnte als eine klassisch thermische Sattdampfbehandlung. Dies ist hinsichtlich einer thermischen Produktschonung von entscheidender Bedeutung. Es gilt nun festzustellen, inwieweit sich die mtVDV-Entkeimung auf weitere Systeme anwenden lässt. Gute Ergebnisse konnten bereits mit dem für die Lebensmittelindustrie interessanten Testsystem "natürlich verkeimter Pfeffer" erzielt werden [45].

4.4 Bewusste Beeinflussung der Haftkräfte und der thermischen Inaktivierung durch Ionen

Die bei der Flash-Verdampfung zu überwindende Gesamthaftkraft setzt sich aus verschiedenen einzelnen Haftkräften zusammen (Kap. 2.3.2). Eine dieser Haftkräfte sind die elektrostatischen Wechselwirkungen. Durch Zugabe von Salzen zur Sporensuspension sollten diese elektrostatischen Wechselwirkungen gezielt beeinflusst werden. Nach dem Beimpfen der Modellträger mit der jeweiligen Sporensuspension wurden diese, wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, im Exsikkator getrocknet. Dabei verbleiben die in der Sporensuspension gelösten Salze auf dem Modellträger und gehen bei der Kondensatfilmbildung während der Bedampfung wieder in Lösung. Dies verändert die Ionenstärke des Kondensatfilms.

In den Abbn. 4.46 u. 4.47 ist die relative Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung für mit Sporen von *B. subtilis* Typ III und *G. stearothermophilus* Typ III beimpfte Modellträger bei An- und Abwesenheit von Ionen dargestellt. Dabei zeigt sich sowohl für *B. subtilis*-Sporen Typ III als auch für *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III eine Zunahme der relativen Keimzahlreduktion bei der Anwesenheit von Ionen. Nach Mazas et al. [51] nimmt die thermische Inaktivierung bei der eine Erhöhung der Ionenstärke ab. Schließlich wird der a_w -Wert abgesenkt, was die geringe thermische Inaktivierung erklärt. Offenbar können die Ionen im Kondensatfilm zu einer Reduktion der Gesamthaftkraft führen (Kap. 2.3.2). Somit werden niedrigere Satt-dampftemperaturen bzw. geringere ablösende Kräfte benötigt, um die Sporen von der Modellträgeroberfläche zu entfernen.

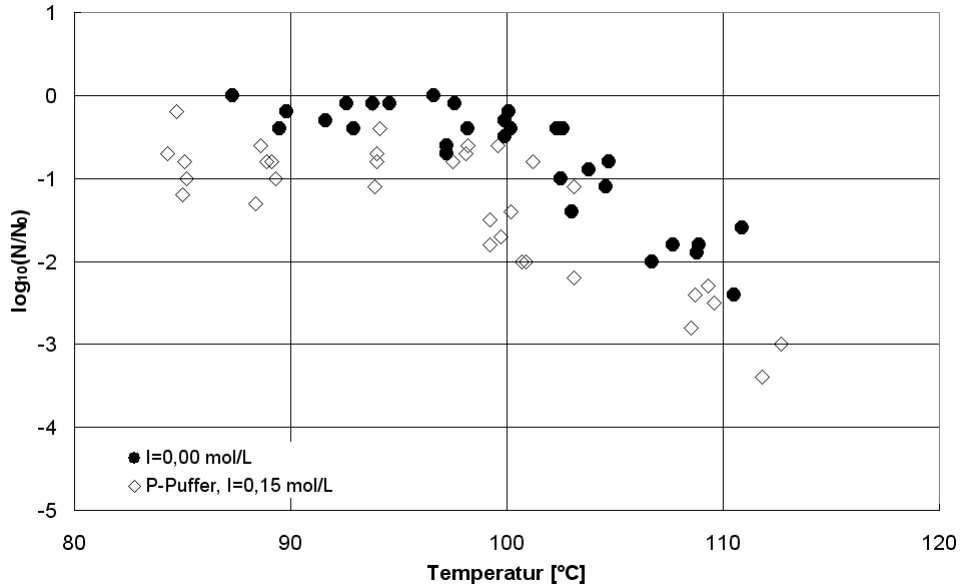


Abb. 4.46: Relative Keimzahlreduktion durch eine mtVDV-Entkeimung für Sporen von *B. subtilis* Typ III auf Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und der auf die Modellträger aufgetragenen Sporensuspensionen. P-Puffer (pH7, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $I=0,15 \text{ mol L}^{-1}$). t_{VV} , t_D , $t_{NV}= 45 \text{ s}$, 10 s , 80 s . $N_0 \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$.

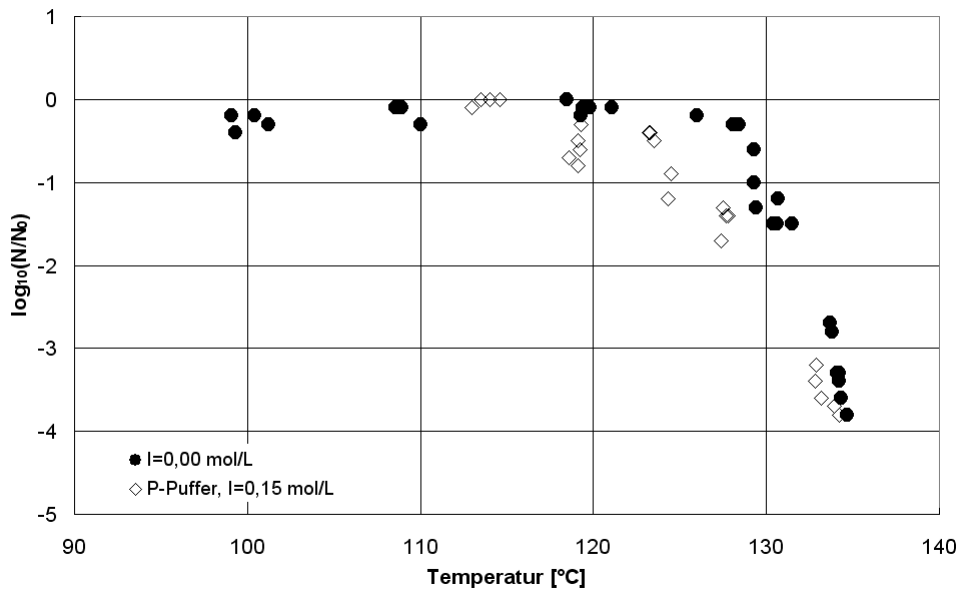


Abb. 4.47: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung für Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und der auf die Modellträger aufgetragenen Sporensuspensionen. P-Puffer (pH7, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $I=0,15 \text{ mol L}^{-1}$). t_{VV} , t_D , $t_{NV}= 45 \text{ s}$, 10 s , 80 s . $N_0 \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$.

In weiteren Untersuchungen wurde die Ionenstärke (NaCl) der für die mtVDV-Versuche verwendeten Sporensuspensionen gezielt variiert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die auf der Oberfläche der Modellträger aufliegenden Sporen (Abb. 4.48). Die nach dem Trocknen der beimpften Modellträger zurückbleibenden Sporen und Salzkristalle sind in Abb. 4.48b zu erkennen. Dabei liegen die Sporen auf dem Modellträger (Abb. 4.48c) und sind nicht an die Salzkristalle angelagert (Abb. 4.48d).

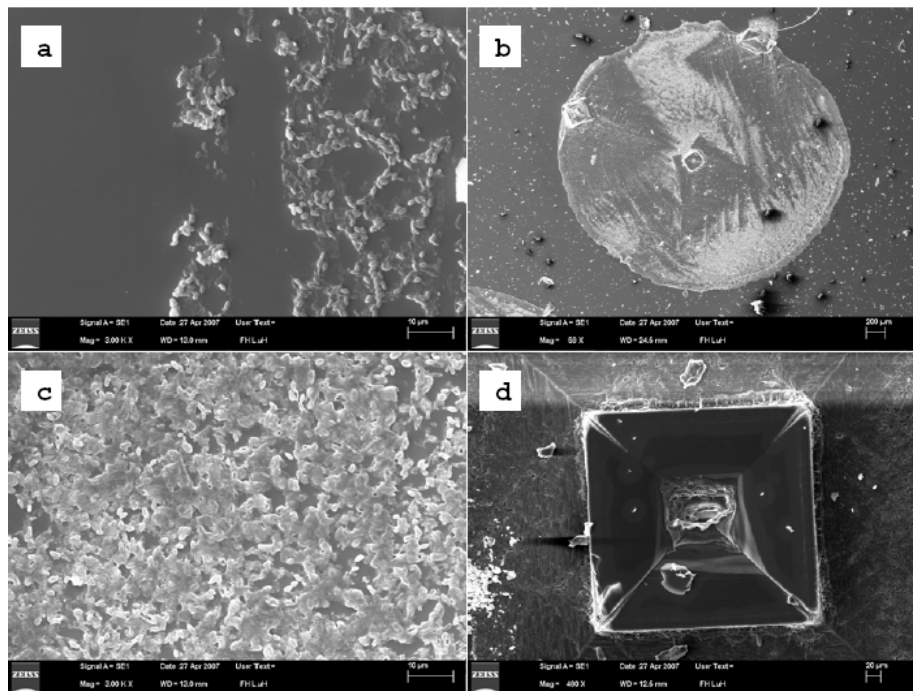


Abb. 4.48: REM-Aufnahmen von Modellträgern und angetrockneten Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III bei unterschiedlicher Ionenstärke (NaCl) der Sporensuspension. a: destilliertes Wasser $I = 0,0 \text{ mol L}^{-1}$, b: $I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, c/d: $I = 0,25 \text{ mol L}^{-1}$.

Die Abbn. 4.49 u. 4.50 zeigen die ermittelten relativen Keimzahlreduktionen für verschiedene Ionenstärken der Sporensuspensionen von *B. megaterium* und *B. licheniformis* (beide Typ III) in Abhängigkeit von der Temperatur. Für *B. megaterium* Typ I und *B. licheniformis* Typ I konnte keine Zunahme der relativen Keimzahlreduktion mit steigender Ionenstärke aufgezeigt werden. Sporen von *B. licheniformis* Typ I zeigen bei 110°C eher die nach Mazas et al. [51] erwartete Abnahme der Keimzahlreduktion bei einer rein thermischen Inaktivierung aufgrund der a_w -Wert-Reduktion bei Anwesenheit von Ionen. Offenbar können die Haftkräfte der Sporen von *B. megaterium* und *B. licheniformis* nicht dermaßen reduziert werden, dass die bei der Flash-Verdampfung auftretenden Kräfte ein Abtrennen der Sporen von der Modellträgeroberfläche ermöglichen.

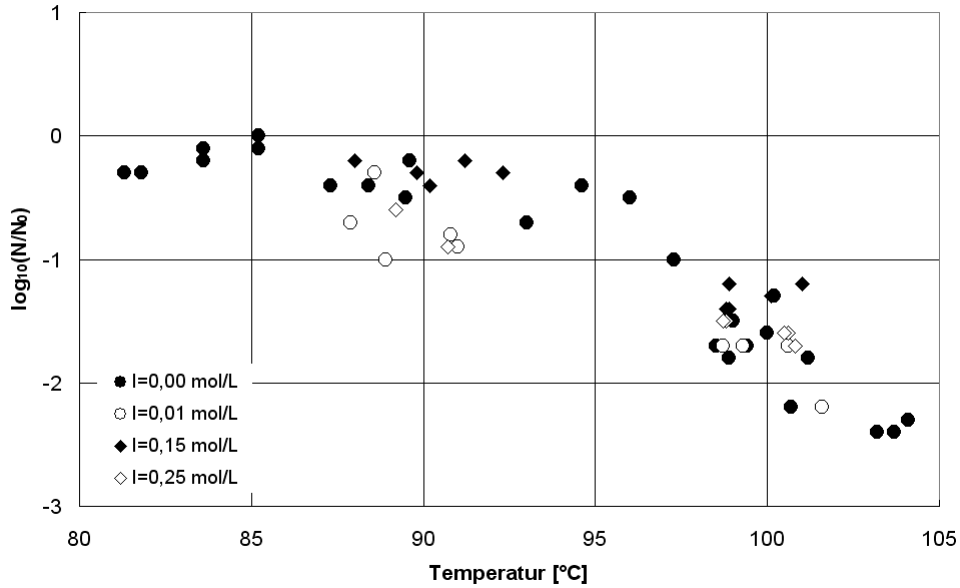


Abb. 4.49: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. megaterium*-Sporen Typ I belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und unter Variation der Zusammensetzung des während der Bedampfung gebildeten Kondensates. Die o.g. Ionenstärken für NaCl entsprechen den Ionenstärken der für die Beimpfung der Glasträger verwendeten Sporensuspensionen. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45$ s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7$ cm^{-2} .

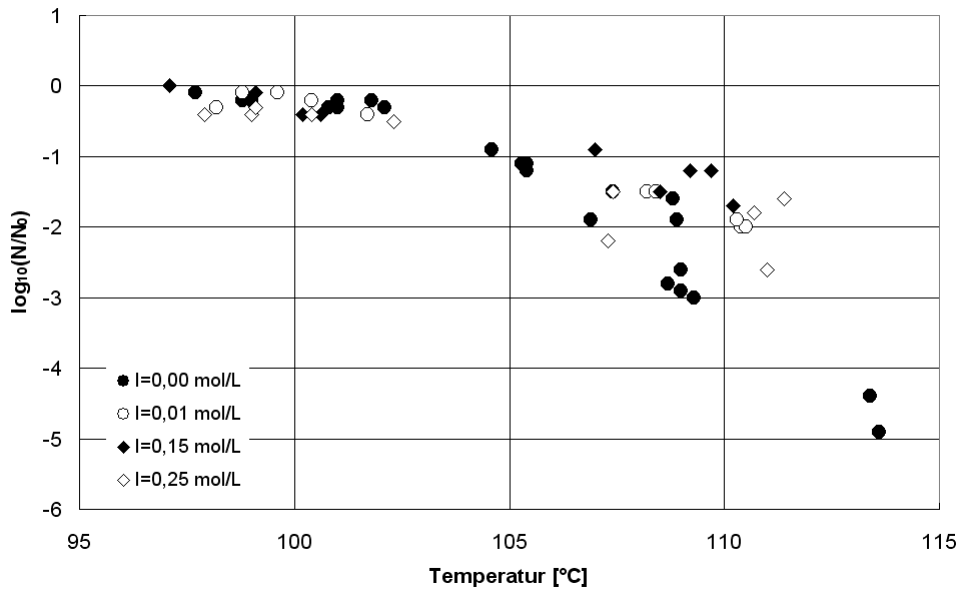


Abb. 4.50: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. licheniformis*-Sporen Typ I belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und unter Variation der Zusammensetzung des während der Bedampfung gebildeten Kondensates. Die o.g. Ionenstärken für NaCl entsprechen den Ionenstärken der für die Beimpfung der Glasträger verwendeten Sporensuspensionen. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45$ s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^8$ cm^{-2} .

Anders verhält es sich bei Sporen von *B. subtilis* Typ III (Abb. 4.51) und *G. stearotherophilus* Typ III (Abb. 4.52). Hier zeigt sich bei Ionenstärken von 0,15 und 0,25 mol L⁻¹ eine Zunahme der relativen Keimzahlreduktion. Bei Sporen von *B. subtilis* Typ III wurde dabei bei Temperaturen von über 105°C die mikrobiologische Nachweisgrenze (10³ mL⁻¹) wiederholt unterschritten, was einer Keimzahlreduktion von mind. drei Dekaden entspricht. Eine Ionenstärke von 0,01 mol L⁻¹ scheint die Haftkräfte nur unwesentlich zu reduzieren und führt somit nicht zu einer messbaren Zunahme der relativen Keimzahlreduktion.

Die Beeinflussung der mechanischen Entkeimungseffekte durch Ionen im Kondensatfilm auf der Produktoberfläche während der Bedampfungsphase der mtVDV-Entkeimung kann beispielsweise bei der Entkeimung von biologischen Materialien (z.B. Lebensmitteln) von Bedeutung sein. So ist es denkbar, dass während der Bedampfungsphase Ionen aus dem Produkt in den Kondensatfilm diffundieren und somit die Haftkräfte zwischen den oberflächlich vorhandenen Mikroorganismen und der Produktoberfläche verändern.

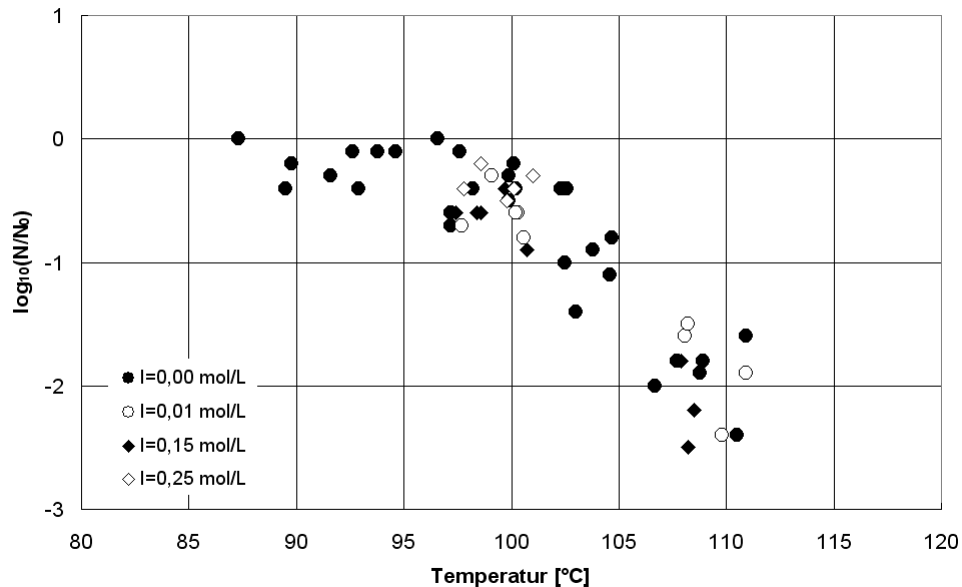


Abb. 4.51: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *B. subtilis*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und unter Variation der Zusammensetzung des während der Bedampfung gebildeten Kondensates. Die o.g. Ionenstärken für NaCl entsprechen den Ionenstärken der für die Beimpfung der Glasträger verwendeten Sporensuspensionen. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^6$ cm⁻².

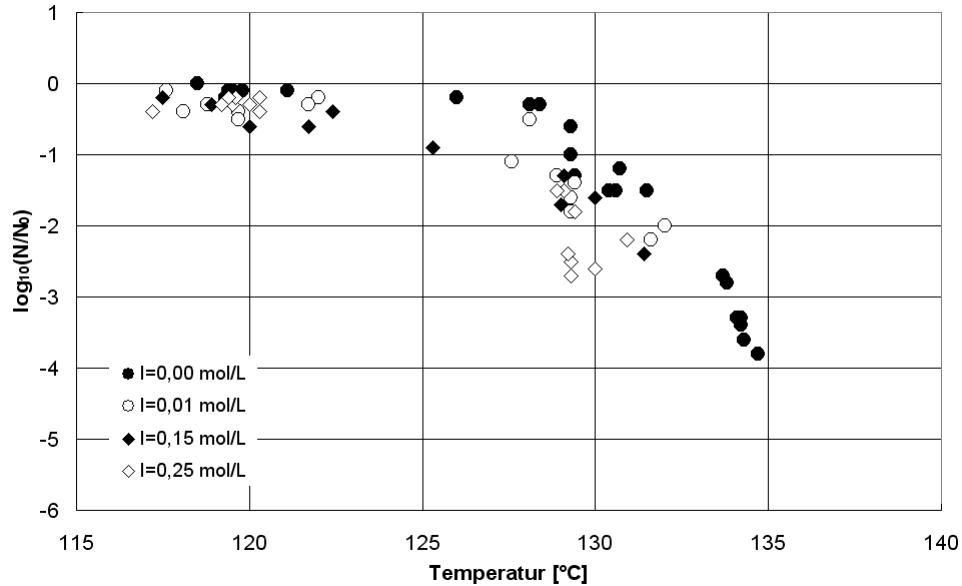


Abb. 4.52: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch eine mtVDV-Entkeimung von mit *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III belegten Modellträgern in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase und unter Variation der Zusammensetzung des während der Bedampfung gebildeten Kondensates. Die o.g. Ionenstärken für NaCl entsprechen den Ionenstärken der für die Beimpfung der Glasträger verwendeten Sporensuspensionen. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_0 \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$.

Wie erwähnt, steht die Zunahme der relativen Gesamtentkeimung bei einer mtVDV-Entkeimung bei der Anwesenheit von Ionen im Widerspruch zur rein thermischen Inaktivierung. Die rein thermische Inaktivierung nimmt erfahrungsgemäß mit Erhöhung der Ionenstärke ab, was durch eine Absenkung des Anteils an freiem, ungebunden Wasser begründet ist (a_w -Wert-Senkung) [51]. Durch Kapillarversuche wurde der Einfluss von NaCl-Ionen auf die rein thermische Inaktivierung von *B. subtilis*-Sporen Typ III untersucht. Dabei ergab sich die zu erwartende Reduktion der thermischen Inaktivierung durch eine Erhöhung der Ionenstärke von NaCl (Tab. 4.6). Sporen von *B. subtilis* Typ III zeigen bereits bei einer geringen Erhöhung der Ionenstärke eine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Eine Erhöhung der Ionenstärke auf bis zu $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ zeigt für Sporen von *B. subtilis* keine weitere Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Eine tendenzielle Zu- oder Abnahme der Lag-Zeiten in Abhängigkeit von der Ionenstärke kann anhand der ermittelten Werte nicht gezeigt werden (Tab. 4.7).

Tab. 4.6: Reaktionskinetische Parameter der thermischen Inaktivierung Aktivierungsenergie E_A und Frequenzfaktor k_0 von *B. subtilis*-Sporen Typ III im linearen Abschnitt der Überlebenskurven sowie die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k bei 110°C/383,15K in Abhängigkeit von der Ionenstärke I an NaCl der Sporensuspension.

Ionenstärke	E_A [kJ mol ⁻¹]	k_0 [s ⁻¹]	$k_{383,15K}$ [s ⁻¹]
0,00 mol L ⁻¹	340	$1,63 \cdot 10^{46}$	0,72
0,01 mol L ⁻¹	276	$7,43 \cdot 10^{36}$	0,17
0,15 mol L ⁻¹	256	$1,92 \cdot 10^{34}$	0,24
0,25 mol L ⁻¹	290	$5,98 \cdot 10^{38}$	0,17

Tab. 4.7: Übersicht der durch Kapillarversuche ermittelten temperaturabhängigen Lag-Zeiten t_{lag} [s] für *B. subtilis*-Sporen Typ III in Abhängigkeit von der Ionenstärke I . ("-" bedeutet, keine Lag-Zeit festzustellen).

Temperatur [°C]	$I=0,00$ mol L ⁻¹	$I=0,01$ mol L ⁻¹	$I=0,15$ mol L ⁻¹	$I=0,25$ mol L ⁻¹
95	-/59/36	-/-/-	-/-	-/-
100	45/40/13	-/-	-/-	39/-/51/143
105	9/26/6	8/18	-/-/27	-/38
110	5/16/6	8/14/13	11/-	13/-

In Abb. 4.53 ist die rein thermische Inaktivierung nach einer Reaktion erster Ordnung (Gln. 6 u. 7) für Sporen von *B. subtilis* Typ III in wässrigen Lösungen von NaCl unterschiedlicher Ionenstärke unter isothermen Bedingungen und einer Inaktivierungsdauer von 10 s mit Verwendung der reaktionskinetischen Parameter nach Tab. 4.6 dargestellt. Bereits ab einer Temperatur von 100°C zeigt sich die erwartete, deutlich geringere thermische Inaktivierung bei Anwesenheit von NaCl-Ionen. So ist die thermische Inaktivierung bei Anwesenheit von NaCl-Ionen bei 110°C um mehr als 2 Dekaden geringer als in destilliertem Wasser.

Beispielhaft wurden Kapillarversuche mit Sporen von *G. stearothermophilus* Typ III in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Sporensuspension bei 130°C durchgeführt. Auch hier ist die tendenzielle Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k mit zunehmender Ionenstärke erkennbar (Tab. 4.8). Im Gegensatz zu Sporen von *B. subtilis* Typ III zeigt sich eine Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erst bei einer Ionenstärke von 0,15 mol L⁻¹.

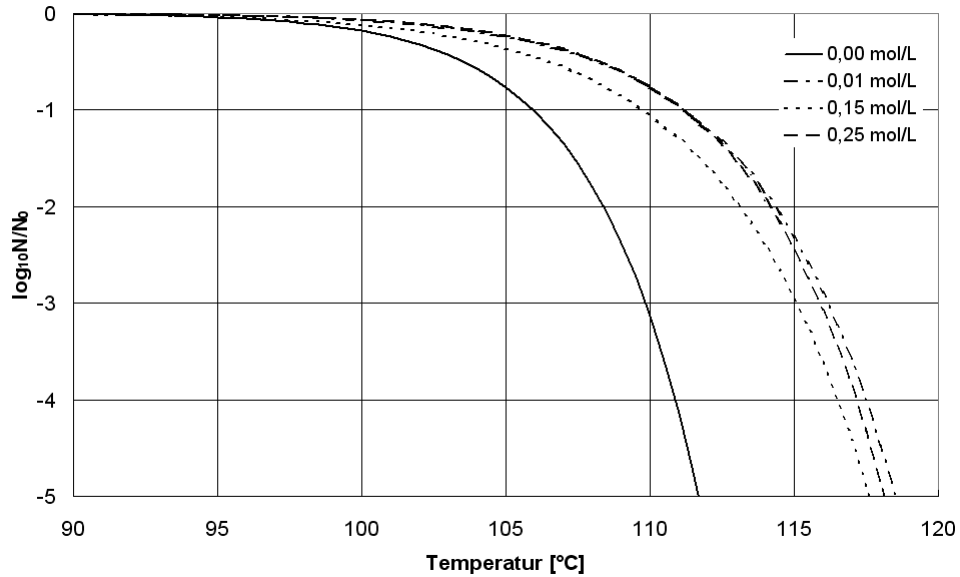


Abb. 4.53: Isotherme Inaktivierung N/N_0 von *B. subtilis*-Sporen Typ III nach 10 s in wässrigen Lösungen von NaCl mit verschiedenen Ionenstärken nach einer Reaktion 1. Ordnung.

Tab. 4.8: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k der thermischen Inaktivierung von *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III in NaCl-Lösungen verschiedener Ionenstärken bei $130^\circ\text{C}/403,15\text{K}$ im linearen Abschnitt der Überlebenskurven.

Ionenstärke	$k_{403,15\text{K}} [\text{s}^{-1}]$
0,00 mol L ⁻¹	0,074
0,01 mol L ⁻¹	0,087
0,15 mol L ⁻¹	0,058
0,25 mol L ⁻¹	0,035

Es ist nicht auszuschließen, dass die auf dem Modellträger existente Zelldebris Ionen in den Kondensatfilm entlässt und so die thermische Inaktivierung beeinflusst. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dies dann zu einer geringeren thermischen Inaktivierung führen sollte. Dies wäre, neben den Erläuterungen in Kap. 4.3.2, eine weitere Erklärung für die Diskrepanz zwischen der experimentell ermittelten Keimzahlreduktion und der modellierten thermischen Inaktivierung bei *B. megaterium* (Abb. 4.41) und *B. licheniformis*-Sporen (Abb. 4.42).

Somit bleibt festzuhalten, dass Ionen im Kondensatfilm auf der Produktoberfläche während der Bedampfungsphase einer mtVDV-Entkeimung die mechanischen Entkeimungseffekte durch eine mögliche Reduktion der Haftkräfte erhöhen und die thermischen Entkeimungseffekte durch eine mögliche Reduktion des a_w -Wertes reduzieren können.

4.5 Notwendige Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten als Auslegungskriterium für eine industrielle Umsetzung

4.5.1 Erzielte Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten

Das mtVDV-Entkeimungsverfahren soll eine klassisch thermische Inaktivierung während der Bedampfungsphase mit einem mechanischen Entfernen der Mikroorganismen von der Produktoberfläche kombinieren. Dies erfolgt durch ein schlagartiges Anlegen des Nachvakuums nach erfolgter Dampfbehandlung, was zu einer intensiven Flash-Verdampfung führt, da das Kondensat eine überhitzte Flüssigkeit darstellt (Kap. 2.3.5). Die Intensität der Flash-Verdampfung und somit das Ausmaß der die Haftkräfte (F_{adh}) überwindenden Kräfte (F_{det}) nehmen mit steigender Druckerniedrigungsgeschwindigkeit zu. Dabei ist die zu Beginn der Nachvakuumphase anliegende Druckdifferenz entscheidend, welche durch den Sattdampfdruck und somit die Behandlungstemperatur im Behandlungsraum beeinflusst wird. Als Druckerniedrigungsgeschwindigkeit wird dabei die als positiver Wert ausgedrückte maximale Druckänderungsgeschwindigkeit während der ersten Sekunde des Nachvakuums angesehen, was beispielhaft für eine mtVDV-Entkeimung bei etwa 115°C in Abb. 4.54 zu sehen ist. Im dargestellten Versuch wurde eine maximale Druckerniedrigungsgeschwindigkeit von $1,9 \cdot 10^6 \text{ Pa s}^{-1}$ ermittelt.

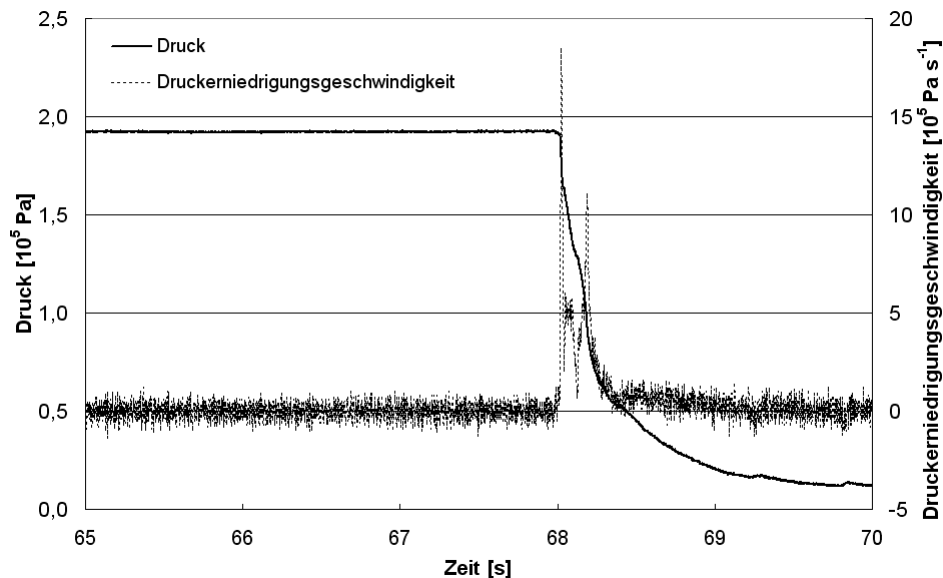


Abb. 4.54: Druckverlauf und Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten während des Übergangs von der Druckphase zur Nachvakuumphase einer mtVDV-Entkeimung (mittlere Behandlungsraumtemperatur=116°C, maximale Behandlungsraumtemperatur=120°C). t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

Der Verlauf der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit weist zu Beginn des Nachvakuums stets zwei Maxima auf. Mögliche Ursachen hierfür werden in Kap. 4.5.3 erläutert.

Die exponentiellen Zusammenhänge zwischen Temperatur und Druckerniedrigungsgeschwindigkeit bzw. Sattdampfdruck von reinem Wasser sind in Abb. 4.55 dargestellt. Die Kurvenverläufe weisen eine ähnliche Steigung auf und lassen erkennen, dass die Druckerniedrigungsgeschwindigkeit erwartungsgemäß in direktem Zusammenhang mit der eingesetzten Sattdampf-temperatur steht, denn je höher der Sattdampfdruck, desto höher die Druckdifferenz zwischen Behandlungsraum und Nachvakuumbereich. Die in den mtVDV-Entkeimungsversuchen erzielten Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten liegen im Bereich von $6 \cdot 10^5 \text{ Pa s}^{-1}$ (85°C) bis $4 \cdot 10^6 \text{ Pa s}^{-1}$ (140°C). Durch Ermittlung einer Regressionskurve (Gl. 28) ist es nun möglich, anlagen-spezifisch jeder mittleren Behandlungsraumtemperatur (ϑ_{BR}) eine Druckerniedrigungsgeschwindigkeit $\left(\frac{dp}{dt}\right)$ zuzuordnen.

$$\frac{dp}{dt} [10^5 \text{ Pa s}^{-1}] = 0,2257 \cdot e^{0,0367\vartheta} \quad (28)$$

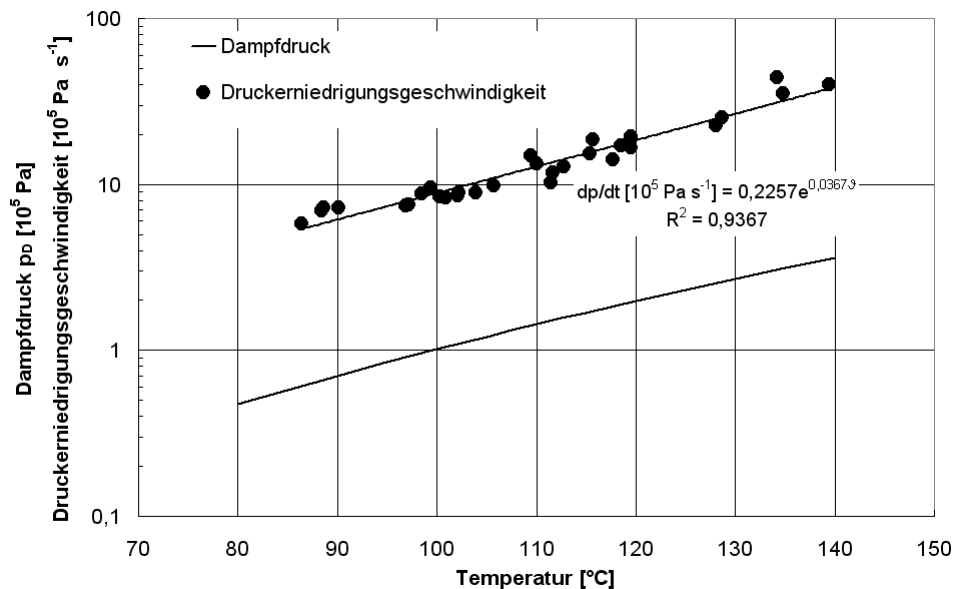


Abb. 4.55: Dampfdruck von reinem Wasser und Druckerniedrigungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

4.5.2 Gesamtkeimzahlreduktion in Abhängigkeit von der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit

Unter Verwendung der in Kap. 4.5.1 ermittelten Regressionskurve (Gl. 28) können die in Kap. 4.1.1 dargestellten relativen Keimzahlreduktionen auf die für die jeweilige Sattdampf-temperatur

zugehörige Druckerniedrigungsgeschwindigkeit bezogen werden. Für die untersuchten Modellsysteme ist dies in den Abbn. 4.56 und 4.57 gezeigt. Anhand dieser Darstellungen lässt sich für jedes Modellsystem eine minimale Druckerniedrigungsgeschwindigkeit ermitteln, ab der eine vorgegebene relative Keimzahlreduktion erzielt werden kann. So beträgt die minimale Druckerniedrigungsgeschwindigkeit einer mtVDV-Entkeimung von *G. stearothermophilus*-Sporen Typ III auf Modellträgern für eine relative Keimzahlreduktion von mindestens drei Dekaden etwa $3,1 \cdot 10^6 \text{ Pa s}^{-1}$.

In den gezeigten Beispielen handelt es sich um eine relativ glatte, chemisch homogene Modellträgeroberfläche mit jeweils nur einem Sporentyp. In der Praxis stellen die zu entkeimenden Produkte oftmals Systeme aus stark strukturierten Materialien mit heterogener Oberflächenchemie dar, welche mit einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen verkeimt sein können. Somit sind auch die durch eine Flash-Verdampfung zu überwindenden Haftkräfte system- bzw. produktspezifisch. Folglich wird sich für jedes zu entkeimende Produkt eine spezifische minimale Druckerniedrigungsgeschwindigkeit für eine gewünschte minimale Keimzahlreduktion ermitteln lassen. Die Kenntniss dieser minimalen Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten kann für die Planung einer industriellen mtVDV-Entkeimungsanlage herangezogen werden. Des Weiteren stellt deren Kenntniss ein Know-How dar, was zu Wettbewerbsvorteilen führen kann.

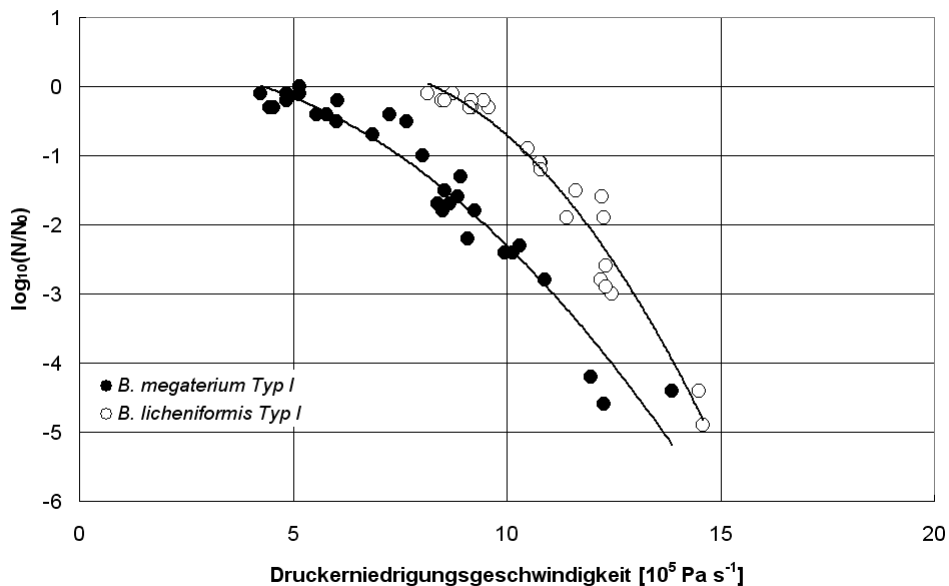


Abb. 4.56: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch die mtVDV-Entkeimung verschiedener Modellsysteme in Abhängigkeit von der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s. $N_{0,B.megaterium} \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$, $N_{0,B.licheniformis} \approx 10^8 \text{ cm}^{-2}$.

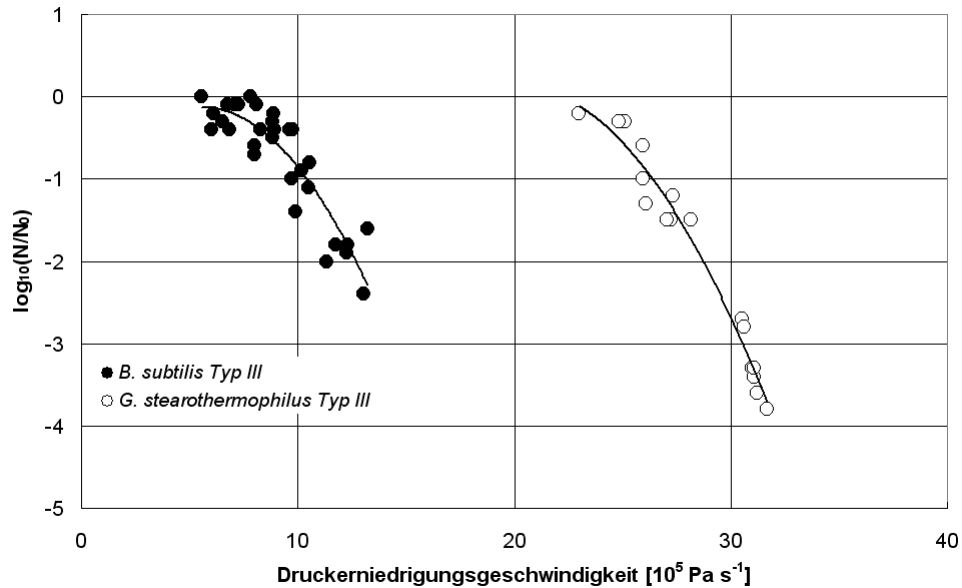


Abb. 4.57: Relative Keimzahlreduktion N/N_0 durch die mtVDV-Entkeimung verschiedener Modellsysteme in Abhängigkeit von der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit. t_{VV} , t_D , $t_{NV} = 45 \text{ s}$, 10 s , 80 s . $N_{0,B.\textit{subtilis}} \approx 10^6 \text{ cm}^{-2}$, $N_{0,G.\textit{stearothermophilus}} \approx 10^7 \text{ cm}^{-2}$.

In den gezeigten Beispielen handelt es sich um eine relativ glatte, chemisch homogene Modellträgeroberfläche mit jeweils nur einem Sporentyp. In der Praxis stellen die zu entkeimenden Produkte oftmals Systeme aus stark strukturierten Materialien mit heterogener Oberflächenchemie dar, welche mit einer Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen verkeimt sein können. Somit sind auch die durch eine Flash-Verdampfung zu überwindenden Haftkräfte system- bzw. produktspezifisch. Folglich wird sich für jedes zu entkeimende Produkt eine spezifische minimale Druckerniedrigungsgeschwindigkeit für eine gewünschte minimale Keimzahlreduktion ermitteln lassen. Die Kenntniss dieser minimalen Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten kann für die Planung einer industriellen mtVDV-Entkeimungsanlage herangezogen werden. Des Weiteren stellt deren Kenntniss ein Know-How dar, was zu Wettbewerbsvorteilen führen kann.

Die Umsetzung des Verfahrens in den industriellen Maßstab erfolgt derzeit im Rahmen eines PRO INNO II-Projekts in Zusammenarbeit mit einem mittelständischen Gewürzhersteller (Projekt-Nr. KF0595401UL7, "Entwicklung eines neuartigen Verfahrens zur erheblichen Reduzierung mikrobieller Kontamination auf Gewürzen. Erforschung aller verfahrenstechnischen Elemente des neuartigen Gewürzentkeimungsverfahrens unter besonderer Berücksichtigung mikrobiologischer Fragestellungen"). Dabei soll die mtVDV-Entkeimung in einem Feststoffmischer erfolgen, um einen hohen Wärme- und Stofftransport zu ermöglichen. Das Abtrennen von eventuell aus dem Feststoffmischer im Dampfstrom ausgetragenen Partikeln soll mittels Zyklons erfolgen. Eine Prinzipskizze der im Bau befindlichen Anlage zeigt Abb. 4.58.

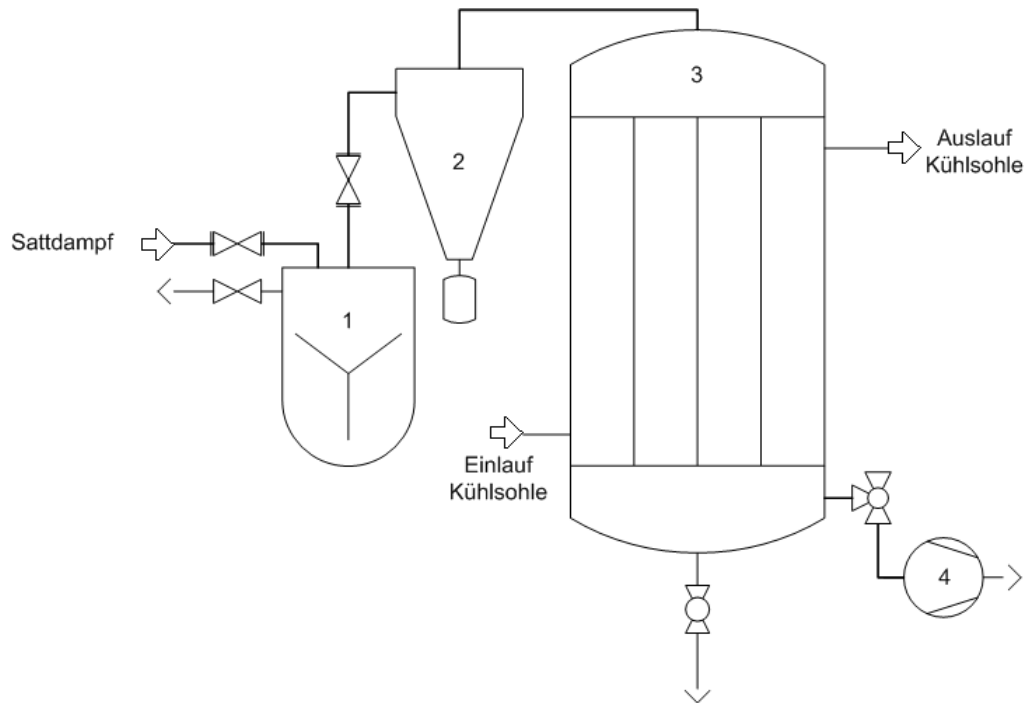


Abb. 4.58: Prinzipskizze einer mtVDV-Entkeimungsanlage mit einem Mischer als Behandlungsraum. 1) Mischer 2) Zyklon 3) Vakuumpuffertank/Wärmeübertrager 4) Verdichter.

In einem weiteren Projekt wird ein möglicher Einfluss der mtVDV-Entkeimung auf relevante Qualitätsparameter von Arzneidrogen untersucht (AIF-FAH-Projekt-Nr. 15547 BG, "Mechanische Sattdampfentkeimung von Drogen"). Hier soll insbesondere der Einfluss der Flash-Verdampfung auf den Gehalt an ätherischen Ölen untersucht werden.

4.5.3 Betrachtung der Flash-Verdampfung

Die mechanischen Entkeimungseffekte bei der mtVDV-Entkeimung, d.h. das Abtrennen der Mikroorganismen von der Produktoberfläche, basieren auf der intensiven, explosionsartigen Verdampfung (Flash-Verdampfung) des während der Bedampfungsphase gebildeten Kondensates. Diese Flash-Verdampfung wird durch ein schlagartiges Anlegen des Nachvakuums mit hohen Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten induziert. Durch den rapiden Druckabfall unter den Dampfdruck des Kondensates, stellt dieses eine überhitzte Flüssigkeit dar, was zur Flash-Verdampfung führt. Der dabei entstehende Dampf entzieht dem zurückbleibenden Kondensat Energie, was mit einer Temperaturabnahme des zurückbleibenden Kondensates einhergeht.

Anhand der während der mtVDV-Entkeimung aufgezeichneten Temperaturverläufe auf den Modellträgern lassen sich Rückschlüsse auf die Flash-Verdampfung zu Beginn der Nachvakuumphase ziehen. So gibt die rapide Abkühlung der Modellträgeroberfläche Hinweise auf die Dauer

und Intensität der Flash-Verdampfung. Für einen direkten Vergleich von einzelnen mtVDV-Entkeimungsversuchen wurde die dimensionslose Temperatur NEF während der ersten 10 s des Nachvakuum herangezogen.

Die Abbn. 4.59 u. 4.60 zeigen beispielhaft die dimensionslose Modellträgeroberflächentemperatur während der ersten 10 s der Nachvakuumphase einer mtVDV-Entkeimung bei 90°C bzw. 140°C.

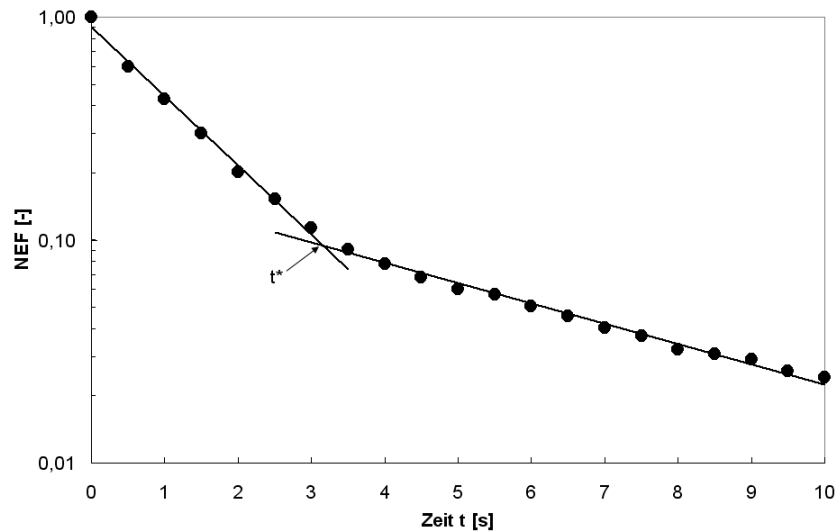


Abb. 4.59: Dimensionslose Modellträgeroberflächentemperatur (NEF) während der ersten 10s der Nachvakuumphase einer mtVDV-Entkeimung bei 90°C. t^* =Flash-Zeit. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

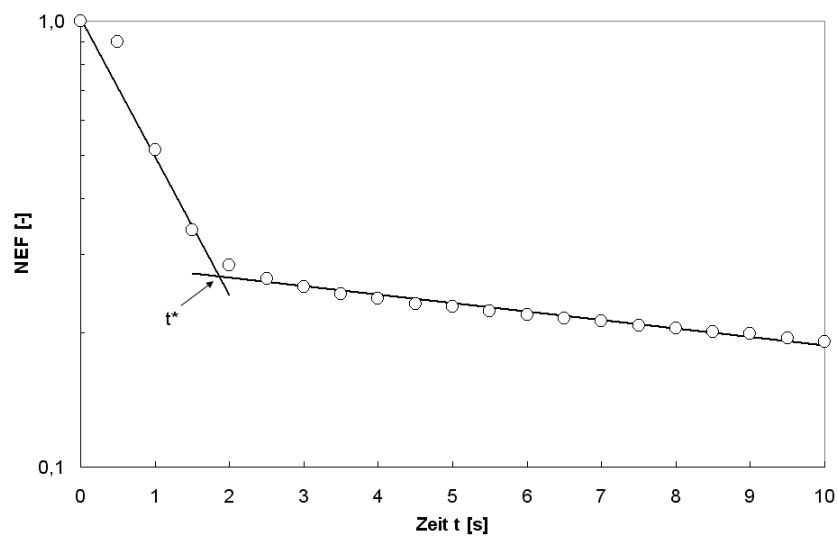


Abb. 4.60: Dimensionslose Modellträgeroberflächentemperatur (NEF) während der ersten 10s der Nachvakuumphase einer mtVDV-Entkeimung bei 140°C. t^* =Flash-Zeit. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

Bei 90°C wurde eine Flash-Zeit von etwa 3 s, bei 140°C von etwa 2 s ermittelt. Die zwar kürzere aber dafür offenbar intensivere Flash-Verdampfung bei 140°C zeigt sich in der größeren Temperaturabnahme im ersten Verdampfungsabschnitt (von 140°C auf 60°C) im Vergleich zur mtVDV-Entkeimung bei 90°C (von 90°C auf 40°C). Dies zeigt, dass mit steigender Behandlungstemperatur von einer Zunahme der Flash-Verdampfungsintensität und folglich auch von einer Zunahme der bei der Verdampfung wirkenden Kräfte ausgegangen werden kann.

Wie bereits in Kap. 4.5.1 erwähnt, weist die Druckerniedrigungsgeschwindigkeit während des Nachvakuums zwei Maxima auf (Abb. 4.61). Die Zeitdifferenz zwischen beiden Maxima liegt stets im Bereich von 0,15-0,17 s.

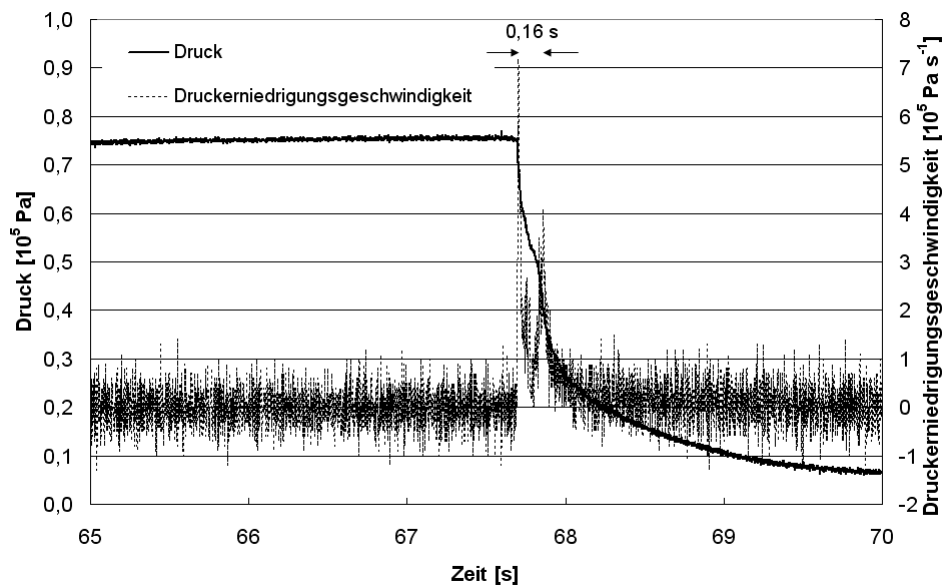


Abb. 4.61: Druckverlauf und Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten während des Übergangs von der Druckphase zur Nachvakuumphase einer mtVDV-Entkeimung bei 90°C. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

Das erste Maximum der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit ist stets größer. Beide Maxima nehmen mit der Temperatur etwa im gleichen Umfang zu (Abb. 4.62), was auf einen systematischen Zusammenhang hinweist. Das erste Maximum resultiert aus dem Druckunterschied zwischen Nachvakuumbereich (etwa $5 \cdot 10^3$ Pa) und Behandlungsraum ($5 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^5$ Pa) zu Beginn der Nachvakuumphase. Eine Ursache für das zweite Maximum ist möglicherweise in der folgenden Kondensation des Dampfes im Wärmeübertrager des Nachvakuumbereichs zu sehen, was mit einer rapiden Drucksenkung einhergeht. Zum anderen ist es denkbar, dass sich der Ventilöffnungsvorgang im Druckverlauf widerspiegelt. In der mtVDV-Laborapparatur wurden pneumatisch gesteuerte Schrägsitzventile mit einer Nennweite von 0,5 Zoll und einer Öffnungszeit (laut Hersteller) von etwa 0,4 s unter Normbedingungen verwendet. Da die beiden

Maxima der Druckerniedrigungsgeschwindigkeit in diesem Zeitbereich liegen, kann ein Einfluss der Ventilöffnung auf den Druckabfall nicht ausgeschlossen werden.

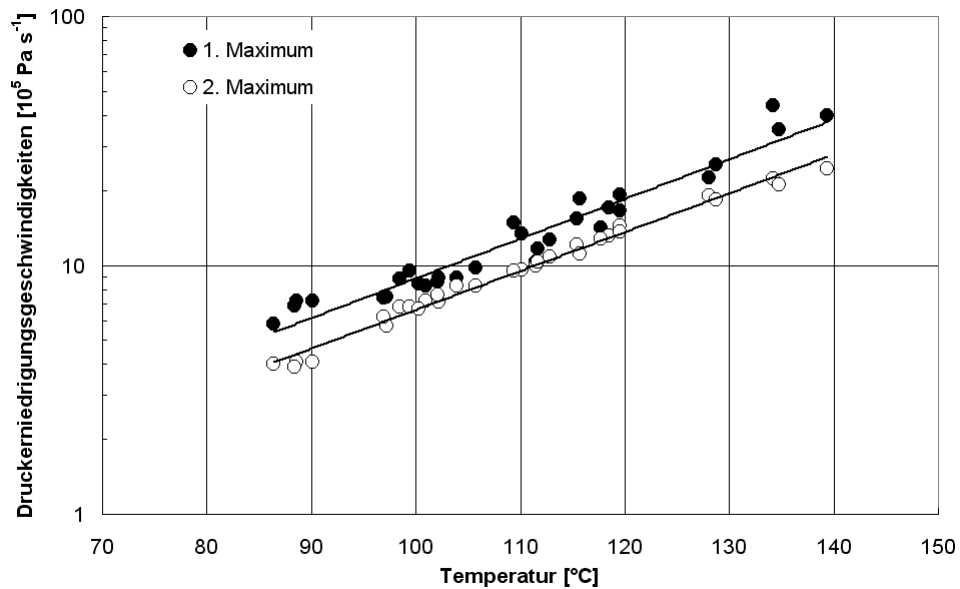


Abb. 4.62: Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten (1. und 2. Maximum) in Abhängigkeit von der mittleren Behandlungsraumtemperatur während der Bedampfungsphase. t_{VV} , t_D , t_{NV} = 45 s, 10 s, 80 s.

In einer späteren industriellen Umsetzung kann eine hohe Druckerniedrigungsgeschwindigkeit und somit eine Flash-Verdampfung, auch bei größerem Rohrquerschnitt durch schnell öffnende Armaturen, wie z.B. Klappen mit pneumatischem Schwenkantrieb, sichergestellt werden.

Neben der thermischen existiert auch eine mechanische Produktbelastung, aufgrund der bei der Flash-Verdampfung wirkenden Kräfte. Dies kann zu einer Schädigung des Produktes führen. Denkbar wäre z.B. ein Aufreißen von Ölzellen, welche bei der für die Lebensmittelindustrie relevanten Gewürzpflanze Majoran an der Blattoberfläche vorliegen. Aus diesem Grund sollte nicht stets die maximal erreichbare Druckerniedrigungsgeschwindigkeit gewählt werden, wenn eine niedrigere Druckerniedrigungsgeschwindigkeit verbunden mit einer geringeren mechanischen Produktbelastung zur Erzielung einer gewünschten Keimzahlreduktion ausreicht.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Produkte, wie z.B. Gewürze und Arzneidrogen, erfordern, u.a. aufgrund gesetzlicher Vorgaben, eine Keimzahlreduktion. Hierfür stehen chemische, mechanische, thermische und diverse Kombinationsverfahren zur Verfügung. Bei den thermischen Verfahren werden die Mikroorganismen aufgrund von Effekten auf molekularer Ebene inaktiviert. Mechanische Verfahren nutzen Kräfte, um die Mikroorganismen zu zerstören oder von einer Oberfläche zu entfernen. Durch vorherige Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei einer speziellen Variante der Vakuum-Dampf-Vakuum-(VDV)-Entkeimung bestimmte Entkeimungsergebnisse auf eine rein thermische Inaktivierung nicht zurückgeführt werden konnten. Offenbar existieren neben der thermischen Inaktivierung zusätzliche mechanische Entkeimungseffekte. Es ist möglich, dass durch eine Flash-Verdampfung des während der Bedampfungsphase gebildeten Kondensates die Mikroorganismen von der Produktoberfläche abgetrennt werden können. Diese Kombination verschiedener Entkeimungseffekte kann es ermöglichen, die Behandlungstemperatur bzw. die Behandlungszeit im Vergleich zu herkömmlichen VDV-Entkeimungsverfahren zu reduzieren. Im Zuge der Beweisführung für die Existenz mechanischer Entkeimungseffekte wurde die mtVDV-Entkeimung (mechano-thermische VDV-Entkeimung) anhand von mit bakteriellen Sporen künstlich verkeimten Modellträgern untersucht.

Als Modellorganismen wurden Sporen von *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* und *Geobacillus stearothermophilus* eingesetzt, welche aufgrund ihrer hohen aber unterschiedlichen Resistenz gegenüber Hitze und Chemikalien eine besondere Herausforderung für Entkeimungsverfahren darstellen. Als Modellträger wurde ein Kalk-Natron-Glas verwendet. Für die mtVDV-Entkeimung kam eine spezielle Laborapparatur zum Einsatz, welche eine schnelle Evakuierung des Behandlungsraums nach der kurzzeitigen Sattedampfzufuhr (10 s oder 30 s) ermöglicht.

Mit der Sattedampftemperatur steigt auch die Druckerniedrigungsgeschwindigkeit ($6 \cdot 10^5 \text{ Pa s}^{-1}$ bei 85°C bis $4 \cdot 10^6 \text{ Pa s}^{-1}$ bei 140°C). Bei einer Bedampfungszeit von 10 s wurde eine Keimzahlreduktion um etwa zwei Dekaden für Sporen von *B. megaterium* bei etwa 100°C und für Sporen von *B. licheniformis*- und *B. subtilis* bei etwa 110°C ermittelt. Sporen von *G. stearothermophilus* zeigen diese Keimzahlreduktion bei einer Temperatur von etwa 130°C . Ein Einfluss der vorangegangenen Sporenkultivierungsbedingungen (auf festem/in flüssigem Nährmedium) auf die Keimzahlreduktion wurde nicht festgestellt.

Nachfolgend wurde die Abtrennung der Sporen von der Modellträgeroberfläche mittels Bildanalyse untersucht. Für Sporen von *G. stearothermophilus* wurde eine Abtrennung bei Temperaturen über 130°C festgestellt, was mit den mikrobiologischen Untersuchungen korreliert.

Offenbar können die Haftkräfte zwischen den Sporen von *G. stearothermophilus* und der Modellträgeroberfläche durch eine mtVDV-Entkeimung bei über 130°C überwunden werden.

Im weiteren Verlauf wurden mittels Rasterkraftmikroskopie die Haftkräfte zwischen den unterschiedlichen Sporen und einer Mikroglasskugel (stellvertretend für die Modellträgeroberfläche) ermittelt, wobei sich in wässriger Umgebung Haftkräfte von bis zu 26 nN (Sporen von *B. subtilis*) ergaben. Bei vergleichenden Untersuchungen wurden in wässriger Umgebung Haftkräfte ermittelt, die mindestens um den Faktor 10^3 geringer sind als die in gasförmiger Umgebung. Für die Haftkräfte in trockener Umgebung zeigt sich ein Zusammenhang mit den mikrobiologischen Ergebnissen der mtVDV-Entkeimung. Umso größer die Haftkräfte in gasförmiger Umgebung, desto größer ist die notwendige Temperatur für eine Keimzahlreduktion um zwei Dekaden bei einer Bedampfungszeit von 10 s. Eine Korrelation der mittels MATH-Methode (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) ermittelten Sporenoberflächenhydrophobizität und den festgestellten Haftkräften ist nicht gegeben.

Durch Ionen sollten die Haftkräfte zwischen den bakteriellen Sporen und der Modellträgeroberfläche gezielt beeinflusst werden. Für Sporen von *G. stearothermophilus* und *B. subtilis* zeigte sich dabei eine Zunahme der Keimzahlreduktion mit steigender Ionenstärke.

Um die Anteile der unterschiedlichen Entkeimungseffekte darzustellen, wurde eine nicht-isotherme Modellierung der thermischen Inaktivierung während der mtVDV-Entkeimung auf Basis von reaktionskinetischen Daten aus Kapillarversuchen durchgeführt. Das Ausmaß der mechanischen Entkeimungseffekte wurde durch einen Vergleich der experimentellen mtVDV-Entkeimungsergebnisse mit der modellierten thermischen Inaktivierung ermittelt. Danach beträgt die modellierte thermische Inaktivierung für Sporen von *G. stearothermophilus* während einer mtVDV-Entkeimung bei etwa 135°C und einer Bedampfungszeit von 10 s weniger als eine Dekade. Bei einer ermittelten Keimzahlreduktion von etwa drei Dekaden durch die mtVDV-Entkeimung beträgt das Ausmaß der mechanischen Effekte über zwei Dekaden.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse kann die Existenz von mechanischen Entkeimungseffekten bei dieser Art der Sattdampfbehandlung als gesichert angesehen werden. Die Arbeit liefert, u.a. durch die Angabe von Druckerniedrigungsgeschwindigkeiten, Beiträge für die Auslegung einer industriellen Entkeimungsanlage.

6 Verzeichnisse

Literaturverzeichnis

- [1] Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), zuletzt geändert durch Artikel 9 Abs. 1 des Gesetzes vom 23. November 2007 (BGBl. I S. 2631).
- [2] Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl. I S. 945), zuletzt geändert durch Artikel 12 des Gesetzes vom 26. Februar 2008 (BGBl. I S. 215).
- [3] J.E. Algie and J.A. Lindsay. Some physical properties of coat material from *Bacillus stearothermophilus* spores. *Curr Microbiol*, 9:121–126, 1983.
- [4] A. Atrih and S.J. Foster. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol*, 91:364–372, 2001.
- [5] J. Baranyi, A. Jones, C. Walker, A. Kaloti, T.P. Robinson, and B.M. Mackey. A combined model for growth and subsequent thermal inactivation of *Brochothrix thermosphacta*. *Appl Environ Microbiol*, 62(3):1029–1035, 1996.
- [6] J. Baumgart, W. Heeschen, F. v. Rheinbaben, and R. Zschaler. *Lexikon der Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene*. Behr's Verlag Hamburg, 2004.
- [7] T.C. Beaman and P. Gerhardt. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaption. *Appl Environ Microbiol*, 52(6):1242–1246, 1986.
- [8] T.C. Beaman, J.T. Greenamyre, T.R. Corner, H.S. Pankratz, and P. Gerhardt. Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. *J Bacteriol*, 150(2):870–877, 1982.
- [9] W. Blel, T. Bénézech, P. Legentilhomme, J. Legrand, and C. Le Gentil-Lelièvre. Effect of flow arrangement on the removal of *Bacillus* spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning In Place procedure. *Chem Eng Sci*, 62:3798–3808, 2007.
- [10] R. Bültermann. *Untersuchungen zur Hitzeresistenz von bakteriensporen und zur Pasteurisation von oberflächlich verkeimten Lebensmitteln*. PhD thesis, Universität Karlsruhe (TH), 1997.

- [11] U. Bobe. *Die Reinigbarkeit technischer Oberflächen im immmergierten System*. PhD thesis, Technische Universität München, 2008.
- [12] W.R. Bowen, A.S. Fenton, R.W. Lovitt, and C.J. Wright. The measurement of *Bacillus mycoides* spore adhesion using atomic force microscopy, simple counting methods, and a spinning disc technique. *Biotechnol Bioeng*, 79(2):170–179, 2002.
- [13] H.J. Butt, B. Capella, and M. Kappl. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep*, 59:1–152, 2005.
- [14] O. Cerf. Tailing of survival curves of bacterial spores. *J Appl Bacteriol*, 42:1–9, 1977.
- [15] V.G.R. Chada, E.A. Sanstad, R. Wang, and A. Driks. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *J Bacteriol*, 185(21):6255–6261, 2003.
- [16] J.W. Cleaver and B. Yates. Mechanism of detachment of colloidal particles from a flat substrate in a turbulent flow. *J Colloid Interface Sci*, 44(3):464–474, 1973.
- [17] M.B. Cole, K.W. Davies, G. Munro, C.D. Holyoak, and D.C. Kilsby. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *J Ind Microbiol*, 12:232–239, 1993.
- [18] S. Condon, M. Bayarte, and F.J. Sala. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol*, 73:251–256, 1992.
- [19] N. Datta and H.C. Deeth. High pressure processing of milk and dairy products. *Aust J Dairy Tech*, 54:41–48, 1999.
- [20] K.R. Davey. Linear-arrhenius models for bacterial growth and death and vitamin denaturations. *J Ind Microbiol*, 12:172–179, 1993.
- [21] L.I. Dehne, M. Pfister, and K.W. Bögl. Neuere physikalische Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 43:33–40, 2000.
- [22] Y.F. Dufrêne. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol*, 184(19):5205–5213, 2002.
- [23] Y.F. Dufrêne. Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope. *J Bacteriol*, 186(11):3283–3285, 2004.
- [24] Y.F. Dufrêne, C.J.P. Boonaert, P.A. Gerin, M. Ashter, and P.G. Rouxhet. Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol*, 181(17):5350–5354, 1999.

- [25] Y.F. Dufrêne, C.J.P. Boonaert, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, and P.G. Rouxhet. Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86:113–120, 2001.
- [26] A. Fernandez, M.J. Ocio, P.S. Fernandez, and A. Martinez. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol*, 63:257–264, 2001.
- [27] K. Fox and B.D. Eder. Comparison of survivor curves of *Bacillus subtilis* spores subjected to wet and dry heat. *J Food Sci*, 34:518–521, 1969.
- [28] I. Gonzalez, M. Lopez, S. Martinez, A. Bernardo, and J. Gonzales. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. *Int J Food Microbiol*, 51:81–84, 1999.
- [29] V. Heinz and D. Knorr. Verringerung pathogener Mikroorganismen durch Hochdruck und gepulste elektrische Felder: theoretische und praktische Betrachtungen. *Nutrition*, 26(3):102–106, 2002.
- [30] M. Hermansson. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf , B*, 14:105–119, 1999.
- [31] L.W. Hom. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. *J Sanit Eng Div ASCE*, 1:183–194, 1972.
- [32] M.A. Hubbe. Theory of detachment of colloidal particles from flat surfaces exposed to flow. *Colloid Surface*, 12:151–178, 1984.
- [33] U. Husmark. Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces. In *SIK-Rapport*, volume 590. SIK, The Swedish Institute for Food and Biotechnology, Göteborg, Sweden, 1993.
- [34] U. Husmark and U. Rönner. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J Appl Bacteriol*, 69(4):557–562, 1990.
- [35] Institute of Food Research. Combbase-DMFit. [Online im Internet] URL: <http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombbasePMP/GP/DMFit.aspx>, Stand 23.04.2009, 18:00.
- [36] D.N. Kamau, S. Doores, and K.M. Pruitt. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl Environ Microbiol*, 56:2711–2716, 1990.

- [37] H.G. Kessler. *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie*, volume 4. Verlag A. Kessler, 1996.
- [38] U. Köhler. *Entwicklung eines Messverfahrens (PIV) zur Untersuchung von Partikelbewegungen in wandnahen turbulenten Strömungen*. PhD thesis, Technische Universität Clausthal, 2000.
- [39] D. Knorr. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol*, 47:156–161, 1993.
- [40] T. Koshikawa, M. Yamazaki, M. Yoshimi, S. Ogawa, A. Yamada, K. Watabe, and M. Torii. Surface hydrophobicity of spores of *Bacillus* spp. *J Gen Microbiol*, 135:2717–2722, 1989.
- [41] F.V. Kosikowski and P.F. Fox. Low heat, hydrogen peroxide, and bacto-fugation treatments of milk to control coliforms in cheddar cheese. *J Dairy Sci*, 51(7):1018–1022, 1968.
- [42] M. Kozempel, N. Goldberg, and C.C.Jr. Craig. The vacuum/steam/vacuum process. *Food Technol*, 57(12):30–33, 2003.
- [43] M.F. Kozempel, D.L. Marshall, E.R. Radewonuk, O.J. Scullen, N. Goldberg, and M.F.A. Bal'a. A rapid surface intervention process to kill *Listeria innocua* on catfish using cycles of vacuum and steam. *J Food Sci*, 66:1012–1016, 2001.
- [44] I. Leguerinel and P. Mafart. Modelling the influence of pH and organic acid types on the thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *Int J Microbiol*, 63:29–43, 2001.
- [45] M. Lilie, S. Hein, P. Wilhelm, and U. Müller. Decontamination of spices by combining mechanical and thermal effects - an alternative approach for quality retention. *Int J Food Sci Technol*, 42:190–193, 2007.
- [46] M. Lilie, P. Wilhelm, and U. Müller. Mechanische Effekte bei der Sattedampferntkeimung. *Chem Ing Tech*, 76(10):1602–1605, 2004.
- [47] J.A. Lindsay, T.C. Beaman, and P. Gerhardt. Protoplast water content of bacterial spores determined by buoyant density sedimentation. *J Bacteriol*, 163(2):735–737, 1985.
- [48] R.H. Linton, W.H. Carter, M.D. Pierson, and C.R. Hackney. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Prot*, 58:946–954, 1995.

- [49] R.H. Linton, W.H. Carter, M.D. Pierson, C.R. Hackney, and J.D. Eifert. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. *J Food Prot*, 59:16–23, 1996.
- [50] P. Manas and R. Pagán. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J Appl Microbiol*, 98:1387–1399, 2005.
- [51] M. Mazas, S. Martinez, M. Lopez, A.B. Alvarez, and R. Martin. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by the solutes used to control water activity of the heating medium. *Int J Food Microbiol*, 53:61–67, 1999.
- [52] J.M. Membre, V. Majchrzak, and I. Jolly. Effects of temperature, pH, glucose, and citric acid on the reduced calorie mayonnaise. *J Food Prot*, 60:1497–1501, 1997.
- [53] F. Mermillod-Blondin, G. Fauvet, A. Chalamet, and M. Creuzé des Châtelliers. A comparison of two ultrasonic methods for detaching biofilms from natural substrata. *Internat Rev Hydrobiol*, 86:349–360, 2001.
- [54] O. Miyatake, T. Fujii, T. Tanaka, and T. Nakaoka. Flash evaporation phenomena of pool water. *Heat Transfer-Jap Res*, 6:13–24, 1977.
- [55] O. Miyatake, K. Murakami, Y. Kawata, and T. Fujii. Fundamental experiments with flash evaporation. *Heat Transfer-Jap Res*, 2:89–100, 1973.
- [56] G. Müller and H. Weber. *Mikrobiologie der Lebensmittel*. Behr's Verlag Hamburg, 1996.
- [57] G. Müller and H. Weber, editors. *Mikrobiologie der Lebensmittel*. Behr's Verlag Hamburg, 1996.
- [58] U. Müller. Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln - 2. Physikalische Verfahren. In K. Fehlhaber and E. Kleer, J. Kley, editors, *Handbuch Lebensmittelhygiene*, chapter 5. Behr's Verlag Hamburg, 2006.
- [59] U. Müller and P. Wilhelm. Mechanische Entkeimung. *Lebensmitteltechnik*, 34(9):58–59, 2002.
- [60] A.I. Morgan. Method and apparatus for treating and packaging raw meat. Technical report, U.S. patent 5,281,428, 1994.
- [61] A.I. Morgan, I. Goldberg, E.R. Radewonuk, and O.J. Scullen. Surface pasteurization of raw meat by steam. *Lebensm Wiss Technol*, 29(5/6):447–451, 1996.

- [62] S. Nakashio and P. Gerhardt. Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores. *J Bacteriol*, 162(2):571–578, 1985.
- [63] R. Oliveira. Understanding adhesion: A means for preventing fouling. *Exp Therm Fluid Sci*, 14:316–322, 1997.
- [64] M.E. O’Neil. A sphere in contact with a plane wall in a slow linear shear flow. *Chem Eng Sci*, 23(11):1293–1298, 1968.
- [65] Y.L. Ong, A. Razatos, G. Georgiou, and M.M. Sharma. Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir*, 15(8):2719–2725, 1999.
- [66] N. Otsu. A threshold selection method from grey level histograms. In *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, pages 62–66. Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1979.
- [67] R. Pagán, P. Manas, and S. Condon. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 65(1):297–300, 1999.
- [68] M. Peleg and M.B. Cole. Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38(5):353–380, 1998.
- [69] M. Peleg and C.M. Penchina. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40(2):159–172, 2000.
- [70] D.L. Popham, S. Sengupta, and P. Setlow. Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Appl Environ Microbiol*, 61(10):3633–3638, 1995.
- [71] J. Raso and G.V. Barbosa-Cánovas. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(3):265–285, 2003.
- [72] J. Raso and G.V. Barbosa-Cánovas. Preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(3):265–285, 2003.
- [73] J. Raso, A. Palop, R. Pagán, and S. Condon. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *J Appl Microbiol*, 85(5):849–854, 1998.
- [74] U. Rönner, U. Husmark, and A. Henriksson. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *J Appl Bacteriol*, 69:550–556, 1990.

- [75] A.I.V. Ross, M.W. Griffiths, G.S. Mittal, and H.C. Deeth. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*, 89:125–138, 2003.
- [76] H. Rumpf. Grundlagen und Methoden des Granulierens. *Chem Ing Tech*, 30(3):144–158, 1958.
- [77] V. Sapru and T.P. Labuza. Temperature dependence of thermal inactivation rate constants of bacterial spores in a glassy state. *J Ind Microbiol*, 12:247–250, 1993.
- [78] D. Saury, S. Harmand, and M. Siroux. Experimental study of flash evaporation of a water film. *Int J Heat Mass Transfer*, 45(16):3447–3457, 2002.
- [79] G. Scherba, R.M. Weigel, and W.D. O'Brian JR. Quantitative assessment of the germicidal efficiency of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol*, 57(7):2079–2084, 1991.
- [80] H. Schubert. Grundlagen des Agglomerierens. *Chem Ing Tech*, 51(4):266–277, 1979.
- [81] D. Serp, U. von Stockar, and I.W. Marison. Immobilized bacterial spores for use as bioindicators in the validation of thermal sterilization processes. *J Food Protect*, 65(7):1134–1141, 2002.
- [82] M. Serrano, R. Zilhao, E. Ricca, A.J. Ozin, C.P. Moran, and A.O. Henriques. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol*, 181(12):3632–3643, 1999.
- [83] Y. Shigeta, T. Aoyama, Y. Hagura, and K. Suzuki. Hydrostatic pressure-induced germination and inactivation of *Bacillus* spores in the presence or absence of nutrients. *Food Sci Technol Res*, 13(3):193–199, 2007.
- [84] H. Sielaff. *Technologie der Konservenherstellung*. Behr's Verlag Hamburg, 1996.
- [85] G. Sillen. Experience with modern bacto-fuges in the dairy industrie. *Nordisk Mejeriindustri*, 14(6):252–255, 1987.
- [86] S. Simmonds, B.L. Mossel, T. Intaraphan, and H.C. Deeth. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J Food Prot*, 66(11):2070–2075, 2003.
- [87] Spectrum. <http://www.spektrum.de/sixcms/media.php/767/vanderwaal3.gif>. Internet, 24.02.2009.
- [88] A. Stack and G. Sillen. Bactofugation of liquid milk. *Nutrition & Food Science*, 5:280–282, 1998.

- [89] M. Stieß. *Mechanische Verfahrenstechnik*. Springer Verlag, 2001.
- [90] K. Strauss. Entkeimungsverfahren. In U.J. Salzer and F. Siewek, editors, *Handbuch Aromen und Gewürze*. Behr's Verlag Hamburg, 2003.
- [91] L.S. Tisa, T. Koshikawa, and P. Gerhardt. Wet and dry bacterial spore densities determined by buoyant density sedimentation. *Appl Environ Microbiol*, 43(6):1307–1310, 1982.
- [92] J.A. Torres and G. Velazquez. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *J Food Eng*, 67:95–112, 2005.
- [93] S.B. Velegol and B.E. Logan. Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves. *Langmuir*, 18:5256–5262, 2002.
- [94] J. Visser. Particle adhesion and removal: a review. *Part Sci Technol*, 13:169–193, 1995.
- [95] W.M. Waites. *Inactivation of spores with chemical agents*. Academic Press, New York, London, 1985.
- [96] B. Weigl. *Trennkräfte zwischen Mikroorganismen, Partikeln und Oberflächen*. PhD thesis, Technische Universität München, 2004.
- [97] R.C. Whiting, S. Sackitey, S. Calderone, K. Morely, and J.G. Philips. Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. *Int J Food Microbiol*, 31:231–243, 1996.
- [98] R. Xiong, G. Xie, A.E. Edmondson, R.H. Linton, and M.A. Sheard. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiol*, 16:269–279, 1999.
- [99] R. Xiong, G. Xie, A.E. Edmondson, and M.A. Sheard. A mathematical model for bacterial inactivation. *Int J Food Microbiol*, 46:45–55, 1999.
- [100] S.G. Yiantsios and A.J. Karabelas. Detachment of spherical microparticles adhering on flat surfaces by hydrodynamic forces. *J Colloid Interface Sci*, 176:74–85, 1995.
- [101] I. Zürner and U. Müller. *Untersuchungen zur Entwicklung eines kontinuierlichen hydrothermischen Entkeimungsverfahrens für Arzneipflanzen*. AIF-Forschungsbericht Nr. 9149. 1995.

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
A	Hamaker-Konstante	[J]
AFM	Atomic Force Microscopy	
C_s	Federkonstante	[N m ⁻¹]
CIP	Cleaning In Place	
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit	[min]
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen	
E_A	Aktivierungsenergie	[J mol ⁻¹]
F_{adh}	Haftkraft	[N]
$F_{Auftrieb}$	Auftriebskraft	[N]
F_{det}	Ablösekraft	[N]
F_G	Gewichtskraft	[N]
$F_{Gleichgewicht}$	Gleichgewichtskraft	[N]
F_{Kanal}	Hydrodynamische Kraft	[N]
H	Abstand	m
HHP	High Hydrostatic Pressure	
I	Ionenstärke	[mol L ⁻¹]
Ja	Jacob-Zahl	
KBE	Koloniebildende Einheiten	
N(t)	Keimzahl zum Zeitpunkt t	
N_0	Keimzahl zum Zeitpunkt t=0	
NEF	Non-Equilibrium Fraction (Dimensionslose Temperatur)	
PEF	Pulsed Electric Field	
R	Allgemeine Gaskonstante (R=8.314)	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]
R ²	Regressionskoeffizient	
R_a	Oberflächenrauheit	[μm]

Symbol	Bedeutung	Einheit
Re	Reynoldszahl	
REM	Rasterelektronenmikroskopie	
T	Temperatur	[K]
V_{vdW}	Van-der-Waals-Wechselwirkungsenergie	[J]
VDV	Vakuum-Druck-Vakuum	
a	Parameter zur Berechnung der Lag-Zeit der thermischen Inaktivierung	[s]
a_w	frei verfügbares Wasser bzw. örtliche relative Feuchte	
b	Parameter zur Berechnung der Lag-Zeit der thermischen Inaktivierung	[°C ⁻¹]
d	Durchmesser	[m]
$\frac{dp}{dt}$	Druckerniedrigungsgeschwindigkeit	[10 ⁵ Pa s ⁻¹]
f_i	Anteil der Mikroorganismenpopulation i an der Gesamtpopulation	
$k_i(T)$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Population i bei gegebener Temperatur	[s ⁻¹]
k_0	Frequenzfaktor	[s ⁻¹]
p	Druck	[Pa]
q_0	Anzahlverteilungsdichte der Haftkraft	[nN ⁻¹]
r	Partikelradius	[m]
t	Zeit	[s]
t_D	Bedampfungsdauer	[s]
t_{lag}	Lag-Zeit der thermischen Inaktivierung	[s]
t_{NV}	Nachvakuumdauer	[s]
t_{VV}	Vorvakuumdauer	[s]
v_m	Mittlere Strömungsgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]
v_τ	Wandschubgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]
z-Wert	Dezimale Reduktionstemperatur	[°C]

Symbol	Bedeutung	Einheit
γ	Oberflächenspannung	$[\text{N m}^{-1}]$
δ_s	Dicke der laminaren Unterschicht	$[\text{m}]$
ϑ	Temperatur	$[\text{°C}]$
ϑ_{St}	Stufentemperatur	$[\text{°C}]$
λ_R	Rohrreibungszahl	
ν	Kinematische Viskosität	$[\text{m}^2 \text{s}^{-1}]$
ρ	Dichte	$[\text{kg m}^{-3}]$
σ	Randwinkel	$[\text{°}]$
τ_w	Wandschubspannung	$[\text{N m}^{-2}]$

7 Visual Basic Code

```
' Bezeichner: Therm_V50_SLD
' *****

' Modul 3
' *****
'
' Programm besteht aus den Unterprogrammen:
' *** Thermobac_V11() ***
' *** InitBac_11() ***
' *** Classic_Keimzahl ***
' *** Calc_km ***
' *** Format_Spalte ***
' *** BZ_Keimzahl ***
'
Option Explicit
Option Private Module
'
' 1. Deklarationsteil
' *****
' Autor: P. Wilhelm
' Version: 5.0 SLD
'
' Modulkonstanten
' *****
'
' Allg. Gaskonstante [J/(mol*K)]
Const R As Double = 8.314
'
' Globale Variablenbezeichner:
' *****
'
' Ende Deklarationsteil
' *****

' 2.8 Programmteil
' *****
' Auswertungsroutine fuer Thermobakteriologie
' *****

Public Function Thermobac_V11(EineSpalte As Integer, EineDatei As PSystem, EinBac As PBac) As Double

Dim N_ti As Double
' Keimzahl N(t) [KBE]
```

Kapitel 7

```
Dim ErstesBlatt As Integer
' Allg. Statusvariable: 1 = Erstes Tabellenblatt; 0 = Spaetere Tabellenblaetter

Dim Ergebnisspalte As Integer
' Nummer der Ergebnisspalte

Dim Zeit1 As Double
Dim Zeit2 As Double
Dim tau As Double
Dim ErsteWirk As Double
Dim ErsteWirkFlag As Boolean
' Zeit1, 2: Zeitpunkte zweier Messungen (Labor)
' tau: dimensionslose Zeitdifferenz (Labor)
' ErsteWirk: Erste Ueberschreitung der Wirktemperatur (Labor)

Dim Temp1 As Double
Dim Temp2 As Double
Dim MittTemp As Double
' Temp1, 2: Temperaturen zweier Messungen
' MittTemp: Arithm. Mittel zweier Temperaturmessungen

Dim i As Long
Dim l As Long
' Allg. Schleifenvariablen

' Schleifenrandbedingungen
N_ti = EinBac.No
MittTemp = 0
EineDatei.Zaehler = EineDatei.Startzaehler
EineDatei.Blattname = FillName(EineDatei.Prefix, EineDatei.Startzaehler)
ErstesBlatt = 1
Ergebnisspalte = EineSpalte + 6
Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(Anfang, Ergebnisspalte) = Round(Log(EinBac.No) / Log(10), 3)

' Vorbereitende Rechnungen fuer spezielle Modelle
Select Case EineDatei.ThermoModell

Case ThermoBac

Case ThermLag
ErsteWirkFlag = False
End Select

' Uebernimmt Startmessung, wenn Zelle nicht leer.
If Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(Anfang, EineSpalte) <> "" Then
Temp2 = Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(Anfang, EineSpalte)
Temp2 = Temp2 + Kelvin
```

```
Zeit2 = Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(Anfang, 7)
Else: EineDatei.ErrStr = "200"
End If

' Schleifenbeginn
For l = 1 To EineDatei.Anzahl
EineDatei.Blattname = FillName(EineDatei.Prefix, EineDatei.Zaehler + l - 1)

For i = Anfang + ErstesBlatt To Ende

' Reset Blattflag
ErstesBlatt = 0

' Gibt Temperatur [K] und Zeit aus erster Messung weiter
Temp1 = Temp2
Zeit1 = Zeit2

' Nimmt Temperatur [°C] und Zeit naechster Messung auf, wenn Zelle nicht leer.
If Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(i, EineSpalte) <> "" Then
Temp2 = Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(i, EineSpalte)
Temp2 = Temp2 + Kelvin
Zeit2 = Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(i, 7)

' Berechnet mittlere Entkeimungstemperatur
MittTemp = (Temp2 + Temp1) / 2

' Prüft, ob mittlere Temperatur wirksam ist
If MittTemp >= EinBac.TBioMax Then
tau = Zeit2 - Zeit1

' Fordert dann Keimzahlberechnung gem. Modellvorgabe an
Select Case EineDatei.ThermoModell

Case ThermoBac
N_ti = Classic_Keimzahl(N_ti, MittTemp, tau, EinBac)

Case ThermLag
If ErsteWirkFlag = False Then
ErsteWirk = Zeit1
ErsteWirkFlag = True
End If
N_ti = BZ_Keimzahl(N_ti, tau, Zeit2, ErsteWirk, MittTemp, EinBac)

End Select

' Korrigiert ggf. zu niedrige Werte
If N_ti < 0.000000000001 Then
```

```
N_ti = 0.000000000001
End If
End If

' Falls Temperaturzelle leer folgt Abbruch.
Else
i = Ende
l = EineDatei.Anzahl
End If

' Ausgabe Ergebnisse jeden Schleifendurchlaufes
Worksheets(EineDatei.Blattname).Cells(i, Ergebnisspalte) = Round(Log(N_ti) / Log(10), 3)

' Beendet Blattschleife
Next i

' Formatiert Ergebnis-Spalten
EineDatei.ErrStr = Str(Format_Spalte(EineDatei.Blattname, EineSpalte, Ergebnisspalte))
EineDatei.ErrStr = "000"

' Beendet Tabellenschleife
Next l

Thermobac_V11 = N_ti

End Function

' Ende Prozedurteil
' *****

' D. Funktionenteil
' *****

Public Function InitBac_11(EinRechenModell As Integer) As PBac

Dim EinBacSet As PBac
' Arbeitsdatensatz

Select Case EinRechenModell
Case ThermoBac
' Ruft Dialogobjekt auf
Application.ScreenUpdating = True
With BacDlg
.Show

' Datentransfer in Bac-Objekt
EinBacSet.TBioMax = .Wachstums_T.Value
EinBacSet.No = .N_Null
```

```

EinBacSet.Genus = .Organismus
If .D_Wert > 0 Then
EinBacSet.DWert = .D_Wert
EinBacSet.ZWert = .z_Wert
EinBacSet.TRef = .T_Ref
Else
EinBacSet.DWert = -1
EinBacSet.km = .k_t
EinBacSet.EA = .EA
EinBacSet.TRef = .T_RefK
End If
EinBacSet.a_Lag = 0
EinBacSet.b_Lag = 0
End With
Application.ScreenUpdating = False

Case ThermLag
' Ruft Dialogobjekt auf
Application.ScreenUpdating = True
With LagDlg
.Show

' Datentransfer in Bac-Objekt
EinBacSet.TBioMax = .Wachstums_T.Value
EinBacSet.No = .N_Null
EinBacSet.Genus = .Organismus
If .D_Wert > 0 Then
EinBacSet.DWert = .D_Wert
EinBacSet.ZWert = .z_Wert
EinBacSet.TRef = .T_Ref
Else
EinBacSet.DWert = -1
EinBacSet.km = .k_t
EinBacSet.EA = .EA
EinBacSet.TRef = .T_RefK
End If
EinBacSet.a_Lag = .a_Wert
EinBacSet.b_Lag = .b_Wert
End With
Application.ScreenUpdating = False
End Select

' Umformung Bigelow nach Arrhenius und Nebenrechnungen
With EinBacSet
.TBioMax = .TBioMax + Kelvin
.TRef = .TRef + Kelvin

```

```

If .DWert <> -1 Then
.km = 2.303 / .DWert
.EA = (2.303 * R * .TRef * .TRef) / .ZWert
Else
.EA = .EA * 1000
.DWert = 2.303 / .km
.ZWert = (2.303 * R * .TRef * .TRef) / (.EA)
End If
.ko = .km / (Exp(-.EA / (R * .TRef)))
End With

```

```
InitBac_11 = EinBacSet
```

```
End Function
```

```

Public Function Classic_Keimzahl(N As Double, Temperatur As Double, Dauer As Double,
EinBacSet As PBac) As Double
' Berechnet Keimzahl nach der Zeit tau
Classic_Keimzahl = N * Exp(-Calc_km(Temperatur, EinBacSet) * Dauer)

```

```
End Function
```

```
Public Function Calc_km(Temperatur As Double, EinBacSet As PBac) As Double
```

```

' Berechnet Geschwindigkeitskoeffizient von Temperatur
If Temperatur > 0 Then
Calc_km = EinBacSet.ko * Exp(-EinBacSet.EA / (R * Temperatur))
Else: Calc_km = 0
End If

```

```
End Function
```

```
Public Function Format_Spalte(EinBlattName As String, EineDatenSpalte As Integer, EineErgSpalte As Integer) As Integer
```

```

' Formatiert Ergebnis-Spalten
Sheets(EinBlattName).Activate
Worksheets(EinBlattName).Cells(Anfang - 1, EineErgSpalte) = "lg N(t, T_" + Str(EineDatenSpalte) + ") [KBE]"
Columns("H:L").NumberFormat = "0.000"
Columns("H:L").Columns.AutoFit
Range("A1").Select

```

```
Format_Spalte = 201
```

```
End Function
```

Public Function BZ_Keimzahl(N As Double, Dauer As Double, tk As Double, t_null As Double, Temperatur As Double, EinBacSet As PBac) As Double

' Berechnet Keimzahl unter Beruecksichtigung der Lag-Phase nach Baranyi (BZ)

Dim t_lag As Double

Dim delta_t As Double

Dim A_t As Double

Dim BZ_klg As Double

' Fordert km-Berechnung an

BZ_klg = Calc_km(Temperatur, EinBacSet)

' Berechnet Zeitabstand zwischen Messung und erster Ueberschreitung der Wirktemp.

delta_t = tk - t_null

' Berechnet Lag-Zeit gemaess Temperatur

t_lag = (EinBacSet.a_Lag * Exp(EinBacSet.b_Lag * Temperatur)) - delta_t

If t_lag <= 0 Then

t_lag = 0

End If

' Berechnet Baranyi-Faktor

A_t = Dauer + ((1 / BZ_klg) * Log(Exp(-BZ_klg * Dauer) + Exp(-BZ_klg * t_lag) - Exp((-BZ_klg * Dauer) - (BZ_klg * t_lag))))

' Berechnet Keimzahl

BZ_Keimzahl = Exp(Log(N) - (BZ_klg * A_t))

End Function

' Ende Funktionenteil

' *****

' Ende Modul 3

' *****

8 Publikationen & Lebenslauf

Fachzeitschriften/Journals, Reprints

M. Lilie, S. Hein, P. Wilhelm, U. Müller. Decontamination of spices by combining mechanical and thermal effects – an alternative approach for quality retention. *Int J Food Sci Tech*, 42(2):190-193, 2007.

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller, U. Anwendung der Flash-Verdampfung zur Entkeimung pflanzlicher Materialien. *Chem Ing Tech*, 78:1243-1244, 2006.

T. Rumke, M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Schonende Keimzahlreduktion von Arznei- und Gewürzpflanzen am Beispiel von *Matricariae flos*. *Z Arzn Gew Pfl*, 11(3):142-144, 2006.

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Mechanische Effekte bei der Sattdampfentkeimung. *Chem Ing Tech*, 76(10):1602-1605, 2004.

P. Wilhelm, M. Lilie, S. Barbe und U. Müller. Mild steam-decontamination of drugs and other plant material using mechanical effects. Reprint zum International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, 15.-17.03.2004.

U. Müller, P. Wilhelm, M. Lilie und S. Barbe. Mechanical decontamination effects during a steam treatment of foods. Reprint zum International Congress on Engineering and Food (ICEF 9), Montpellier/F, 8.-11.03.2004.

Vorträge

Vortragender

M. Lilie, U. Müller, V. Walhorn, R. Ros, D. Anselmetti, K. Friehs, E. Flaschel. Haftkraftuntersuchungen an bakteriellen Sporen von *Bacillus sp.* in Luft und Wasser mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM). Vortrag beim GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie 2007, HH-Harburg, 11.-13.10.2007.

M. Lilie, R. Pfaff, P. Wilhelm, U. Müller. Haftkraftuntersuchungen an bakteriellen Sporen mittels eines Vakuum-Druck-Vakuum-Verfahrens am Beispiel von *Bacillus sp.* Vortrag zur ProcessNet-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Zürich/CH, 15./16.03.2007.

M. Lilie, P. Wilhelm, B. Loskand, U. Müller. Anlagenoptimierung bei der Vakuum-Druck-Vakuum-Behandlung von pflanzlichen Materialien. 4. Lemgoer Nachmittag zu Entkeimungsfragen, FH Lippe und Höxter, Lemgo, 1.12.2006.

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Energetische Betrachtungen zur Sattdampfentkeimung im fluidisierten Bett. GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittel-verfahrenstechnik, Reinbek, 20.-22.03.06.

M. Lilie, P. Wilhelm, S. Hein, U. Müller. Fortschritte bei der mechanischen Sattdampfentkeimung. VDI-GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Berlin, 07.-09.03.2005.

M. Lilie, S. Hein, P. Wilhelm, C. Giefers, U. Müller. Fortschritte beim Lemgoer Sattdampfentkeimungsverfahren. 2. Lemgoer Nachmittag zu Entkeimungsfragen, FH Lippe und Höxter, Lemgo, 10.12.2004.

M. Lilie, P. Wilhelm, C. Giefers, U. Müller, D.M. Cuqat. Fortschritte bei der Anwendung der Flash-Verdampfung für die mechanische Entkeimung von (Lebensmittel-)Oberflächen. Innofood 2004, HS Anhalt, Köthen, 23.-24.10.2004.

Co-Autor

U. Müller, M. Lilie, P. Wilhelm. Thermisch-letale Effekte und mechanische Ablösung bei der mechanischen Sattdampfentkeimung. Vortrag bei der Tagung der GEFTA (Ges. für Thermische Analyse), Bremerhaven, 12.-14.9.2007.

P. Wilhelm, C. Giefers, M. Lilie, U. Müller. Kalkulation thermischer Abtötungseffekte – Unterstützung bei der Auslegung von Entkeimungsprozessen. GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie 2005, Dresden, 06.-08.10.2005.

U. Müller, P. Wilhelm, C. Giefers, M. Lilie. Stand der Untersuchungen zur mechanischen Sattdampfentkeimung. GDL Kongress Lebensmitteltechnologie 2005, Dresden, 06.-08.10.05.

S. Hein, U. Müller, M. Lilie, P. Wilhelm, C. Giefers. Übersicht - Einordnung neuartiger Entkeimungsverfahren. 2. Lemgoer Nachmittag zu Entkeimungsfragen, FH Lippe und Höxter, Lemgo, 10.12.2004.

U. Müller, M. Lilie, P. Wilhelm. Mechanische Entkeimung – der Einsatz der Flashverdampfung für die Oberflächenentkeimung. Symposium „Höhere Qualität durch reinere Produkte“, Universität Karlsruhe, 30.9.-01.10.2004.

P. Wilhelm, M. Lilie, S. Barbe, U. Müller. Mild steam-decontamination of drugs and other plant material using mechanical effects. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg, 15.-17.03.2004.

P. Wilhelm, U. Müller, S. Barbe, M. Lilie. Mechanische Effekte bei der Sattedampfentkeimung von *B. subtilis* und *L. plantarum* auf verschiedenen Oberflächen. 1. Lemgoer Nachmittag zu Entkeimungsfragen, FH Lippe und Höxter, Lemgo, 12.12.2003.

P. Wilhelm, U. Müller, S. Barbe, M. Lilie. Mechanical components in the decontamination of *B. subtilis* and *L. plantarum* on various surfaces – a progress report”, Institute of Food Research, Norwich/UK, 14.11.2003.

Poster

M. Lilie, S. Burgemeister, E. Flaschel, K. Friehs, U. Müller. Einsatz der Bildanalyse zum Nachweis mechanischer Entkeimungseffekte. ProcessNet-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Lausanne/CH, 23.-25.03.2009.

M. Zakowski, M. Lilie, D. Schisnowski, S. Bogdon, P. Wilhelm, E. Flaschel, K. Friehs, U. Müller. Nicht-Isotherme Modellierung der thermischen Inaktivierung von *Bacillus*-Sporen. ProcessNet-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Lausanne/CH, 23.-25.03.2009.

B. Loskand, M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Anlagenoptimierung bei der VDV-Entkeimung von pflanzlichen Materialien im bewegten Produktbett – Verbesserung der Produkteigenschaften und der Produktrückhaltung. ProcessNet-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Zürich/CH, 15.-16.03.2007.

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Anwendung der Flash-Verdampfung zur Entkeimung pflanzlicher Materialien. GVC/DECHEMA-Jahrestagung, Wiesbaden, 26.-28.09.2006 und Innofood 2006, HS Anhalt, Bernburg, 02.-03.11.2006.

A. Plassmeier, M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Das besondere Problem des ätherischen Öls bei der Sattedampfentkeimung von Majoran. GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Reinbek, 20.-22.03.2006.

T. Rumke, M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Sattedampfentkeimung von Kamilleblüten unter Berücksichtigung qualitativer Aspekte. GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Reinbek, 20.-22.03.2006.

S. Hein, M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Produktschonende Entkeimung mit Sattedampf – Betrachtungen zur Veränderung des Gehaltes und der Zusammensetzung von ätherischen Ölen am Beispiel von schwarzem Pfeffer. VDI-GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Berlin, 7.-09.03.2005.

P. Wilhelm P, Giefers C, Lilie M, Müller U. Kalkulation thermischer Entkeimungseffekte beim Lemgoer Sattdampfentkeimungsverfahren auf Basis realer Temperaturverläufe. VDI-GVC-Fachausschusssitzung Lebensmittelverfahrenstechnik, Berlin, 7.-09.03.2005.

S. Hein, M. Lilie, C. Giefers, D. Cuqat, U. Müller. Produktschonende Entkeimung – Betrachtungen zur Veränderung des Gehaltes und der Zusammensetzung von ätherischen Ölen am Beispiel von schwarzem Pfeffer. Innofood 2004, HS Anhalt, Köthen, 23.-24.10.2004.

U. Müller, P. Wilhelm, M. Lilie, S. Barbe. Mechanical decontamination effects during a steam treatment of foods. International Congress on Engineering and Food (ICEF 9), Montpellier/F, 08.-11.03.2004.

M. Lilie, P. Wilhelm, U. Müller. Lemgoer Sattdampfverfahren – Ansätze einer Reinigungstechnik für Oberflächen. GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie 2003, Stuttgart-Hohenheim, 25.09.-27.09.2003.

Lebenslauf

Perönliche Daten

Name: Markus Lilie
Anschrift: Bergstr. 14
32657 Lemgo
geboren am: 09.03.1980
in: Wolfen/Sachsen-Anhalt
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Berufliche Tätigkeiten

ab 09/2009 Projektingenieur (Abt. Technology and Engineering) bei der Baxter Oncology GmbH, Halle/Westf.

09/2003 - 08/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Labor Verfahrenstechnik der Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Lemgo

Studium/Wehrdienst/Schule

09/2005 - 04/2009 Promotion an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld, extern an der Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Lemgo
Thema: Mechano-thermische Vakuum-Dampf-Vakuum-Entkeimung (mtVDV) am Beispiel bakterieller Sporen
04/2004 - 09/2005 Studium zum Erhalt der Promotionsberechtigung an der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld
03/2000 - 08/2003 Studium der Lebensmitteltechnologie, Fachrichtung Biotechnologie mit zusätzlicher Vertiefung auf dem Gebiet der Abwasserreinigung an der Fachhochschule Lippe, Lemgo
11/1998 - 12/1999 Wehrdienst (W12) beim ABC Abwehr Btl. 7, Höxter
1998 Abitur am Gymnasium Wolfen-Stadt

Fremdsprachen

Gute Englischkenntnisse in Wort und Schrift
Grundkenntnisse Französisch

Hobbys

Angeln, Squash, Ahnenforschung

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Bielefeld im Juli 2009

Markus Lilie