

Gabriela Badolato Bönisch

# Untersuchung zur mikrobiologischen Stabilisierung von Emulsionen



universitätsverlag karlsruhe



Gabriela Badolato Bönisch

**Untersuchung zur mikrobiologischen Stabilisierung  
von Emulsionen**



# **Untersuchung zur mikrobiologischen Stabilisierung von Emulsionen**

von  
Gabriela Badolato Bönisch



---

universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)  
Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2009

## Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe  
c/o Universitätsbibliothek  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe  
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz  
lizenziiert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2009  
Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-407-2







# **Untersuchung zur mikrobiologischen Stabilisierung von Emulsionen**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
der Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte  
**Dissertation**

von  
MSc. Gabriela Badolato Bönisch  
Geb. Gastaldo Badolato  
aus São Paulo  
Brasilien

Referent: Prof. Dr.-Ing. habil. H. Schubert  
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. C. Posten  
Tag des Kolloquiums: 15. Mai 2009



## Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2002 bis 2007 am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich Lebensmittelverfahrenstechnik der Universität Karlsruhe (TH). An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr.-Ing. Helmar Schubert für die Anregung und Betreuung dieser Dissertation sowie für die zahlreichen Ideen und Vorschläge und für die kontinuierliche Unterstützung,

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für das Interesse an meiner Arbeit und die freundliche Übernahme des Korreferats,

Prof. Dr.-Ing. Heike P. Schuchmann, die mich nach Übernahme der Institutsleitung im Jahre 2004 unterstützt und mit Rat und Vorschlägen geholfen hat,

Dr. Ing. Jutta Altenbach-Rehm, die mich während der ersten Monate meiner Promotionszeit freundlich betreut hat,

Martina Göring, die mir als technische Mitarbeiterin über weite Teile meiner Promotionszeit im Bio-Labor geholfen hat,

Nina Weis, die immer freundlich und hilfsbereit, große Teile meiner Versuche mit großer Sorgfalt durchgeführt hat,

allen Studentinnen und Studenten, die im Rahmen ihrer Studien- und Diplom-Arbeiten, sowie durch das Erasmus und Pro-3 Programm oder im Rahmen von Hiwi-Tätigkeiten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Andreea, Anja, Diliana, Giulliana, Huayna, Kristina, Mareike, Jessica, Carlos und Angelo,

den LVT-Mädels; Andrea Butterbrodt, Annette Berndt, Jessica Kehler, Lydia Schütz, Renate Genzer und Nina Weis, die mir immer wieder bei Messungen, Vorschlägen und Korrekturen von Emails und Briefen geholfen haben. Und für die vielen, lustigen Stunden, die wir zusammen am Kaffeetisch oder beim Frauenabend verbracht haben,

an Heinrich Steigleder für die hilfreichen Konstruktionszeichnungen, technischen Ratschläge, Begleitung „gefährlicher“ Experimente und für die Schach-Lehrstunden.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich für die fachlichen Diskussionen, Probevorträge, Deutsch-Korrekturen und moralische Unterstützung

bedanken und die dafür gesorgt haben, dass die Arbeit am Institut viel Spaß gemacht hat. Mein herzlichster Dank gilt Kevin, Caroline, Claudia, Robert, Freddy, Kai, Henelyta, Mathias, Kerstin, Ping und Marc.

Bei Volker Gaukel möchte ich mich sehr für die organisatorische Hilfe bedanken.

Diana Behsnilian und Ulrich Metzger danke ich für die freundliche Hilfe bei der Mikroorganismen-Trocknung.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dipl.-Ing. Caroline Sauter, Erika Sonnenburg und Katharina Bönisch.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft bedanken, die einen Teil dieser Arbeit ermöglicht hat.

Meinem Mann Wolfgang Bönisch danke ich für die unermüdliche Unterstützung, die vielen Korrekturen, die interessanten Diskussionen und insbesondere für sein Verständnis und seine Geduld.

Meinen Eltern Danilo A. C. Badolato und Elza S. Badolato gilt mein herzlichster Dank für die große finanzielle und moralische Unterstützung, auch wenn sie unter der großen Distanz leiden mussten. Ohne sie hätte diese Arbeit nicht realisiert werden können.

Ich danke auch meinen Brüdern Alexandre G. Badolato und Thiago G. Badolato, die mich auf ihre Art immer unterstützt haben. Thiago, danke für die Unterstützung beim Layoutdesign.

*Para*

*Elza, Danilo, Ale, Thi e Wolfi*

*com amor*



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen und Stand des Wissens.....</b>	<b>5</b>
2.1	Emulsionen.....	5
2.1.1	Allgemeines.....	5
2.1.2	Emulgierverfahren.....	6
2.1.2.1	Membranemulgieren.....	7
2.1.3	Physikalische Stabilität von Emulsionen.....	11
2.2	Bakterien und Bakterienwachstum.....	13
2.2.1	Mikroorganismen.....	13
2.2.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	13
2.2.2	Oberflächeneigenschaften von Mikroorganismen....	13
2.2.3	Wachstum von Bakterien.....	15
2.2.3.1	Ermittlung des Wachstums.....	17
2.3	Mikrobiologische Stabilität von Emulsionen.....	18
2.3.1	Allgemeines.....	18
2.3.2	Mikrobiologische Stabilität von W/O-Emulsionen....	20
2.4	Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen.....	23
2.4.1	Allgemeines.....	23
2.4.2	Überlebungskurve und mathematische Modellierung.....	26
2.5	Sterilfiltration.....	30
2.5.1	Allgemeines.....	30
2.5.2	Sterilfiltration von parenteralen Emulsionen.....	31
<b>3</b>	<b>Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>33</b>

---

<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
4.1	Material.....	35
4.1.1	Ölige Fluide.....	35
4.1.2	Emulgatoren.....	36
4.1.3	Mikroorganismen.....	37
4.1.4	Nährmedien.....	39
4.2	Analyse und Analysegeräte.....	40
4.2.1	Tropfengrößenverteilung.....	40
4.2.2	Keimzahlbestimmungen.....	42
4.2.2.1	Bestimmung der optischen Dichte.....	42
4.2.2.2	Bestimmung der Keimzahl nach dem Plattenverfahren.....	43
4.3	Methoden.....	45
4.3.1	Allgemeine Methoden.....	45
4.3.1.1	Herstellen der Emulsionen.....	45
4.3.1.2	Trennung des Bakterienpellets.....	45
4.3.1.3	Trocknen und Dispergieren der Mikroorganismen in Öl .....	46
4.3.2	MATH-Test und Verteilung der Mikroorganismen in Emulsionen.....	46
4.3.3	Mikroskopische Untersuchungen.....	47
4.3.3.1	Lichtmikroskope.....	47
4.3.3.2	Fluoreszenzmikroskop und Farbstoffe.....	48
4.4	Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen.....	48
4.4.1	Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in einzelnen Phasen einer Emulsion.....	48
4.4.2	Herstellung und Untersuchung von mit Mikroorganismen versetzten Emulsionen.....	49



---

4.4.3	Herstellung und Untersuchung von mit Mikroorganismen versetzten Biliquid Foams.....	50
4.5	Untersuchung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	50
4.5.1	Untersuchung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in reinen öligen und wässrigen Phasen.....	51
4.5.2	Inaktivierung in der wässrigen Phase.....	51
4.5.3	Inaktivierung in der öligen Phase.....	52
4.5.4	Untersuchung zur Inaktivierung von Mikroorganismen in den kontinuierlichen Phasen von O/W-Emulsionen.....	52
4.6	Untersuchung zum Herstellen von sterilen Emulsionen durch Premix-Membranemulgieren.....	54
4.6.1	Membranen.....	54
4.6.2	Herstellung von Modellemulsionen zur Untersuchung des Premix-Membranemulgierens.....	55
4.6.3	Ermittlung des Prozessfluxes.....	56
4.6.4	Untersuchung der physikalischen Stabilität.....	56
4.6.5	Untersuchung der mikrobiologischen Stabilität.....	56
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>59</b>
5.1	Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	59
5.1.1	Ergebnisse des MATH-Tests.....	59
5.1.2	Verteilung von Mikroorganismen in den Phasen während des Emulgierverlaufs.....	60
5.1.3	Mikroorganismen an der Tropfengrenzfläche.....	62
5.1.4	Zusammenfassung zur Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	65

---

5.2	Mikrobiologische Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend kleiner Tropfen.....	67
5.2.1	Wachstum von Mikroorganismen in den einzelnen Phasen einer Emulsion.....	67
5.2.1.1	Wachstum von <i>E. coli</i> K12 in LB-Medium.....	67
5.2.1.2	Wachstum von Mikroorganismen in Pflanzenöl.....	73
5.2.2	Modellberechnung zur Beschreibung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen....	75
5.2.2.1	Berechnung der maximalen Keimzahl bezüglich des Tropfenvolumens.....	75
5.2.2.2	Berechnung der maximalen Keimzahl unter Berücksichtigung der Substratmenge in einem Tropfen.....	80
5.2.3	Experimentelle Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen.....	83
5.2.3.1	Vorversuche.....	83
5.2.3.2	Einfluss der Tropfengröße der W/O-Emulsionen auf das Wachstum der Mikroorganismen.....	86
5.2.3.3	Einfluss der Substratkonzentration auf das Mikroorganismenwachstum.....	89
5.2.3.4	Einfluss der Anfangskeimzahl auf das maximale Mikroorganismenwachstum in Emulsionen.....	90
5.2.3.5	Langzeitversuche zur mikrobiologischen Stabilität von W/O-Emulsionen.....	92
5.2.3.6	Mikroskopische Untersuchung von W/O-Emulsionen.....	93
5.2.4	Untersuchung der mikrobiologischen Stabilität von Biliquid Foams.....	94
5.2.5	Langzeitversuche zur mikrobiologischen Stabilität von Biliquid Foams.....	97

---

5.2.6	Vergleich der Keimzahl von <i>E. coli</i> K12 im LB-Medium, Pflanzenöl und in Emulsionen während der Langzeitlagerung.....	97
5.2.7	Vergleich der experimentellen und theoretischen Ergebnisse des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen.....	98
5.2.8	Zusammenfassung und Schlussfolgerung zur Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend feiner Tropfen.....	102
5.3	Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	107
5.3.1	Thermische Inaktivierung von hydrophilen Mikroorganismen in der wässrigen und öligen Phase.....	107
5.3.2	Vorversuche zur Anpassung der Inaktivierungsmethode für O/W-Emulsionen.....	109
5.3.3	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Inaktivierung.....	111
5.3.4	Versuchsplan zur Untersuchung des Einflusses der Emulsionseigenschaften auf die Inaktivierung in O/W-Emulsionen.....	112
5.3.5	Vergleich der Inaktivierung von hydrophilen und hydrophoben Mikroorganismen in der wässrigen Phase einer O/W Emulsion.....	118
5.3.6	Zusammenfassung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen.....	119
5.4	Herstellen von sterilen Emulsionen durch Premix-Membranemulgieren.....	121
5.4.1	Charakterisierung des Verfahrens.....	121

---

5.4.1.1	Einfluss der Prozessparameter auf das Emulgierergebnis.....	123
5.4.1.2	Einfluss der Zusammensetzung der Emulsion auf das Emulgierergebnis.....	127
5.4.1.3	Einsatzbereiche für Membranen mit mittlerer Porengröße von 0,2 µm und 0,45 µm.....	132
5.4.2	Herstellung von parenteralen Emulsionen mittels des Premix-Membranemulgierens.....	135
5.4.2.1	Physikalische Stabilität der Emulsion.....	141
5.4.2.2	Mikrobiologische Stabilität der Emulsion.....	141
5.4.3	Zusammenfassung zur Untersuchung der Abtrennung von Mikroorganismen mit Hilfe des Premix-Verfahrens.....	144
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>147</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>161</b>

**Abkürzungen:**

ATCC	American Type Culture Collection
BATH	Bacterial Adhesion to Hydrocarbons
BFE	Bundesforschungsanstalt für Ernährung
CMC	Kritische Mizelbildungskonzentration
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSZM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
HEPA	High Efficiency Particulate Air
HLB	Hydrophil-lipophil-balance
KBE	Koloniebildende Einheiten
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MATH	Microbial Adhesion to Hydrocarbons
MCT	Medium Chain Triglyceride
ME	Membranemulgieren
MO	Mikroorganismus bzw. Mikroorganismen
MRI	Max Rubner-Institut
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
OW	Öl-in-Wasser
O.D.	Optische Dichte
PGPR	Polyglycerinpolyrhecinoleat
PIDS	Polarization Intensity Differential Scattering
PIT	Phaseninversionstemperatur
PME	Premix-Membranemulgieren
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	Umdrehung pro Minute
UHT	Ultrahochtemperatur
W/O	Wasser-in-Öl

**Mikroorganismen:**

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>

**Formelzeichen & Symbole**

## Lateinische Buchstaben

A	Membranfläche	$m^2$
$a_w$	Wasseraktivität	-
B	Durchlässigkeit bzw. Permeabilität	$m^2$
b	Geschwindigkeitsparameter des weibullähnlichen Modells	-
C	Substratmenge	g
c	Konzentration	$g \cdot l^{-1}$
D	Dezimale Reduktionszeit (D-Wert)	s
d	Durchmesser	m
F	Inaktivierungszeit (F-Wert)	s
f	Fit- Parameter (Cerf, 1977)	-
g	Erdbeschleunigung	$9,81 m \cdot s^{-2}$
l	Länge	m
J	Flux des Prozesses	$m^3 \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$
K	Beiwert, abhängig von der Porenstruktur ( $K = 1$ für zylindrische Poren)	-
K	Substrat-Konstante	-
k	Geschwindigkeitskonstante	$s^{-1}$
k	Konstant	-
$k_1$	Parameter des Sigmoiden Ansatzes (Länge der Schulter)	-

$k_2$	Parameter des Sigmoiden Ansatzes (Restpopulation)	-
L	Dicke der Membran	m
M	Biomasse /	g
M'	Biomasse der Mikroorganismus	g
m	Formfaktor des sigmoiden Ansatzes	-
$m_e$	Energie, die ein Mikroorganismus zum Überleben benötigt	$g \cdot h^{-1}$
N	Keimzahl, Keimkonzentration; maximale Mikroorganismen-Konzentration	KBE/g; KBE/l
n	Inaktivierungskriterium ( $\log(N/N_0)$ )	-
n	Formfaktor des weibullähnlichen Modells	-
n	Anzahl	-
p	Drück	Pa; bar
$P_0$	Anfangskeimzahl in der wässrigen Phase	KBE/g; KBE/l
$P_r$	Zahl der Tropfen mit Radius r und einem Mikroorganismus	-
$q_2(x)$	Oberflächendichteverteilung	$m^{-1}$
$q_3(x)$	Volumendichteverteilung	$m^{-1}$
R	Universelle Gaskonstante	8,314 $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
S	Menge an Substrat	g
$S_v$	Spezifische Grenzfläche	$m^2$
SPAN	Breite einer Verteilung	-
T	Temperatur	$^{\circ}C$ ; K
T	Anzahl an Tropfen	-
t	Zeit	s
$t_{ext}$	Extinktionszeit	s
$\dot{V}$	Volumenstrom des Fluids	$m^3 \cdot h^{-1}$

V	Volumen	l
v	Strömungsgeschwindigkeit /	s <sup>-1</sup>
x	Tropfengröße	m
x <sub>1,2</sub>	Sauterdurchmesser	m
x <sub>1,3</sub>	Mittlerer Durchmesser der Volumenverteilung	m
x <sub>3,10</sub>	x <sub>10</sub> -Wert der Volumenverteilung	m
x <sub>3,50</sub>	x <sub>50</sub> -Wert der Volumenverteilung	m
x <sub>3,90</sub>	x <sub>90</sub> -Wert der Volumenverteilung	m
x <sub>3,99</sub>	x <sub>99</sub> -Wert der Volumenverteilung	m
Y <sub>x/S</sub>	Ausbeutekoeffizient (oder Ertragskoeffizient)	-
z	Dezimale Reduktionstemperatur (z-Wert)	K
z	Zentrifugalkraft	m·s <sup>-2</sup>

### Griechische Buchstaben

γ	Grenzflächenspannung zwischen den Phasen	N·m <sup>-1</sup>
δ	Kontaktwinkel zwischen Fluid und Membran	°
η	Dynamische Viskosität des Fluids	Pa·s
μ	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit	h <sup>-1</sup>
λ	Wellenlänge	m
φ	Dispersphasenanteil	-
α	Signifikanzniveau	-

### Indizes

0	Anfangswerte
E	End-Wert
K	Kontroll-Wert
k	Kapillar-
krit	kritisch
max	maximal
min	minimal



---

MO	Mikroorganismus
osm	Osmotisch
p	Poren-
r	Tropfen mit Radius r
S	Substrat
T	Temperatur
T	Tropfen
X	Biomasse

**Operator**

$\Delta$	Differenz
d	Differential
$\Sigma$	Summe

**Anmerkung zu den Abbildungen**

Die Balken an den Messwerten einiger Abbildungen geben jeweils die Standardabweichungen der Mittelwerte an.



## 1 Einleitung

Aus Sicht der öffentlichen Meinung in Deutschland werden viele Verfahren, wie die einfache Nutzung von Zusatzstoffen oder Mikrowellen, als hohes Risiko angesehen. In Bezug auf Mikroorganismen ist es das Gegenteil und die Menschen haben nur geringe Angst [vgl. Schubert, 2007]. Was vielleicht vielen nicht bewusst ist: Allein in Deutschland werden jährlich rund 200000 Lebensmittelerkrankungen gemeldet [Keweloh, 2006]. Weltweit sterben viele Menschen an Vergiftungen, die durch Mikroorganismen hervorgerufen werden.

Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung der mikrobiologischen Stabilisierung einer bestimmten Produktart: Emulsionen. Viele Lebensmittel wie Milch, Margarine, aber auch kosmetische Cremes und einige Arzneimittel sind Emulsionen, disperse Mehrphasensysteme aus mindestens zwei ineinander nahezu unlöslichen Flüssigkeiten. Diese Produkte sind häufig ideale Nährböden für viele Mikroorganismen. Ein klassisches Beispiel ist die Milch.

Ein Produkt ist mikrobiologisch stabil, wenn keine Veränderung auf Grund der Tätigkeit von Mikroorganismen stattfindet. Die mikrobiologische Stabilität kann durch unterschiedliche Verfahren, zum Beispiel durch Absenken des pH- oder  $a_w$ -Wertes (Wasseraktivität), der Zugabe von Konservierungsmitteln und/oder durch eine thermische Behandlung (Pasteurisieren, Sterilisieren) erreicht werden. Die thermische Behandlung findet häufig Anwendung. Sie wird vom Verbraucher akzeptiert und ist gleichzeitig kostengünstig im Vergleich zu anderen Haltbarkeitsverfahren.

Unterschiedliche Produkte haben unterschiedliche Anforderungen an die mikrobiologische Stabilität. Für Milch ist z.B. die Pasteurisierung und anschließende Kühlung hinreichend, um über einen relativ kurzen Zeitraum (wenige Tage) ein sicheres Produkt zu liefern. Produkte wie parenterale Emulsionen, die direkt ins Blut des Menschen oder eines Tieres injiziert werden, müssen jedoch steril sein.

In den letzten Jahrzehnten ist „fast food“ immer weiter verbreitet worden. Eine Folge dieser Entwicklung ist die Zunahme an übergewichtigen Menschen in der Bevölkerung und es entstanden fett- bzw. kalorienreduzierte Lebensmittel. Ein Beispiel hierfür ist Margarine, die als Halbfettmargarine im Fettgehalt von 80 % auf bis zu 40 % reduziert wurde. Durch die Erhöhung des Wassergehalts wurde das Produkt jedoch empfindlicher gegenüber Mikroorganismenbefall. Gleichzeitig wächst die Tendenz bei den Verbrauchern, Lebensmittel mit weniger „Chemikalien“ zu bevorzugen. Das bedeutet, dass übliche Konservierungsmittel wie Sorbinsäure für Halbfettmargarine derzeit nicht von hoher Akzeptanz sind.

Da Mikroorganismen Wasser benötigen, um sich zu vermehren, können sie in Öl, wegen der zu geringen Löslichkeit des Wassers, nicht wachsen [Miller, 2006]. In einer Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsion wie Butter und Margarine erfolgt das Wachstum daher nur in den Tropfen aus Wasser oder an der W/O-Grenzfläche. In früheren Zeiten war das Herstellen von Butterschmalz weit verbreitet. Die Haltbarkeit der Butter wurde durch Wasserentzug verlängert.

Jacobsen hatte im Jahr 1931 die erste Vermutung, dass das Mikroorganismen-Wachstum in einer W/O-Emulsion von der Tropfengröße abhängig sein muss. Damals konnte er seine Hypothese nicht überprüfen. 1980 bewiesen *Verrips und Zaalberg* sowie *Verrips et al.*, dass W/O-Emulsionen ohne Konservierungsstoffe und/oder Sterilisationsverfahren bei geeigneter Mikrostruktur mikrobiologisch stabil sind. Erfahrungsgemäß ist diese Stabilität dann gegeben, wenn der Wasseranteil hinreichend klein ist und die Tropfen eine kritische Größe nicht überschreiten. Ab welcher Tropfengröße das Wachstum verhindert werden kann und inwiefern sich der Einfluss des Dispersphasenanteils auswirkt, ist weiterhin unklar. Prinzipiell könnte man sich vorstellen, dass eine Emulsion mit hohem Wassergehalt (Biliquid Foams, mit einem Dispersphasenanteil  $\varphi \geq 90\%$ ) nur durch ihre Struktur und ohne weitere Verfahren mikrobiologisch stabil sein kann. Um diese und andere Fragen zu beantworten wurde in dieser Arbeit die **mikrobiologische Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend kleiner Tropfen** untersucht.

Generell können sich in Produkten, bei denen Wasser die kontinuierliche Phase ist (Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsionen), Mikroorganismen schnell vermehren. Die mikrobiologische Stabilität von O/W-Emulsionen kann durch eine thermische Behandlung erreicht werden. Bei der thermischen Behandlung muss berücksichtigt werden, dass die Mikroorganismen in Öl eine höhere Resistenz haben können. Dies wurde von unterschiedlichen Autoren, wie *Senhaji und Loncin, 1977* und *Cerny und Fink, 1986*, berichtet. 2006 zeigte *Miller*, dass vegetative Mikroorganismen nicht nur in Öl, sondern auch in Mayonnaise ein hohes Maß an Resistenz, im Vergleich zur wässrigen Phase, besitzen. Als wässriges System wurde allerdings entionisiertes Wasser, anstatt einer wässrigen Phase mit der gleichen Zusammensetzung wie die der Mayonnaise untersucht. Hier wären folgende Fragen zu klären: Warum können Mikroorganismen in Emulsionen eine so hohe Resistenz besitzen? Gibt es einen Schutzeffekt des Öls, wenn sich die Mikroorganismen im Öl oder an der Grenzfläche befinden? Dazu wurden im zweiten Teil dieser Arbeit einige Versuche über die **thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen** durchgeführt.

Um empfindliche und ölhaltige Produkte mikrobiologisch zu stabilisieren, wurde als alternative Methode das **Herstellen von sterilen Emulsionen**

**durch Premix-Membranemulgieren** in dieser Arbeit untersucht. Das so genannte Premix-Membranemulgieren [Suzuki et al., 1998] soll nicht nur als Emulgierverfahren, sondern auch als Mikroorganismenabtrennung dienen.

Das Membranemulgieren wird erst seit dem letzten Jahrzehnt untersucht. Dieses Verfahren ist besonders interessant, da Emulsionen sehr schonend hergestellt werden können. Weiterhin benötigt das Verfahren weniger Energie als konventionelle Emulgierprozesse und bei geeigneten Systemen können Emulsionen mit einer sehr engen Tropfengrößenverteilung hergestellt werden [Schröder, 1999]. Industriell ist der Prozess nicht weit verbreitet. Dazu müssen die Probleme, wie der geringe Durchsatz im Vergleich zu den konventionellen Emulgierverfahren und das Fouling der Membran, gelöst werden.

Bei der Abtrennung der Mikroorganismen ist das Prinzip vergleichbar mit der Sterilfiltration. Ein typisches Emulsionsprodukt, bei dem die Sterilfiltration zum Einsatz kommt, sind parenterale Emulsionen, die neben der Anforderung an die Sterilität auch keine Partikeln größer als 3 µm enthalten dürfen [Sigg, 2005]. Normalerweise wird diese Art der Emulsion zuerst bei hohem Energieeintrag in Hochdruckhomogenisatoren hergestellt und dann filtriert.

Da es nur wenige Arbeiten über dieses Verfahren gibt, wurde hierfür auch der Einfluss der Prozessparameter untersucht und es wurde überprüft, ob das Herstellen von parenteralen Emulsionen mit dem Premix-Membranemulgieren möglich ist.

Zusammenfassend gesagt, wurden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Methoden zur mikrobiologischen Stabilisierung von Emulsionen untersucht: Die mikrobiologische Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend kleiner Tropfen, die thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen und die Abtrennung von Mikroorganismen aus Emulsionen mit Hilfe des Premix-Verfahrens.



## 2 Grundlagen und Stand des Wissens

### 2.1 Emulsionen

#### 2.1.1 Allgemeines

Emulsionen sind disperse Mehrphasensysteme aus mindestens zwei ineinander nahezu unlöslichen Flüssigkeiten. Im einfachsten Fall handelt es sich um ein Zweiphasensystem aus einer wässrigen (hydrophilen), z.B. Wasser, und einer öligen (lipophilen) Phase, z.B. Öl. Die disperse Phase liegt in Form von Tropfen in der anderen Phase (kontinuierliche Phase) vor. Man unterscheidet zwischen Öl-in-Wasser(O/W)-Emulsionen, bei denen Öltropfen in einer Wasserphase dispergiert sind und Wasser-in-Öl(W/O)-Emulsionen, die aus einer kontinuierlichen Ölphase und feinen Wassertröpfchen bestehen.

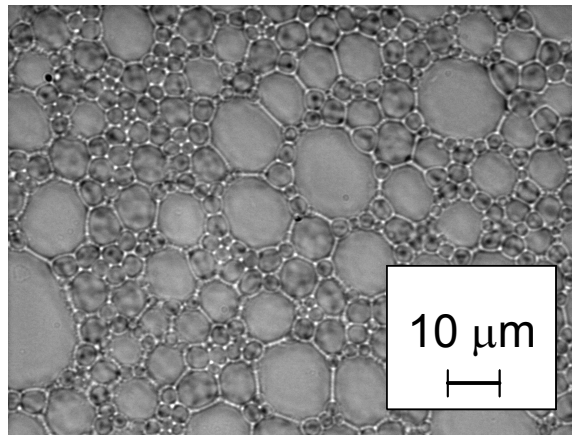
Viele Lebensmittel, wie Milch und Mayonnaise sowie pharmazeutische und kosmetische Cremes, sind Beispiele für O/W-Emulsionen. Butter und Margarine sind Beispiele für W/O-Emulsionen.

Bei Emulsionen mit hohen Dispersphasenanteilen (ca. 90 %) spricht man auch von „Biliquid Foams“. Hierbei sind die Tropfen der dispersen Phase durch einen dünnen Film der kontinuierlichen Phase, vergleichbar mit einem Schaum, voneinander getrennt [Sonneville-Aubrun et al., 2000]. Haben Emulsionen mit etwa gleich großen Tropfen einen Dispersphasenanteil höher als 74 %, werden ihre Tropfen beengt organisiert und dabei deformiert, sodass sie von der Kugelform abweichen. Abb. 2.1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme von einem W/O-Biliquid Foam.

Zum Herstellen von Biliquid Foams kann die kontinuierliche Phase einer Emulsion durch Zentrifugation weitgehend entzogen werden [Sonneville-Aubrun et al., 2000]. Diese Methode wurde oft zum Herstellen von O/W-Biliquid Foams untersucht [Princen et al., 1980; Ribeiro et al., 2004]. O/W-Biliquid Foams mit bis 94 % Dispersphasenanteil können mit dieser Methode hergestellt werden [Ribeiro et al., 2004].

Das Herstellen von W/O-Emulsionen mit bis 85 % Dispersphasenanteil kann durch einfache Emulgierprozesse (dispergieren von Wasser in Öl) erreicht werden [Chan Ik Park et al., 2003]. Höhere Dispersphasenanteile (von ca. 95 %) können anhand der PIT- (Phaseninversionstemperatur) Methode erzielt werden. Bei dieser Methode wird eine O/W-Emulsion schnell erwärmt, bis eine Temperatur oberhalb der so genannten  $T_{HLB}$  (HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance) erreicht ist. Mit der Temperatur-

erhöhung erhöht sich der lipophile Anteil des Emulgators und damit die Tendenz, eine W/O-Emulsion zu bilden [Esquena et al., 2003].



**Abb. 2.1:** Mikroskopische Aufnahme einer hoch konzentrierten W/O-Emulsion (Biliquid Foam).

Eine Emulsion wird vor allen durch ihren Dispersphasenanteil, ihre Tropfengröße und ihre Tropfengrößenverteilung charakterisiert. Weitere wichtige Eigenschaften einer Emulsion sind ihre physikalische, chemische und mikrobiologische Stabilität sowie ihre Fließeigenschaften.

### 2.1.2 Emulgierverfahren

Die Tropfengröße und die Tropfengrößenverteilung einer Emulsion werden hauptsächlich durch das Emulgierverfahren, die verwendeten Hilfsstoffe und die Viskositäten der beteiligten Phasen beeinflusst.

Bei den meisten Emulgierverfahren werden die beteiligten Komponenten zu einer Rohemulsion vorgemischt. Die Rohemulsion enthält meist große Tropfen, die anschließend durch mechanischen Energieeintrag zerkleinert werden. Die Tropfen werden dann zerkleinert, wenn deformierende Kräfte (Spannungen, die an der Grenzfläche angreifen) größer als die formerhaltenden Kräfte sind.

Die zur Tropfenzerkleinerung benötigte mechanische Energie kann auf unterschiedliche Weise in die Emulsion eingetragen werden. Ein einfacher diskontinuierlicher Emulgierapparat ist der Rührbehälter. Hierbei findet die Tropfenzerkleinerung hauptsächlich in unmittelbarer Umgebung der Rührblätter statt, was zu einem inhomogenen Leistungseintrag in das Dispergiervolumen führt. Infolgedessen weisen die so hergestellten Emulsionen eine relativ breite Tropfengrößenverteilung auf [Karbstein, 1994]. Zu den kontinuierlichen Emulgiemaschinen zählen einige Rotor-Stator-Maschinen (Kolloidmühlen oder Zahnkranz-Dispergiemaschinen) und Hochdruckhomogenisatoren. Erfahrungen mit diesen Maschinen



zeigen, dass bedingt durch eine enge Verweilzeitverteilung und durch einen hohen spezifischen Energieeintrag in Hochdruckhomogenisatoren enge Tropfengrößenverteilungen erzeugt werden können [Schuchmann u. Schuchmann, 2005]. *Stang, 1998* zeigt, dass die Tropfengrößenverteilung bei den von ihm untersuchten Düsen auch stark von der Blendengeometrie abhängt. Die Dehnströmungen am Blendeneinlauf und die hochturbulenten Strömungen am Blendenauslauf sind hierbei insbesondere für die Zerkleinerung der Tropfen und Breite der Verteilung verantwortlich und können daher über die Blendengeometrie beeinflusst werden.

Weitere Möglichkeiten, um Emulsionen herzustellen, bieten Ultraschall-emulgieren und mikroporöse Systeme.

Durch Ultraschallwellen werden die Tropfen durch Kavitation zerkleinert. Das Verfahren wird hauptsächlich im Laborbereich eingesetzt [Schuchmann u. Schuchmann, 2005]. Eine detaillierte Untersuchung zum Emulgieren mit Ultraschall befindet sich in *Behrend, 2002*.

Mikroporöse Systeme sind bekannt für ihren geringen Energieeintrag und die enge Tropfengrößenverteilung der Emulsion. Hierzu zählen zum Beispiel das Membranemulgieren und das Mikrokanal-Emulgieren [Lambrich u. Vladisavljevic´, 2004].

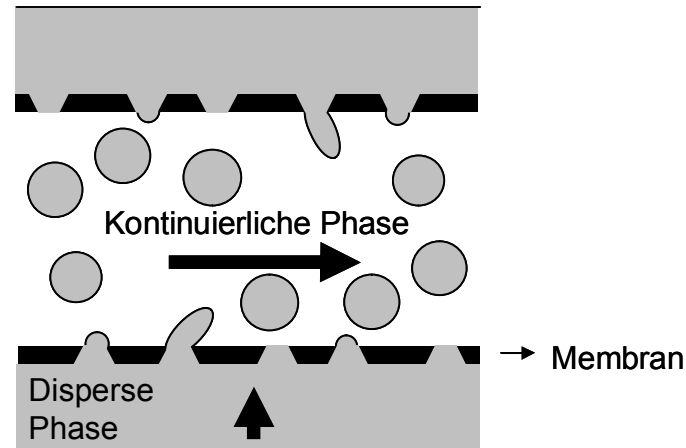
Da in dieser Arbeit das Membranemulgieren verwendet wurde, wird es im folgenden Abschnitt im Detail erläutert.

### 2.1.2.1 Membranemulgieren

Seit einigen Jahren wird das Emulgieren mit Hilfe mikroporöser Membranen untersucht. Bei richtiger Oberflächencharakteristik der Membran erhält man im Vergleich zu konventionellen Emulgierverfahren eine engere Tropfengrößenverteilung [Vladisavljevic´ et al., 2003; Altenbach-Rehm, et al., 2002]. Des Weiteren ist es möglich, sehr schonend zu emulgieren, d.h. bei geringem spezifischem Energieeintrag sowie geringen Scherkräften zu emulgieren [Schröder, 1999; Schröder u. Schubert, 1996; Schubert u. Ax, 2003]. Dies ist vor allem für scherempfindliche Inhaltsstoffe wichtig. Von Nachteil bei den Membranprozessen sind die niedrigen Durchsätze im Vergleich zu den konventionellen Emulgierverfahren. Außerdem kann in Membranprozessen Fouling auftreten.

Beim klassischen Membranemulgieren (Direkt-Membranemulgieren) entfällt das Herstellen einer Rohemulsion. Die Dispersphase wird durch die Poren der mikroporösen Membran in die kontinuierliche Phase gepresst (Abb. 2.2). Die hierbei gebildeten Tropfen wachsen solange an, bis sie von der parallel zur Membranoberfläche fließenden, kontinuierlichen Phase abgelöst werden [Schröder, 1999].

Zur Herstellung von Emulsionen mittels Membranemulgieren müssen der Druckverlust in den Poren sowie der Kapillardruck überwunden werden. Der Anteil des Druckverlusts in den Poren wurde nach Hagen-Poiseuille (Gl. 2.1) berechnet [Lambrich u. Vladisavljevic', 2004].



**Abb. 2.2:** Prinzip des Direkt-Membranemulgierens. Die Dispersphase wird durch die Membran in eine kontinuierliche Phase gepresst.

$$\Delta p = \frac{32 \cdot \eta \cdot l_p \cdot v}{d_p^2} \quad (2.1)$$

Wobei:

$\eta$  = dynamische Viskosität

$l_p$  = Porenlänge

$v$  = Strömungsgeschwindigkeit

$d_p$  = Porendurchmesser

Der Kapillardruck muss zur Erzeugung der Grenzfläche überwunden werden. Er kann anhand der Kapillardruckformel (Gl. 2.2) berechnet werden [vgl. Lambrich et al., 2005]:

$$p_k = \frac{4 \cdot K \cdot \gamma \cdot \cos \delta}{d_p} \quad (2.2)$$

Wobei:

$K$  = Beiwert, abhängig von der Porenstruktur ( $K = 1$  für zylindrische Poren)

$\gamma$  = Grenzflächenspannung zwischen den Phasen

$\delta$  = Kontaktwinkel zwischen Fluid und Membran

$d_p$  = Porendurchmesser der Membran

Zum Emulgieren wurden verschiedene Membranen eingesetzt. Beispiele sind Rohrmembranen aus Keramik [Schöder, 1999] oder aus speziellem Glas wie die SPG-(Shiratsu Porous Glass) Membranen [Vladisavljevic´ et al., 2003] sowie Flachmembranen aus PTFE [Suzuki et al., 1998]. Außerdem werden spezielle Membranen mit definierter Porenzahl, Porenformat und Porengröße zur Herstellung von Emulsionen angefertigt [Schadler u. Windhab, 2005; Kobayashi u. Nakajima, 2006; Geerken, 2006; Zwan et al., 2006]. Sie haben nicht nur eine spezielle Struktur, sondern auch spezielle Materialeigenschaften, mit denen es möglich ist, eine sehr dünne Membran herzustellen und damit den Druckverlust zu reduzieren ohne ihre mechanische Stabilität zu stören [Schuchmann et al., 2005]. Eine weitere spezielle Anfertigung sind Mikrokanäle [Kawakatsu et al., 1997], mit denen bei geeigneter Struktur monodisperse Emulsionen hergestellt werden können. Zur Charakterisierung einer Membran gehören unter anderem die Eigenschaften: Porengröße, Porosität, Benetzbarkeit und Durchlässigkeit.

Die Durchlässigkeit einer Membran wurde nach *Darcy*, 1856 definiert (Gl. 2.3):

$$B = \eta \cdot \frac{\dot{V}}{A} \cdot \frac{L}{\Delta p} \quad (2.3)$$

Wobei:

$\eta$  = dynamische Viskosität des Fluids

$\dot{V}$  = Volumenstrom des Fluids

A = Membranfläche

L = Dicke der Membran

$\Delta p$  = Druckdifferenz

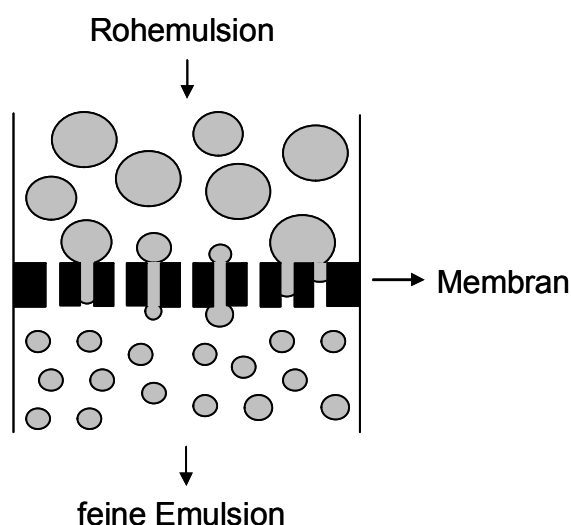
### Premix-Membranemulgieren

Ein weiteres Membranverfahren zur Herstellung feindisperser Emulsionen ist das so genannte Premix-Membranemulgieren (PME). Dabei wird eine zuvor hergestellte Rohemulsion durch die Poren der mikroporösen Membran gepresst (Abb. 2.3, vgl. Badolato et al., 2009<sup>1</sup>).

Das Premix-Membranemulgieren wurde von Suzuki [Suzuki et al., 1996] entwickelt. Suzuki et al. stellte Emulsionen mit enger Tropfengrößenverteilung beim Einsatz von hydrophilen Glasmembranen her. Die durch dieses Verfahren hergestellten Emulsionen haben Tropfengrößen, die ca. dem 2-fachen der Porengröße der Membran entsprechen. Der maximale

<sup>1</sup>Badolato et al.: Membrane emulsification processes and characterization methods. In: Güell, C.; Monserrat F.; Lopez, F.: Monitoring and Visualizing Membrane-based processes. Page 291. 2009. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Flux des Prozesses von  $J = 3,5 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  wurde für Emulsionen mit 50 % Dispersphasenanteil, einer Membran mit einer mittleren Porengröße von  $d_p = 4,2 \text{ }\mu\text{m}$  und Druckdifferenzen von  $\Delta p = 0,6 \text{ bar}$  erreicht.



**Abb. 2.3:** Prinzip des Premix-Membranemulgierens (PME). Es wird eine Rohemulsion durch die Membran gepresst.

Zunächst wurde von *Suzuki et al., 1998* das Premix-Membranemulgieren mittels Plattenmembranen entwickelt. Hierbei wurden hydrophile und hydrophobe Membranen aus PTFE (Polytetrafluorethylen) für das Herstellen von jeweils O/W- und W/O-Emulsionen eingesetzt. Bei Membranen mit einer mittleren Porengröße von  $1 \text{ }\mu\text{m}$  wurden Emulsionen (O/W mit 30 % Dispersphasenanteil und W/O mit 20 % Dispersphasenanteil) mit einer Tropfengröße von ca. dem 3-fachen der Porengröße der Membran erhalten. Als Emulgierhilfsstoffe wurden zwei Emulgatoren (2 Gew. % Emulgator decaglycerol monolaurate, HLB = 15, und 2 Gew. % hexaglycerol polyricinoleat, HLB < 1) jeweils in der wässrigen und der öligen Phase eingesetzt [Suzuki et al., 1998].

Weiterhin berichten *Altenbach-Rehm et al., 2002*, dass durch 3-faches Emulgieren durch eine Membran Emulsionen mit kleineren Tropfen und engeren Tropfengrößenverteilungen hergestellt werden können. Eine Emulsion mit 10 % Dispersphasenanteil erzielte bei gleichem Emulgatorsystem wie bei *Suzuki et al., 1998*, nach 3-fachem Emulgieren durch eine Membran mit einer mittleren Porengröße von  $1 \text{ }\mu\text{m}$  und einer Druckdifferenz von 8 bar einen maximalen Tropfendurchmesser von  $x_{3,99} = 2,1 \text{ }\mu\text{m}$  (vgl. Kap. 4.2.1). Das Verfahren eignet sich auch zur Herstellung von Emulsionen mit hohen Dispersphasenanteilen (bis 80 %). Es kann direkt oder durch Phasenumkehr durchgeführt werden [Suzuki et al., 1999]. In der Regel wird die Art der Emulsion über die Benetzbarkeit der Membran bestimmt. Ist die Membran hydrophil, wird eine O/W-Emulsion hergestellt

unabhängig von der Art der Rohemulsion. Hydrophobe Membranen eignen sich für das Herstellen von W/O-Emulsionen [Lambrich et al., 2005].

Die erste Arbeit über die Tropfenbildung beim Premix-Membranemulgieren wurde bereits von *Zwan et al., 2006* publiziert. Beim Beobachten des Emulgierverhaltens einer Rohemulsion durch Mikrokanäle mit veränderter Anzahl der Schichten wurde die Tropfenzerkleinerung untersucht. Nach Angabe der Autoren sind die Ursachen der Tropfenzerkleinerung Scherkräfte, Grenzflächenspannungskräfte (Rayleigh- und Laplace-Instabilität) und hydrodynamische Effekte (Drainage der Flüssigkeit zwischen den Tropfen) mit der Voraussetzung, dass die Grenzflächen hinreichend stabilisiert werden.

Ein besonderer Vorteil des Premix-Membranverfahrens im Vergleich zu den herkömmlichen Membranemulgierverfahren ist der hohe Flux. Zudem ist beim Premix-Membranemulgieren die Konzentration der dispersen Phase unabhängig von der Dauer des Prozesses. Die Anzahl der Rezirkulationen und somit die Prozesszeit können deutlich gesenkt und somit die Durchsätze des Produkts erhöht werden.

### 2.1.3 Physikalische Stabilität von Emulsionen

Neben der mikrobiologischen Stabilität einer Emulsion, welches das Thema dieser Arbeit ist, sind auch die chemische und physikalische Stabilität von großer Bedeutung. In vielen Fällen kann auch durch chemische und mikrobiologische Destabilisierung die physikalische Stabilität einer Emulsion gestört werden. Ein Beispiel ist das Brechen der Emulsion durch Mikroorganismen, die Lipasen herstellen und freisetzen und damit die Grenzfläche zwischen Wasser und Öl zerstören können [Keweloh, 2006].

Allgemein ist eine Emulsion physikalisch stabil, wenn ihre Tropfengrößenverteilung unabhängig von Ort und Zeit ist [Karbstein, 1994]. Mechanismen, welche zur Instabilität von Emulsionen führen, sind Sedimentation, Aggregation, Koaleszenz und Ostwald-Reifung. Koaleszenz, also das Zusammenfließen kleiner Tropfen zu einem größeren, ist für fein disperse Emulsionen der wichtigste Instabilitätsmechanismus. Im Fall von Koaleszenz kann die Tropfengröße nur durch erneutes Emulgieren, d.h. durch Energieeintragen, wieder verkleinert werden.

Behindert wird die Koaleszenz zum einen durch Emulgatoren, welche die Grenzfläche stabilisieren, zum anderen können als Hilfsstoff auch Stabilisatoren eingesetzt werden, die durch Erhöhen der Viskosität der kontinuierlichen Phase die Beweglichkeit der Tropfen einschränken und somit Tropfenkollisionen verhindern. Durch Sedimentation ändert sich die Tropfengrößenverteilung einer Emulsion örtlich, indem sich die schwerere Phase unter dem Einfluss der Schwerkraft ablagert. Der ursprünglich

homogene Zustand der Emulsion kann aber durch Mischen wiederhergestellt werden. Sedimentation lässt sich verhindern oder vermeiden, wenn die Tropfen der Emulsion hinreichend klein sind und somit die Brownsche molekulare Bewegung die Bewegung der Tropfen durch Sedimentation überschreitet.

Lagern sich mehrere Tropfen zu Aggregaten zusammen, wobei die einzelnen Tropfen noch durch eine dünne Schicht der kontinuierlichen Phase voneinander getrennt sind, spricht man von Flockung, Koagulation oder Aggregation. Da die Flocken größer als die Einzeltropfen sind, sedimentieren sie schneller.

Bei der Ostwald-Reifung wachsen größere Tropfen zu Lasten der kleineren. Aufgrund unterschiedlicher Kapillardrücke diffundieren Moleküle der dispersen Phase durch die kontinuierliche Phase von den kleinen zu den großen Tropfen [vgl. Schubert, 2004].

Die Phasenumkehr gilt auch als Instabilitätsmechanismus mit dem Unterschied, dass dieser Mechanismus nicht spontan, sondern gezielt stattfindet. Ein Beispiel ist die Herstellung von Butter. Durch Einbringen von Scherkräften in Rahm (O/W-Emulsion) binden sich die Fetttropfen in Form einer kontinuierlichen Phase zusammen. Als Konsequenz entsteht aus der wässrigen Phase die neue disperse Phase (Tropfen) und eine W/O-Emulsion (Butter) ist erzeugt [Schuchmann u. Schuchmann, 2005]. Außer dem Eintrag mechanischer Energie gibt es mehrere Faktoren, die eine Phasenumkehr verursachen können, z.B. Temperaturänderung oder die Änderung der Konzentration einer Komponente. Ein Emulgator, der z.B. bei niedriger Temperatur bevorzugt in wässrigen Systemen löslich ist, kann bei Erhöhen der Temperatur in einem öligen System besser löslich werden. In diesem Fall kann die Erhöhung der Temperatur eine Änderung des HLB-Wertes des Emulgators verursachen (vgl. PIT-Methode).

Die physikalische Stabilität ist in sämtlichen Einsatzbereichen von großer Bedeutung. Durch die Tropfengrößenverteilung werden weitere wichtige Qualitätsparameter beeinflusst, z.B. das Mundgefühl bei Lebensmittel-emulsionen, die rheologischen Eigenschaften (Fließverhalten, Streichfähigkeit, Verarbeitbarkeit) und das optische Erscheinungsbild (Farbe, Glanz).

Im nächsten Kapitel werden zuerst einige Erläuterungen zur Mikrobiologie gegeben und danach die mikrobiologische Stabilität einer Emulsion diskutiert.

## 2.2 Bakterien und Bakterienwachstum

### 2.2.1 Mikroorganismen

Mikroorganismen können gezielt zur Herstellung von Lebensmitteln benutzt werden, z.B. Hefe zur Herstellung von Brot und Bier. Andererseits können Lebensmittel durch Mikroorganismen verderben. Außerdem gibt es pathogene Mikroorganismen, die für Lebewesen schädlich sind. Sie können das lebende Gewebe von Menschen und Tieren zerstören und verschiedene Infektionskrankheiten verursachen. Eine besondere Stellung nehmen die Mikroorganismen, die toxische Stoffwechselprodukte bilden, ein. Ein Beispiel für Bakterientoxine ist *Cl. Botulinum*. Es ist extrem giftig und schon in einer Menge von  $1 \cdot 10^{-9}$  g/kg für Menschen tödlich [vgl. Thi Lam An, 2006]. Ein zweites Beispiel ist die *Salmonelle*, die eine schwere Darmerkrankung erzeugen kann. Nicht nur Bakterien, sondern auch Schimmelpilze können Toxine produzieren, die so genannten Mykotoxine. Ein klassisches Beispiel ist das Aflatoxin, das vom *Aspergillus flavus* erzeugt wird. Ein häufiges Lebensmittel, indem es vorkommen kann, ist die Erdnuss. Dieses Toxin kann lebertoxisch und krebserregend sein.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich *Escherichia coli* K12 erforscht, welches im folgenden Kapitel beschrieben wird.

#### 2.2.1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein Darmbewohner und gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Es handelt sich dabei um 1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$  lange, bewegliche, Gram-negative, stäbchenförmige, nicht-sporenbildende und fakultative anaerobe Bakterien. *Escherichia coli* ist ein möglicher pathogener Mikroorganismus in Rohmilch und pasteurisierter Milch (wenn eine Reinfektion nach der Erhitzung stattfindet) und folglich in Milchprodukten wie Käse und Butter zu finden. Viele *E. coli* Stämme verursachen Durchfallerkrankungen, die in der Regel harmlos verlaufen [Schlegel, 1992; Bell und Kyriakides, 1998; Baumgart, 1999; Fritsche, 2002].

*Escherichia coli* K12 ist als Modellmikroorganismus in der molekularbiologischen Forschung weit verbreitet. Es ist ein apathogener Stamm, der eine enge Verwandtschaft zu lebensmittelrelevanten Pathogenen (*E. coli* O157:H7) aufweist [Fritsche, 2002].

#### 2.2.2 Oberflächeneigenschaften von Mikroorganismen

Die Oberfläche von Mikroorganismen kann hydrophil oder hydrophob sein. Beispiele für hydrophile Oberflächen sind *E. coli* K12 und *Staphylococci*

*epidermidis* SL58 [Rosenberg et al., 1980; vgl. van der Mei et al., 1998]. Beispiele für hydrophobe Mikroorganismenstämme sind *Enterococcus faecalis* C1030 und *Pseudomonas aeruginosa* AK1, diese Mikroorganismen sind jedoch pathogen. Zu den hydrophoben und nicht pathogenen Mikroorganismen zählen z.B. Stämme von *L. (Lactobacillus) acidophilus* RC14 und *L. fermentum* B54 [vgl. van der Mei et al., 1998].

Mit der Beschaffenheit der Oberfläche (hydrophil oder hydrophob) von mikrobiellen Zellen hängen wichtige Eigenschaften zusammen, wie die Fähigkeit von Bakterien zur Adhäsion an nicht wässrigen benetzbaren Feststoffoberflächen sowie die Verteilung der Mikroorganismen an flüssig-flüssig und flüssig-gasförmigen Grenzflächen [Rosenberg et al., 1980]. Außerdem stehen vermutlich Infektionen von pathogenen Mikroorganismen mit der Anhaftung an Geweben in Verbindung, die durch ihre hydrophoben Eigenschaften verursacht werden [Doyle, 2000].

In der Literatur wird häufig von Interaktionen zwischen Bakterien und Emulsionen berichtet. *Dorabantu et. al, 2004* zeigen den Effekt von hydrophoben Bakterien als Stabilisator für O/W-Emulsionen. *McClemens u. McLandsborough, 2001* berichten über die Instabilität von O/W-Emulsionen, verursacht durch zwei Stämme von *E. coli*.

Mehrere Methoden wurden zur Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheit von Mikroorganismen eingesetzt [van der Mei et al., 1991]. Unter anderem sind dies die Kontaktwinkelmessung am Bakterienrasen [van der Mei u. Busscher, 1998], die Messung der Adhäsion von Bakterien an Kohlenwasserstoffen (sog. BATH = bacterial adhesion to hydrocarbons, bzw. MATH = microbial adhesion to hydrocarbons), die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie (HIC = hydrophobic interaction chromatography) sowie die Mikroelektrophorese-Messung zur Bestimmung des Zeta-Potentials [Geertsema-Doornbusch et al., 1993].

BATH (MATH) ist die meist benutzte Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität von Zelloberflächen [Geertsema-Doornbusch et al., 1993]. Sie beruht auf der Auftrennung von Zellen mit hydrophoben Oberflächeneigenschaften an der Grenzfläche eines lipophil-hydrophilen Zweiphasensystems nach kurzzeitigem Mischen. Dabei sammeln sich die Zellen von hydrophoben Mikroorganismen nach Trennung beider Phasen in den Tropfen der lipophilen Phase, die sich dann (bei kleinem Anteil der lipophilen Flüssigkeit) an der Oberfläche anhäufen. Bei hydrophilen Mikroorganismen bleiben die Zellen nach der Trennung in der wässrigen Phase zurück [van der Mei et al., 1991]. Die „Hydrophobizität“ wird danach aus Messungen der optischen Dichte (Zellkonzentration) der hydrophilen Phase vor und nach dem Mischvorgang berechnet. In der Literatur sind unterschiedliche Varianten dieser Methoden zitiert (z.B. [Rosenberg et al., 1980; Geertsema-Doornbusch et al., 1993; Itzhak et al., 1983; Pelletier et al., 1997]), die sich z.B. in Anteil und Typ der lipophilen Phase, der



Mischzeit oder Wellenlänge zur Messung der optischen Dichte unterscheiden.

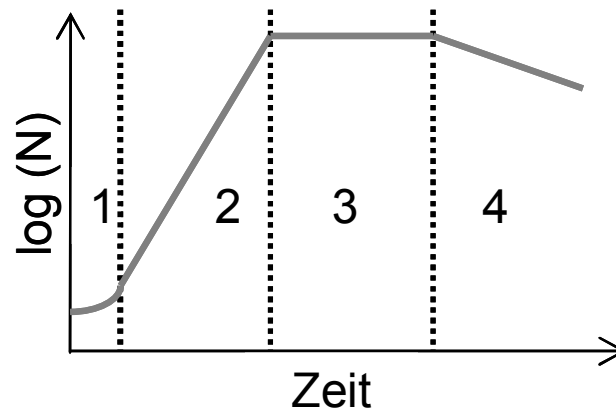
Die Charakterisierung der Oberflächen von *E. coli* K12 wurde von *Rosenberg et al., 1980* mit dem MATH-Test unter Verwendung von Hexadecan, Octan und Xylen als lipophile Phase (mit unterschiedlichen Volumenanteilen der lipophilen Phase zwischen 1 % und 17 %) untersucht. Für Hexadecan und Octan wurden Adhäsionswerte gegen Null, für Xylen wurde ein Adhäsionswert von 25 % ermittelt.

### 2.2.3 Wachstum von Bakterien

Wenn sich Bakterien in einem Medium befinden, in dem alle Wachstumsvoraussetzungen gegeben sind, können sie wachsen und sich vermehren. Das Medium kann z.B. eine Suppe sein. Unter anderem benötigen Mikroorganismen Wasser für ihr Wachstum. Vegetative Mikroorganismuszellen besitzen einen Wassergehalt von ca. 85 % und benötigen Wasser für die Aufnahme der Nährstoffe und den Transport der Stoffwechselprodukte [Müller, 1974]. Der entscheidende Faktor für das Wachstum ist die Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert). Im Allgemeinen liegt der Minimalwert der Wasseraktivität für das Wachstum von Bakterien bei  $a_w = 0,9$ , für Hefen und Schimmelpilze bei  $a_w = 0,7 - 0,8$  und für osmophile Hefen bei  $a_w = 0,6$  [vgl. Schubert, 2002]. Das Wachstum bei Bakterien besteht aus parallel aneinander gekoppelten Prozessen. Während des Wachstums wird die Bakterie größer oder länger. Als Konsequenz werden die Stofftransportwege zu lang und die Stoffumsätze nehmen ab. Dieses Problem wird einfach gelöst, indem die Bakterie sich in zwei identische Tochterzellen halbiert. Die Tochterzellen können weiter wachsen und sich vermehren [Keweloh, 2006].

Eine wachsende Bakterienkultur kann in mehrere Wachstumsphasen unterteilt werden (Abb. 2.4). Die Hauptphasen sind die Anlauf- oder lag-Phase (1), die exponentielle Phase (log-Phase) (2), die stationäre Phase (3) und die Absterbephase (4) [Fuchs u. Schlegel, 2006].

In der Anlaufphase findet die Aktivierung des Stoffwechsels statt. Die Länge der Latenzphase variiert stark. Sie ist besonders lang, wenn die Zellen alt oder geschädigt waren und hängt stark von der Eignung der Nährlösung und der Vorgeschichte ab. Je günstigere Entwicklungsbedingungen ein Substrat bietet (z.B. Zusammensetzung, Wassergehalt,  $a_w$ -Wert, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration), desto kürzer ist die Anlaufphase. Eine Verlängerung der Anlaufphase, z.B. durch Zugabe von Konservierungsmitteln, kann die Lebensmittelhaltbarkeit erhöhen.



**Abb. 2.4:** Typische Mikroorganismen Wachstumskurve, Keimzahl in Abhängigkeit der Zeit. Die Hauptphasen sind die lag- (1), exponentielle- (2), stationäre- (3) und Absterbephase (4).

Während der exponentiellen Phase ist die Wachstumsgeschwindigkeit maximal und konstant. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  kann für die exponentielle Wachstumsphase nach Gl. 2.4 bestimmt werden.

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x \quad (2.4)$$

Die Bakterienmasse, die in der stationären Phase erreicht wurde, wird Ausbeute (oder Ertrag) genannt. Der Ausbeutekoeffizient (oder Ertragskoeffizient)  $Y_{x/s}$  ist als Verhältnis von Biomassewachstum und Substrataufnahmegeschwindigkeit definiert (Gl. 2.5) [vgl. Posten, 2004].

$$Y_{x/s} = \frac{c_x - c_{x_0}}{c_{s_0} - c_s} \quad (2.5)$$

Als Konsequenz dieser Wachstumsphase können sich die Bakterien in über eine Milliarde Zellen in einem Milliliter eines Nährmediums ( $10^9$  / ml oder  $10^{12}$  / l) anreichern [Keweloh, 2006].

Durch verschiedene Faktoren ist die exponentielle Phase zeitlich begrenzt. Folgende Faktoren können das Wachstum limitieren [Keweloh, 2006; Schlegel, 1985]:

- Substratverarmung
- Hohe Populationsdichte
- Sauerstoffmangel (aerobe Keime)

- Ansammlung hemmender oder toxischer Stoffwechsel-Produkte z.B. Organische Säuren, die den pH-Wert absenken

Wenn nur ein Nährstoff abwesend ist, bedeutet dies nicht unbedingt einen Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase. In diesem Fall können verschiedene Systeme in den Zellen aktiviert werden, um weiteres Wachstum zu ermöglichen. Zwei gut charakterisierte Systeme sind das cAMP/CAP System und das *pho* regulons [Schlegel, 1985; Botsford u. Harman, 1992].

Ist das Wachstum limitiert, beginnt die stationäre Phase. Der Übergang zur stationären Phase ist ein sehr geordneter Prozess, wozu auch die Änderung der zellulären Physiologie und Morphologie gehören [Hengge-Aronis, 1993]. Die Bakterien können sich nicht weiter vermehren, doch wenn sie die notwendige Energie durch Verarmung von Speicherstoffen oder Proteinen gewinnen können, können sie lange Zeit lebensfähig bleiben. Nur empfindliche Bakterien sterben schnell [Fuchs u. Schlegel, 2006].

Im Anschluss folgt die Absterbephase, in der die Keimzahl abnimmt. Die Ursachen des Absterbens sind bisher nur wenig untersucht [Fuchs u. Schlegel, 2006].

Neben dem Substrat übt die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf das Mikroorganismenwachstum aus. Jeder Mikroorganismus hat eine optimale Wachstumstemperatur, bei der die exponentielle Phase und die Generationszeit (Zeitspanne, in der eine Verdoppelung der Zellenzahl eintritt) minimiert werden [vgl. Müller u. Weber, 1996; Schlegel, 1992].

Es gibt immer mehr Anhaltspunkte, dass Bakterien durch eine chemische interzelluläre Kommunikation einige Prozesse beeinflussen können. Es kann z.B. die Erklärung sein, warum einige Bakterien nach einer bestimmten Zahl der Teilung im frischen Medium nicht mehr wachsen können. Einige der nicht vermehrungsfähigen Bakterien hemmen das Wachstum der anderen durch Produktion von Toxinen. Dadurch wird das Wachstum gestoppt [Kaprelyants u. Kell, 1996].

### 2.2.3.1 Ermittlung des Wachstums

Um das Bakterienwachstum zu verfolgen, wird die Keimzahl in Abhängigkeit der Zeit bestimmt.

Es gibt verschiedene Methoden zur Keimzahlbestimmung, z.B. die direkte Zählung nach Visualisierung unter dem Mikroskop, die Messung der Trübung des Mediums, die Messung des Gewichts der getrockneten Biomasse und die Plattentechnik.

Jede Methode hat Vor- und Nachteile und daher sollte für jeden Versuch die geeignete Messmethode zum Einsatz gebracht werden. Die Trübungsmessung z.B. gilt als indirekte Methode und wird für eine schnelle Bestimmung der Keimzahl verwendet. Allerdings kann man durch diese Methode nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Den gleichen Nachteil hat die gravimetrische Bestimmung der Biomasse.

Die Plattentechnik ist weiter verbreitet. Es kann sich dabei um das Gussplattenverfahren oder das Spatelplattenverfahren handeln. Bei dem Gussplattenverfahren wird eine genaue Probenmenge mit dem Agarnährboden vermischt und nach der Bebrütung ausgezählt. Bei dem Spatelplattenverfahren wird die Probe auf dem Agarnährboden verteilt. Die Plattentechnik ist für aerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen geeignet. Für nicht allzu extreme Anaerobier werden die Platten in einem Anaerobtopf bebrütet [Bast, 1999]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass nur die lebenden Zellen gezählt werden. Von Nachteil ist, dass die Methode wegen der Vorbereitung der Agarplatten und der langen Inkubationszeit sehr zeitaufwendig ist.

Bei dieser Methode bedeutet jeder Punkt auf der Platte eine KBE (koloniebildende Einheiten) und wird als ein Mikroorganismus betrachtet. Als Keimzahl wird häufig N benutzt, was eigentlich der Mikroorganismenkonzentration in KBE/ml bzw. KBE/g entspricht.

## 2.3 Mikrobiologische Stabilität von Emulsionen

### 2.3.1 Allgemeines

Viele Emulsionen werden direkt an den Verbraucher geliefert und dienen der Ernährung und der Gesunderhaltung (z.B. Lebensmittel, pharmazeutische Cremes, Sonnenschutzmittel). Diese Produkte sind häufig ideale Nährböden für viele Mikroorganismen. Abb. 2.5 zeigt ein Beispiel einer O/W-Emulsion mit sichtbarer Kontamination von Schimmel.

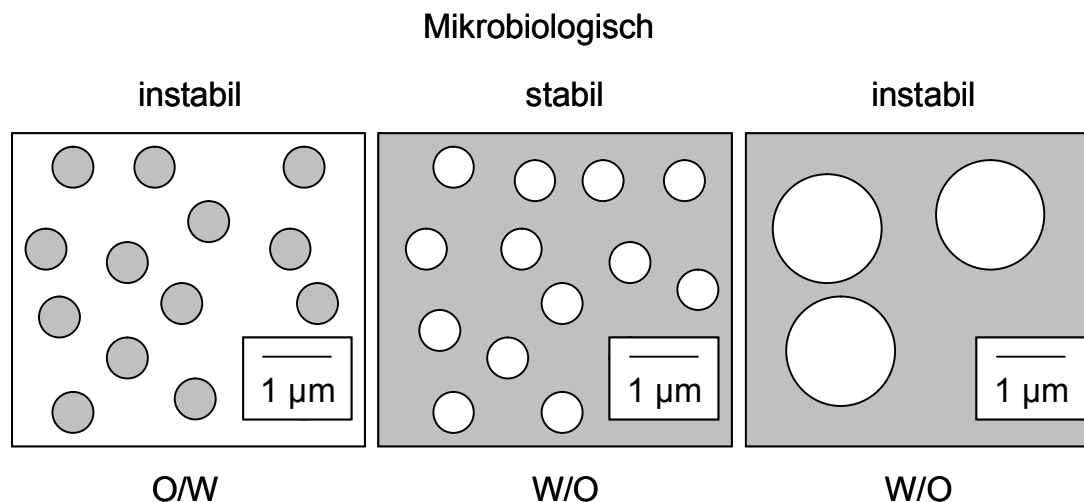
In Emulsionsprodukten können verschiedene Arten von Bakterien vorkommen. In der Milchwirtschaft sind von Bedeutung z. B. *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*; *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas*, *Escherichia* usw. Außer Bakterien können Hefen, Schimmelpilze und Viren in Milch vorkommen [Kessler, 1996].



**Abb. 2.5:** Bild einer kontaminierten O/W-Emulsion.

Die mikrobiologische Stabilität kann z.B. durch eine Wärmebehandlung (Pasteurisieren, Sterilisieren), durch Absenken des pH- oder  $a_w$ -Wertes oder durch Zugabe von Konservierungsmitteln erreicht werden. Eine Besonderheit stellen W/O-Emulsionen dar, die ohne Konservierungsstoffe und/oder Sterilisationsverfahren bei geeigneter Mikrostruktur mikrobiologisch stabil sind. Erfahrungsgemäß ist diese Stabilität dann gegeben, wenn der Wasseranteil hinreichend klein ist und die Tropfen eine kritische Größe nicht überschreiten. Man geht davon aus, dass ein Keimwachstum in kleinen Wassertropfen wegen der räumlichen Begrenzung nicht möglich ist. In der Ölphase können Mikroorganismen, aufgrund der zu geringer Löslichkeit des Wassers, ebenfalls nicht wachsen [Miller, 2006]. Abb. 2.6 erfasst die mikrobiologische Stabilität von Emulsionen:

- O/W-Emulsionen sind allgemein mikrobiologisch instabil
- Die intrinsische Stabilität von W/O-Emulsionen hängt hauptsächlich von ihrer Tropfengröße ab



**Abb. 2.6:** Zusammenfassung zur mikrobiologischen Stabilität von Emulsionen: Allgemein sind O/W-Emulsionen und W/O-Emulsionen mit größeren Tropfen ( $x > \sim 1 \mu\text{m}$ ) instabil im Gegensatz zu W/O-Emulsionen mit kleinerer Tropfengröße ( $x \sim \leq 1 \mu\text{m}$ ).

### 2.3.2 Mikrobiologische Stabilität von W/O-Emulsionen

Aus den bisher publizierten Daten [Verrips u. Zaalberg, 1980; Verrips et al., 1980; Verrips, 1989] lässt sich jedoch nicht exakt angeben, wie sich die Mikrostruktur der W/O-Emulsion auf ihre mikrobiologische Stabilität auswirkt. Die Hauptergebnisse dieser Arbeiten bestehen aus einem einfachen Modell mit den folgenden Voraussetzungen:

- Die Mikroorganismen befinden sich in der wässrigen Phase (in den Tropfen).
- Pro Tropfen darf höchstens 1 Mikroorganismen enthalten sein.
- Das Wachstum ist durch die Tropfengröße, dem kritischen Durchmesser  $x_{\text{krit}}$ , ab dem die Mikroorganismen nicht mehr wachsen können, beschränkt.
- Auch in größeren Tropfen ( $x > x_{\text{krit}}$ ) ist das Wachstum wegen Substratlimitierung begrenzt.
- Das Modell ist gültig für Mikroorganismen, die keine (Phospo-) Lipasen enthalten.
- Im Wassertropfen kann das Verhältnis zwischen der Anfangssubstratmenge ( $C_0$ ) und der insgesamt gebildeten Biomasse ( $M$ ) näherungsweise nach *Monod, 1942* (Gl. 2.6) beschrieben werden.  $K$  wird näherungsweise als Substrat-Konstante angenommen.

$$M = K \cdot C \quad (2.6)$$

- Die Biomasse ist proportional zur Keimzahl.

Zur Berechnung der Anzahl der Tropfen pro Volumen, die anfänglich mit je einem Mikroorganismus belegt sind, wurde Gl. 2.7 verwendet.

$$P_r = \frac{V_r \cdot n_r \cdot P_0}{\sum_{r > r_{MO}} V_r \cdot n_r} \quad (2.7)$$

Wobei:

$V_r$  = Volumen der Tropfen mit Radius  $r$

$n_r$  = Anzahl der Tropfen mit Radius  $r$  pro Volumen wässrige Phase

$P_0$  = Anfangskeimzahl in der wässrigen Phase pro Volumen wässrige Phase

$P_r$  = Zahl der Tropfen mit Radius  $r$  und einem Mikroorganismus

Die Menge an Substrat  $S_r$  in einem Tropfen mit dem Radius  $r$  wurde aus der Substratkonzentration  $c$  multipliziert mit dem Tropfenvolumen  $V_r$  berechnet (Gl. 2.8):

$$S_r = V_r \cdot c \quad (2.8)$$

Nach Gl. 2.6 ist bei vernachlässigbarer Diffusion in einem Tropfen mit Radius  $r$  die Biomasse  $M_r$  proportional zur Substratmenge (Gl. 2.9):

$$M_r = K \cdot S_r \quad (2.9)$$

Es ist klar, dass nur in den Tropfen, in denen die Biomasse größer als die Biomasse  $M'$  eines Mikroorganismus ist, Wachstum stattfindet (Gl. 2.10):

$$V_{r_{\min}} \cdot K \cdot C = M' \rightarrow r_{\min} = \sqrt[3]{\frac{3}{4 \cdot \pi} \cdot M' \cdot \frac{1}{K \cdot C}} \quad (2.10)$$

Die maximale Keimzahl ( $N$  in KBE) in einem Tropfen wurde als Verhältnis der Biomasse in einem Tropfen zur Biomasse von einem Mikroorganismus berechnet (Gl. 2.11).

$$N = \frac{M_r}{M'} \quad (2.11)$$

Das Mikroorganismenwachstum folgt aber einer Exponentialfunktion, das heißt, aus einem Mikroorganismus entstehen zwei, aus zwei vier, aus vier acht und so weiter. Dieser Prozess der Verdoppelung der Mikroorganismen findet gleichzeitig statt. Es stellt sich nun die Frage, was passiert, wenn das Substrat nicht für alle Mikroorganismen ausreicht. Verdoppeln sich die Mikroorganismen nur teilweise oder ist das Wachstum gestoppt?

*Verrips u. Zaalberg, 1980* zeigen, dass dann die Beziehung (Gl. 2.12) gilt, wobei der Exponent  $n$  die maximale Zahl vollständiger Verdopplungen ist.

$$N = 2^n \leq \frac{M_r}{M'} + 1 \quad (2.12)$$

Zusammenfassend wurde die maximale Konzentration der Mikroorganismen als die maximale Keimkonzentration pro Tropfen in Abhängigkeit der Tropfengröße (Substratmenge) berechnet. Zwei Hypothesen wurden während des Wachstums betrachtet. Dabei wird bei einer zu geringen Konzentration an Substrat von einer Verringerung des Wachstums (nur ein Teil der Mikroorganismen kann sich weiter vermehren) oder einem Wachstumsstopp ausgegangen.

In Tropfen mit dem Radius  $r < r_{MO}$  können die Mikroorganismen nicht wachsen. Sie benötigen jedoch zum Überleben Energie. Ihre Überlebenszeit wurde von *Verrips u. Zaalber, 1980* abgeschätzt.

Modellrechnung für der Fall, dass nach einem Wachstumsstopp die Mikroorganismen in Tropfen mit den Radius  $r > r_{MO}$  beginnen abzusterben, liegen vor [*Verrips u. Zaalber, 1980*].



## 2.4 Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen

### 2.4.1 Allgemeines

In Produkten, bei denen Wasser die kontinuierliche Phase ist, wie O/W-Emulsionen, können sich Mikroorganismen schnell vermehren. Untersuchungen zum Wachstum pathogener Bakterien bei verschiedenen Dispersphasenanteilen (30, 70 und 83 %) [Brocklehurst et al., 1995] und zum lokal aufgelösten Keimwachstum in O/W-Emulsionen [Parker et al., 1995] liegen vor.

Die Vermehrung von Mikroorganismen in O/W-Emulsionen kann beispielsweise durch Zugabe von Konservierungsmitteln vermieden werden. Andere Arbeiten zeigten aber, dass gebräuchliche Konservierungsmittel in den üblichen Konzentrationen nicht generell das Wachstum von Mikroorganismen verhindern können [Flores et al., 1997; Valderrama et al., 1997; Hugo, 2001].

Neben verschiedenen Inaktivierungsverfahren, zum Beispiel Bestrahlung, Hochdruckinaktivierung und Elektropulsverfahren, ist die thermische Behandlung die am häufigsten verwendete physikalische Methode. Dieses Verfahren hat sich etabliert und ist gleichzeitig sehr günstig im Vergleich zu anderen Haltbarkeitsverfahren. Die meisten Autoren (z.B. Russel, 1982) geben als Ursache für die Hitzeinaktivierung eine Denaturierung von Proteinen (oder DNA) an.

Auch für Emulsionen ist die thermische Behandlung weit verbreitet, z.B. für Milch (3,5 % Fett) oder für Sahne (ca. 30 % Fett).

Für die thermische Inaktivierung von Enzymen und Mikroorganismen werden üblicherweise verschiedene Begriffe, z.B. das Blanchieren, Thermisieren, Pasteurisieren und Sterilisieren benutzt [vgl. Kessler, 1996; Schuchmann u. Schuchmann, 2005].

Beim Blanchieren handelt es sich um eine kurze milde Wärmebehandlung, bei dem die meisten Enzyme inaktiviert werden. Es wird häufig zur Behandlung von Obst und Gemüse verwendet, um die enzymatischen Reaktionen, die Farbe und Geschmack verändern können, zu vermeiden.

Das Thermisieren gilt als schonendes Verfahren zur Haltbarmachung von Milch ( $T = 62\text{ °C} - 65\text{ °C}$ ,  $t = 15\text{ s} - 20\text{ s}$ ). Dadurch werden thermolabile Mikroorganismen abgetötet und die Produktqualität kann bei niedrigen Lagerungstemperaturen über eine kurze Zeit (ein paar Tage) hoch gehalten werden [Kessler, 1996].

Durch das Pasteurisieren werden die rein vegetativen Mikroorganismen, inklusive der pathogenen Mikroorganismen wie *Salmonellen* oder *Escherichia coli*, inaktiviert und die Haltbarkeit des Produktes zeitlich

befristet verlängert. Nach dem Pasteurisieren enthält Milch noch ca.  $10^4$  bis  $10^5$  hitzeresistente Keime pro ml [Kessler, 1996].

Beispiele für Prozessparameter bei der Pasteurisation sind 62 °C - 65 °C für 30 min (Dauererhitzung) oder 72 °C - 75 °C für 15 s - 30 s (Kurzerhitzung) [Kessler, 1996]. Üblicherweise wird das Verfahren der Pasteurisierung mit anderen Verfahren, z.B. der Nutzung spezieller Verpackungen (mit modifizierter Atmosphäre), kombiniert.

Die Abtötung von vegetativen Keimen und auch Sporen kann durch eine Sterilisation erreicht werden. Beim Sterilisieren wird das Produkt auf über 100 °C erhitzt. Bei dem für Milch verwendeten Verfahren, der Ultrahochtemperaturerhitzung (UHT), wird die Milch für eine Zeit von 10 s - 1 s auf eine Temperatur von 135 °C - 150 °C erhitzt [Kessler, 1996].

Die totale Abwesenheit von pathogenen, toxinbildenden und verderbniserregenden Mikroorganismen kann nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit gelingen. Deswegen wird oft der Begriff der „praktischen Sterilität“ verwendet [vgl. Kessler, 1996].

Die benötigte Behandlungsintensität ist von den Produkteigenschaften, der Wasseraktivität, der Zusammensetzung und des pH-Werts abhängig. Im Allgemeinen benötigen Produkte mit niedriger Wasseraktivität eine stärkere Behandlung bei höheren Temperaturen oder längeren Heißhaltezeiten [Kessler, 1996]. Produkte, die einen hohen Säureschutz (pH-Wert < 4,5) aufweisen, wie es zum Beispiel bei Orangensaft der Fall ist, können nur durch Pasteurisieren eine längere Haltbarkeit erhalten [vgl. Regier u. Schuchmann, 2005].

Ein besonderer Fall ist die Abtötung von Mikroorganismen in Ölen. Sporen z.B. haben in Speiseöl eine hohe Resistenz. *Senhaji u. Loncin, 1977* konnten nach 20 min bei 105 °C sowie *Cerny u. Fink, 1986* nach 30 min bei 95 °C keinen Abtötungseffekt auf *Bacillus subtilis* Sporen im Öl feststellen. *Senhaji u. Loncin, 1977* haben auch die Hitzeresistenz von vegetativen Zellen (*Pseudomonas fluorescens*) in Öl untersucht und gezeigt, dass auch hier eine Schutzwirkung von Öl gegen thermische Inaktivierung der Mikroorganismen auftritt, die auf die geringe Wasseraktivität bzw. Wasser-  
verfügbarkeit zurückzuführen ist. *Miller, 2006* hat das Inaktivierungsverhältnis von zwei verschiedenen Mikroorganismen *Listeria innocua* und *L. Lactis*, in Öl, Wasser und Mayonnaise bei Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C verglichen. Auch *Miller, 2006* konnte eine Schutzwirkung des Öls nachweisen. Bei *L. Lactis* wurden allerdings kaum Unterschiede in der Inaktivierung in Mayonnaise (67 % Öl, pH-Wert ca. 4,7) und in Öl festgestellt, obwohl nach ihrer Untersuchung dieser Mikroorganismus als hydrophil (96 % Wiederfindung in Wasser, nach MATH-Test) charakterisiert wurde.

*Murrell u. Scott, 1966* äußerten die Vermutung, dass in den Sporen Proteine und Proteinkomplexe mit Wassermolekülen stabilisiert sind. Nach dieser Hypothese würde in Medien mit niedriger Wasseraktivität der Spore ein Teil dieses Wassers entzogen und folglich die Denaturierung der Proteine verzögert.

Im Gegensatz zur oben genannten Literatur konnten *Smith et al., 1976* keinen deutlichen Einfluss eines Fettanteils von 11 bis 38 % auf die Inaktivierung von Bakterien in Brühwürsten feststellen, ebenso *Juneja et al., 2001* für die Inaktivierung von *Salmonellen* in Hackfleisch mit einem Fettgehalt von 1 bis 12 % bei untersuchten Temperaturen zwischen 58 °C und 65 °C. Weiterhin haben *Schultze et al., 2007* eine umgekehrte Tendenz für die Inaktivierung von *Listeria monocytogenes* in Frankfurter Wurstteig bei 60 °C beobachtet. Der D-Wert, welcher die Zeit beschreibt, die erforderlich ist, um 90 % der Mikroorganismen zu inaktivieren [vgl. Bast, 1999], wurde für verschiedene Rezepturen verglichen. Im Wurstteig mit 23 % Fett wurden niedrigere D-Werte (0,9 min) als in einem Teig mit 11 % Fett (D-Wert = 1,0 min) und 8,5 % Fett (D-Wert = 2,2 min) festgestellt.

Der Einfluss des Fettgehalts von Lebensmitteln auf die Inaktivierung von Mikroorganismen ist bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. Sollte das Fett oder Öl einen Schutzeffekt aufweisen, so sollten auch Lebensmittel mit hohem Fettgehalt diesen Schutzeffekt nachweisen, dazu müssten aber erst die Mikroorganismen in die ölige Phase gelangen. Es wäre daher wichtig, die Oberflächeneigenschaften bzw. die Verteilung der Mikroorganismen in Emulsionen näher zu kennen.

Die Inaktivierung hängt auch von der Art der Mikroorganismen und ihrem physiologischen Zustand ab. Mikroorganismen besitzen unterschiedliche Verhaltenscharakteristiken gegenüber einer Wärmeeinwirkung. Auch Mikroorganismen einer Population können verschiedene Resistenzen aufweisen. Außerdem spielen die Vorgeschichte, z.B. Wachstums-Temperatur und -Medium, bei der thermischen Inaktivierung eine wichtige Rolle. Dieses Thema wurde von *Pardey, 2007* detailliert untersucht.

Ein Inaktivierungsverfahren ist erfolgreich, wenn das Produkt sicher für den Verbraucher ist (z.B. ohne pathogene Mikroorganismen), wenn möglichst wenige Produktveränderungen stattfinden (z.B. Veränderungen am Geschmack, der Textur und am Vitamingehalt) und wenn die erwünschte Produkthaltbarkeit erreicht ist.

Bei der Wärmebehandlung gibt es verschiedene Möglichkeiten, um das Verfahren zu optimieren. Zum einen können Prozessparameter wie Temperatur und Zeit optimiert werden. Andererseits können das Produkt und die Verpackung getrennt behandelt und anschließend das Produkt aseptisch verpackt werden.

Zur Untersuchung der Inaktivierung von Mikroorganismen werden oft Überlebenskurven ermittelt, was Thema des nächsten Kapitels ist.

#### 2.4.2 Überlebenskurve und mathematische Modellierung

Überlebenskurven werden grundsätzlich als semilogarithmische Darstellung der relativen Zellzahl ( $\log(N/N_0)$ ) während der Inaktivierungsdauer  $t$  aufgetragen. Die Zellzahlen  $N$  und  $N_0$  sind meist in KBE/ml (Kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter) beschrieben.

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Ansätze, um die Überlebenskurven der Mikroorganismen mit Hilfe einer mathematischen Funktion zu beschreiben.

Seit Jahrzehnten wird in der Praxis ein Ansatz verwendet, der die folgenden Hypothesen beinhaltet: Alle Zellen in einer Population verfügen über eine identische Hitzesensibilität und die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Zelle oder ein Ziel in der Zelle inaktiviert wird, bestimmt die Todesrate [Peleg u. Cole, 1998]. Unter dieser Voraussetzung kann die Zerstörungsrate von mikrobiellen Zellen bei einer vorgegebenen Temperatur durch eine Differentialgleichung beschrieben werden. Das Abtöten der Mikroorganismen ist in diesem "klassischen" Fall durch eine Reaktionskinetik erster Ordnung beschreibbar (Gl. 2.13).

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad (2.13)$$

Wobei:

$N$  = die momentane Anzahl von Zellen im Medium

$k$  = die Geschwindigkeitskonstante in 1/s

Die Integration von Gl. 2.13 resultiert in (Gl. 2.14):

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \cdot \int_0^t dt \rightarrow \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k \cdot t \quad (2.14)$$

Wobei:

$N_0$  = Anfangszellzahl zur Zeit  $t = 0$

Der Term  $(N/N_0)$  wird auch oft als  $S$  abgekürzt, vom engl. "Survival rate".

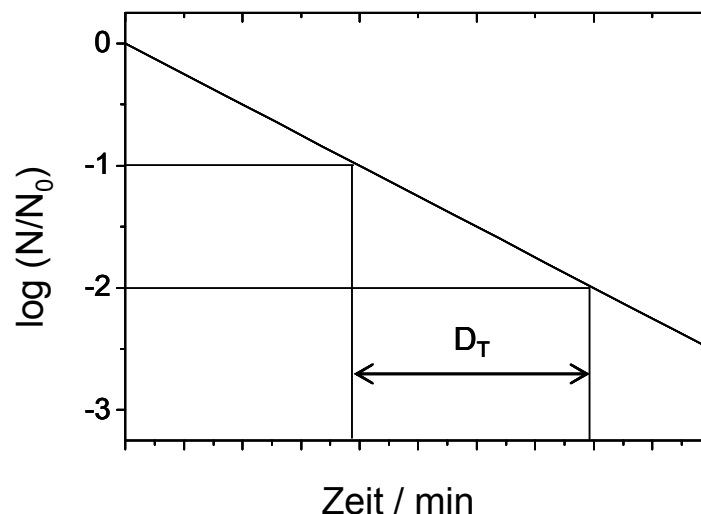
Die Umrechnung auf den dekadischen Logarithmus ergibt (Gl. 2.15):

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \frac{-k}{2,303} \cdot t = -k' \cdot t \quad (2.15)$$

Zur Beschreibung des Inaktivierungsverhaltens dient der im Abschnitt 2.4.1 definierte D-Wert. Der D-Wert wurde für eine konstante Temperatur bestimmt.  $D_T$  gilt dann als D-Wert bei der Temperatur  $T$  (Gl. 2.16):

$$D_T = \frac{2,303}{k} = \frac{1}{k'} \quad (2.16)$$

Abb. 2.7 zeigt ein Beispiel einer graphischen Darstellung von  $\log(N/N_0)$  über der Zeit  $t$ . In diesem "klassischen" Fall ist die Überlebenskurve eine Gerade, die bei  $\log(N/N_0) = 0$  beginnt und eine Steigung von  $-k'$  besitzt. Die Steigung der Geraden hängt von der Inaktivierungstemperatur  $T$  ab. Je größer die Temperatur ist, desto kleiner wird  $D_T$ .



**Abb. 2.7:** Verlauf der relativen Keimzahl über der Inaktivierungszeit nach dem klassischen Modell. Je höher die Temperatur, desto größer ist der Betrag der Steigung der Geraden und desto kleiner ist der D-Wert.

Außer von der Temperatur ist der D-Wert vom Mikroorganismus und Inaktivierungsmedium abhängig. Zum Beispiel besitzt *Clostridium botulinum*

einen  $D_{121^\circ\text{C}}$  von 12 s, während für *Bacillus stearothermophilus* ein  $D_{121^\circ\text{C}}$  von 408 s (6,8 min) in einem Phosphatpuffer bei  $\text{pH} = 7$  gilt [Kessler, 1996].

Wenn der D-Wert bei einer bestimmten Temperatur bekannt ist, kann der D-Wert für unterschiedliche Temperaturen über den Arrhenius-Ansatz (wie bei einer chemischen Reaktion) berechnet werden (Gl. 2.17):

$$k = k_{\max} \cdot e^{\frac{E_A}{R \cdot T}} \quad (2.17)$$

Wobei:

$k_{\max}$  = Inaktivierungsgeschwindigkeit

$E_A$  = Aktivierungsenergie

$R$  = Universelle Gaskonstante ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )

In der Praxis wurde anstatt  $E_A$  und  $k_{\max}$  der Bezug zwischen zwei konstanten Temperaturen hergestellt (Gl. 2.18):

$$\log \left( \frac{D_{T_1}}{D_{T_2}} \right) = \frac{E_A \cdot (T_2 - T_1)}{2,303 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2} = \frac{(T_2 - T_1)}{z} \quad (2.18)$$

In Gl. 2.18 ist  $z$  der so genannte z-Wert. Der z-Wert beschreibt, um wie viel Grad die Temperatur  $T$  (in K) erhöht werden muss, um den D-Wert um 90 % zu senken.

Mit Hilfe der D- und z-Werte lässt sich daher das Absterbeverhalten der Mikroorganismen für alle Temperatur-Zeit-Kombinationen vorhersagen.

In der Steriltechnik werden noch zwei weitere Werte berücksichtigt, der n- und der F-Wert. Der n-Wert ist das Inaktivierungskriterium ( $n = \log(N/N_0)$ ), das erreicht werden soll. Es sagt aus, um wie viele Zehnerpotenzen die Keimzahl eines spezifischen relevanten Mikroorganismus herabgesetzt werden muss [vgl. Regier u. Schuchmann, 2005].

Der F-Wert ist die Inaktivierungszeit, die benötigt wird, um eine n-Reduktion der Mikroorganismen zu erreichen. Bei konstanter Temperatur ist der F-Wert das Produkt aus Inaktivierungskriterium und D-Wert (Gl. 2.19) [vgl. Pardey, 2007]:

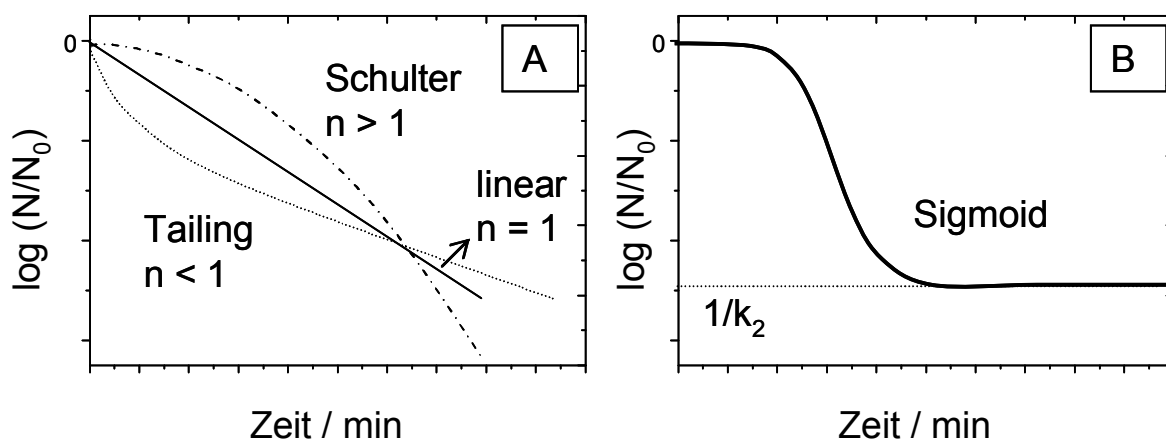
$$F_T = n \cdot D_T \quad (2.19)$$

Beispiele von kinetischen Kenngrößen können bei *Regier u. Schuchmann, 2005* gefunden werden.

Experimentelle Werte zeigen, dass die Beziehung zwischen  $\log(N/N_0)$  und der Inaktivierungszeit nicht immer linear ist und verschiedene Formen aufweisen kann. Häufig werden Kurven mit einer Auf- oder Abwärtswölbung, einer so genannten Schulter oder Tailing beobachtet. Sigmoid Kurven weisen eine Kombination aus beiden Wölbungsarten auf (Abb. 2.8) [Peleg, 2006].

Die Interpretation für die Schulterkurven ist, dass am Anfang des Prozesses die Zellen beschädigt und dadurch geschwächt werden, bis zu dem Punkt, an dem ihre Zerstörungsrate mit steigender Inaktivierungszeit anfängt zu steigen.

Bei der so genannten Tailing-Kurve sind die schwachen oder empfindlichen Bakterien der Bakterienpopulation in einer relativ kurzen Zeit abgetötet und die Überlebenden besitzen eine immer höhere Widerstandskraft.



**Abb. 2.8:** Verlauf der relativen Keimzahl über der Inaktivierungszeit. Beispiele von Schulter-, Tailing- (A) und sigmoid-Kurvenverläufen (B).

Die Sigmoid-Kurven können mit der Kombination der beiden Effekte erklärt werden. Am Anfang werden die empfindlichen Zellen einer Mikroorganismenkultur durch die Behandlung bedeutend geschwächt, während nach einer bestimmten Zeit eine widerstandsfähige Subpopulation durch die Behandlung überhaupt nicht inaktiviert werden kann [Peleg, 2000].

Schulterkurve, lineare Kurve und Tailing-Kurve können nach Gl. 2.20 beschrieben werden [vgl. Peleg, 2006].

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log S(t) = -b \cdot t^n \quad (2.20)$$

Die Form der Kurve hängt sowohl von einem Formfaktor  $n$ , der größer, kleiner oder gleich 1 sein kann, als auch von einem Maßstabsfaktor  $b$  ab. Ausgangspunkte dieses Ansatzes ist die Überlegung, dass Mikroorganismen im Gegensatz zum klassischen Ansatz (Gl. 2.13) unterschiedlich sensibel auf die gleiche Inaktivierung reagieren, also ihre Widerstandsfähigkeit bei identischem Inaktivierungsstress einer Verteilung unterliegt. Für  $b = k'$  und  $n = 1$  zeigt die Zellzahl eine lineare Zeit-Abhängigkeit in einer semilogarithmischen Auftragung an und die Gl. 2.20 entspricht Gl. 2.15. Ist  $n > 1$ , so handelt es sich um eine Schulterkurve, während für  $n < 1$  die Gleichung eine Tailing-Kurve beschreibt.

Kurven, die ein sigmoides Verhalten zeigen (siehe Abb. 2.8), können nach Peleg, 2000 mit Gl. 2.21 angepasst werden.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log S(t) = -\frac{t^m}{k_1 + k_2 \cdot t^m} \quad (2.21)$$

Durch den Bruch  $1/k_1$  wird die Anfangssteigung der Kurve festgelegt, d.h. je kleiner  $1/k_1$  ist, desto ausgeprägter ist die Schulter. Der Bruch  $1/k_2$  gibt Auskunft über die Größe der Restpopulation. Die Konstanten  $k_1$  und  $k_2$  sowie  $b$ ,  $n$  und  $m$  (Gl. 2.20 und Gl. 2.21) hängen vom Mikroorganismus und den Inaktivierungsbedingungen ab [Peleg, 2000].

Zur Modellierung der nichtlinearen Überlebenskurven gibt es kein allgemeingültiges Gesetz zur Temperaturabhängigkeit der Parameter. Deshalb ist es nur möglich, empirische Gleichungen aufzustellen.

## 2.5 Sterilfiltration

### 2.5.1 Allgemeines

Bei der Sterilfiltration werden im Allgemeinen Mikroorganismen und Verunreinigungen aus Gasen oder Flüssigkeiten entfernt. Es wird insbesondere für thermisch empfindliche Produkte wie Antibiotika oder andere Arzneimittel eingesetzt. Durch die Sterilfiltration können keine virusfreien Produkte erzielt werden. Dies ist nur durch ein Ultrafiltrations-Verfahren möglich.



Es werden hauptsächlich drei Arten von Sterilfiltern eingesetzt: Tiefenfilter, Membranfilter und HEPA-Filter (High Efficiency Particulate Air). Tiefenfilter bestehen aus dünnen Fasern, von denen die Mikroorganismen durch mechanische Trennung und Adsorption eliminiert werden können. Membranfilter sind dünne Filter mit definierter Porengröße von normalerweise  $0,2\ \mu\text{m}$  oder  $0,45\ \mu\text{m}$ , durch die die Mikroorganismen nicht gelangen können. Der HEPA-Filter wird zum Sterilisieren von Luft in Reinräumen eingesetzt [Waites et al., 2001] und wird hier nicht diskutiert, da im Folgenden nur die Sterilfiltration von Flüssigkeiten mittels Membranfilter behandelt wird.

In der pharmazeutischen Industrie werden Membranfilter mit mittlerer Porengröße von  $0,2\ \mu\text{m}$  bis  $0,02\ \mu\text{m}$  verwendet. Für die Lebensmittelindustrie sind Filter mit einer mittleren Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  für die meisten Einsätze ausreichend, da das Keimspektrum in den Produkten im Allgemeinen keine extrem kleinen Mikroorganismen enthält. In diesen Fällen ist die Nutzung von Filtern mit kleineren Porengrößen aufgrund des geringen Durchsatzes wirtschaftlicher kaum möglich [Brendel-Thimmel et al., 2006].

Eine typische Anwendung der sterilen Filtration für Emulsionen ist bei der Herstellung von parenteralen Emulsionen zu finden.

### 2.5.2 Sterilfiltration von parenteralen Emulsion

Parenterale Emulsionen werden direkt in das Blut von Patienten injiziert, wenn der Magen-Darmtrakt umgangen werden muss. Diese Emulsionen dienen zur Ernährung des Patienten oder als Trägersystem für nicht oder schlecht wasserlösliche Arzneimittel. Sie haben hohe Qualitätsanforderungen, so müssen sie steril sein und dürfen keine Partikel oder Tropfen mit einem Durchmesser größer als  $3\ \mu\text{m}$  nach ihrer Herstellung und nach der Lagerungszeit enthalten. Größere Tropfen können zu Embolien führen. Die Lagerungszeit beträgt in der Regel zwei Jahre [Thews et al., 1998].

Normalerweise werden parenterale Emulsionen mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. Nach dem Emulgieren werden die Emulsionen durch Filter mit einer größeren Porengröße ( $d_p \geq 0,45\ \mu\text{m}$ ) filtriert, verpackt und anschließend sterilisiert. Im Falle von wirkstoffhaltigen Emulsionen, bei denen der Wirkstoff thermisch empfindlich ist, wird die Emulsion aseptisch filtriert ( $d_p = 0,2\ \mu\text{m}$ ) und verpackt.

Derartige Emulsionen enthalten üblicherweise einen Dispersphasenanteil von 10 %. Sie benötigen spezielle Materialien für die parenterale Anwendung, zum Beispiel ein spezielles Lecithin als Emulgator und besonders gereinigte Pflanzenöle. Ein ausführlicher Überblick der Her-

stellung und Eigenschaften von parenteralen Emulsionen steht in *Floyd, 1999* zur Verfügung.

Die Herstellung von parenteralen Emulsionen mit tangentialer Mikrofiltration wurde von *Brouillet, et al., 2003* untersucht. Emulsionen mit mittleren Tropfendurchmessern bis ca. 0,5  $\mu\text{m}$  wurden erzeugt. Es wurden allerdings Membranen mit mittlerer Porengröße von 0,8  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$  und 1,4  $\mu\text{m}$  eingesetzt, was für eine Sterilfiltration nicht ausreicht.

### 3 Ziele dieser Arbeit

Insgesamt umfasst diese Arbeit die Untersuchung von drei verschiedenen Verfahren bzw. Methoden, um die mikrobiologische Stabilität von W/O- und O/W-Emulsionen zu erreichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die mikrobiologische Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend feiner Tropfen untersucht werden. Es ist bekannt, dass W/O-Emulsionen nur durch ihre Struktur und ohne weitere Hilfsstoffe mikrobiologisch stabil sein können. In den bisherigen Untersuchungen zur mikrobiologischen Stabilisierung von W/O-Emulsionen [Verrips und Zaalberg, 1980; Verrips et al., 1980; Verrips, 1989] lässt sich jedoch nicht exakt angeben, wie sich die Mikrostruktur der W/O-Emulsion auf ihre mikrobiologische Stabilität auswirkt.

Das Verhalten von hydrophilen und hydrophoben Mikroorganismen in der Ölphase und im Phasengrenzbereich soll ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Ferner ist zu prüfen, ob und wie sich die Tropfengrößenverteilung und der Dispersphasenanteil einer W/O-Emulsion auf das Wachstum von Mikroorganismen auswirken. Für eine W/O-Emulsion gilt es, den kritischen Tropfendurchmesser  $x_{krit}$  einer Emulsion zu bestimmen, bei der Mikroorganismenwachstum in Tropfen nicht mehr möglich ist. Für  $x < x_{krit}$  sollte eine derartige W/O-Emulsion mikrobiologisch stabil sein. Für größere Tropfen  $x > x_{krit}$  soll überprüft werden, in welcher Weise das MO-Wachstum eingeschränkt und wie das Wachstum durch den Dispersphasenanteil (bis hin zu Biliquid Foams) beeinflusst wird. Erfahrungsgemäß wird es mit zunehmendem Dispersphasenanteil (Wassergehalt) schwieriger, W/O-Emulsionen mikrobiologisch stabil zu halten. Ob und wo eine mögliche Stabilitätsgrenze liegt, ist Thema dieser Arbeit. Diese Fragestellung ist z.B. für fettarme Streichfette und W/O-Cremes bedeutsam.

Als zweites Thema soll die thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in wässrigen Systemen, in Öl und in Emulsionen erforscht werden. Es soll überprüft werden, ob es tatsächlich einen Schutzeffekt gibt, wenn sich die Mikroorganismen im Öl befinden. Für O/W-Emulsionen soll zudem die Abtötungskinetik von hydrophilen und hydrophoben Mikroorganismen in Abhängigkeit der Emulsionseigenschaften bestimmt werden.

Zusätzlich soll das Premix-Membranemulgieren nach *Suzuki et al., 1998* als Alternative zum gleichzeitigen Herstellen und Sterilisieren von O/W-Emulsionen untersucht werden. Die Anlage soll am Institut gebaut und ihre Prozessparameter charakterisiert werden. Es soll überprüft werden, ob mit dem Premix-Membranemulgieren Emulsionen mit handelsüblichen

Membranen und Emulgatoren hergestellt werden können, die auch enge Tropfengrößenverteilungen besitzen.

Im dritten Teil der Arbeit soll das Augenmerk auf die Herstellung von Modellemulsionen für die parenterale Anwendung gerichtet werden. Parenterale Emulsionen wurden als Beispiel ausgewählt, da sie hohe Anforderungen in Bezug auf ihre Sterilität, physikalische Stabilität und Tropfengröße (kleiner als 3  $\mu\text{m}$ ) haben. Um eine ausreichende Sterilfiltration erreichen zu können, werden Membranen mit mittleren Porengrößen von 0,2  $\mu\text{m}$  und 0,45  $\mu\text{m}$  eingesetzt.

## 4 Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeiten wurden sowohl O/W als auch W/O-Emulsionen hergestellt.

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend feiner Tropfen wurden hydrophile Mikroorganismen in die wässrige Phase von W/O-Emulsionen eingebracht. Als disperse Phase wurde Luria-Bertani(LB)-Nährmedium eingesetzt, damit ausreichende Mengen an Substraten für die Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Als kontinuierliche Phase wurde Pflanzenöl mit dem Emulgator PGPR 90 (vgl. Kap. 4.1.2) verwendet.

Die thermische Inaktivierung von Mikroorganismen wurde hauptsächlich in O/W-Emulsionen erforscht. Die Mikroorganismen wurden im Nährmedium bis zur stationären Phase kultiviert, zentrifugiert, in Ringerlösung suspendiert und in die kontinuierliche Phase der Emulsion dispergiert. Hier wurde der Emulgator Tween 80 (vgl. Kap. 4.1.2) verwendet.

Zur Untersuchung der Abtrennung von Mikroorganismen aus Emulsionen mit Hilfe des Premix-Verfahrens wurden O/W-Modellemulsionen mit Pflanzenöl als disperse Phase und demineralisiertes Wasser mit Emulgator Tween 80 als kontinuierliche Phase verwendet. Schwerpunktmäßig wurden in diesem Teil der Arbeit Modellemulsionen für die parenterale Anwendung untersucht. Hierzu wurden spezielle Materialien wie gereinigte Öle, fraktioniertes Lecithin und bi-destilliertes Wasser verwendet.

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Ölige Fluide

Als ölige Phase wurde mit Ausnahme von parenteralen Emulsionen und Biliquid Foams Pflanzenöl (Fa. Floreal Hagen GmbH) verwendet. Für parenterale Emulsionen kam gereinigtes Sojaöl 700 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) zum Einsatz. Zur Herstellung von Biliquid Foams wurde ein fraktioniertes Palmöl (Miglyol, Schumann und Sohn, Karlsruhe) eingesetzt. In Tab. 4-1 sind die verwendeten öligen Fluide mit ihren Eigenschaften dargestellt. Die Viskosität wurde mittels eines Rheometers mit einstellbarer Scherspannung (CSL-100 Rheometer, Carri-Med, Düsseldorf) bei 20 °C gemessen. Das Rheometer wurde schubspannungsgesteuert (von 0 bis 10 N·m<sup>-2</sup>) betrieben und die Scherrate in einem Doppelspaltssystem gemessen. Die ermittelten Werte wurden mit einem angeschlossenen Computer ausgewertet und die Fließkurve nach Newton angepasst. Die Dichte wurde mittels der Auftriebsmethode bei 20 °C (DCAT 11, Data

Physics, Filderstadt) bestimmt. Ein Siliziumtauchkörper mit bekannter Dichte ist in die zu messende Flüssigkeit eingetaucht. Die Auftriebskraft des Körpers in der Flüssigkeit wird gemessen und entspricht der Gewichtskraft der vom Körper verdrängten Flüssigkeit. Diese Gewichtskraft ist das Produkt aus verdrängtem Volumen, der Dichte des Fluids und der Erdschwerebeschleunigung. Der Messbereich liegt zwischen 0,5 und 2,5 g/cm<sup>3</sup> und die Auflösung bei ± 0,002 g/cm<sup>3</sup> [Dataphysics, 2005].

**Tab. 4-1:** Eingesetzte Fluide

<b>Ölige Fluide</b>	<b>Dyn. Viskosität mPa·s (T = 20 °C)</b>	<b>Dichte g/cm<sup>3</sup> (T = 20 °C)</b>
Pflanzenöl	58	0,92
Gereinigtes Sojaöl 700	59	0,92
Miglyol	27	0,94

#### 4.1.2 Emulgatoren

Als wasserlösliche Emulgatoren wurde Tween 80 (Polysorbat 80 (PS80), E433, Carl Roth GmbH+Co) verwendet. PGPR 90 (Polyglycerinpolyricinoleat, E476, Danisco Ingredients Deutschland GmbH) wurde als schnell stabilisierender, öllöslicher Emulgator eingesetzt. Die Emulgatoren wurden unter den folgenden Kriterien ausgewählt: Sie sollten für Lebensmittel zugelassen und autoklavierbar sein und nicht toxisch auf Mikroorganismen wirken.

Zur Herstellung von Emulsionen mit dem Premix-Membranemulgieren wurden zusätzlich als wasserlösliche Emulgatoren Tween 20 (Carl Roth GmbH +Co) und Lezithin (Epikuron 100P, Lucas Meyer GmbH), ein langsam stabilisierender Emulgator, getestet. Zudem wurde die Kombination aus PGPR 90 (schnell stabilisierender, öllöslicher Emulgator) und Tween 80 untersucht, da ähnliche Kombinationen von Emulgatoren von *Suzuki et al., 1998* für das Premix-Membranemulgieren eingesetzt wurden.

Zur Herstellung von parenteralen Emulsionen wurden Soja-Lezithin Lipoid S75 mit ca. 68 % Phosphatidylcholin sowie Ei-Lezithin Lipoid E80 mit ca. 80 % Phosphatidylcholin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) als Emulgatoren eingesetzt. Lezithin ist ein amphoterer Emulgator, das heißt, jedes Molekül enthält sowohl eine anionische als auch eine kationische Gruppe. Lezithin ist für parenterale Emulsionen zugelassen und gilt als sichere und nicht toxische Komponente.

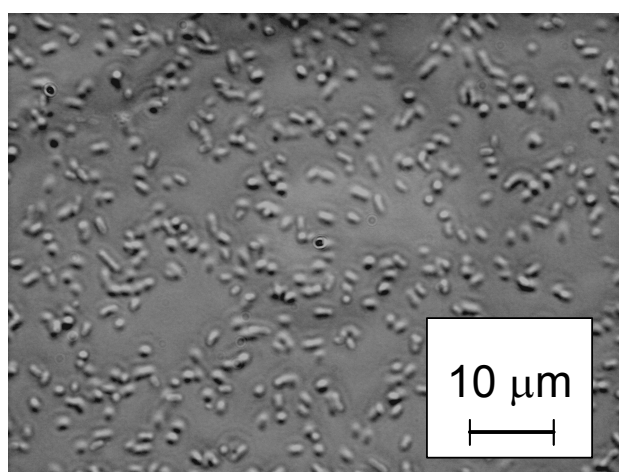
In Tab. 4-2 sind die verwendeten Emulgatoren, die eingesetzte Konzentrationen und ihre Anwendungen in dieser Arbeit zusammengefasst.

**Tab. 4-2:** Eingesetzte Emulgatoren

Emulgator	Konzentration	Anwendung
Tween 80	$\geq 1$ Gew.-%	Allgemeine O/W-Modellemulsionen
PGPR 90	$\leq 10$ Gew.-% der disperse Phase	W/O-Emulsionen, Test mit PME
Tween 20	2 Gew.-%	Test mit PME
Lezithin	5 Gew.-%	Test mit PME
Soja-Lezithine – Lipoid S75	1,2 Gew.-%	Parenterale Emulsionen
Ei-Lezithine- Lipoid E80	1,2 Gew.-%	Parenterale Emulsionen

#### 4.1.3 Mikroorganismen

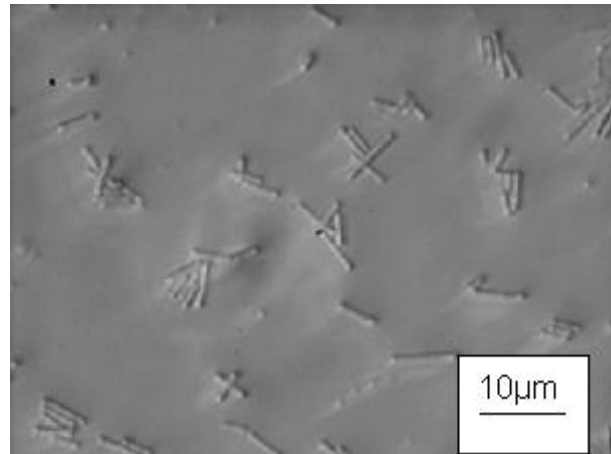
Für die allgemeinen Versuche wurde *Escherichia coli* K12 DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) 498 als Modellmikroorganismus mit hydrophilen Eigenschaften erforscht. Es handelt sich um stäbchenförmige Mikroorganismen mit einer Länge von 1  $\mu\text{m}$  - 3  $\mu\text{m}$  und Durchmessern von 0,3  $\mu\text{m}$  - 1  $\mu\text{m}$  (Abb. 4.1) [Munk, 2000; Waites et. al, 2001].



**Abb. 4.1:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12.

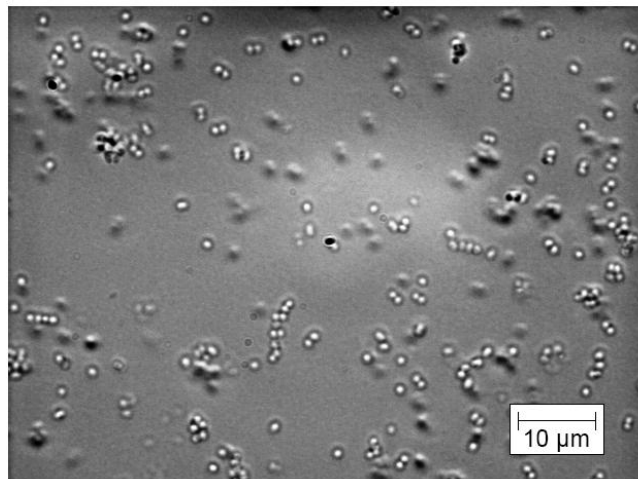
Einige Versuche wurden in dieser Arbeit mit *Lactobacillus casei* 6126 durchgeführt. Dieser *Lactobacillus* stammt aus der Sammlung der BFEL (Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe, jetzt

MRI, Max Rubner-Institut, Karlsruhe). Er wurde aus Lebensmitteln isoliert und vom Institut für Hygiene und Toxikologie des MRI zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen probiotischen Mikroorganismus, der in dieser Arbeit aufgrund seiner hohen Hydrophobizität verwendet wurde. Diese Mikroorganismen besitzen Stäbchenformat (Abb. 4.2), sind Gram-positiv und fakultativ anaerob.



**Abb. 4.2:** Mikroskopische Aufnahme von *L. casei* 6126.

*Micrococcus luteus* DSMZ 20030 wurde wegen seines kugelförmigen Formats (Kokkus, Abb. 4.3.) und des kleinen Durchmessers von 1 µm bis 2 µm [Müller, 1974] zur Untersuchung und Beurteilung der Sterilität der Emulsionen im Premix-Verfahren eingesetzt. Es handelt sich um Gram-positiv, aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien [Schlegel, 1992].



**Abb. 4.3:** Mikroskopische Aufnahme von *M. luteus*.

In Tab. 4-3 sind die verwendeten Mikroorganismen und ihre Eigenschaften zusammengefasst.



**Tab. 4-3:** Untersuchte Mikroorganismen und ihre Eigenschaften

Mikroorganismen	Kolonieeigenschaften	Ideales Wachstum
<i>E. coli</i> K12 DSMZ 498 / ATCC 23616	Stäbchen, l = 1 µm - 3 µm, d = 0,3 µm - 1,0 µm	37 °C, pH 7, aerobe
<i>L. casei</i> BFE 6126	Stäbchen	30 °C, pH 7 anaerobe
<i>M. luteus</i> DSMZ 20030	Kokkus, d = 1 µm - 2 µm	30 °C, pH 7 aerobe

#### 4.1.4 Nährmedien

Zur Kultivierung von Mikroorganismen wurde ein Inkubationsschüttler bei der Schüttelfrequenz 250 rpm eingesetzt. Das Nährmedium im Erlenmeyerkolben wurde mit einer Mikroorganismenkolonie angeimpft. Der Erlenmeyerkolben wurde unter idealen Bedingungen bebrütet. Das Nährmedium sowie die Kultivierungsbedingungen hängen vom Mikroorganismus ab.

Für die Kultivierung von *E. coli* K12 wurde Luria-Bertani(LB)-Medium eingesetzt. Außerdem diente das LB-Medium als disperse Phase der W/O-Emulsionen. Es steht den Mikroorganismen als Substrat in den Tropfen zur Verfügung. Die Zusammensetzung dieses Mediums besteht aus 10 g Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl. Da das LB-Medium keine Glucose enthält, bleibt der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung von *E. coli* K12 konstant. Dies ist wichtig, um das Wachstum und die Inaktivierung der Mikroorganismen sowie die Resistenz der resultierenden Population nicht zu beeinflussen [Pardey, 2007]. Unter idealen Wachstumsbedingungen (37 °C) in LB-Medium erreicht *E. coli* K12 die stationäre Phase nach ca. 16 h.

*M. luteus* wurde im Nutrient-Medium kultiviert. Für diesen Mikroorganismus ist es wichtig, den pH-Wert des Mediums auf 7 einzustellen. Dies wurde durch Zugabe von NaOH 0,1 M erreicht. *M. luteus* erreicht die stationäre Phase nach ca. 48 h Kultivierung bei 30 °C.

Zur Keimzahlbestimmung von *E. coli* K12 und *M. luteus* mit der Spatelplattentechnik wurde Standard I-Nähragar (Merck, Darmstadt) benutzt. Endo-Agar (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde als spezifisches Medium für Enterobakterien bzw. für *E. coli* K12 eingesetzt.

Für *L. casei* wurde ein MRS-Medium zur Kultivierung und MRS-Agar zur Keimzahlbestimmung benutzt. Das effizienteste Wachstum wurde in Reagenzgläsern ohne Rühren erzielt, d.h. ohne zusätzlichen Eintrag von Sauerstoff. Unter diesen Bedingungen und bei einer Temperatur von 30 °C erreichte *L. casei* die stationäre Phase nach ca. 24 h.

Die Ringerlösung (Merck, Darmstadt) wurde unabhängig von den eingesetzten Mikroorganismen als Verdünnungsmedium verwendet.

Tab. 4-4 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Medien bzw. ihrer Verwendungszwecke. Die genaue Zusammensetzung der Medien befindet sich im Anhang A1.

**Tab. 4-4:** Untersuchte Mikroorganismen und verwendete Medien

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Medium</b>	<b>Verwendungszweck</b>
<i>E. coli</i> K12	LB (Luria-Bertani)-Medium	Kultivierung
	Ringerlösung pH-Wert 7	Verdünnung
	Standard I –Nähragar	Plattenmethode
	Endo-Agar (Sigma-Aldrich)	Plattenmethode
<i>L. casei</i> 6126	MRS-Medium (Merck)	Kultivierung
	Ringerlösung (Merck)	Verdünnung
	MRS-Agar (Merck)	Plattenmethode
<i>M. luteus</i>	Nutrient-Medium	Kultivierung
	Ringerlösung pH-Wert 7	Verdünnung
	Standard I –Nähragar	Plattenmethode

Bei den Inaktivierungsversuchen wurde eine NaCl-Pepton Pufferlösung nach *Buranasompob, 2005* benutzt. Die genaue Konzentration von diesem Puffer befindet sich im Anhang A2.

## 4.2 Analyse und Analysegeräte

### 4.2.1 Tropfengrößenverteilung

Für die Analyse der Tropfengrößenverteilung der Emulsionen mussten die Proben vorher verdünnt werden. Demineralisiertes Wasser wurde zur Verdünnung von O/W-Emulsionen und Pflanzenöl zur Verdünnung von W/O-Emulsionen verwendet.

Für diese Messungen wurde das Weitwinkel Laserlichtbeugungsspektrometer Coulter LS 230 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) mit PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering)-Technologie eingesetzt.

Das Messprinzip beruht auf der Bestimmung der Beugung des Lichts, die von der Tropfengröße abhängig ist. Durch Verwendung der PIDS-Technik wird mit einer binokularen Optik zusätzlich die Seitwärtsstreuung unterschiedlich polarisierten Lichts aufgenommen und ausgewertet. Damit können auch sehr kleine Teilchen erfasst werden. Mit diesem Gerät können Tropfendurchmesser von 0,04  $\mu\text{m}$  bis 2000  $\mu\text{m}$  gemessen werden.

Auch die Größe der Mikroorganismen wurde mit dem Coulter LS 230 gemessen. Der Brechungsindex der Mikroorganismen wurde aus der Literatur übernommen [Bateman, 1965].

In dieser Arbeit wurde der volumenbezogene mittlere Tropfendurchmesser  $x_{1,3}$  zur Beschreibung der Tropfengröße von W/O-Emulsionen verwendet Gl. 4.1.

$$x_{1,3} = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} x \cdot q_3(x) dx \quad (4.1)$$

Wobei:

$x$  = Tropfendurchmesser

$x_{\min}$  = Kleinster ermittelter Tropfendurchmesser

$x_{\max}$  = Größter ermittelter Tropfendurchmesser

$q_3(x)$  = Volumendichteverteilungen der Tropfendurchmesser

Der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$ , sowie der SPAN wurden eingesetzt, um die Tropfengröße bzw. die Breite der Verteilung von O/W-Emulsionen zu beschreiben. Der Sauterdurchmesser der Emulsionen ist ein Maß für die spezifische Grenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase (Gl. 4.2).

$$x_{1,2} = \frac{6}{S_v} = \int_{x_{\min}}^{x_{\max}} x \cdot q_2(x) dx \quad (4.2)$$

Wobei:

$S_v$  = Spezifische Grenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase

$q_2(x)$  = Oberflächendichteverteilungen der Tropfendurchmesser

Die Breite einer Tropfengrößenverteilung (SPAN) ist definiert als:

$$\text{SPAN} = \frac{x_{3,90} - x_{3,10}}{x_{3,50}} \quad (4.3)$$

Wobei:

$x_{3,90}$  = Tropfengröße, bei der 90 % des Volumens der Dispersphase die gleiche Größe besitzt oder kleiner ist ( $x \leq x_{90}$ )

$x_{3,50}$  = Tropfengröße, bei der 50 % des Volumens der Dispersphase die gleiche Größe besitzt oder kleiner ist ( $x \leq x_{50}$ )

$x_{3,10}$  = Tropfengröße, bei der 10 % des Volumens der Dispersphase die gleiche Größe besitzt oder kleiner ist ( $x \leq x_{10}$ )

Für parenterale Emulsionen ist die Größe der größten Tropfen sehr wichtig. In diesem Fall wurde der maximale Tropfendurchmesser  $x_{3,99}$  gewählt;  $x_{3,99}$  ist die Tropfengröße, bei der die Summenvolumenverteilung 99 % beträgt.

## 4.2.2 Keimzahlbestimmungen

### 4.2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Messung der optischen Dichte (O.D.) wurde als schnelle Methode zur Bestimmung der Keimzahlkonzentrationen in Suspensionen und zur Verfolgung des Wachstums von Mikroorganismen eingesetzt. Sie wurde in einem Zwei-Kanal-Spektralphotometer (U-2000, Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf) durchgeführt.

Das Messprinzip basiert auf der Messung der Abschwächung einer Strahlung (zum Beispiel Licht) in einem Medium. Die Intensität des Streulichtes hängt von der Anzahl und Größe der streuenden Teilchen ab. Damit ist eine quantitative Analyse möglich.

Vor jeder Messung wurde das Gerät mit dem entsprechenden Nährmedium in den beiden Küvetten tariert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen das entsprechende Nährmedium.

Bei einer optischen Dichte größer als 0,4 musste die Probe verdünnt werden. Bei der Auswertung mussten die Werte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Für den MATH-Test (Kap. 4.4.2) wurde zur Messung der O.D. eine Wellenlänge von 580 nm benutzt.

#### 4.2.2.2 Bestimmung der Keimzahl nach dem Plattenverfahren

Die Bestimmung der Keimzahlkonzentration wurde nach einer Variante des Oberflächen-Spatelplattenverfahrens [Pichhardt, 1989, Bast, 1999] durchgeführt. Der Unterschied zur hier verwendeten Methode ist, dass die Probe nicht mit einem Spatel auf der Agaroberfläche verteilt wird, sondern mit dem Spiralplattiergerät Eddy Jet (Firma IUL Instruments GmbH, Königswinter) aufgetragen wird. Mit diesem Gerät können genauere Volumenproben schon ab 50 µl ausplattiert werden.

Die Proben wurden zuerst verdünnt, um zählbare Koloniezahlen zwischen 30 und 300, optimal zwischen 100 und 200, auf einer Platte zu erhalten [Bast, 1999]. Da die optimale Verdünnung nicht vorhersehbar ist, müssen mehrere Verdünnungsstufen hergestellt und ausplattiert werden. Die Verdünnungen wurden in 10-er Schritten hergestellt. Die verschiedenen Proben wurden unterschiedlich vorbereitet bzw. verdünnt. Für wässrige Lösungen sowie für O/W-Emulsionen wurde die Verdünnung mit Ringerlösung hergestellt. Ölproben wurden mit Ringerlösung, der zusätzlich 1% Emulgator Tween 80 zugesetzt wurde, verdünnt.

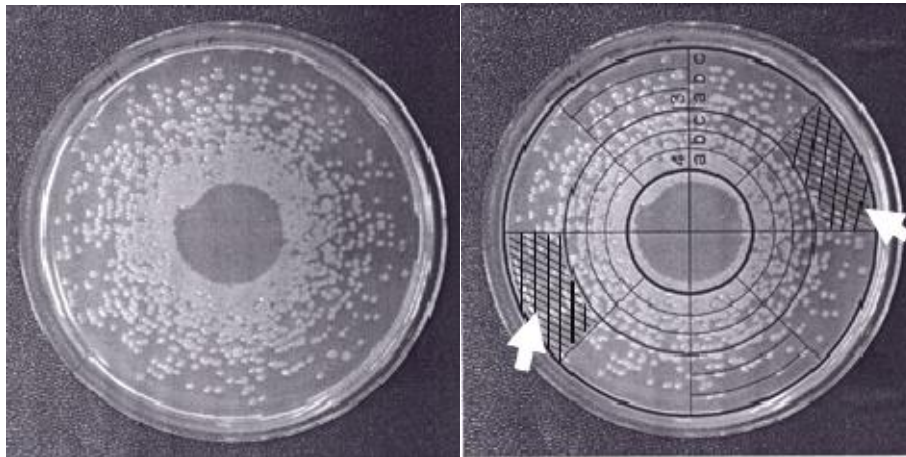
Bei den W/O-Emulsionen wurden wegen der Unlöslichkeit der kontinuierlichen Phase in wässrigen Medien die Verdünnungen in Anlehnung an die Methoden zur Untersuchung von Butter/Margarine bzw. kosmetischen Cremes auf Ölbasis, nach *DiLiello, 1982 und Pichhardt, 1998* durchgeführt. Hierzu wurden die Proben bei der ersten und zweiten Verdünnungsstufe mit Ringerlösung bei 45 °C verdünnt (9 g Probe + 1 g Ringerlösung) und im Wasserbad bei 45 °C, t = 5 min, stehen gelassen. Die Probe wurde mit einem Rührer der Art Vortex gut gemischt. Bei diesem Verfahren wurden die Phasen der Proben invertiert und somit die Mikroorganismen aus den Wassertropfen in die kontinuierliche Phase überführt. Ab dem dritten Verdünnungsschritt wurden die Proben weiter mit der konventionellen Methode (Ringerlösung bei Raumtemperatur) verdünnt.

Nach der Verdünnung wurde von jeder Probe ein definiertes Volumen von 50 µl bis 200 µl auf zwei Agarplatten mittels des Spiralplattensystems ausplattiert. Auf jeder Platte wurde, logarithmisch abnehmend von innen nach außen, eine Archimedes-Spirale aufgetragen. Da die ölhaltigen Proben nach den Verdünnungen nur einen geringen Anteil an Öl besitzen, wurde wegen der unterschiedlichen Dichte des Öls in diesem Schritt der Fehler beim Ausplattieren vernachlässigt. Es wurde angenommen, dass die Proben eine Dichte von 1 g/cm<sup>3</sup> haben. Bei allen Bestimmungen der Keimzahlen nach dem Plattenverfahren wurde durch entsprechende Verdünnung und eventuelle Desagglomeration dafür gesorgt, dass die Mikroorganismen vereinzelt und nicht im Form von Agglomeraten vorlagen. Die Vereinzlung wurde durch mikroskopische Untersuchungen geprüft.

Die Platten wurden im Brutschrank bei einer für die Mikroorganismen idealen Temperatur gelagert. Die Lagerungszeit ist von den Mikroorganismen abhängig. *E. coli* K12 wurde über Nacht (ca. 17 h) im Brutschrank bei 37 °C gelagert. *L. casei* wurde für ca. 4 d und *M. luteus* für ca. 2 d jeweils bei 30 °C inkubiert. Die Platten sollen so lange im Brutschrank bleiben, bis die Keimzahl sich nicht mehr ändert, jedoch nicht zu lange, damit die Kolonien nicht zu stark anwachsen und noch einzeln gezählt werden können. Die Keimzahlen wurden für alle Proben in KBE/g ermittelt.

Es wurde festgestellt, dass *L. casei* besser unter anaeroben Bedingungen wachsen kann. Dazu wurden die Platten in einem Anaerobtopf mit Anaerocult® C (Merck, Darmstadt) zur Erzeugung einer sauerstoffreduzierten und CO<sub>2</sub>-angereicherten Atmosphäre kultiviert.

Nach der Kultivierung wurden die Platten ausgezählt. Auf der linken Seite der Abb. 4.4 ist ein Beispiel von einer mit Mikroorganismen belegten Platte.



**Abb. 4.4:** Beispiel einer mit Mikroorganismen belegten Agarplatte mit und ohne aufgelegter Zählschablone. Im Beispiel wurde der Sektor 3 (a, b und c) gezählt [vgl. Pardey, 2007].

Sind die Platten nicht zu voll (bis ca. 100 Kolonien), werden die Platten ganz gezählt. Befinden sich sehr viele Mikroorganismen auf der Platte, können sie mit Hilfe einer speziellen Auszählungsschablone gezählt werden (Abb. 4.4 rechts). Hierbei wird die Zählungsschablone willkürlich auf das Zentrum der Platte gelegt. Die Platte wird damit in Sektoren eingeteilt, was das Zählverfahren vereinfacht.

Durch das logarithmische Auftragen der Probe erhalten die Sektoren verschiedene Mengen der Probe, d.h. eine unterschiedliche Konzentration von Mikroorganismen. Die Konzentration von Mikroorganismen steigt von außen nach innen. Man zählt nun die Sektoren von außen nach innen, bis eine minimale Zahl von 15 Kolonien in einem Sektor erreicht wird. Der Sektor der gegenüberliegenden Fläche muss ebenfalls gezählt werden und

auch mindestens 15 Kolonien enthalten (siehe Abb. 4.4 links). Falls der gegenüberliegende Sektor weniger als 15 Kolonien enthält, werden weiteren Sektoren auf beiden Seiten gezählt, bis beiden Seiten mindestens 15 Kolonien enthalten. Mit der Anzahl der Kolonien und unter Berücksichtigung der gezählten Sektoren kann man auf einer Tabelle (vom Lieferanten berechnet) die Keimzahl (Keimkonzentration) ermitteln. Bei den verdünnten Proben muss bis zur Keimzahlkonzentration der Originalprobe zurückgerechnet werden.

### 4.3 Methoden

#### 4.3.1 Allgemeine Methoden

##### 4.3.1.1 Herstellen der Emulsionen

Es wurden verschiedene Verfahren für die Herstellung der Emulsionen eingesetzt. Zur Herstellung von W/O-Emulsionen mit Mikroorganismen in der dispersen Phase wurden für Emulsionen mit größeren Tropfen ( $x > 5 \mu\text{m}$ ) ein Propellerrührer (RW 18 IKA-Werk, Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau) mit einem Durchmesser von  $d = 40 \text{ mm}$  eingesetzt. Ein Rotor-Stator-System (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel KG, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau), mit  $d = 12 \text{ mm}$  wurde zum Herstellen von Emulsionen mit kleineren Tropfen ( $x < 5 \mu\text{m}$ ) verwendet. Die Nutzung solcher Rührsysteme vereinfacht das sterile Arbeiten, indem Rotor, Stab und Behälter autoklaviert werden können. Die beiden Rührer wurden auch zur Herstellung von Rohemulsionen verwendet.

Für Inaktivierungsversuche wurden Emulsionen mit bestimmten Eigenschaften bezüglich Tropfengröße und Tropfengrößenverteilung hergestellt. Außer dem Rotor-Stator-System wurde das Premix-Membranemulgieren angewandt (siehe Abschnitt 4.6). Die mit diesen Verfahren hergestellten Emulsionen wurden nach ihrer Herstellung autoklaviert.

##### 4.3.1.2 Trennung des Bakterienpellets

In vielen Untersuchungen wurden die Mikroorganismen bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert und in ein neues Medium resuspendiert. Zur Trennung der Pellets wurden zwei Zentrifugen benutzt. Eine Zentrifuge (Biofuge A, Heraeus SEPATECH) eignet sich für kleinere Volumenproben mit 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen. Die Zentrifugationsparameter Umfangsgeschwindigkeit bzw. Beschleunigung ( $z = 12718 \text{ g}$ ) und Zeit ( $t = 10 \text{ min}$ ) wurden konstant gehalten.

Für größere Suspensionsmengen und für das Herstellen von Biliquid Foams (siehe Abschnitt 4.4.3) wurde eine zweite Zentrifuge (Rotanta 460,

Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen) eingesetzt. Für diese Zentrifuge können 15 ml- und 50 ml-Reagenzgefäße verwendet werden. Das Zentrifugieren der Suspensionen in der Zentrifuge wurde bei  $z = 13304 \text{ g}$ ,  $t = 10 \text{ min}$  durchgeführt.

#### 4.3.1.3 Trocknen und Dispergieren der Mikroorganismen in Öl

Eine Möglichkeit, die Mikroorganismen aus dem wässrigen Medium, wo sie kultiviert wurden, wasserfrei in Öl zu überführen, besteht darin, die Mikroorganismen zuerst zu trocknen und dann in Öl zu dispergieren. Zuerst wurden die Mikroorganismen bis zur stationären Phase kultiviert. Die Pellets wurden zentrifugiert und in einer hinreichenden Menge von Ringerlösung resuspendiert. Danach wurden zwei Methoden angewandt. Mit der einen Methode wurden die Mikroorganismen in Pulverform in ein Öl eingebracht und mit einem Rührer suspendiert. Mit der anderen wurde die Ringerlösung in die gleiche Volumenmenge von Pflanzenöl mit dem Rührer dispergiert und die so erhaltene W/O-Emulsion getrocknet.

Zur Trocknung wurde die Probe zuerst in einem Ethanolbad bei  $-40 \text{ °C}$  gefroren und dann in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 (Anlagensteuerung: LCD 1M; Christ/Osterode am Harz) eingebracht. Die Proben wurden so lange getrocknet, bis keine Wasserrückstände mehr zu sehen waren. Die Trocknungszeit betrug ca. 7 h für Suspensionen und 16 h für Emulsionen.

#### 4.3.2 MATH-Test und Verteilung der Mikroorganismen in Emulsionen

Zur Bestimmung der Hydrophobizität nach dem MATH-Test wurden die Mikroorganismen unter idealen Bedingungen bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Die Zellsuspension wurde in Mikroreaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (siehe Kap. 4.3.1.2). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden durch Resuspension in je 1 ml Ringerlösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem zweiten Waschen wurde die Zellsuspension mit Ringerlösung resuspendiert und verdünnt. Die Verdünnung erfolgt, bis die Lösung eine optische Dichte  $O.D._K$  (Kontrollwert) zwischen 0,5 und 0,6 bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 580 \text{ nm}$  erreicht.

In ein 15 ml-PP-Reagenzgefäß wurden 1,5 ml von der Zellsuspension sowie 1,5 ml n-Hexadecan zugegeben. Die Flüssigkeiten wurden dann 60 s mit dem Vortex gemischt und anschließend 1h zur Phasentrennung stehen gelassen. Aus der unteren, wässrigen Phase wurde dann eine 1 ml Probe mit einer Pipette entnommen und die optische Dichte  $O.D._E$  (Endwert) bei  $\lambda = 580 \text{ nm}$  gemessen.



Zur Ermittlung der optischen Dichte der Zellsuspension wurde ein Zweikanal-Spektralphotometer (U 2000, Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf) verwendet.

Die Hydrophobizität wurde dann mit der folgenden Gleichung (Gl. 4.4) berechnet:

$$\text{Hydrophobizität} = \frac{\text{O.D.}_K - \text{O.D.}_E}{\text{O.D.}_K} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Die Verteilung der Mikroorganismen in Emulsionen wurde ebenfalls mit diesem Prinzip gemessen, mit dem Unterschied, dass die zwei Phasen mit einem Propellerrührer vermischt wurden und die Dispersphasenanteile in Gewicht % gemessen wurden. Im Gegensatz zur Vermischung im Vortex lässt sich der Propellerrührer so einstellen, dass keine zusätzliche Emulgierung eintritt.

### 4.3.3 Mikroskopische Untersuchungen

#### 4.3.3.1 Lichtmikroskope

Mit der mikroskopischen Untersuchung von Mikroorganismen an Tropfengrenzflächen sollte geklärt werden, ob die hydrophilen und hydrophoben Mikroorganismen in den wässrigen Phasen in die ölige Phase gelangen können.

Zwei Lichtmikroskope (Mikroskop Axiolab, Carl Zeiss, Jena und Leica Wetzlar, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) wurden für diese Arbeit eingesetzt.

Zur mikroskopischen Untersuchung des Mikroorganismenverhaltens an O/W-Grenzflächen wurden die Mikroorganismen zuerst unter idealen Bedingungen kultiviert. 1 ml der Suspension wurde in einem Eppendorf-Reagenzgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 100 µl Ringerlösung suspendiert ( $N \sim 10^{10}$  KBE/ml).

Ein Tropfen Wasser wurde auf die ölige Phase aufgetragen und mehrere Stunden beobachtet.

Dazu wurde der Glasdeckel mit Nagellack auf dem Objektträger befestigt, um das Austrocknen der Probe zu verhindern.

#### 4.3.3.2 Fluoreszenzmikroskop und Farbstoffe

Um die Visualisierung der Mikroorganismen in Emulsionen zu verbessern, wurden Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopen durchgeführt. Es wurden die folgenden beiden Mikroskope eingesetzt:

- Konfokalmikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena) am Zoologischen Institut 1, Lehrstuhl für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe.
- Lichtmikroskop (ApoTome Z1, Zeiss, Jena) mit Fluoreszenzausstattung am Lehrstuhl für Wasserchemie der Universität Karlsruhe.

Zur Färbung der Mikroorganismen wurde DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Es handelt sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA der Mikroorganismen bindet. Zur Färbung der Bakterien wurden diese zuerst kultiviert, zentrifugiert (s. Kap. 4.3.1.2) und die Pellets abgetrennt. Dann wurden die Pellets in Ringerlösung mit Farbstoff suspendiert. Zur Einwirkung des Farbstoffes wurde die Suspension für 20 min stehen gelassen, bevor sie zur Untersuchung eingesetzt wurde.

Zur Einfärbung der Ölphase wurde der Farbstoff Nile Red (Invitrogen, Oregon, USA) in Pflanzenöl gelöst.

Nach der Färbung der Mikroorganismen in der Suspension und der Färbung des Öls wurde die Emulsion wie üblich hergestellt.

Da die Farbstoffe sehr lichtempfindlich sind, müssen die Vorbereitungen der Materialien, das Emulgieren und die Auftragung auf die Objektträger in abgedunkelten Räumen stattfinden. Dazu wurden z.B. auch alle Probengefäße mit Alufolie eingewickelt.

### 4.4 Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen

#### 4.4.1 Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in einzelnen Phasen einer Emulsion

##### Untersuchung des Wachstums in der wässrigen Phase

Zur Untersuchung des Wachstums von Mikroorganismen in wässrigen Systemen wurden Mikroorganismen im ersten Schritt in der wässrigen Phase inokuliert. Die Suspension wurde bei einer bestimmten Temperatur gelagert. Die Keimzahl wurde nach dem Plattenverfahren (Abschnitt 4.2.2.2) bestimmt. Zur Ermittlung einer Wachstumskurve wurde die Keimzahl in Abhängigkeit der Lagerungszeit dargestellt.

## Untersuchung des Wachstums in Öl

Das Wachstum in Öl wurde ähnlich wie das Wachstum in wässrigen Systemen untersucht, mit dem Unterschied, dass die Mikroorganismen durch Trocknen und Redispergieren (Abschnitt 4.3.1.3) zuerst in ein Öl überführt werden müssen. Zur Ausplattierung erfolgt eine Verdünnung der Probe mit 1 % Tween 80 versetzter Ringerlösung. Durch den Emulgator (Tween 80) wird eine homogene Probe erzeugt.

### 4.4.2 Herstellung und Untersuchung von mit Mikroorganismen versetzten Emulsionen

Für diese Untersuchungen wurden W/O-Modellemulsionen eingesetzt. Die Emulsionen bestehen aus LB-Medium mit Mikroorganismen als wässrige, disperse Phase und Pflanzenöl mit PGPR 90 als kontinuierliche Phase. Hierbei wurden aufgrund ihrer Benetzbarkeit hydrophile *E. coli* K12 verwendet.

Bei den Versuchen wurde der Dispersphasenanteil der Emulsionen, die Konzentration des LB-Mediums, die Anfangskonzentration von Mikroorganismen und das Wichtigste, die Tropfengröße, variiert.

Zur Herstellung der Emulsion wurden zuerst die *E. coli* K12 in das LB-Medium eingebracht und bis zu einer bestimmten Wachstumsphase kultiviert. In einigen Versuchen wurden die Mikroorganismen bis zum Anfang der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Diese kann schnell durch photometrische Messungen der optischen Dichte bestimmt werden.

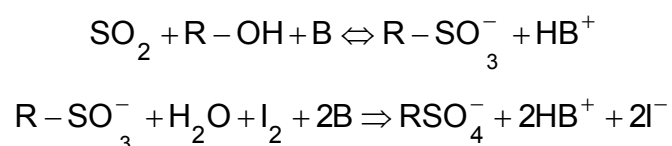
Bei anderen Versuchen wurden die Mikroorganismen bis zur stationären Phase kultiviert. Das Medium wurde anschließend zentrifugiert und in ein neues Medium mit einer bestimmten Konzentration von Substrat und Mikroorganismen resuspendiert.

Diese Mikroorganismensuspension wurde in die ölige Phase der Emulsion dispergiert und untergerührt (s. Kapitel 4.3.1.1). Die Geschwindigkeit des Propellerrührers wurde variiert, um die gewünschte Tropfengröße zu erreichen. Für kleinere Tropfengrößen wurden die Emulsionen mit dem Rotor-Stator-System emulgiert. Die Geschwindigkeit wurde auch hier variiert, um Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen zu erhalten.

Die Proben wurden bei 30 °C im Brutschrank gelagert. Die Keimzahlkonzentration wurde wie vorher beschrieben (Kap. 4.2.2.2) bestimmt.

#### 4.4.3 Herstellung und Untersuchung von mit Mikroorganismen versetzten Biliquid Foams

Zur Herstellung eines Biliquid Foams wurde zuerst eine W/O-Emulsion, wie zuvor beschrieben, hergestellt. Die Emulsion wurde durch Zentrifugieren (Rotanta 460, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen) bei 17595 g, 10 °C und verschiedenen Zeiten aufkonzentriert. Es wurden sechs Proben einer Emulsion in 50 ml Gefäßen zentrifugiert. Eine Probe wurde zur Bestimmung des Wassergehalts verwendet. Der Wassergehalt wurde mittels der Karl-Fischer-Titration (701 KF Titrino, Metrohm AG, Herisau, Schweiz) mit den Reagenzien HYDRANAL-Titrant 2 E, und HYDRANAL-Solvent E (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze) bestimmt. Das Prinzip basiert auf der Reaktion von Wasser mit Iod. Die Reaktion folgt in zwei Schritten [Scholz, 1983]:



In der dargestellten Reaktion steht B für eine Base und R für einen Alkylrest.

Der Wassergehalt lässt sich durch das benötigte Iod berechnen.

Eine zweite Probe wurde zur Keimzahlbestimmung verwendet. Die restlichen Proben wurden bei 30 °C gelagert und zur Keimzahlbestimmung in Abhängigkeit der Lagerungszeit benutzt.

Zur Keimzahlbestimmung wurde die Probe zuerst gewogen. Der Überstand wurde verworfen und das Anfangsgewicht wurde mit Ringerlösung wieder eingestellt. Die Probe wurde mit dem Rotor-Stator-System ( $u = 12 \text{ m/s}$ ,  $t = 2 \text{ min}$ ) homogenisiert, verdünnt und ausplattiert.

#### 4.5 Untersuchung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen

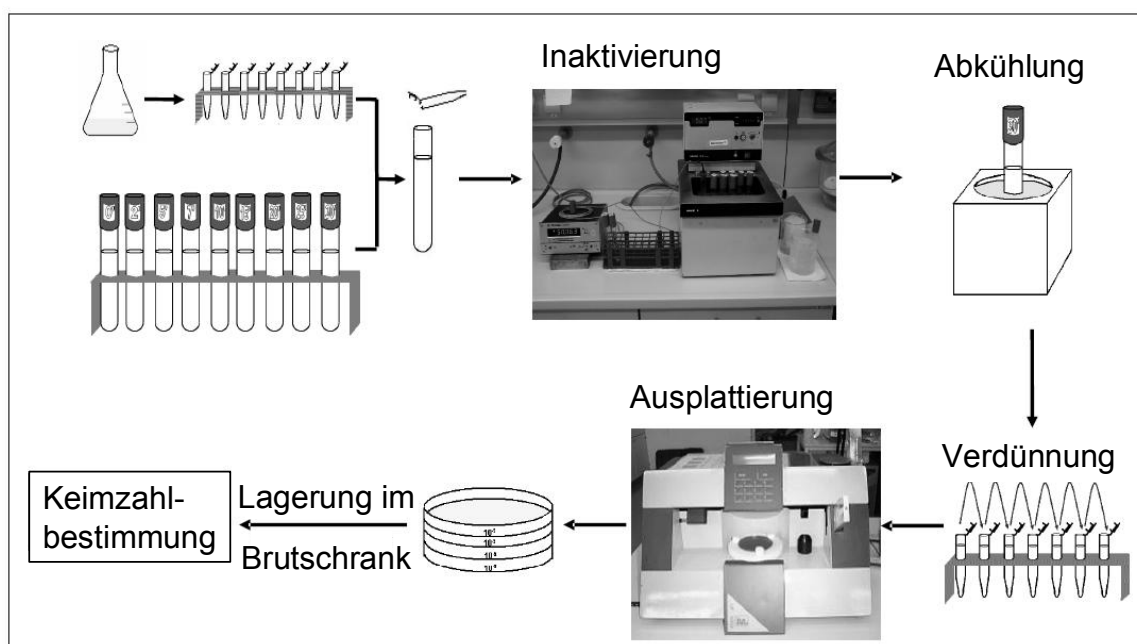
Die Versuche zur Wärmebehandlung von Mikroorganismen wurden prinzipiell nach *Pardey, 2007* durchgeführt (Abb. 4.5).

Prinzipiell wurde die thermische Inaktivierung in Reagenzgläsern (150 mm lang, 16 mm Innendurchmesser) in einem thermostatisierten Wasserbad (N2 digital, Haake Technik GmbH, Vreden) durchgeführt. Es wurde ein Reagenzglas für jeden zu untersuchenden Probenahmezeitpunkt eingesetzt. Jedes Reagenzglas wurde mit 9 g Medium (Ringerlösung, Öl oder Emulsion) aufgefüllt und in das Wasserbad eingebracht. In einem Reagenzglas, das 10 g des zu untersuchenden Mediums enthält, taucht eine externe Messelektrode ein, mit der die Temperatur während des

gesamten Versuchs gemessen wird. Somit kann die Einhaltung einer konstanten Temperatur über die Versuchsdauer kontrolliert werden.

Ein Inaktivierungsexperiment wurde durch Zugabe von 1 g Bakterien-suspension im vorgeheizten Medium (9 g) gestartet. Die Bakterien-suspension wurde hergestellt, indem die Mikroorganismen zuerst im Nährmedium bis zur stationären Phase kultiviert wurden und dann die Pelletts durch Zentrifugieren und Resuspendieren in Ringerlösung gebracht wurden (Kap. 4.3.1.2). Bei dieser Methode darf nicht zu viel Zeit zwischen der Zugabe der Bakteriensuspension, dem Mischen und Zurückstellen der Suspension ins Wasserbad vergehen. Andererseits kann die Temperatur unter die Solltemperatur sinken.

Zur Senkung der Aufheizzeit für die Isothermeninaktivierung können 0,1 g der Bakteriensuspension in 9,9 g Medium anstatt 1 g in 9 g zugegeben werden [Pardey, 2007].



**Abb. 4.5:** Schema des Inaktivierungsversuchs nach *Pardey, 2007*. Je nach Inaktivierungsversuch wurde die Methode von *Pardey, 2007* angepasst.

#### 4.5.1 Untersuchung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in reinen öligen und wässrigen Phasen

#### 4.5.2 Inaktivierung in der wässrigen Phase

Die Untersuchung der Mikroorganismeninaktivierung in der wässrigen Phase erfolgt entsprechend der Methode nach *Pardey, 2007*.

Da ein Einfluss der Wachstumstemperatur auf die Inaktivierungsergebnisse besteht [Pardey, 2007], wurde die Temperatur zum Wachstum von *E. coli* K12 auf 30 °C festgelegt.

#### 4.5.3 Inaktivierung in der öligen Phase

Zur Inaktivierung in der öligen Phase wurden die Mikroorganismen zuerst getrocknet, um in die ölige Phase eingebracht zu werden (siehe Abschnitt 4.3.1.3).

Das Inaktivierungsverfahren wurde ähnlich wie bei der Inaktivierung in der wässrigen Phase untersucht, mit dem Unterschied, dass das Reagenzglas zu Beginn mit 9 g Pflanzenöl gefüllt und im Wasserbad erwärmt wurde bis sich die gewünschte Inaktivierungstemperatur eingestellt hat. Im Anschluss wurde 1 g mit Mikroorganismen versetztes Öl in das Reagenzglas eingegeben und der Inaktivierungsversuch gestartet.

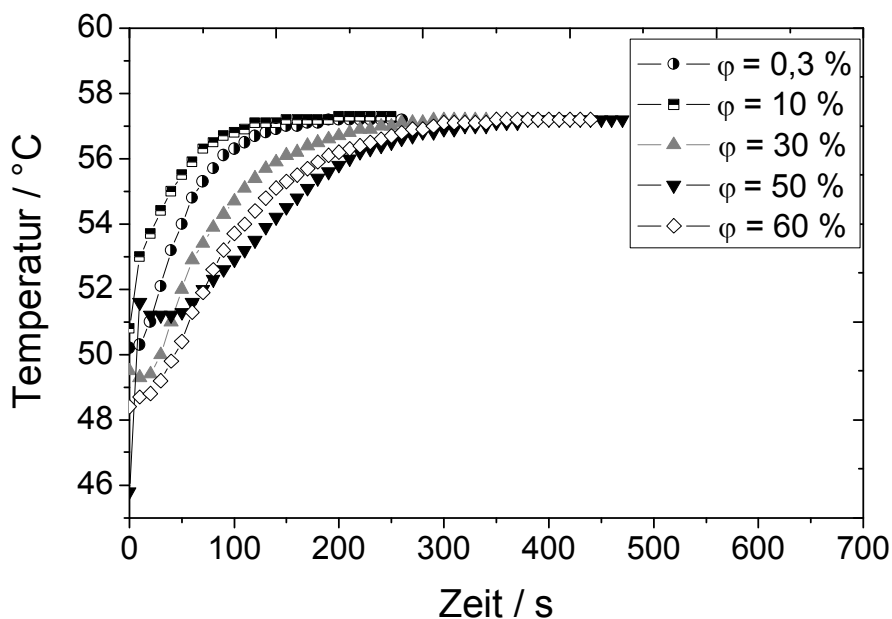
#### 4.5.4 Untersuchung zur Inaktivierung von Mikroorganismen in den kontinuierlichen Phasen von O/W-Emulsionen

Der Verlauf der Inaktivierungstemperatur für Emulsion wurde ermittelt. Dies ist insbesondere wichtig, wenn man den Dispersphasenanteil der Emulsion variiert. Wegen der unterschiedlichen Wärmeleitfähigkeit zwischen Wasser und Öl ( $0,6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  bzw.  $0,1 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) ist die Aufheizzeit vom Dispersphasenanteil abhängig. In Abb. 4.6 ist der Temperaturverlauf für Emulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen nach Zugabe von 1 g Ringerlösung in 9 g vorgewärmte Emulsion bei einer Inaktivierungstemperatur von 57 °C dargestellt.

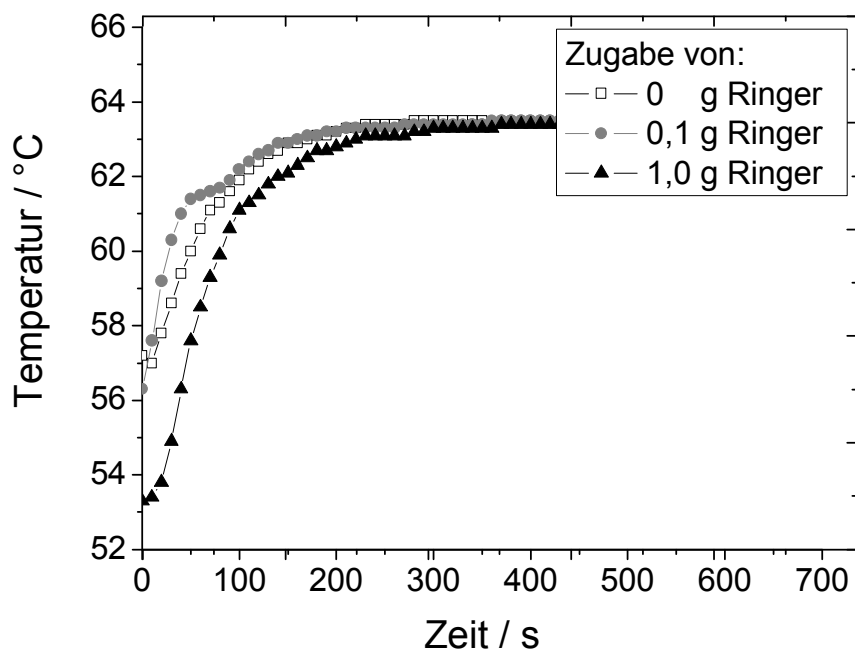
Es ist zu erkennen, dass die gewünschte Temperatur nach ca. 2 min für Emulsionen mit 0,3 und 10 % Dispersphasenanteil erreicht wird. Für Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil nach ca. 4 min und für Emulsionen mit Dispersphasenanteilen von 50 und 60 % nach ca. 5 min. Betrachtet man die Kurven in Abb. 4.6 genauer, erkennt man die Ungenauigkeit dieser Methode (Kurve der Emulsion mit 50 % Dispersphasenanteil liegt unter der Kurve der Emulsion mit 60 %; gleiches gilt für die Kurven der Emulsionen mit 0,3 % und 10 % Dispersphasenanteil). Dies liegt wahrscheinlich an der Entnahme der Reagenzgläser aus dem Wasserbad zur Probenzugabe.

In einem zweiten Diagramm (Abb. 4.7) ist der Temperaturverlauf unter dem Einfluss der zugegebenen Menge an Ringerlösung und der Methode (Reagenzglas aus dem Wasserbad nehmen, rühren und zurückstellen) für eine Inaktivierungstemperatur von 63 °C dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur durch das Herausnehmen und Zurückstellen des Reagenzglases aus bzw. in das Wasserbad 2 min vergehen, bis die Flüssigkeit wieder

63 °C erreicht. Die Aufwärmungszeit durch Zugabe von 0,1 g in 9,9 g anstatt 1 g in 9 g Flüssigkeit wurde dadurch etwas reduziert.



**Abb. 4.6:** Temperaturverlauf von Emulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen in Abhängigkeit der Erwärmungszeit.



**Abb. 4.7:** Verlauf der Temperatur einer Emulsion nach der Zurückgabe des Reagenzglases in das Wasserbad und nach Zugabe von 0 g, 0,1 g und 1 g Ringerlösung.

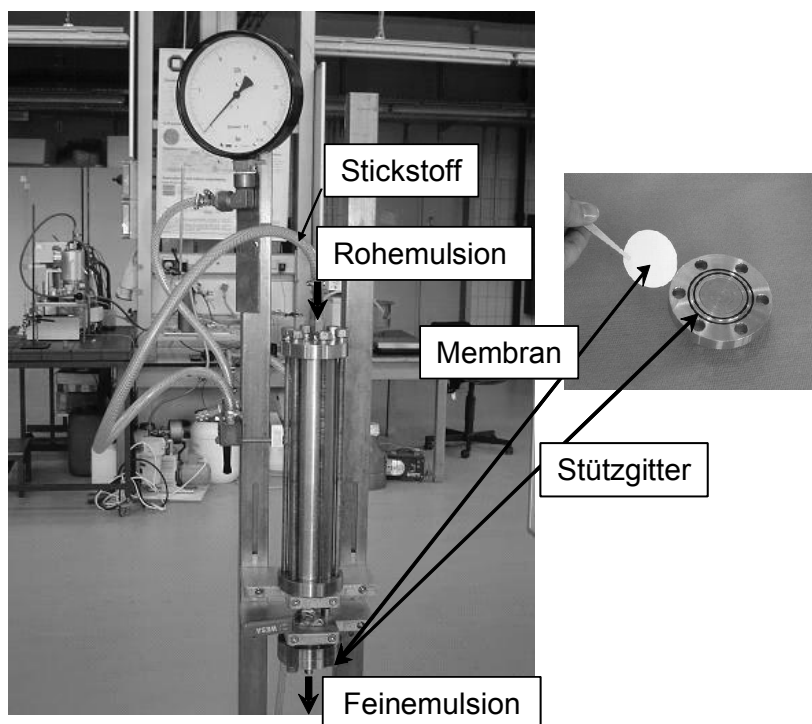
Schlussfolgernd wurde die Methode von Pardey für einige Versuche modifiziert, indem die Bakteriensuspension in die Reagenzgläser zugegeben und gemischt wurde, ohne sie aus dem Wasserbad herauszunehmen.

#### 4.6 Untersuchung zum Herstellen von sterilen Emulsionen durch Premix-Membranemulgieren

Die Anlage zum Premix-Membranemulgieren wurde nach dem Prinzip von *Suzuki et al., 1998* (Abb. 4.8) am Institut aufgebaut. Die Konstruktionszeichnungen befinden sich in Anhang A3.

Beim Premix-Verfahren wird eine zuvor hergestellte Rohemulsion durch die Poren einer Flachmembran mittels Stickstoff gepresst.

Da nur wenig über dieses Thema in der Literatur berichtet wurde, wird in dieser Arbeit der Einfluss einiger Prozessparameter zusätzlich untersucht.



**Abb. 4.8:** Aufbau der Premix-Membrananlage.

##### 4.6.1 Membranen

Das Premix-Membranemulgieren sollte nicht nur zum Emulgieren dienen, sondern auch, durch gleichzeitiges Abtrennen vorhandener, insbesondere pathogener Mikroorganismen, sterile Emulsionen liefern. Daher wurden insbesondere Membranen mit mittlerer Porengröße von  $0,45 \mu\text{m}$  und  $0,2 \mu\text{m}$  untersucht.



Unter verschiedenen untersuchten hydrophilen Filtermembranen hat sich die Polyamid-Membran (Whatman, Intl. Ltd., Maidstone, England) als die zum Emulgieren am Besten geeignete erwiesen. Diese Membran ist in drei mittleren Porengrößen, 0,8  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$  und 0,2  $\mu\text{m}$ , verfügbar. Außer diesen Membranen wurden zur Herstellung von O/W-Emulsionen für Inaktivierungsversuche zusätzlich Membranen mit mittlerer Porengröße von 10  $\mu\text{m}$  (Pall GmbH, Dreieich) eingesetzt.

Die Eigenschaften der Membranen nach den Angaben der Hersteller sind in Tab. 4-5 zusammengestellt.

**Tab. 4-5:** Eingesetzte Membranen und ihre Eigenschaften

Mittlere Porengröße $d_p / \mu\text{m}$	Material	Lieferant	Dicke $\mu\text{m}$
0,2	Polyamid (hydrophil)	Whatman, Intl. Ltd., Maidstone, England	150 - 187,5
0,45			150 - 187,5
0,8			137,5 - 200
10	Polypropylen	Pall GmbH Dreieich, Deutschland	127

#### 4.6.2 Herstellung von Modellemulsionen zur Untersuchung des Premix-Membranemulgierens

Zum Charakterisieren des Premix-Membranemulgierens wurden hauptsächlich O/W-Emulsionen mit Pflanzenöl als Dispersphase und demineralisiertes Wasser mit Tween 80 als Emulgator verwendet. Premix-Emulsionen (Rohemulsionen) mit Tropfengrößen von ca. 25  $\mu\text{m}$  wurden mittels eines Propellerrührers (Umfangsgeschwindigkeit  $u = 1,5 \text{ m/s}$ , Zeitdauer  $t = 3 \text{ min}$ ) hergestellt. Premix-Emulsionen mit Tropfengrößen von ca. 10  $\mu\text{m}$  wurden durch Rühren mit einem Propellerrührer ( $u = 1,5 \text{ m/s}$ ,  $t = 3 \text{ min}$ ) und einer anschließenden Behandlung mit einem Rotor-Stator-System (Ultra-Turrax<sup>®</sup>,  $u = 8,5 \text{ m/s}$ ,  $t = 7 \text{ min}$ ) produziert.

Wie bereits erwähnt, sind für das Herstellen von parenteralen Emulsionen spezielle Pflanzenöle sowie spezielle Emulgatoren erforderlich. Für die hier gewählten Modellemulsionen wurde der Emulgator Soja-Lezithin S75 in einer Konzentration von 1,2 % eingesetzt. Das Lezithin wurde in der öligen Phase der Emulsion (Sojaöl 700) bei 60 °C unter Rühren gelöst. Die wässrige Phase bestand aus bidestilliertem Wasser mit 2,2 % Glycerin. Die ölige Phase wurde zunächst in die wässrige Phase mit Hilfe eines

Propellerrührers ( $u = 1,5 \text{ m/s}$ ,  $t = 3 \text{ min}$ ) dispergiert und anschließend mit einem Rotor-Stator-System (Ultra-Turrax®,  $u = 8,5 \text{ m/s}$ ,  $t = 7 \text{ min}$ ) behandelt. Diese Rohemulsion hatte einen Sauterdurchmesser von ca.  $x_{1,2} = 15 \text{ }\mu\text{m}$ . Sie wurde anschließend mit dem Premix-Verfahren weiter behandelt.

#### 4.6.3 Ermittlung des Prozessfluxes

Der Volumenstrom des Prozesses wurde gemessen, indem das Volumen des Produktes mit einem Messzylinder und die Zeit ermittelt wurden. Der Flux wurde als Volumenstrom des Prozesses pro beanspruchter Membranfläche ( $J = \text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) bezeichnet. Die hier verwendeten Membranen besitzen einen Durchmesser von 47 mm und eine effektive Fläche von  $9,62 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ .

Um die Durchlässigkeit zu ermitteln, wurde Wasser unter verschiedenen Druckdifferenzen (bis 12 bar) durch die Membranen gepresst.

#### 4.6.4 Untersuchung der physikalischen Stabilität

Zur Untersuchung der physikalischen Stabilität wurden die Emulsionen bei Raumtemperatur, bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Es wurden Proben über die Lagerungszeit genommen und ihre Tropfengrößenverteilung durch Weitwinkel-Laserlichtbeugungsspektrometer Coulter LS 230 (siehe Kapitel 4.2.1) ermittelt. Erfahrungsgemäß reicht es für eine Aussage über die physikalische Stabilität aus, wenn die Emulsion einen Monat lang bei  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wird. Zeigt die Emulsion während dieser Zeit keine Zeichen von Phasentrennung und gibt es keine Veränderung der Tropfengrößenverteilung, kann die Emulsion als stabil angesehen werden.

#### 4.6.5 Untersuchung der mikrobiologischen Stabilität

Mittels des Premix-Membranverfahrens werden Mikroorganismen ähnlich wie beim Sterilfiltrieren abgetrennt. Die Güte dieser Trennung wird durch den Anteil der jeweils abgetrennten Keime festgelegt. Als Keime wurden *E. coli* K12 und *M. luteus* eingesetzt.

*E. coli* K12 wurde in LB-Medium und *M. luteus* in Nutrient-Medium bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Die Mikroorganismen wurden zentrifugiert und in Ringerlösung resuspendiert. Die Mikroorganismen-Suspension wurde in die kontinuierliche Phase der Emulsion eingegeben. Die Keimzahlkonzentration wurde vor und nach der Filtration mit dem Plattenverfahren bestimmt.

Für die Messung der Größenverteilung der Mikroorganismen wurde ebenfalls das Weitwinkel-Laserlichtbeugungsspektrometer Coulter LS 230

---

verwendet. Zur Verdünnung der Proben diente Ringerlösung. Für die Auswertung dieser Messungen ist der Brechungsindex des untersuchten Materials erforderlich, der von *Bateman et al., 1965* mit 1,401 übernommen wurde.



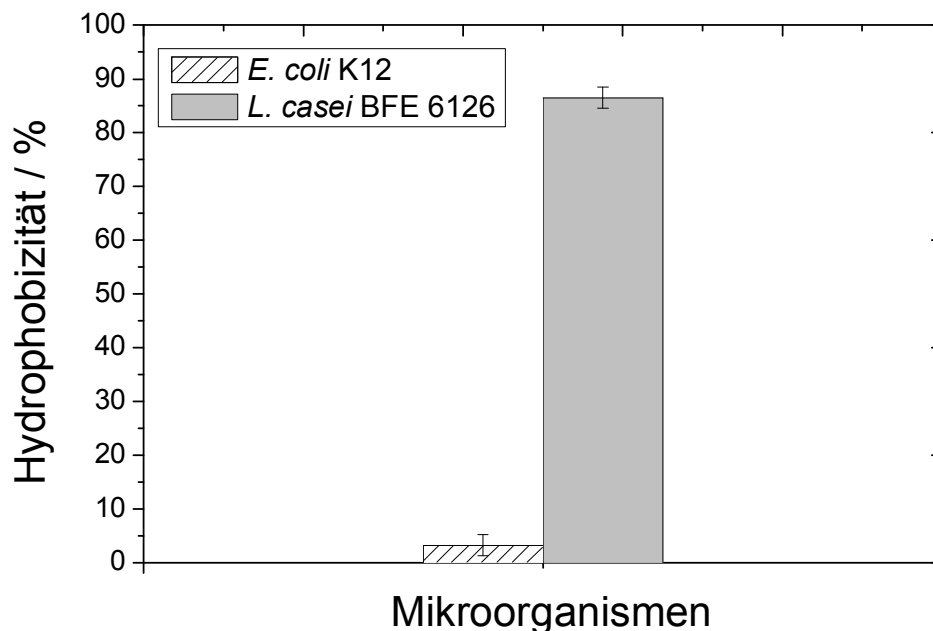
## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

#### 5.1.1 Ergebnisse des MATH-Tests

Zur Charakterisierung der Mikroorganismen bezüglich ihrer Hydrophobizität wurde in dieser Arbeit der MATH-Test benutzt. Der Test basiert auf der Mischung einer Mikroorganismensuspension (in Ringerlösung) mit einer hydrophoben Phase (n-Hexadecan). Die optische Dichte der wässrigen Phase wurde vor der Mischung und nach der Phasentrennung gemessen.

Das Ergebnis des MATH-Tests wird auch als „Hydrophobizität“ von Mikroorganismen bezeichnet. Sie wurde als Anteil (%) der Mikroorganismen in der öligen Phase dargestellt. Die Testmethode muss mit Vorsicht eingesetzt werden, da die wässrige Phase und die ölige Phase vollständig getrennt werden müssen. Ansonsten würden die Öltröpfchen im Wasser die optische Dichte erhöhen und die Ergebnisse verfälschen. Daher wurde die Hydrophobizität 3-fach bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.1 dargestellt.



**Abb. 5.1:** Hydrophobizität der Mikroorganismen nach der MATH-Methode.

Nach dem MATH-Test ist *Escherichia coli* K12 sehr hydrophil und *Lactobacillus* BFE 6126 hydrophob. Die Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an.

Die Hydrophobizitäten von anderen probiotischen Mikroorganismen befinden sich in Anhang A4.

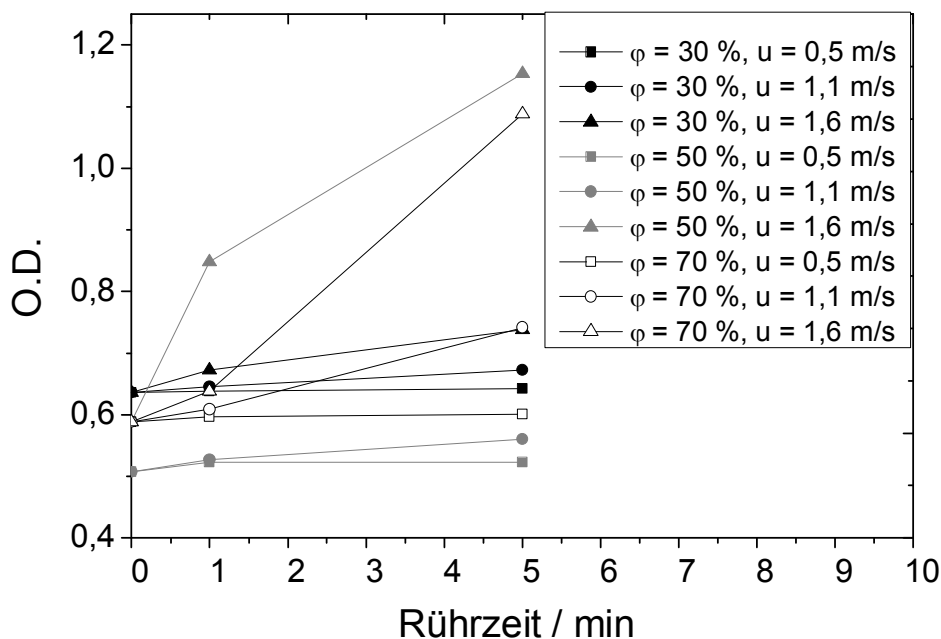
### 5.1.2 Verteilung von Mikroorganismen in den Phasen während des Emulgierverlaufs

Für diese Untersuchung wurden die Mikroorganismensuspensionen wie für den MATH-Test vorbereitet: Bis zur stationären Phase kultiviert, zentrifugiert und in Ringerlösung bis zu einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 0,6 resuspendiert.

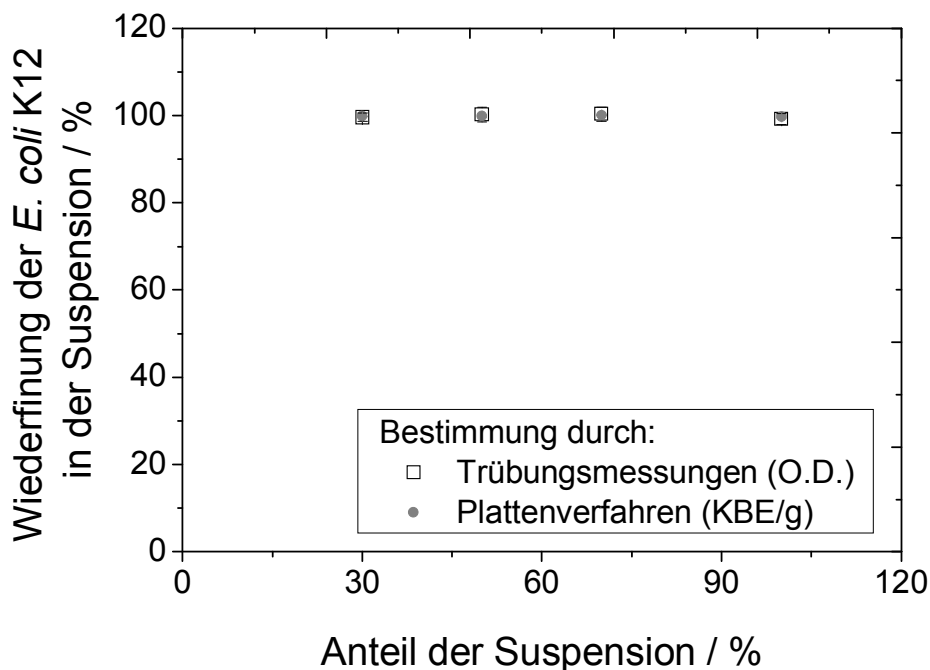
Um zu vermeiden, dass die Mikroorganismen den Becher und Rührer verkleben, wurde für *E. coli* K12 PTFE als Material gewählt. Für *L. casei* 6126 wurden Becher aus Glas und Rührer aus Metall benutzt. Das Verhältnis zwischen Durchmesser des Bechers und Durchmesser des Rührers  $D/d$  betrug 0,5.

Zuerst wurde *E. coli* K12 untersucht. Die Suspension wurde in verschiedenen Konzentrationen (in Gewicht %), 30 %, 50 % und 70 %, in Pflanzenöl dispergiert. Die Umfangsgeschwindigkeit  $u$  des Rührers wurde zwischen 0,5 m/s und 1,6 m/s variiert. Es wurden Proben von der wässrigen Phase nach 1 und 5 min Rühren gezogen. Vor jede Probenahme wurde die Mischung 15 min stehen gelassen, um die Phase zu trennen. Abb. 5.2 zeigt den Verlauf der optischen Dichte der Suspension (wässrige Phase) über die Mischungszeit. Es ist zu sehen, dass unabhängig vom Dispersphasenanteil und der Mischungszeit keine Abnahme der Konzentration der Mikroorganismen in der Suspension stattgefunden hat. Stattdessen wurde, insbesondere für die höheren Rührgeschwindigkeiten, eine Erhöhung der O.D. beobachtet. Dies kann nur durch die Bildung einer Emulsion (keine vollständige Trennung der Phase) erklärt werden. Als Folgerung wurde für weitere Versuche die Rührerumfangsgeschwindigkeit auf 0,5 m/s festgelegt.

Abb. 5.3 zeigt die Wiederfindung der *E. coli* K12 in Suspensionen nach der Mischung mit Pflanzenöl ( $N/N_0$  bzw.  $O.D._E/O.D._K$  in %) in Abhängigkeit des Anteils der Suspension. Mit den untersuchten Bedingungen blieb die Wiederfindung von *E. coli* K12 in der wässrigen Phase der Mischung unabhängig vom Anteil der Suspension.



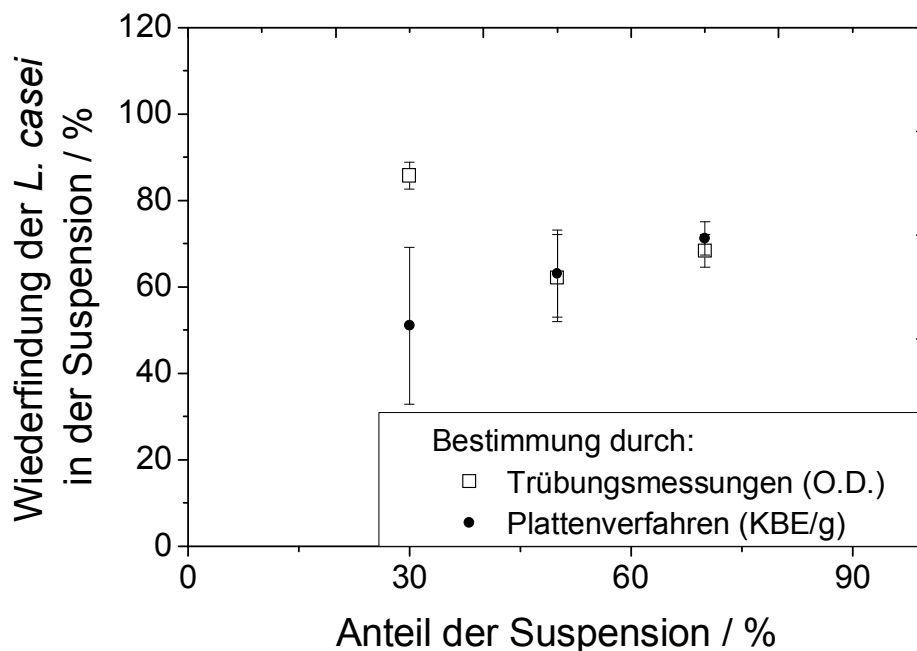
**Abb. 5.2:** Verlauf der O.D. der Suspensionen in einer Suspension/Pflanzenöl-Mischung in Abhängigkeit der Rührzeit bei verschiedenen Umfangsgeschwindigkeiten des Rührers und verschiedenen Konzentrationen der Suspension.



**Abb. 5.3:** Wiederfindung von *E. coli* K12 in der Suspension nach der Mischung mit Pflanzenöl in Abhängigkeit des Suspensionsanteils bei konstanter Rührzeit und Umfangsgeschwindigkeit.

Der gleiche Versuch wurde für *L. casei* BFE 6126 durchgeführt (Abb. 5.4). In diesem Fall gelangte ein Großteil der Mikroorganismen ins Öl. Bei der Bestimmung über die O.D. variierte der Wert der Wiederfindung zwischen 87 % und 62 %. Eine klare Tendenz zur Wiederfindung in Abhängigkeit des Anteils der Suspension wurde jedoch nicht festgestellt. Über die Bestimmung mittels Plattenverfahren variierten die Werte zwischen 51 % und 70 % mit folgender Tendenz: Je höher der Suspensionsanteil, desto höher der Wiederfindungswert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nur Mikroorganismen mit hydrophoben Eigenschaften vom Wasser ins Öl gelangen können.



**Abb. 5.4:** Wiederfindung von *L. casei* BFE 6126 in der Suspension nach der Mischung mit Pflanzenöl in Abhängigkeit der Konzentration der Suspension.

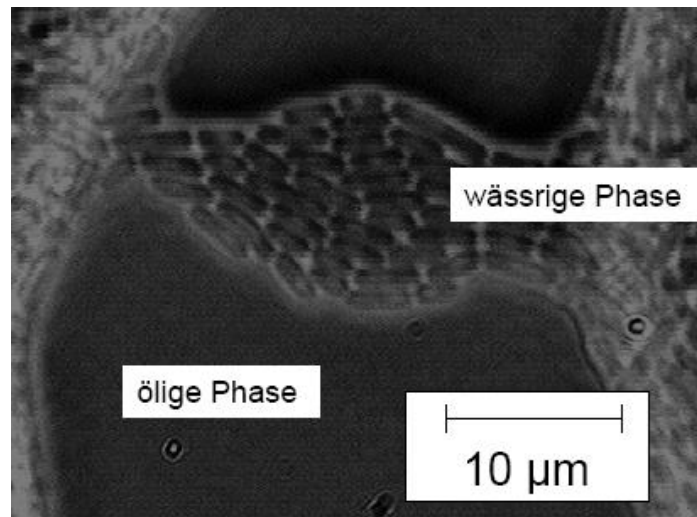
### 5.1.3 Mikroorganismen an der Tropfengrenzfläche

Um das Verhältnis der Mikroorganismen an der Tropfengrenzfläche zu untersuchen, wurden die Mikroorganismen in Nährmedium kultiviert. Die Suspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert ( $z = 12718$  g,  $t = 10$  min). Ein Tropfen dieses konzentrierten Mediums wurde auf einen Objektträger neben einem Pflanzenöltropfen aufgetragen.

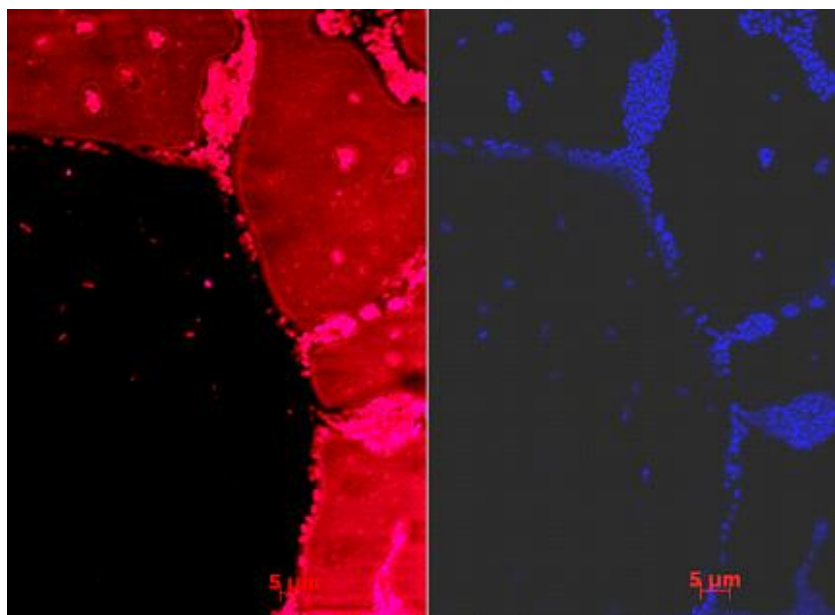
In Abb. 5.5 ist ein lichtmikroskopisches Bild von *E. coli* K12 zu sehen. Vermutlich sind die *E. coli* K12 durch Konvektionsströmung zusammen gekommen. Trotzdem haben sie die wässrige Phase nicht verlassen. Das Bild stimmt mit dem Ergebnis des MATH-Test überein, indem gezeigt wurde, dass *E. coli* K12 sehr hydrophil ist.



Ein sehr ähnliches Bild konnte mit dem Fluoreszenzmikroskop (ApoTome Z1, Zeiss) aufgenommen werden. Abb. 5.6 zeigt zwei Bilder der gleichen Aufnahme unter Verwendung unterschiedlicher Filter. Auf der linken Seite ist die Aufnahme mit dem Filter CY5 zu sehen, wodurch die Farbe Nile Red (Öl) gezeigt wird. Im Schwarz erkennt man die wässrige Phase. Für die rechte Aufnahme in Abb. 5.6 wurde ein DAPI-Filter verwendet, wodurch nur die mit DAPI gefärbten Mikroorganismen dargestellt werden. Auch auf diesem Bild ist zu erkennen, dass sich die Mikroorganismen in der wässrigen Phase befinden.

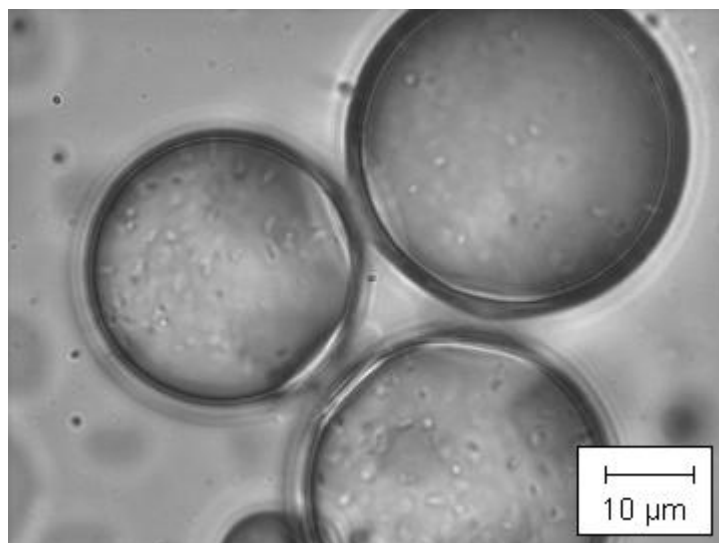


**Abb. 5.5:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12 in der wässrigen Phase.



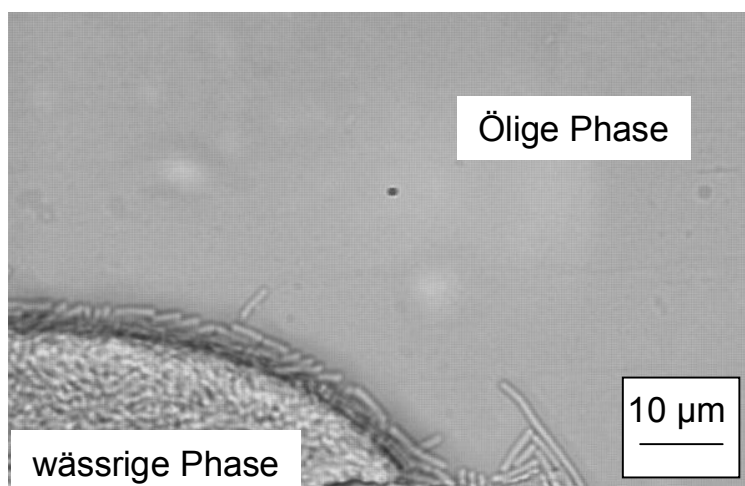
**Abb. 5.6:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12 in der wässrigen Phase. Links: Wasser (schwarz), Öl (rot), Mikroorganismen (hellrot). Rechts: Wasser (schwarz), Öl (schwarz), Mikroorganismen (blau).

Das Gleiche beobachtet man, wenn sich die *E. coli* K12 in den Tropfen einer W/O-Emulsion befinden. Sie tendieren dazu, im Tropfen zu bleiben (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12 in Tropfen einer W/O-Emulsion.

Im Gegenteil zu *E. coli* K12 können die *L. casei* BFE 6126 aufgrund ihrer Hydrophobizität in die ölige Phase gelangen (Abb. 5.8). Dieses Verhalten kann durch den Druck zwischen Objektträger und Deckelglas verstärkt werden.



**Abb. 5.8:** Mikroskopische Aufnahme von *L. casei* BFE 6126 an der Tropfengrenzfläche (Wasser in Öl).

#### 5.1.4 Zusammenfassung zur Verteilung von Mikroorganismen in Emulsionen

Die Ergebnisse des MATH-Tests zeigen, dass *E. coli* K12 mit einer Hydrophobizität von  $5 \pm 3$  % sehr hydrophil ist, während *L. casei* BFE 6126 mit  $86 \pm 2$  % sehr hydrophob ist. Das Ergebnis von *E. coli* K12 stimmt mit denen aus der Literatur überein [Rosenberg et al., 1980]. Für *L. casei* BFE 6126 stehen keine Daten aus der Literatur zur Verfügung, es ist jedoch bekannt, dass probiotische Mikroorganismen eine hohe Hydrophobizität besitzen können [van der Mei et al., 1980].

Zur Untersuchung der Verteilung der Mikroorganismen während des Emulgierens wurden die Mischversuche der Mikroorganismensuspension mit Pflanzenöl durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Geschwindigkeit des Rührers auf maximal  $u = 0,5$  m/s eingesetzt werden durfte. Bei zu hohen Rührergeschwindigkeiten ist keine vollständige Trennung der Phase mehr möglich. Auch diese Untersuchungen bestätigten die niedrige Hydrophobizität von *E. coli* K12. Unabhängig des Anteils der Suspension blieben die Mikroorganismen vollständig in der wässrigen Phase. Hingegen gelangten bei den Mischversuchen der Ringerlösung mit *L. casei* BFE 6126 und Pflanzenöl bis zur Hälfte der Mikroorganismen ins Öl.

Die mikroskopischen Untersuchungen bestätigten die diskutierten Ergebnisse.

Können hydrophobe Mikroorganismen ins Öl gelangen, sind zwei wichtige Fragen zur mikrobiologischen Stabilität der Emulsionen zu klären:

- 1) Können die Mikroorganismen in Öl wachsen?
- 2) Haben Mikroorganismen eine höhere Hitzeresistenz, wenn sie sich in Öl befinden?

Die Antworten dieser Fragen werden in Kap. 5.2.1.2 bzw. Kap. 5.3.1 diskutiert.



## 5.2 Mikrobiologische Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend kleiner Tropfen

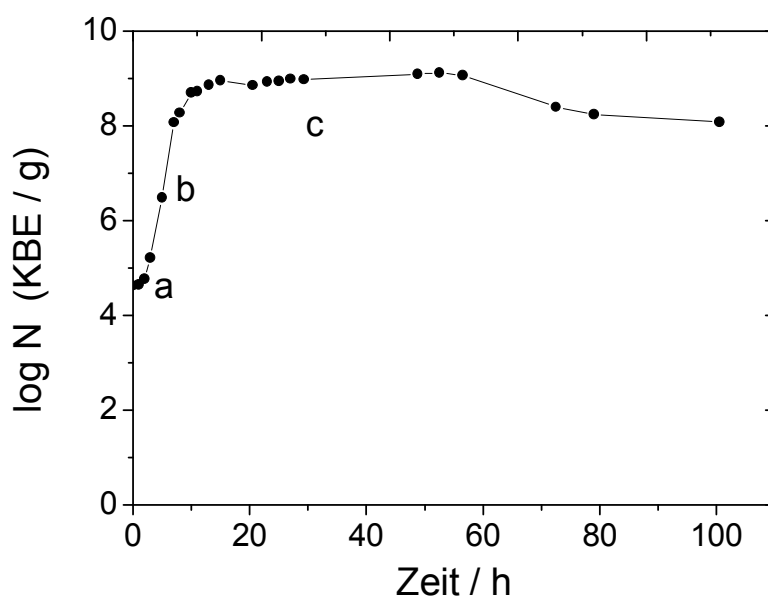
### 5.2.1 Wachstum von Mikroorganismen in den einzelnen Phasen einer Emulsion

#### 5.2.1.1 Wachstum von *E. coli* K12 in LB-Medium

In diesem Teil der Arbeit wurde insbesondere das Wachstum von *E. coli* K12 erforscht, da dieser Mikroorganismus zur Untersuchung des Wachstums in W/O-Emulsionen eingesetzt wurde. Neben *E. coli* K12 wurde für *L. casei* BFE 6126 überprüft, ob das Wachstum von hydrophoben Mikroorganismen in Öl möglich ist.

Bevor das LB-Medium zur Kultivierung von *E. coli* K12 eingesetzt wurde, wurde ein synthetisches Medium getestet. Das Medium wurde aber gewechselt, da in diesem Medium die Mikroorganismen eine lange Zeit benötigen, um sich an die neue Umgebung anzupassen. Zudem zeigten die Untersuchungen, dass die Zeit, die bis zum Erreichen der lag-Phase nötig ist, nicht reproduzierbar ist (s. Anhang A5).

Die Wachstumskurve der *E. coli* K12 in LB-Medium im Erlenmeyerkolben wurde unter idealen Bedingungen (Schüttelfrequenz 250 rpm, T = 37 °C) aufgenommen. Dazu wurde die Konzentration der Mikroorganismen in der Suspension über die Kultivierungszeit durch Ausplattieren bestimmt (Abb. 5.9). Die Kurve ist eine typische Wachstumskurve für Batch Prozesse. Man kann zwischen der lag-Phase (a), der exponentiellen (b) und stationären Wachstumsphase (c) unterscheiden.



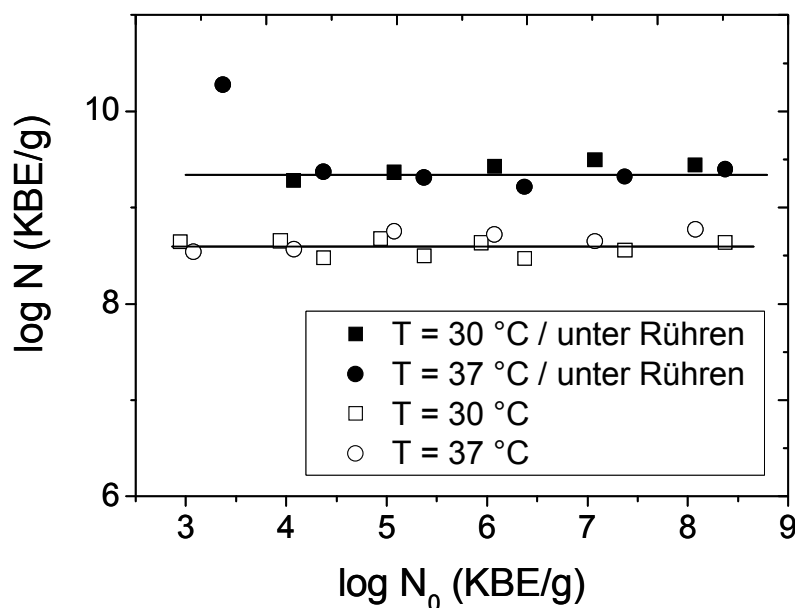
**Abb. 5.9:** Wachstumskurve von *E. coli* K12 in LB-Medium unter idealen Bedingungen (Schüttelfrequenz 250 rpm, T = 37 °C) im Kolben.

Unter den untersuchten Bedingungen kann sich *E. coli* K12 schnell an das LB-Medium anpassen und zeigt eine sehr kurze lag-Phase. Die exponentielle Wachstumsphase beginnt ca. 2 Stunden nach der Bebrütung und ist nach ca. 12 Stunden Kultivierung beendet.

Die maximale Keimkonzentration entspricht der Konzentration der Mikroorganismen, wenn sie sich in der stationären Phase befinden. Bei *E. coli* K12 liegt die maximale Keimkonzentration unter idealen Bedingungen bei ca.  $2 \cdot 10^9$  KBE/g.

In weiteren Untersuchungen zur maximalen Keimzahl wurde *E. coli* K12 unter idealen Bedingungen bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert, die Pellets wurden durch Zentrifugation abgetrennt und in neues LB-Medium eingebracht. Die Anfangskeimzahl wurde durch Verdünnung hergestellt und 100 g der Suspension wurden in einen Kolben eingegeben. Der Kolben wurde für 24 h unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert: 30 °C oder 37 °C, mit (250 rpm) oder ohne Inkubationsschüttler.

Die Anfangskeimzahl (bei der Bebrütung) zeigte keinen Einfluss auf die maximale Keimzahl (Abb. 5.10). Weiterhin war die maximale Keimzahl unabhängig von der Wachstumstemperatur (zwischen 30 °C und 37 °C) (Abb. 5.10). Einen Einfluss auf das Wachstum zeigte die Vermischung. Dies konnte beobachtet werden, indem die Mikroorganismen mit (250 rpm) oder ohne Inkubationsschüttler kultiviert wurden (Abb. 5.10). Bei der Kultivierung ohne Schüttler erreicht die Keimzahl einen maximalen Wert von  $4 \cdot 10^8$  KBE/g im Vergleich zu  $2 \cdot 10^9$  KBE/g mit Schüttler.

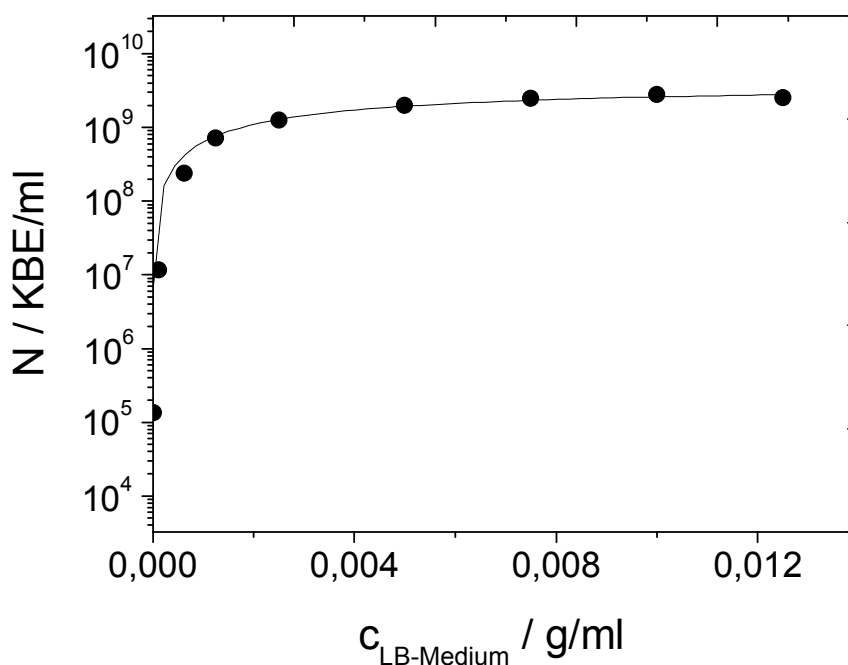


**Abb. 5.10:** Maximale Konzentrationswerte von *E. coli* K12 bei der Kultivierung bei 30 °C und 37 °C, mit (250 rpm) oder ohne Inkubationsschüttler.

### Einfluss der Konzentration des LB-Mediums auf das Wachstum

Bei der Zusammensetzung des LB-Mediums ist die Menge des Kohlenstoffs bzw. der Nährsubstrate nicht bekannt. Deswegen wurde ein Versuch durchgeführt, um die Abhängigkeit der Keimzahl auf die Substratkonzentration ( $g_{\text{LB-Medium}}/l$ ) zu untersuchen. Außerdem sollte bei diesem Versuch die minimale Konzentration von LB-Medium für das maximale Wachstum ( $2 \cdot 10^9$  KBE/g) bestimmt werden.

Die Substratlimitierung in wässrigen Systemen wurde ermittelt, indem *E. coli* K12 in Erlenmeyerkolben mit LB-Medium mit verschiedener Konzentration bis zur stationären Phase kultiviert wurde (Abb. 5.11). Die Konzentration des LB-Mediums wurde zwischen 0 und 0,0125 g/ml variiert. Die normale Konzentration des LB-Mediums betrug 0,025 g/ml (25 g/l).

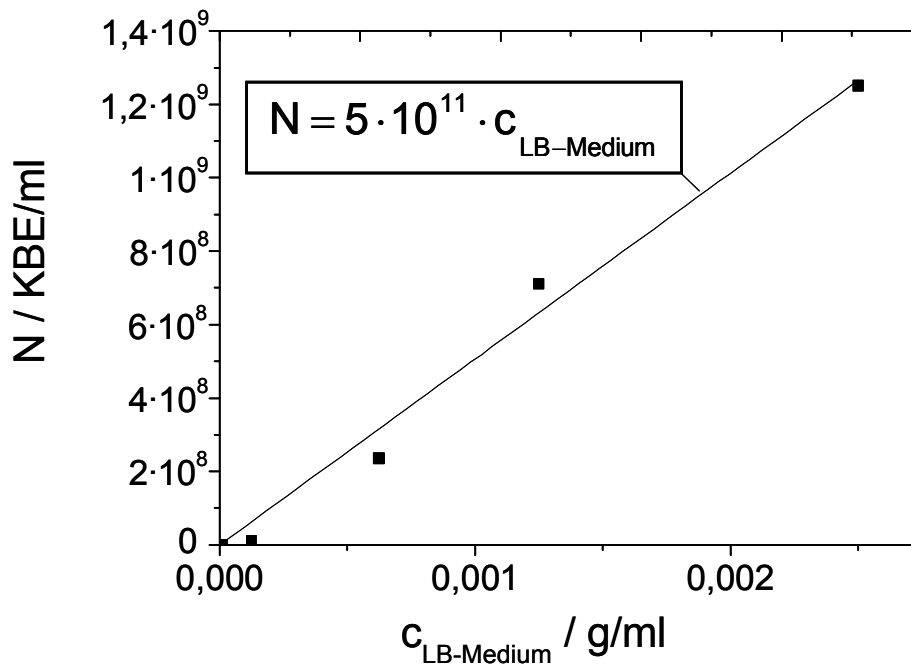


**Abb. 5.11:** Maximale Konzentrationswerte von *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Konzentration des LB-Mediums.

Die Konzentration von Mikroorganismen steigt mit Erhöhung der Konzentration des Mediums. Im LB-Medium mit Konzentrationen unter ca. 0,0025 g/ml ist das Wachstum limitiert. Für Konzentration über 0,0025 g/ml gibt es kaum einen Einfluss der Mediumskonzentration auf das maximale Wachstum. Dies bedeutet, dass in diesem Fall das Wachstum aus einem anderen Grund limitiert wird.

Betrachtet man den linearen Bereich der Kurve (Abb. 5.11) bei niedrigen Konzentrationen (Abb. 5.12), erhält man über die Steigung der Kurve den Ertragskoeffizienten (Gl. 2.6) bzw. die Zahl der Mikroorganismen pro

Volumen,  $N$  / KBE/ml, als Funktion der Substratkonzentration  $c_{\text{LB-Medium}}$  / g/ml.



**Abb. 5.12:** Maximale Konzentrationswerte von *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Konzentration des LB-Mediums.

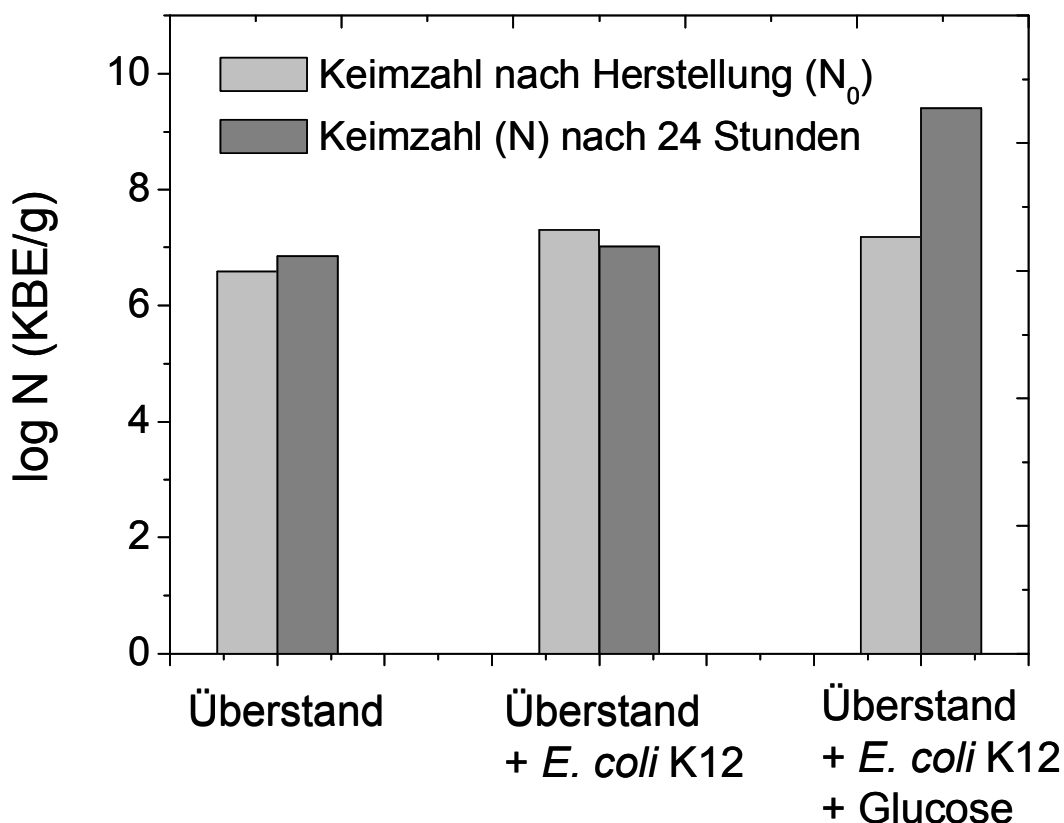
Nach der in Abb. 5.12 genannten Gleichung wird zum Wachstum eines Mikroorganismus  $2 \cdot 10^{-12}$  g LB-Medium benötigt. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Masse eines Mikroorganismus.

Weitere Versuche wurden nach *Siegele et. al, 1993* durchgeführt, um zu klären, ob die Mikroorganismen aus Kohlenstoffmangel verhungern und ob eine Hemmung des Wachstums durch die Anwesenheit von giftigen Metaboliten vorliegt. *E. coli* K12 wurde dazu in LB-Medium (25 g/l) bis zur stationären Phase kultiviert. Die Suspension wurde zentrifugiert ( $z = 12718$  g,  $t = 10$  min) und der Überstand für weitere Versuche eingesetzt.

Zuerst wurde die Keimzahlkonzentration des Überstandes bestimmt. Danach wurde das Medium in drei Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Im ersten Erlenmeyerkolben befand sich nur der Überstand. Die beiden anderen wurden zusätzlich mit *E. coli* K12 versetzt. Im zweiten wurde kein zusätzliches Substrat zugegeben, hingegen wurde im dritten Kolben Glucose mit einer Konzentration von 2,5 g/l hinzugefügt. Die drei Erlenmeyerkolben wurden unter idealen Bedingungen im Schüttler platziert. Die Keimzahlkonzentration der Medien wurde nach ca. 24 Stunden Kultivierung bestimmt.



Im ersten Kolben (mit reinem Überstand) wurde nach dem Zentrifugieren eine Konzentration von ca.  $\log N = 6,5$  (KBE/g) gemessen (Abb. 5.13). Die Keimzahlkonzentration hat sich nach 24 h unter idealen Bedingungen also kaum geändert. Das Gleiche kann man für den Überstand mit zusätzlichen *E. coli* K12 sagen. Nur in der Probe, die zusätzlich mit *E. coli* K12 und mit Glucose versetzt wurde, konnte eine Erhöhung der Keimzahlkonzentration beobachtet werden. Die Konzentration in dieser Probe ist nach 24 Stunden um ca. 2 Zehner-Potenzen gestiegen und lag bei ca.  $\log N = 9,3$  (KBE/g).



**Abb. 5.13:** Keimzahlkonzentration nach der Herstellung und nach 24 h Kultivieren des Überstands von LB-Medium, des Überstands mit zusätzlich *E. coli* K12 und des Überstands mit zusätzlich *E. coli* K12 und Glucose.

Nur im Medium mit zusätzlicher Glucose hat weiteres Wachstum stattgefunden. Daher sind zwei Schlussfolgerungen möglich:

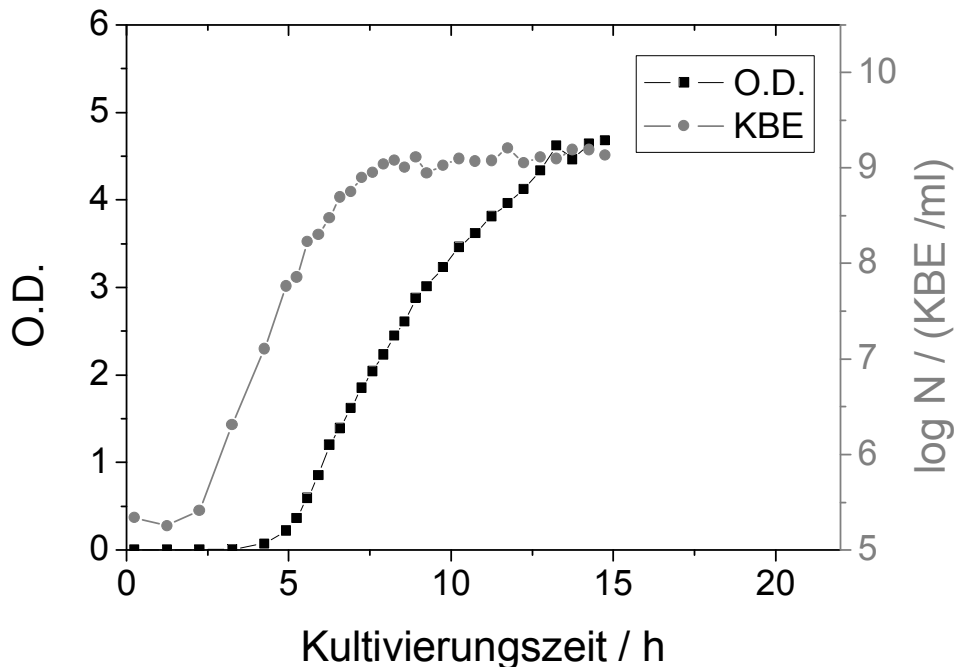
- 1) Im Überstand gab es keinen Nährstoff, der das Wachstum der neu bebrüteten Mikroorganismen ermöglichen könnte. Auch wenn das Medium Substrat einen Überschuss haben sollte (25 g/l).
- 2) Während des Wachstums wurden keine Nebenprodukte oder Metaboliten gebildet, die das Wachstum inhibierten. So können die

bebrüteten Bakterien mit zusätzlichem Substrat (im diesem Fall Glucose) wachsen.

### Korrelationen zwischen koloniebildenden Einheiten (KBE) und optischer Dichte (O.D.) zur Bestimmung der Keimzahl

Zur Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in Emulsionen während der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Mikroorganismen zuerst in einem Nährmedium bis zum Anfang der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und dann die Mikroorganismensuspension in der öligen Phase dispergiert. Mittels Plattenverfahren (Bestimmung der KBE/ml) ist es nur möglich, die Keimzahl nach ausreichender Inkubationszeit der Platte (ca. 17 Stunden) zu bestimmen. Deswegen wurde in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen KBE und O.D. ermittelt (Abb. 5.14).

Die Keimzahl wurde mittels Plattenverfahren (KBE/ml) und Photometrie (O.D.) während 15 Stunden Wachstum von *E. coli* K12 im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) bestimmt. Die Kurven verlaufen im Bereich des exponentiellen Wachstums nahezu parallel. Daher ist es möglich, die Konzentration der Mikroorganismen durch die Photometrie zu bestimmen.

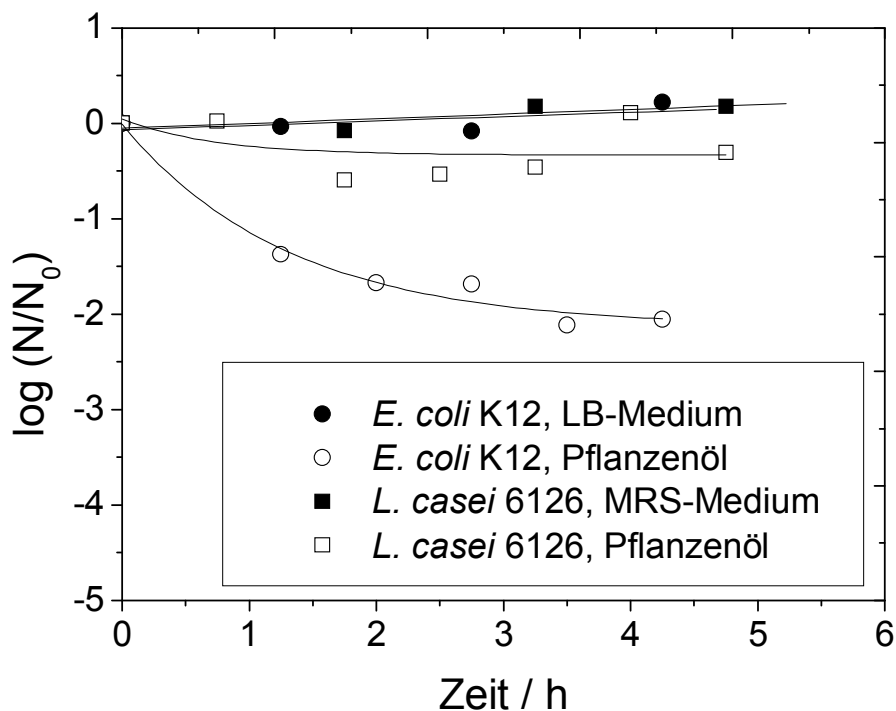


**Abb. 5.14:** Ermittlung des Wachstums von *E. coli* K12 mittels Ausplattieren (KBE/ml) und optischer Dichte (O.D.). Die Kurven verlaufen im exponentiellen Wachstumsbereich annähernd parallel.

## 5.2.1.2 Wachstum von Mikroorganismen in Pflanzenöl

Um das Wachstum in Pflanzenöl zu untersuchen, mussten die Mikroorganismen zuerst ins wasserfreie Öl eingebracht werden. Dazu wurden die Mikroorganismen im LB-Medium kultiviert. Die Suspension wurde bei 11500 g für 10 min zentrifugiert. Die dadurch erhaltenen Mikroorganismen-Pellets wurden in einem Ethanolbad bei -40 °C gefroren und anschließend in einer Gefriertrocknungsanlage bei 0,2 mbar und ca. 7 Stunden getrocknet. Die getrockneten Mikroorganismen wurden bei -18 °C gelagert. Zur Untersuchung des Wachstums der Mikroorganismen in Öl wurden 0,2 g der Mikroorganismen in 20 g Pflanzenöl gemischt und anschließend mit einem Rührer der Art Ultra-Turrax ( $u = 10 \text{ m/s}$ ,  $t = 30 \text{ s}$ ) dispergiert. Neben *E. coli* K12 wurde auch *L. casei* BFE 6126 wegen seiner hohen Hydrophobizität untersucht.

In Abb. 5.15 ist die relative Keimzahlreduktion der Mikroorganismen in Öl und im LB- bzw. MRS-Medium in Abhängigkeit der Lagerungszeit bei 30 °C dargestellt. Sowohl die Konzentration von *E. coli* K12 als auch die Konzentration von *L. casei* BFE 6126 sinken im Öl innerhalb weniger Stunden. Nach 24 Stunden war die Konzentration nicht mehr nachweisbar. In Nährmedium ist während dieser Zeit die Konzentration für beide Mikroorganismen nur leicht angestiegen. Dies lag wahrscheinlich daran, dass sich die Mikroorganismen noch in der lag-Phase befanden.



**Abb. 5.15:** Keimzahlreduktion von *E. coli* K12 und *L. casei* BFE 6126 in Pflanzenöl bei 30 °C.

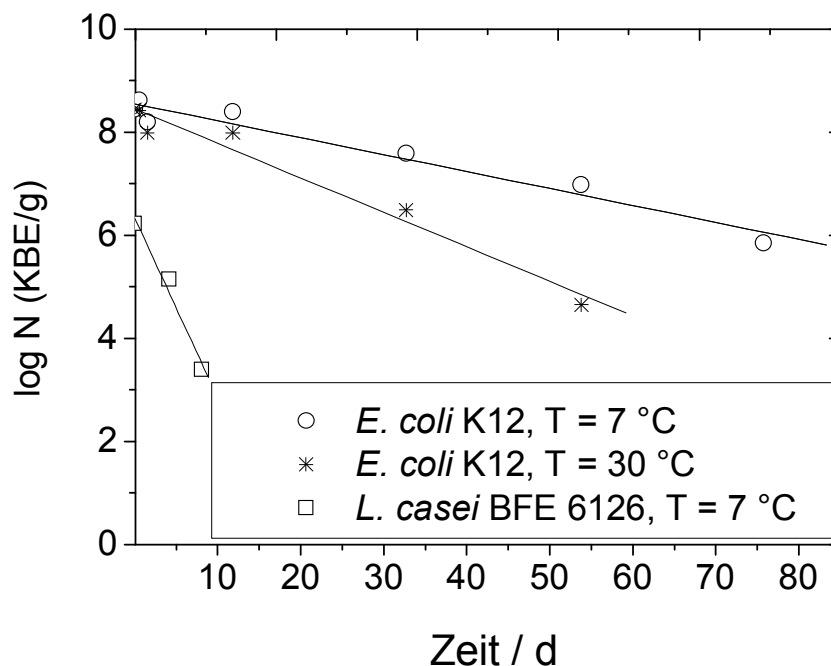
Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Mikroorganismen im Öl nicht vermehren können.

Die Ergebnisse stimmen mit denen von *Schadbolt et al., 1999* überein. Sie haben gezeigt, dass je niedriger die Wasseraktivität des Mediums ist, desto höher ist die Absterberate von *E. coli* M23 OR.H-.

Eine weitere mögliche Ursache für die hohe Absterberate von *E. coli* K12 kann eine Beschädigung der Mikroorganismen durch den Trocknungsprozess sein. Andererseits können sie im wässrigen Medium wieder hydratisieren und somit für eine längere Zeit lebensfähig bleiben. Um eine Beschädigung der Mikroorganismen auszuschließen, wurde der Versuch geändert, indem die Pellet-Suspension als disperse Phase einer W/O-Emulsion eingesetzt wurde. Es wurde 50 g Suspension in 50 g Öl dispergiert. Die Emulsion wurde dann mit der gleichen Methode gefriergetrocknet.

Die Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* K12 nach der Trocknung einige Tage überleben können (Abb. 5.16). Bei niedriger Temperatur ( $T = 7\text{ °C}$ ) ist die Reduktionsgeschwindigkeit niedriger als bei einer höheren Lagerungstemperaturen ( $T = 30\text{ °C}$ ).

Es zeigte sich auch, dass *L. casei* BFE 6126 im Vergleich zu *E. coli* K12 empfindlicher ist. Nach einer Lagerung von 10 Tagen bei  $7\text{ °C}$  war die Keimzahl um etwa 3-Zehner-Potenzen reduziert. Bei  $30\text{ °C}$  konnte bereits bei der zweiten Probenahme nach ca. 4 Tagen die Keimzahl nicht mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 5.16:** Keimzahlreduktion von *E. coli* K12 und *L. casei* BFE 6126 in Öl nach der Gefrier Trocknung in Form einer W/O-Emulsion und Lagerungsbedingungen bei  $7\text{ °C}$  und  $30\text{ °C}$ .

### 5.2.2 Modellberechnung zur Beschreibung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen

Es gibt drei wichtige Faktoren, die das Wachstum von Mikroorganismen im Tropfen auf Grund der räumlichen Struktur limitieren können:

- Platzmangel (räumliche Begrenzung) in einem Tropfen
- Substratmangel in einem Tropfen
- Maximale Zelldichte

Weitere Faktoren wie das Auscheiden wachstumshemmender Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit vernachlässigt.

#### 5.2.2.1 Berechnung der maximalen Keimzahl bezüglich des Tropfenvolumens

Die maximale Keimkonzentration bezüglich des Volumens der Tropfen wurde nach Gleichung Gl. 5.1 berechnet. Der Berechnung liegen die folgenden Voraussetzungen zugrunde:

- Maximal anfänglich 1 MO pro Tropfen
- MO bleiben in den Tropfen
- Emulsion ist monodispers
- Mikroorganismen werden als gleich große Kugeln betrachtet, die in dichtester Kugelpackung (Porosität  $\varepsilon = 0,26$ ) vorliegen.

$$N = (1 - \varepsilon) \cdot \frac{V_T}{V_{MO}} \cdot T_{MO} = 0,74 \cdot \frac{V_T}{V_{MO}} \cdot T_{MO} \quad (5.1)$$

In Gl. 5.1 ist  $N$  die maximale Keimkonzentration,  $V_T$  das Volumen eines Tropfens und  $V_{MO}$  das Volumen eines Mikroorganismus.  $T_{MO}$  ist die Anzahl der Tropfen pro Volumen der dispersen Phase, die anfänglich mit einem Mikroorganismus belegt sind.

Ist die Anzahl von Mikroorganismen  $N_0$  kleiner als die Anzahl der Tropfen, so ist die Anzahl an Tropfen mit einem Mikroorganismus gleich der Anzahl der Mikroorganismen jeweils bezogen auf das Volumen der dispersen Phase (Gl. 5.2):

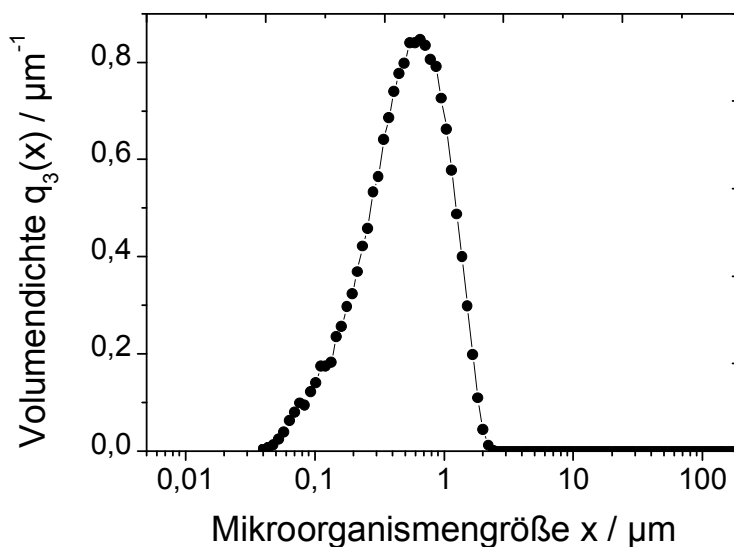
$$T_{MO} = N_0 \quad (5.2)$$

### Volumen von *E. coli* K12 ( $V_{MO}$ )

Die Mikroorganismusgröße wurde mittels des in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Analysengerätes gemessen. Die Mikroorganismen sind bis zur stationären Phase in LB-Medium kultiviert, zentrifugiert und in Ringerlösung wieder resuspendiert. Die Zelle des Laserlichtbeugungsspektrometers wurde mit Ringerlösung gefüllt und die Messung wurde durchgeführt. Die Volumendichteverteilung der Mikroorganismen  $q_3(x)$  ist in Abb. 5.17 dargestellt. Der Kurvenverlauf unterhalb von  $x < 0,5 \mu\text{m}$  ist mit Vorsicht zu betrachten, da einige Voraussetzung wie die Kugelform nicht erfüllt sind.

Bei diesem Verfahren kann man nicht zwischen den verschiedenen Partikelformen unterscheiden. Das heißt, dass das Volumen des Mikroorganismus *E. coli* K12 unter der Annahme einer Kugelform berechnet wurde.

Der erhaltene mittlere Mikroorganismendurchmesser ( $x_{1,3}$ ) ergab einen Wert von  $1,1 \mu\text{m}$ . Das Volumen des Mikroorganismus unter diesen Bedingungen beträgt  $0,7 \mu\text{m}^3$ .



**Abb. 5.17:** Volumendichteverteilung von *E. coli* K12.

Zur Berechnung wurden folgende Werte eingesetzt:

- $V_{MO} = 0,7 \mu\text{m}^3$
- $N_0 = 3,16 \cdot 10^6$  KBE/g ( $\log N_0 = 6,5$ )
- $T_{MO} = N_0 = 3 \cdot 10^6$  Tropfen/ml (für Anzahl der Tropfen pro ml  $T > N_0$ )

Außerdem wurde die Dichte des LB-Mediums für alle Berechnungen mit 1 g/ml angenommen.

Die berechneten maximalen Keimzahlen in Abhängigkeit der Tropfengröße sind in Tab. 5-1 dargestellt. T ist die Anzahl der Tropfen pro ml disperser Phase und  $N_{\max}$  ist die Keimzahl nach dem Mikroorganismenwachstum.

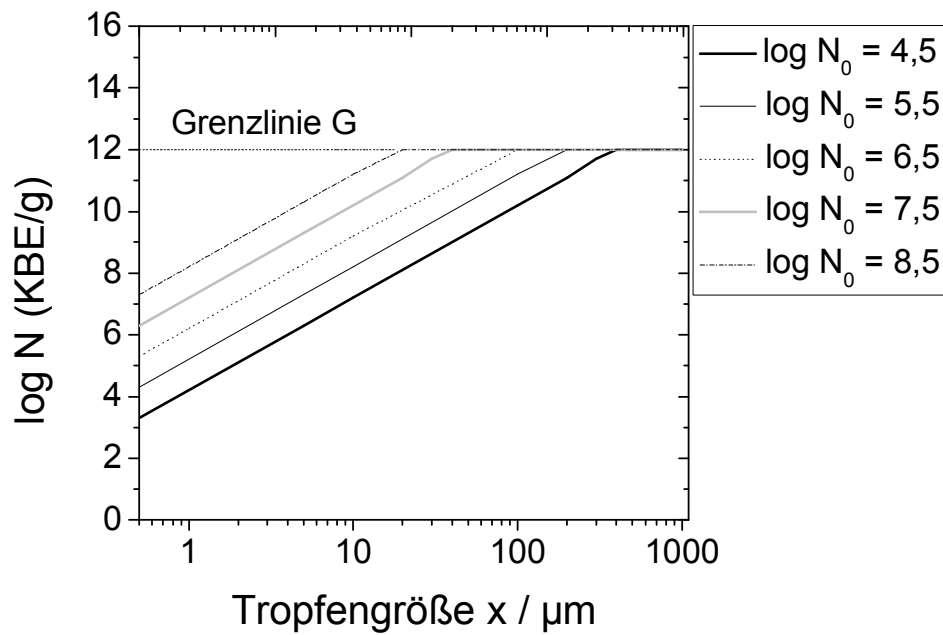
**Tab. 5-1:** Maximale Keimzahlen bezüglich des Tropfenvolumens

x μm	$V_T$ μm <sup>3</sup>	T/ml -	$T_{MO}/ml$ -	$N_{\max}/\text{Tropfen}$ KBE	N KBE/g	log N (KBE/g)
1000	$5,2 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^{3*}$	$5,54 \cdot 10^8$	$1,06 \cdot 10^{12}$	12,0
100	$5,2 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^{6*}$	$5,54 \cdot 10^5$	$1,06 \cdot 10^{12}$	12,0
50	$6,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^7$	$3,16 \cdot 10^6$	$6,92 \cdot 10^4$	$2,19 \cdot 10^{11}$	11,3
10	$5,2 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^9$	$3,16 \cdot 10^6$	$5,54 \cdot 10^2$	$1,75 \cdot 10^9$	9,2
1	$5,2 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^{12}$	$3,16 \cdot 10^6$	$5,54 \cdot 10^{-1}$	$1,75 \cdot 10^6$	6,2
0,5	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$1,53 \cdot 10^{13}$	$3,16 \cdot 10^6$	$6,92 \cdot 10^{-2}$	$2,19 \cdot 10^5$	5,3

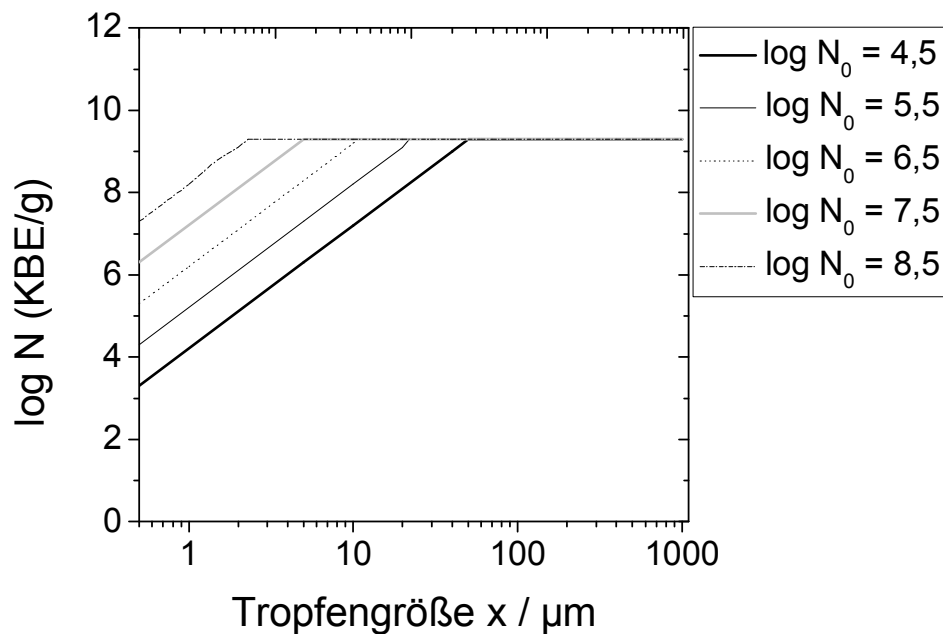
\* In diesen Fällen ist  $T_{MO} = T$ , da  $T < N_0$  ist

Diese Berechnungen wurden für verschiedene Konzentrationen von Mikroorganismen durchgeführt und in Abb. 5.18 in Abhängigkeit der Tropfengröße der Emulsion dargestellt. Die Grenzlinie G limitiert ein weiteres Wachstum dadurch, dass anfänglich jeder Tropfen maximal 1 Mikroorganismus enthält, der solange wächst, bis die Mikroorganismen in dichtester Kugelpackung die Tropfen ausfüllen.

Berücksichtigt man die maximale Zelldichte und nimmt man an, dass dieser Wert gleich dem Wert für wässrige Systeme ist ( $\log N = 9,3$ ), ändert sich das Modell entsprechend Abb. 5.19:



**Abb. 5.18:** Theoretisches Modell für das Wachstum von *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Emulsionstropfengröße. Voraussetzung: keine Substratlimitierung.

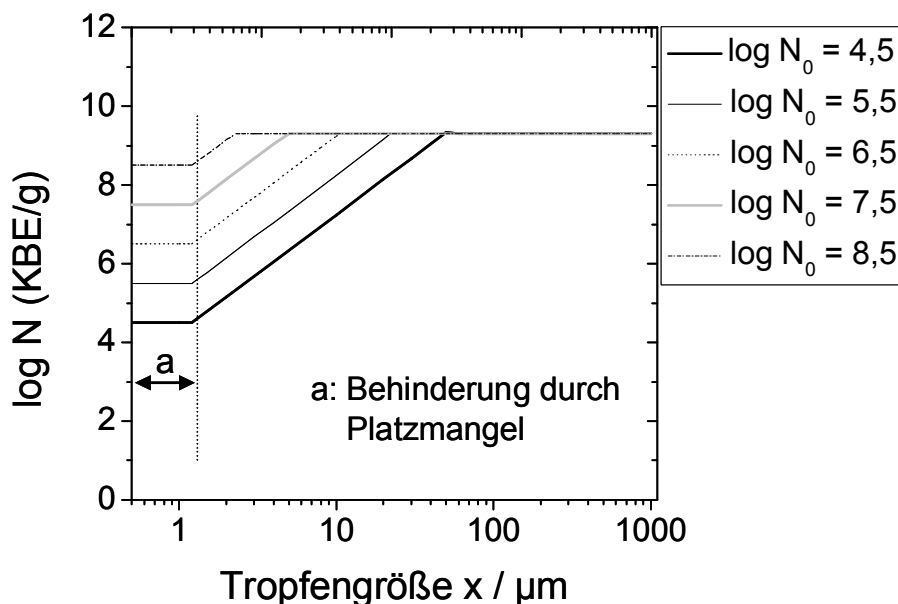


**Abb. 5.19:** Theoretisches Modell für das Wachstum von *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Emulsionstropfengröße unter Berücksichtigung der maximalen Zelldichte. Voraussetzung: keine Substratlimitierung.

Das Modell wurde weiter geändert in der Annahme, dass in Emulsionstropfen mit einem Mikroorganismus und Durchmesser von  $x \leq x_{\text{krit}}$

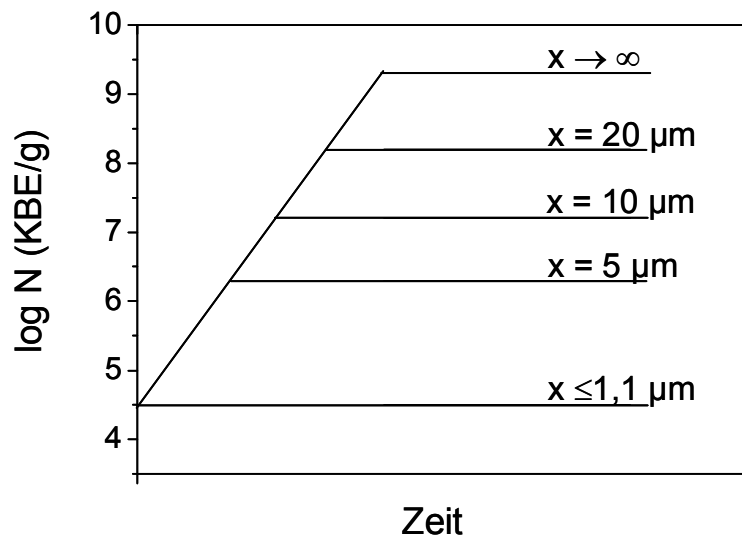


und  $x_{\text{krit}} = x_{1,3}$ , die maximale Keimzahlkonzentration in den Tropfen gleich der Anfangskeimzahl ist (Abb. 5.20):



**Abb. 5.20:** Theoretisches Modell für das Wachstum von *E. coli* K12 in Abhängigkeit der Emulsionstropfengröße unter Berücksichtigung der Behinderung durch Platzmangel (kein Wachstum für  $x < 1,1 \mu\text{m}$ ) und der maximalen Zelldichte. Voraussetzung: keine Substratlimitierung.

Trägt man die Keimzahl der Emulsion über die Lagerungszeit auf, wird eine Wachstumskurve dargestellt. Befinden sich die Mikroorganismen bei der Herstellung der Emulsion in der exponentiellen Wachstumsphase, werden sie bis zum Erreichen der stationären Phase weiter wachsen. Bei konstanter spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  (Gl. 2.5) ist bei gleicher Anfangskeimzahl pro Volumen und sonst gleichen Bedingungen die Wachstumsgeschwindigkeit gleich. Die maximale Keimzahl ist von der Tropfengröße abhängig. Die Wachstumskurven für Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen und einer Anfangskeimzahl von  $\log N_0 = 4,5$  KBE/g ist nach diesem Modell in Abb. 5.21 dargestellt. Wie auch bei den bisherigen Darstellungen wird unterstellt, dass die exponentielle Wachstumsphase direkt in den Bereich mit Nullwachstum übergeht, sodass die Kurven einen Knickpunkt enthalten. Tatsächlich wird wegen der Substratarmut der Kurvenverlauf abgerundet verlaufen. Wegen der ohnehin groben Modellannahmen wird hier auf eine detaillierte Berechnung mittels der Monod-Gleichung verzichtet.



**Abb. 5.21:** Theoretisches Modell für die Wachstumskurven von *E. coli* K12 in Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen. Voraussetzung: keine Substratlimitierung.

#### 5.2.2.2 Berechnung der maximalen Keimzahl unter Berücksichtigung der Substratmenge in einem Tropfen

Nimmt man an, dass sich die maximale Keimzahlkonzentration im Tropfen bezüglich der Substratlimitierung vergleichbar zur maximalen Keimzahlkonzentration in Suspensionen verhält, kann das maximale Wachstum in Emulsionen unter Berücksichtigung ihrer Tropfenvolumen berechnet werden.

In diesem Fall kann die maximale Keimzahl nach Gleichung Gl. 5.3 berechnet werden.

Der Berechnung liegen die folgenden Voraussetzungen zugrunde:

- Maximal 1 MO pro Tropfen
- MO bleiben in den Tropfen
- Emulsion ist monodispers

$$N = \frac{S_T}{S_{MO}} \cdot T_{MO} \quad (5.3)$$

$S_T$  ist die Substratmasse in einem Tropfen und  $S_{MO}$  die Substratmasse, die ein Mikroorganismus benötigt, um zu wachsen. In Abschnitt 5.2.1.1 wurde ermittelt, dass für LB-Medium  $S_{MO} = 2 \cdot 10^{-12}$  g ist.

$S_T$  kann mit Gleichung Gl. 5.4 berechnet werden:

$$S_T = V_T \cdot c_{\text{LB-Medium}} \quad (5.4)$$

Im folgenden Beispiel (Tab. 5-2) wurde die maximale Keimzahl für die nachstehenden Ausgangsparameter berechnet:

- $N_0 = 3,2 \cdot 10^6$  KBE/g ( $\log N_0 = 6,5$ )
- $c_{\text{LB-Medium}} = 25$  g/l

**Tab. 5-2:** Maximale Keimzahlen bezüglich der Substratmenge

$x_{\text{Tropfen}}$ $\mu\text{m}$	$V_T$ $\mu\text{m}^3$	$S_T$ g	N/Tropfen KBE	$T_{M0}/\text{ml}$ -	N/ml KBE/g	log N (KBE/g)
1000	$5,2 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$6,5 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^{10}$	9,3*
100	$5,2 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^{-8}$	$6,5 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^{10}$	9,3*
50	$6,5 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$8,2 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^9$	9,3*
10	$5,2 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^{-11}$	6,5	$3,2 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^7$	7,3
1	$5,2 \cdot 10^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-14}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	6,5**
0,1	$5,2 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-17}$	$6,5 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	6,5**

\* $\log N \leq 9,3$

\*\* $\log N = \log N_0$

Die Zelldichte limitiert das Wachstum auf  $\log N = 9,3$ . Daher wurden alle berechneten Keimzahlwerte größer als 9,3 mit 9,3 ersetzt.

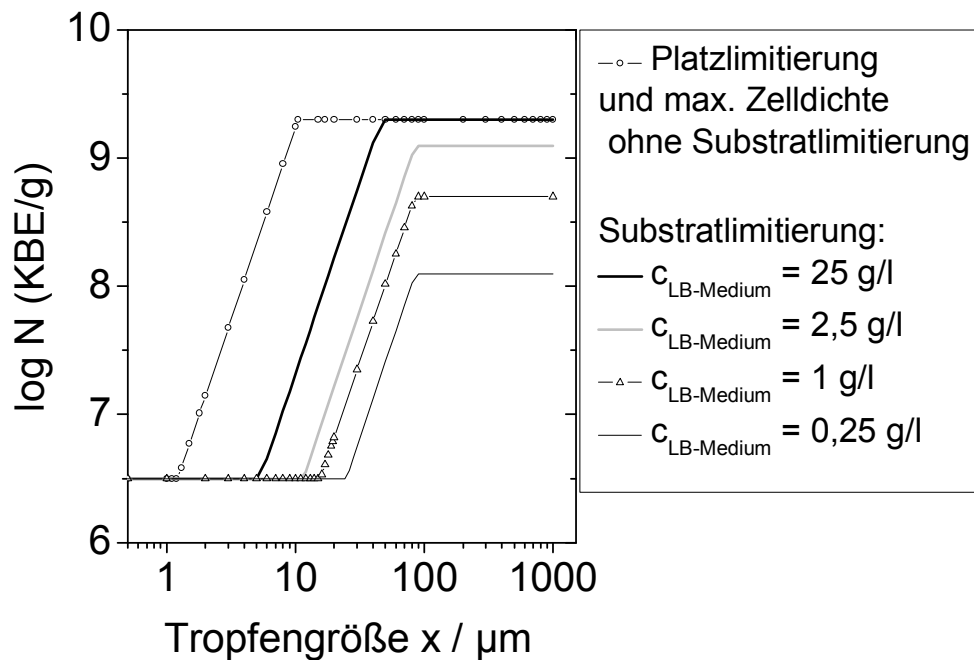
Wenn den Mikroorganismen zu ihrer Vermehrung keine ausreichenden Substrate zur Verfügung stehen, kann die maximale Keimzahl N auch durch die Anfangskeimzahl  $N_0$  ersetzt werden ( $\log N = \log N_0$ ).

Das Diagramm der maximalen Keimzahl in Abhängigkeit der Tropfengröße ist für verschiedene Konzentrationen des LB-Mediums in Abb. 5.22 dargestellt.

Berücksichtigt man in der Modellberechnung die Platz- und Substratlimitierung sowie die maximale Zelldichte, ist zu erkennen, dass das

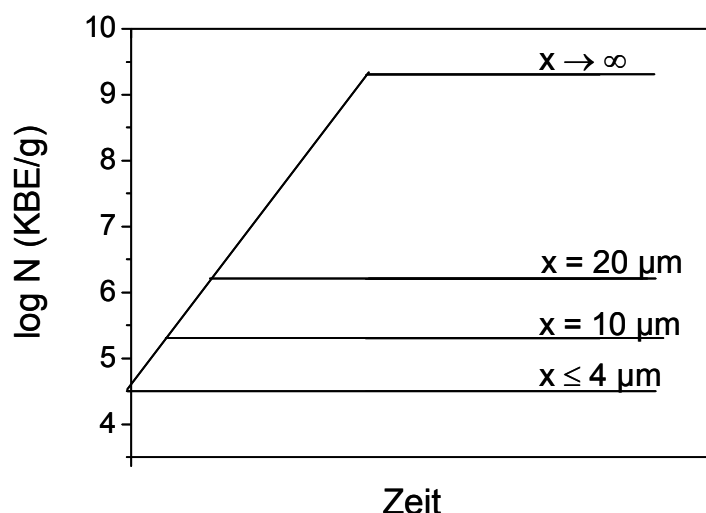
Wachstum bis auf den Fall der höchsten Substratkonzentration und großen Tropfen ( $x > 40 \mu\text{m}$ ) durch die Substratmenge limitiert wird.

Je kleiner die LB-Konzentration ist, desto größer müssen die Tropfen sein, um das Wachstum zu ermöglichen. Aus Abb. 5.22 ist zu erkennen, dass in LB-Medium mit einer Konzentration von 25 g/l die erste Zellteilung erst ab einer Tropfengröße von ca.  $4 \mu\text{m}$  stattfinden kann.



**Abb. 5.22:** Theoretisches Modell für die maximale Keimzahl von *E. coli* K12 in Emulsionen mit LB-Medium und unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Wachstumskurve (vgl. Abb. 5.21) kann ebenfalls für die Substratlimitierung dargestellt werden (Abb. 5.23). Die Anfangskeimzahl wurde auf  $\log N_0 = 4,5 \text{ KBE/g}$  gesetzt.



**Abb. 5.23:** Theoretisches Modell für die Wachstumskurven von *E. coli* K12 in Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen und Substratlimitierung.

Zusammenfassend sind nach dem hier verwendeten Modell für das untersuchte System folgende Ergebnisse zu erwarten:

- Das Wachstum wird im Wesentlichen durch die Substratmenge limitiert.
- Für das LB-Medium mit einer Konzentration von 25 g/l gilt:
  - $x \leq 4 \mu\text{m} \rightarrow \log N = \log N_0$
  - $x > 4 \mu\text{m} \rightarrow \log N_0 \leq \log N \leq 9,3$ ; dabei hängt  $\log N$  von der Tropfengröße und der Anfangskeimzahl ab.
  - $x \rightarrow \infty \rightarrow \log N = 9,3$ ; Limitierung durch die maximale Zelldichte.

### 5.2.3 Experimentelle Untersuchung des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen

#### 5.2.3.1 Vorversuche

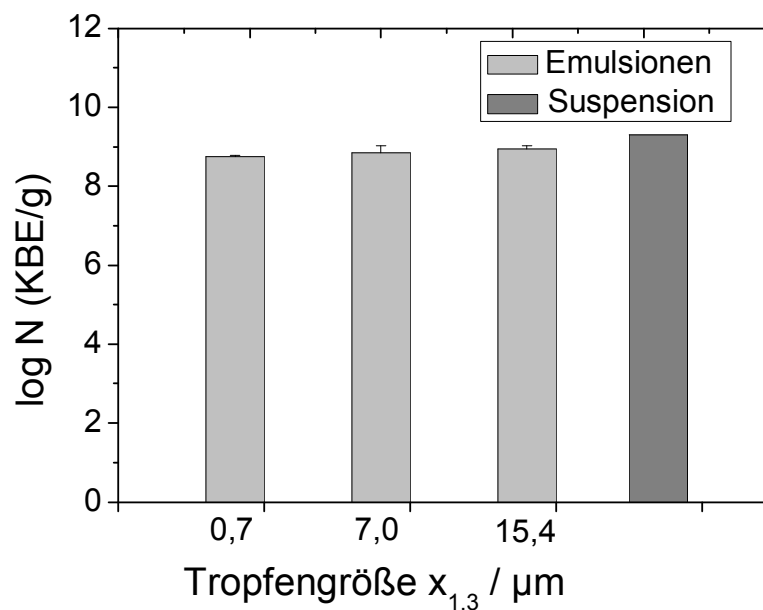
##### Keimzahlbestimmung in W/O-Emulsionen

Aus den untersuchten Methoden zur Bestimmung der Keimzahl in W/O-Emulsionen hat sich die Methode von *DiLiello, 1982* bzw. *Pichhardt, 1998* als geeignet erwiesen (siehe Kap. 4.2.2.2). Bevor weitere Versuche durchgeführt wurden, wurde diese Methode für Emulsionen mit verschiedenen mittleren Tropfengrößen überprüft. Dazu wurde zuerst *E. coli* K12 in LB-Medium bis zur stationären Phase kultiviert. Die Keimkonzentration in dieser Suspension wurde bestimmt. Mit dieser

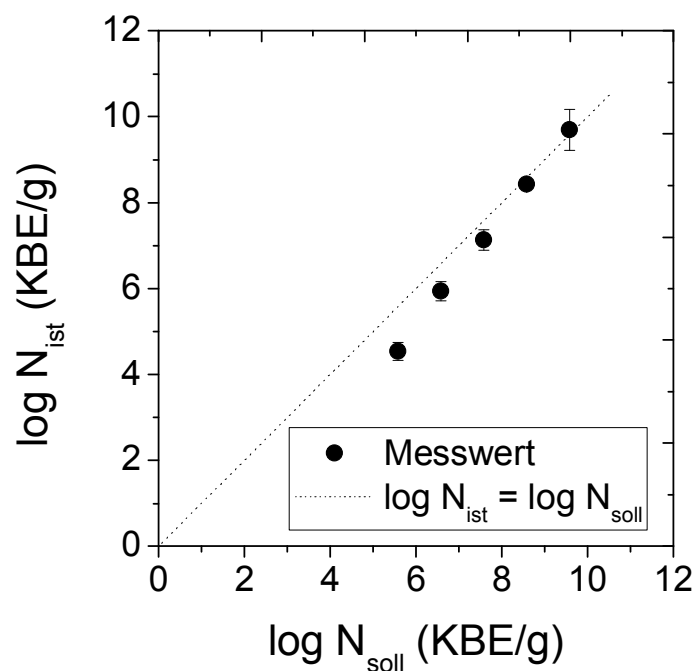
Suspension wurden W/O-Emulsionen mit 30 % Dispersphasenanteil und mit verschiedenen mittleren Tropfengrößen erzeugt. Nach der Herstellung wurde die Keimzahl in der Emulsion bestimmt. Die Keimkonzentration wurde in KBE bezüglich der Masse der wässrigen Phase in g dargestellt. Abb. 5.24 zeigt das Ergebnis für Tropfengrößen  $x_{1,3}$  von 0,7  $\mu\text{m}$ ; 7,0  $\mu\text{m}$  und 15,4  $\mu\text{m}$ .

Aufgrund der hohen Wiederfindungsrate erwies sich die Methode unabhängig von den Tropfengrößen der Emulsionen als geeignet.

In weiteren Versuchen wurde die Methode in Abhängigkeit der Keimkonzentration untersucht. Die Mikroorganismen wurden hierzu ebenfalls bis zur stationären Phase kultiviert. Die Pellets der Suspension wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und mit Ringerlösung bis auf den Konzentrationswert der Originalsuspension resuspendiert. Diese Suspension wurde in 10-er Schritten mit Ringerlösung verdünnt. Die neuen Suspensionen wurden als disperse Phase der W/O-Emulsionen ( $\varphi = 30\%$ ) eingesetzt, um Emulsionen mit verschiedenen Anfangskeimzahlen zu erhalten. Alle Emulsionen wurden unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Der mittlere Tropfendurchmesser lag bei ca. 12  $\mu\text{m}$ . Nach der Herstellung wurden die Emulsionen 3-fach ausplattiert. Die Messwerte wurden mit den Sollwerten verglichen (Abb. 5.25).



**Abb. 5.24:** Wiederfindung der *E. coli* K12 in Emulsionen mit verschiedenen mittleren Tropfengrößen im Vergleich zur Keimzahl in der Suspension.



**Abb. 5.25:** Wiederfindung der *E. coli* K12 in Emulsionen mit verschiedenen Keimzahlen.

Mit Ausnahme des Wertes der höchsten Verdünnung liegen die Messwerte im Bereich der Sollwerte (gleiche Zehner-Potenz). Aus den Messwerten könnte jedoch auch auf eine systematische Abweichung zwischen Soll- und Istwert bei kleinen Keimkonzentrationen geschlossen werden. Bei den hier üblichen Anfangskeimzahlen  $N > 10^6$  KBE/g kann diese Abweichung vernachlässigt werden.

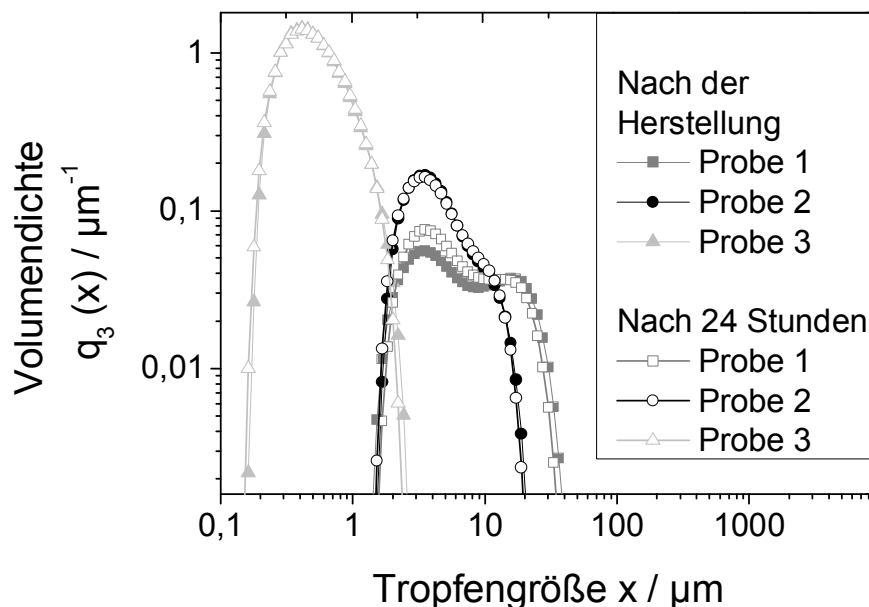
### Diffusion zwischen Tropfen

Zur Untersuchung der physikalischen Stabilität der Modellemulsionen wurde kontrolliert, ob Diffusion und damit der Transfer von Wasser zwischen den Tropfen ausgeschlossen werden kann. Dazu wurde eine Rezeptur eingesetzt, die unempfindlich gegen Ostwald-Reifung ist, da die Löslichkeit des Wassers in Pflanzenöl, wegen seines hohen Anteils an langkettigen Fettsäuren, relativ niedrig ist. Als wässrige Phase der Emulsion wurde das LB-Medium verwendet. Durch die gelösten Substanzen wird der osmotische Druck in den Tropfen erhöht, was zu einem Gleichgewicht des Systems ( $\Delta p_k = \Delta p_{\text{osm}}$ ) führt und damit die Emulsion stabilisiert wird.

Wichtig war hier, dass die Emulsionen mindestens 24 Stunden stabil bleiben, da die Mikroorganismen in dieser Zeit die stationäre Wachstumsphase erreicht haben. Die Stabilität wurde durch den Vergleich der Tropfengrößenverteilung von drei Emulsionen nach ihrer Herstellung

und nach 24 Stunden Lagerung (bei 30 °C) ermittelt. Hierfür wurden gezielt Emulsionen mit unterschiedlichen mittleren Tropfengrößen und Tropfengrößenverteilungen (mono und bimodal) ausgewählt (Abb. 5.26).

Wie aus Abb. 5.26 zu erkennen ist, haben sich die Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen nach 24-stündiger Lagerung bei 30 °C kaum geändert. Wenn eine Diffusion stattgefunden hätte, wäre es zu erwarten gewesen, dass die größeren Tropfen zu Gunsten der kleineren wachsen. Die geringen Unterschiede, die hier zu sehen sind, sind vermutlich durch Messschwankungen zu erklären. Zusammenfassend kann die Diffusion zwischen Tropfen und eine Änderung der Tropfengrößenverteilung während der Lagerung der Emulsion vernachlässigt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass den Mikroorganismen in den Tropfen die gleiche Substratkonzentration wie im Medium zur Verfügung steht.



**Abb. 5.26:** Tropfengrößenverteilung von verschiedenen Emulsionen nach ihrer Herstellung und nach 24 Stunden Lagerung bei 30 °C.

### 5.2.3.2 Einfluss der Tropfengröße der W/O-Emulsionen auf das Wachstum der Mikroorganismen

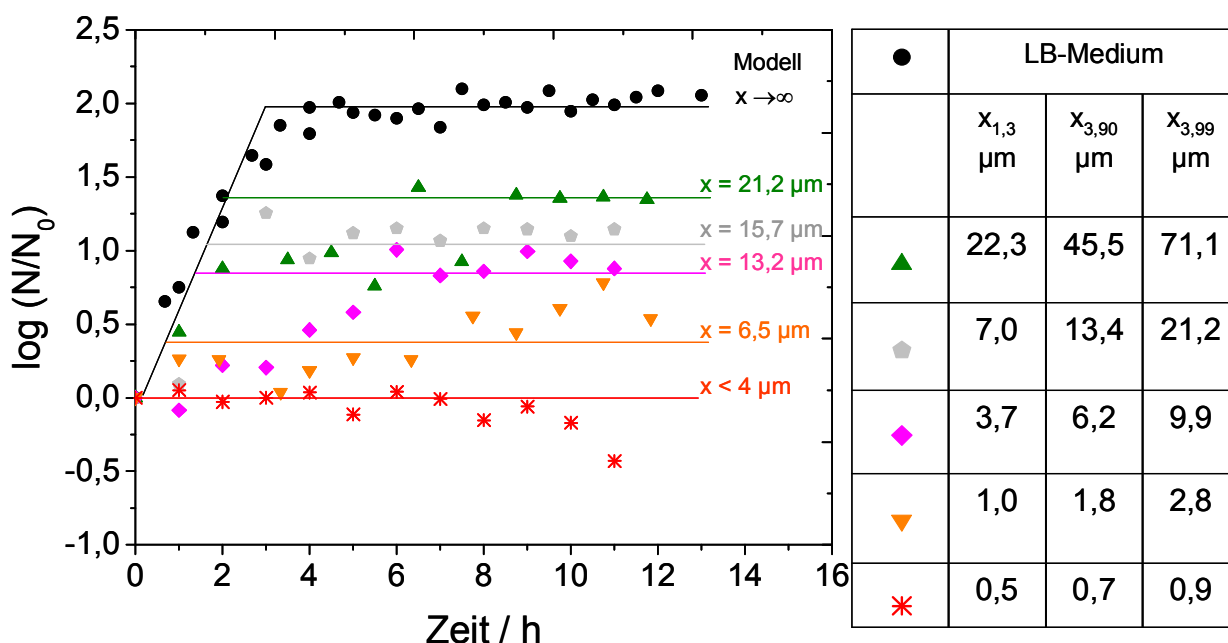
Zur Untersuchung des Wachstums in Emulsionen wurden die Mikroorganismen zuerst bei 37 °C unter Rühren (Schüttelfrequenz 250 rpm) für ca. 2,5 Stunden kultiviert, bis die Suspension eine optische Dichte von 0,06 erreichte. Bis zur Versuchsdurchführung wurde die Suspension über Nacht im Kühlschrank gelagert. Zu Beginn der Versuche war die optische Dichte ca. 0,2 und die Konzentration der Mikroorganismen lag zwischen  $10^{6,5}$  und  $10^7$  KBE/g. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Mikroorganismen in der exponentiellen Wachstumsphase. Zur



Untersuchung des Einflusses der Tropfengröße auf das weitere Wachstum wurde die Mikroorganismen-Suspension als disperse Phase der Emulsionen eingesetzt. Der Dispersphasenanteil der Emulsionen wurde auf 30 % festgelegt. Zum Emulgieren wurde ein Propellerrührer und für kleine Tropfen zusätzlich ein Rotor-Stator-System benutzt. Zur Erzeugung unterschiedlicher Tropfengrößen wurden die Geschwindigkeiten der Geräte variiert. Generell wurde in der kontinuierlichen Phase 10 % Emulgator PGPR eingesetzt. Um Tropfen größer als 30 µm zu erzeugen, musste die Emulgatorkonzentration auf 1 % reduziert werden.

Zuerst wurde eine Wachstumskurve für *E. coli* K12 unter idealen Wachstumsbedingungen im Nährmedium aufgenommen und anschließend die der Emulsionen mit den verschiedenen Tropfengrößen. Die Emulsionen wurden bei 30 °C ohne Rühren gelagert.

In dieser Versuchsreihe konnte die Anfangskeimzahl nicht konstant gehalten werden. Daher wurden die Ergebnisse als log (N/N<sub>0</sub>) über die Zeit dargestellt (Abb. 5.27). Die Messwerte sollten mit Vorsicht betrachtet werden. Die Wachstumskurve mit der Auftragung von log N über der Zeit sowie die Volumendichteverteilungen der Emulsionen befinden sich in Anhang A6.



**Abb. 5.27:** Keimzahlkonzentration (log(N/N<sub>0</sub>)) in Abhängigkeit der Zeit in Emulsionen mit verschiedenen mittleren Tropfengrößen. Zur Zeit t = 0: c<sub>LB-Medium</sub> = 25 g/l.

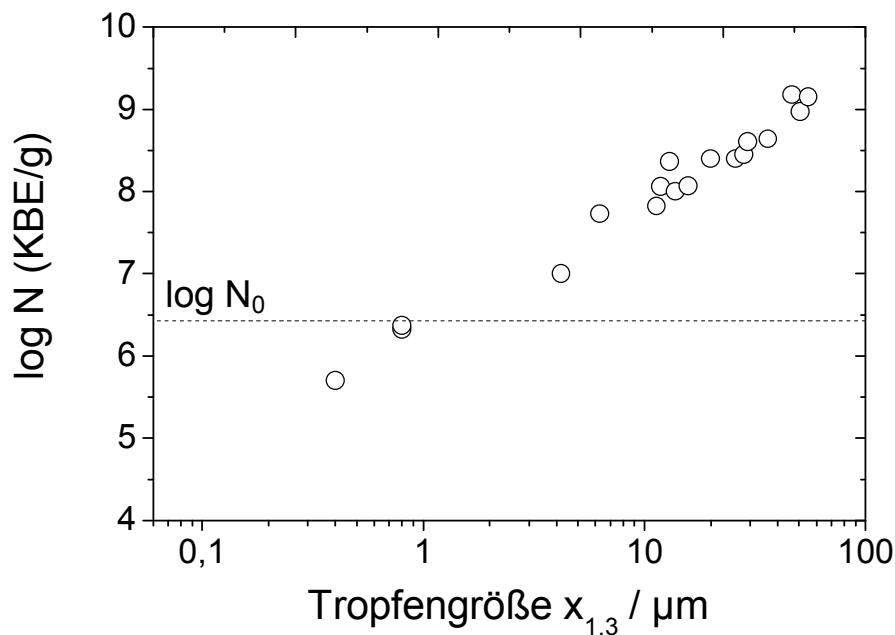
Die Mikroorganismen wachsen im Nährmedium bei idealen Wachstumsbedingungen bis  $\log(N/N_0) = 2$  (wobei die maximale Keimzahl  $\log N = 2 \cdot 10^9$  KBE/g ist). In den Tropfen wird das Wachstum hingegen begrenzt. Bereits bei Emulsionen mit der größten untersuchten mittleren Tropfengröße ( $x_{1,3} = 22,3 \mu\text{m}$ ;  $x_{3,99} = 71,1 \mu\text{m}$ ) zeigte sich eine Limitierung im Wachstum. Bei Emulsionen mit einer Tropfengröße kleiner oder gleich der Mikroorganismusgröße findet kein Wachstum mehr statt und die Emulsion kann als mikrobiologisch stabil angesehen werden. Dies betrifft z.B. die Emulsion mit einer mittleren Tropfengröße von  $x_{1,3} = 0,5 \mu\text{m}$  und  $x_{3,99} = 0,9 \mu\text{m}$ . In diesem Fall nimmt die Keimzahl schon ein paar Stunden nach der Emulsionsherstellung ab.

Für die Messdaten wurden mit Hilfe des theoretischen Modells für die Substratlimitierung ( $C_{\text{LB-Medium}} = 25 \text{ g/l}$ ) die entsprechenden Tropfengrößen berechnet (im Diagramm neben den Kurven dargestellt). Für Emulsionen mit mittleren Tropfengrößen von  $x_{1,3} = 1,0 \mu\text{m}$  und  $x_{1,3} = 3,7 \mu\text{m}$  sind die berechneten Tropfengrößen größer als die gemessenen. Für Emulsionen mit Tropfengrößen von  $x_{1,3} = 7,0 \mu\text{m}$  und  $x_{1,3} = 22,3 \mu\text{m}$  nähern sich die theoretischen Werte den Messwerten an. Ein bevorzugtes Tropfengrößemaß ( $x_{1,3}$ ,  $x_{3,90}$  oder  $x_{3,99}$ ) für das Modell wurde nicht erkannt.

Weitere Versuche mit genauer Anfangskonzentration der Mikroorganismen wurden durchgeführt. Für diese Versuche wurde *E. coli* K12 im LB-Medium bis zur stationären Phase kultiviert, die Pellets zentrifugiert und in frischem LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in 10-er Schritten bis zu  $10^{-3}$  mit frischem LB-Medium verdünnt. Nach der Verdünnung hatten die Suspensionen eine Keimzahlkonzentration von  $\log N_0$  (KBE/g) = 6,43  $\pm$  0,05. Die Emulsionen wurden wie bereits beschrieben (vgl. zum Wachstum ab der exponentiellen Wachstumsphase) hergestellt und bei 30 °C gelagert. Nach 24 Stunden wurde die Keimzahl der Emulsionen bestimmt.

Diese Ergebnisse stützen die vorherigen. Es zeigte sich auch hier, dass mit steigendem Tropfendurchmesser die maximale Keimzahlkonzentration ansteigt (Abb. 5.28). Für die Emulsion mit einem Tropfendurchmesser  $x_{1,3} = 0,4 \mu\text{m}$  wurde kein Wachstum festgestellt. Die maximale Keimzahl lag unter dem Anfangswert. Dies liegt vermutlich daran, dass die Mikroorganismen nicht mehr vollständig in einen Tropfen passen, da er sich zum Teil in der öligen Emulsionsphase befindet und einer höheren Absterberate unterliegt (vgl. in Abb. 5.27, Kurve mit  $x_{1,3} = 0,5 \mu\text{m}$ ). Im untersuchten Bereich überschreitet die maximale Keimzahl in den Emulsionen nie die maximale Keimzahl der Suspension. Physikalisch stabile Emulsionen mit einer mittleren Tropfengröße von mehr als 60  $\mu\text{m}$  sind im untersuchten System schwierig herzustellen.

Die in Abb. 5.28 dargestellten Messwerte werden in Kapitel 5.2.7, Abb. 5.40 diskutiert und mit den Werten der Modellrechnung verglichen.



**Abb. 5.28:** Maximale Keimzahlkonzentration in Abhängigkeit der Tropfengröße.

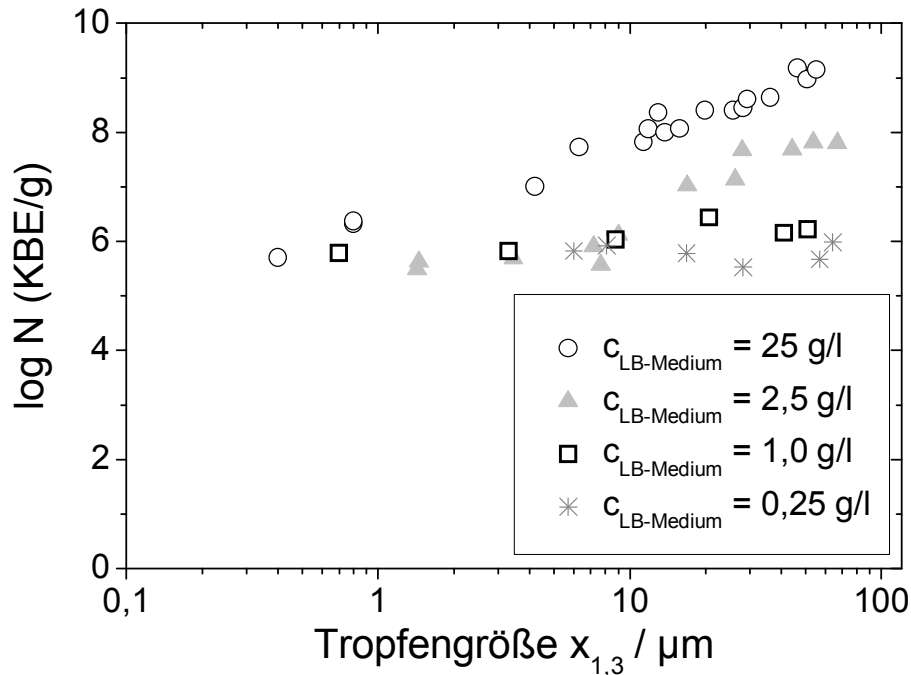
Nicht nur die Tropfengröße hat einen Einfluss auf das maximale Mikroorganismenwachstum, sondern auch die Substratkonzentration in der wässrigen Phase, was das Thema des nächsten Kapitels ist.

### 5.2.3.3 Einfluss der Substratkonzentration auf das Mikroorganismenwachstum

Wie bereits in Abschnitt 5.2.1.1 gezeigt, ist das Wachstum im LB-Medium bei Konzentrationen unter 2,5 g/l limitiert. Im Fall von W/O-Emulsionen befinden sich die Mikroorganismen in den Tropfen und verfügen somit über die dortige vorhandene Substratmenge.

Um den Einfluss der Substratmenge auf die maximale Keimkonzentration zu untersuchen, wurde das im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen an LB-Medium durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.29 dargestellt.

Die Untersuchungen zeigen, dass in Emulsionen mit Tropfendurchmessern bis 10  $\mu\text{m}$  und LB-Medium-Konzentrationen von 0,25 bis 2,5 g/l kein Wachstum stattfindet. In Emulsionen mit Tropfendurchmessern größer als 10  $\mu\text{m}$  findet erst ab LB-Medium-Konzentrationen von 2,5 g/l ein deutliches Wachstum statt.



**Abb. 5.29:** Maximale Keimzahl in Emulsionen mit variiertem Substratkonzentration (LB-Medium) in Abhängigkeit der Tropfengröße bei einer Anfangskeimzahl von  $\log N_0$  (KBE/g) = 6,43.

Die Ergebnisse unterstreichen die schon in Kapitel 5.2.3.2 getroffene Feststellung, dass das Wachstum von Mikroorganismen in kleinen Tropfen einer W/O-Emulsion substratlimitiert ist. Ein Vergleich der hier dargestellten Messergebnisse mit Modellberechnungen wird in Kapitel 5.2.7 diskutiert.

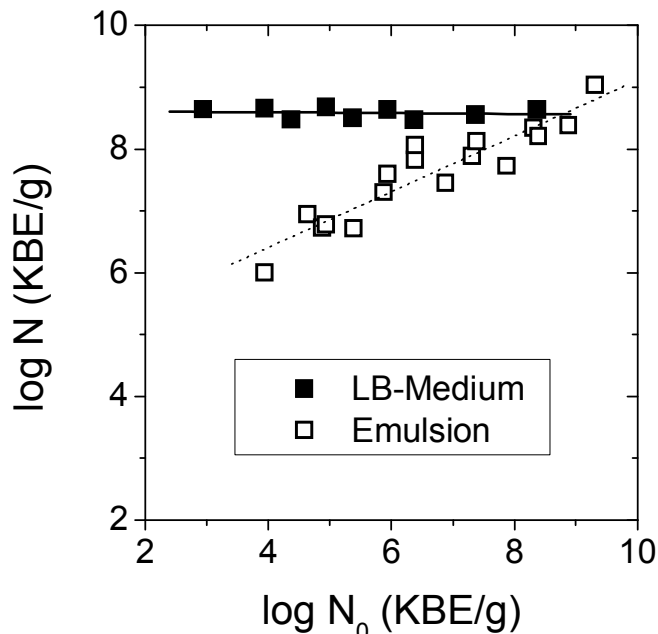
#### 5.2.3.4 Einfluss der Anfangskeimzahl auf das maximale Mikroorganismenwachstum in Emulsionen

In diesen Versuchen wurde das maximale Wachstum von Mikroorganismen in W/O-Emulsionen in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration der Mikroorganismen untersucht.

Abb. 5.30 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen und des Wachstums in reinem LB-Medium (Suspensionen) zum Vergleich.  $N_0$  beschreibt die Konzentration an Mikroorganismen direkt nach der Herstellung der Emulsionen,  $N$  die Konzentration an Mikroorganismen nach 24 stündiger Bebrütung. Sowohl die Emulsionen als auch die Suspensionen wurden bei 30 °C ohne Rühren kultiviert. Aus diesem Grund liegt die maximale Keimzahl  $N$  in LB-Medium unter  $10^9$  KBE/g.

Die untersuchten Emulsionen besaßen einen mittleren Tropfendurchmesser von  $x_{1,3} = 11,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$  mit einem SPAN-Wert von  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Im idealen Fall, d.h. wenn die Emulsionen monodispers ( $x = 11,2 \mu\text{m}$ ) und die Mikroorganismen gleichmäßig in den Tropfen verteilt wären, würde bei

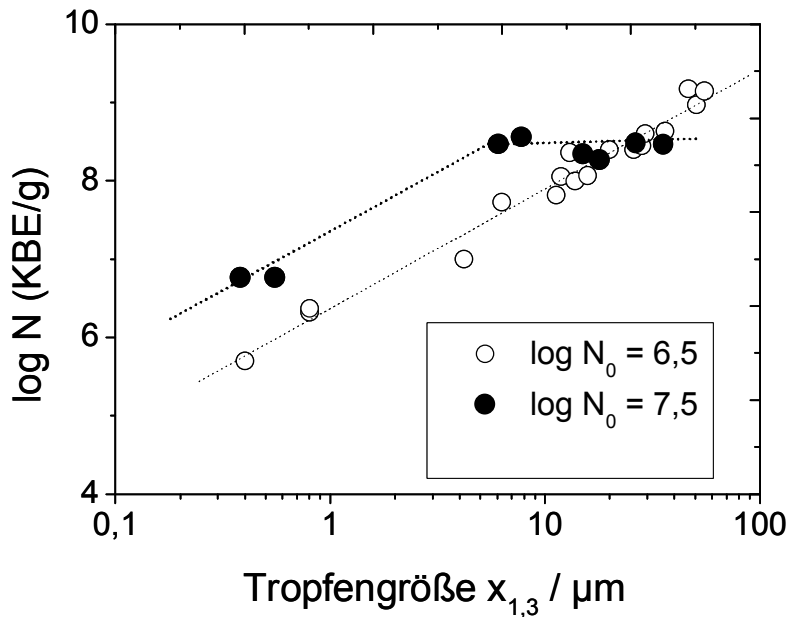
einer Anfangskeimzahl von bis zu  $\log N_0 = 9,13$  das Verhältnis von Mikroorganismen zur Tropfenzahl  $\leq 1$  sein.



**Abb. 5.30:** Maximale Keimzahl in Suspensionen und in Emulsionen in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration der Mikroorganismen.

Aus dem Diagramm kann eine klare Tendenz der Zunahme der Keimzahl ( $\log N$ ) mit der Erhöhung der Anfangskeimzahl ( $\log N_0$ ) beobachtet werden. Mit der Erhöhung der Anfangskeimzahl wird auch die Zahl der Tropfen, welche mit Mikroorganismen belegt sind, erhöht und damit auch die maximale Keimzahl.

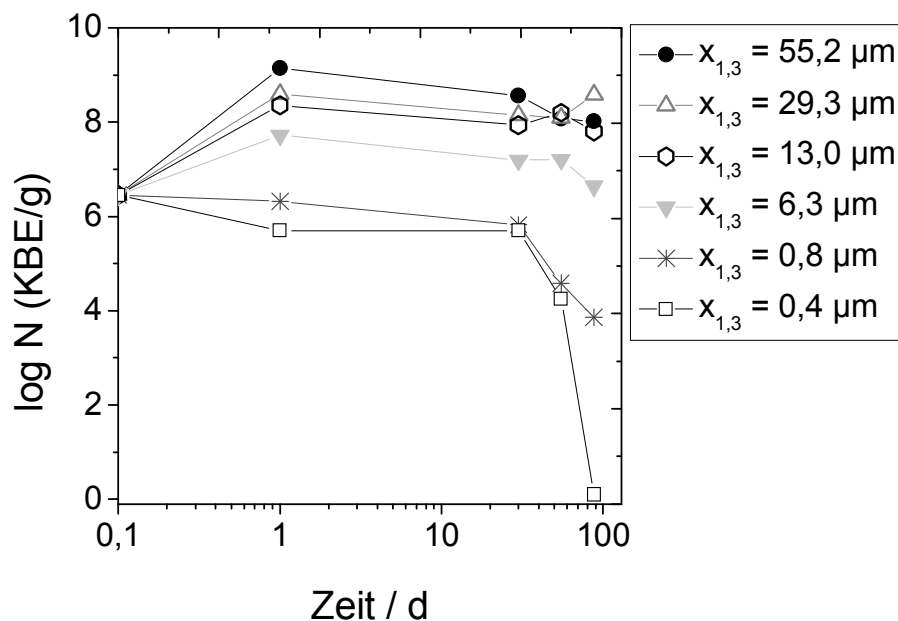
Weiterhin wurden Emulsionen mit zwei verschiedenen Anfangskonzentrationen an Mikroorganismen bei gleicher Substratkonzentration ( $c_{\text{LB-Medium}} = 25 \text{ g/l}$ ) in Abhängigkeit von der Tropfengröße verglichen (Abb. 5.31). In kleineren Tropfen machte sich der Einfluss der Anfangskeimzahl auf die maximale Keimzahl bemerkbar. Dies liegt daran, dass mit größerer Anfangskeimzahl auch mehr Tropfen existieren, die mindestens einen Anfangskeim enthalten. Beispielsweise enthalten bei einer Tropfengröße von  $20 \mu\text{m}$  und einer Anfangskeimzahl von  $\log N_0 = 6,5$  nur 1,3 % der Tropfen einen Anfangskeim. Bei gleicher Tropfengröße und einer Anfangskeimzahl von  $\log N_0 = 7,5$  steigt dieser Wert auf 13 %. Gleichzeitig nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass sich mehr als ein Mikroorganismus in einem Tropfen befindet. Bei Anfangskeimzahlen von  $\log N_0 = 6,5$  und  $\log N_0 = 7,5$  ist ab einer Tropfengröße von ca.  $85 \mu\text{m}$  bzw.  $40 \mu\text{m}$  mehr als ein Anfangskeim pro Tropfen zu erwarten.



**Abb. 5.31:** Maximale Keimzahl in Emulsionen in Abhängigkeit der Tropfengröße für zwei verschiedene Anfangskeimzahlen.

#### 5.2.3.5 Langzeitversuche zur mikrobiologischen Stabilität von W/O-Emulsionen

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Langzeitstabilität wurden Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen über einen längeren Zeitraum im Brutschrank bei 30 °C gelagert und die Keimzahl bestimmt (Abb. 5.32).



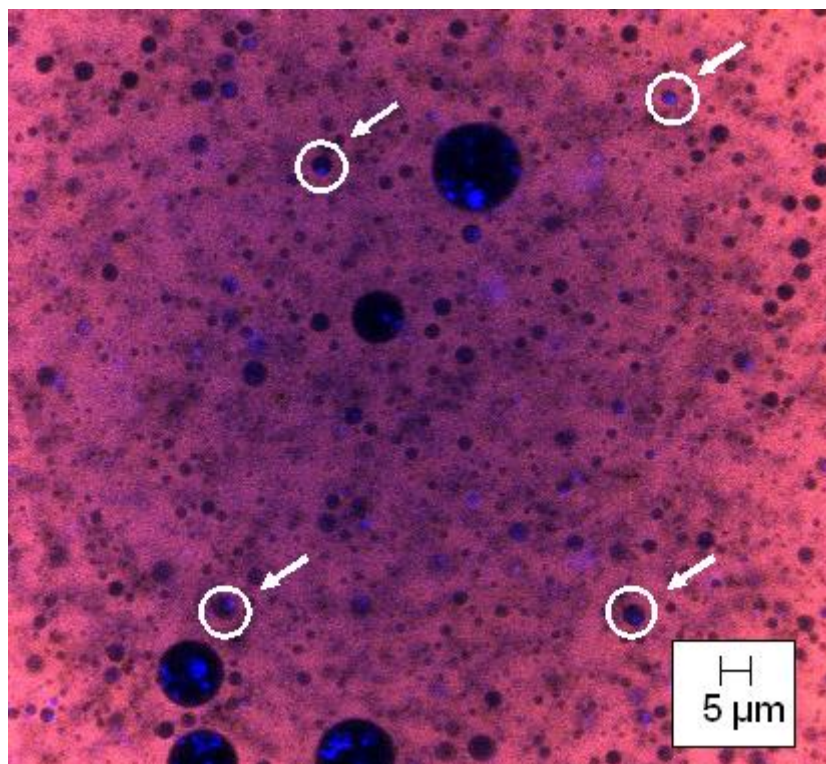
**Abb. 5.32:** Keimzahlen von Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen während einer Lagerungszeit von 88 Tage bei 30 °C.

Die Untersuchung zeigt, dass je kleiner der mittlere Tropfendurchmesser ist, desto höher sind die Absterberaten der Mikroorganismen. Dies kann durch die zu geringe Substratmenge in den Tropfen erklärt werden [Verrips u. Zalberg, 1980]. Hingegen bei Emulsionen mit Tropfendurchmessern zwischen 13  $\mu\text{m}$  und 55,2  $\mu\text{m}$  unterscheiden sich die Kurven kaum. Die Absterberaten bei diesen Emulsionen waren nach 88-tägiger Lagerung nur sehr gering.

#### 5.2.3.6 Mikroskopische Untersuchung von W/O-Emulsionen

Ziel der mikroskopischen Untersuchung war es, das Verhalten der Mikroorganismen in einer W/O-Emulsion zu beobachten. Dazu wurden Emulsionen mit kleinen Tropfen verwendet. Die Mikroorganismen sowie die ölige Phase wurden mit den fluoreszierenden Farbstoffen DAPI bzw. Nile Red eingefärbt.

In Abb. 5.33 ist die Aufnahme einer Emulsion mit einer Tropfengröße von ca. 2  $\mu\text{m}$  dargestellt.

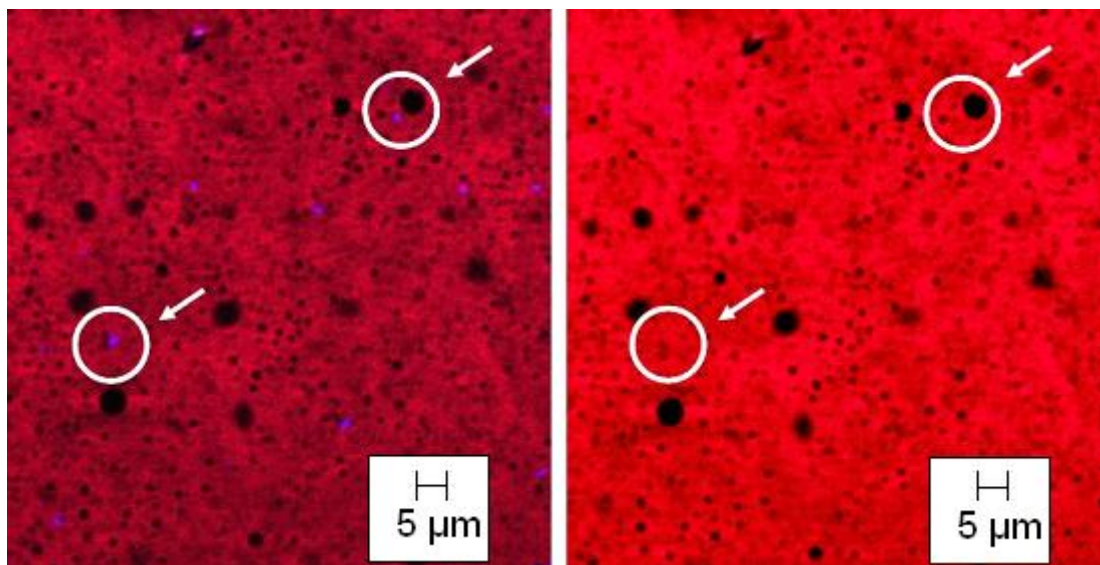


**Abb. 5.33:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12 in Tropfen einer W/O-Emulsion, aufgenommen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop des Max Rubner-Instituts Karlsruhe. Rot: kontinuierliche Phase; schwarz: disperse (wässrige) Phase; blau: Mikroorganismen. Die Pfeile zeigen Tropfen mit darin befindlichen Mikroorganismen.

Die Aufnahme zeigt die wässrige Phase der Emulsion in schwarz und die ölige Phase in rot. Die Mikroorganismen sind als blaue Punkte, die sich in der Emulsion verteilt befinden, dargestellt. Sie belegen die ca. 2 µm großen Wassertropfen der Emulsion. In der Ölphase sind keine Mikroorganismen erkennbar.

Verkleinert man die Tropfen weiter, kann vermutet werden, dass die Mikroorganismen doch in die ölige Phase gelangen können. Abb. 5.34 zeigt die Aufnahmen einer W/O-Emulsion mit zwei verschiedenen Filterkombinationen.

Das linke Bild wurde mit zwei Filtern (für DAPI und für Nile red) aufgenommen, das rechte Bild hingegen nur mit dem Filter für Nile Red. Die Mikroorganismen wurden mit DAPI blau gefärbt, die ölige kontinuierlichen Phase wurde mit Nile Red rot gefärbt. Der Vergleich der beiden Aufnahmen zeigt, dass es an einigen Stellen Mikroorganismen gibt (linkes Bild), wo jedoch kein Wasser vorhanden ist (vgl. rechtes Bild). Beispiele sind mit Pfeilen markiert.



**Abb. 5.34:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* K12 in Tropfen einer W/O-Emulsion mit dem Fluoreszenzmikroskop des Instituts für Wasserchemie der Universität Karlsruhe aufgenommen.

#### 5.2.4 Untersuchung der mikrobiologischen Stabilität von Biliquid Foams

Die Herstellung von Biliquid Foams entspricht im Ansatz dem von W/O-Emulsionen. *E. coli* K12 wurde im LB-Medium bis zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Mit diesem Medium als disperse Phase wurde eine W/O-Emulsion nach der bereits beschriebenen Methode hergestellt. Durch anschließendes Zentrifugieren (17595 g, t = 16 h) wurde ein Teil der kontinuierlichen Phase abgetrennt und somit der

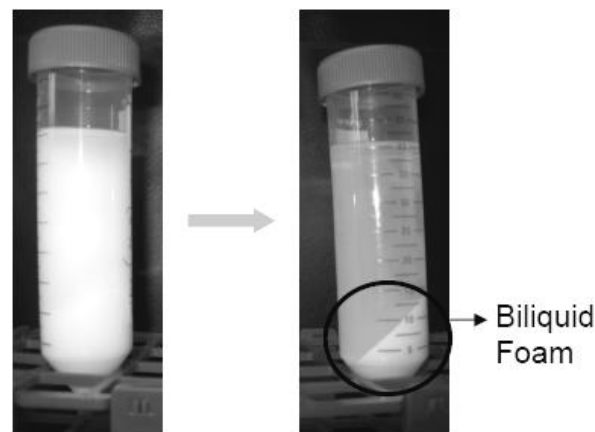


Dispersphasenanteil der Emulsion erhöht. Das Zentrifugieren wurde bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt, um zu vermeiden, dass sich die Mikroorganismen während dieser Zeit vermehren.

Um stabile Emulsionen mit hohem Wassergehalt (Biliquid Foams) zu erhalten, wurden folgende Parameter untersucht:

- Dispersphasenanteil der Emulsion: 20 % und 50 %
- Emulgatorkonzentration: bis 10 %
- Art des Öls: Sojaöl, Miglyol

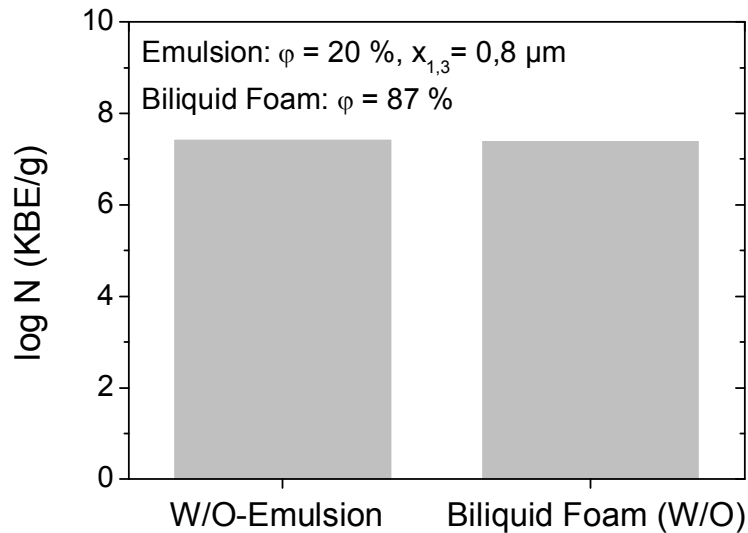
Das beste Ergebnis zur Erzeugung einer stabilen Emulsion mit hohem Wasseranteil wurde durch Zentrifugieren einer Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von 20 %, einer Emulgatorkonzentration von 6 % und der Verwendung von Miglyol erhalten (Abb. 5.35).



**Abb. 5.35:** Bild einer Emulsion vor und nach dem Zentrifugieren.

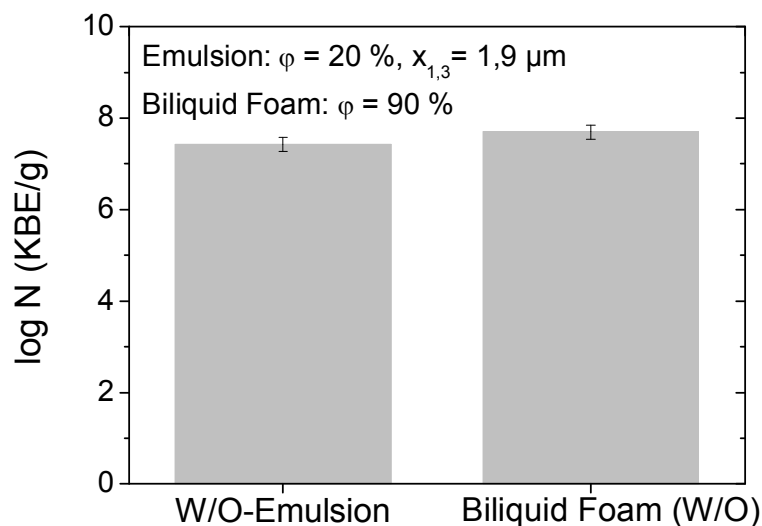
Nach der Herstellung der Ausgangs-Emulsion wurde eine Probe in die Zentrifuge gestellt und eine zweite Probe im Kühlschrank bei gleicher Temperatur (10 °C) gelagert. Nach dem Zentrifugieren der ersten Probe wurden beide Proben in einen temperierten Schrank (30 °C) gestellt und nach 24 Stunden Lagerung ausplattiert.

In Abb. 5.36 sind die maximalen Keimzahlen in einer Emulsion mit 20 % Dispersphasenanteil und der entsprechenden konzentrierten Emulsion nach einer Lagerung von 24 Stunden dargestellt. Die Tropfendurchmesser des Biliquid Foam ( $x_{1,3} = 0,8 \mu\text{m}$ ) waren kleiner als der Durchmesser von *E. coli* K12 ( $x_{1,3} = 1,1 \mu\text{m}$ ). Der Wassergehalt betrug 87 %. Die Keimzahl der Emulsion nach ihrer Herstellung betrug  $\log N_0 \text{ (KBE/g)} = 7,3$ . Während der Lagerung blieb diese Konzentration sowohl für die Emulsion als auch für die entsprechend konzentrierte Emulsion (Biliquid Foam) konstant.



**Abb. 5.36:** Vergleich der maximalen Keimzahl in einer Emulsion ( $x_{1,3} = 0,8 \mu\text{m}$ ) und ihrer entsprechend konzentrierten Version des Biliquid Foams.

Eine weitere Steigerung des Wassergehalts in Biliquid Foams erfordert die Herstellung und anschließende Zentrifugation von Emulsionen mit größeren mittleren Tropfengrößen. Hier haben sich die Keimzahl der Emulsion und die des Biliquid Foams nach der Lagerung auch nur leicht im Vergleich zur Anfangskeimzahl verändert ( $\log N_{\text{Emulsion}} = 7,4 \pm 0,2$ ,  $\log N_{\text{Biliquid Foam}} = 7,7 \pm 0,2$  - Abb. 5.37).

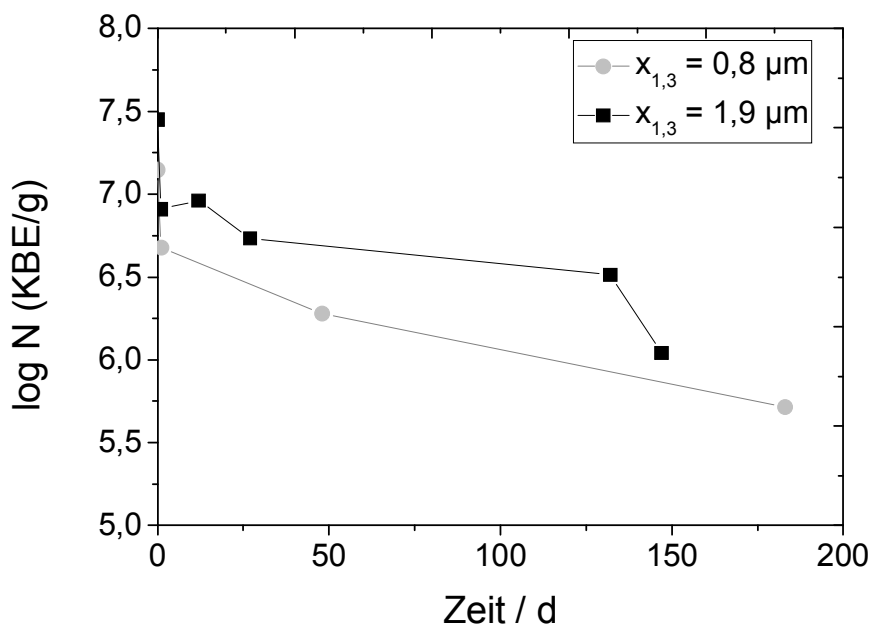


**Abb. 5.37:** Vergleich der maximalen Keimzahlen in einer Emulsion ( $x_{1,3} = 1,9 \mu\text{m}$ ) und ihrer entsprechend konzentrierten Version des Biliquid Foams mit 90 % Dispersphasenanteil.

### 5.2.5 Langzeitversuche zur mikrobiologischen Stabilität von Biliquid Foams

Wie bereits in Abb. 5.36 und Abb. 5.37 gezeigt, kann der Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Keimzahl einer Emulsion bei einer 24-stündigen Lagerung ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zu den Untersuchungen einer Langzeitlagerung sind in Abb. 5.38 dargestellt.

Wie aus Abb. 5.38 zu erkennen ist, findet wie im Fall der Emulsionen mit kleiner Tropfengröße so auch bei Biliquid Foams eine Keimzahlreduzierung während der Lagerung infolge des Substratmangels statt [Verrips u. Zaalberg, 1980].

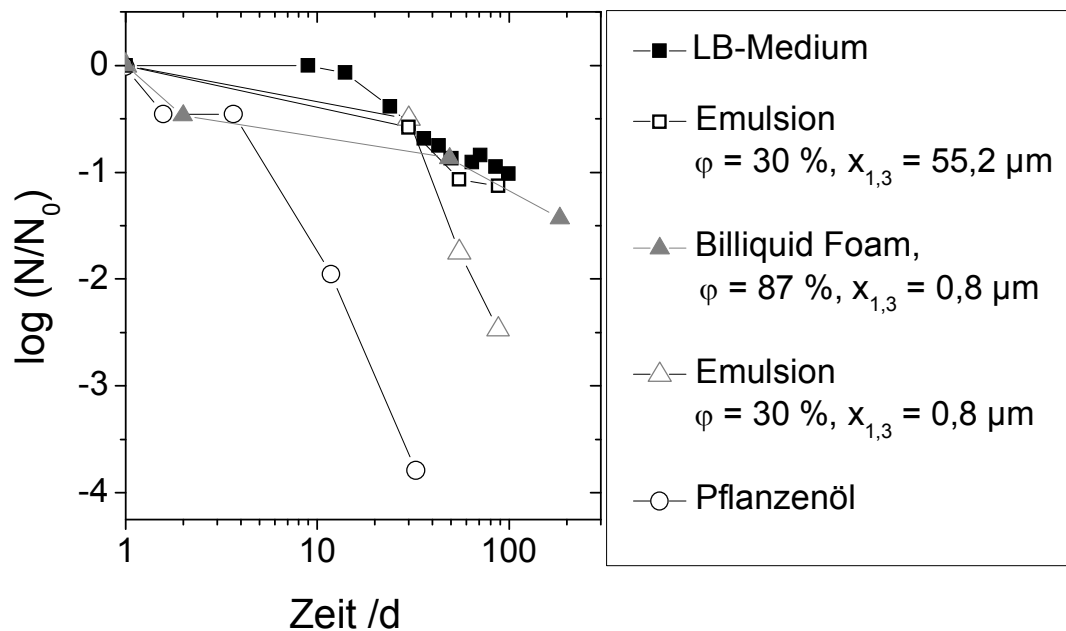


**Abb. 5.38:** Keimzahl von hoch konzentrierten Emulsionen während einer Lagerungszeit von mehr als 100 Tagen bei 30 °C.

### 5.2.6 Vergleich der Keimzahl von *E. coli* K12 im LB-Medium, Pflanzenöl und in Emulsionen während der Langzeitlagerung

Dieser Abschnitt behandelt den Einfluss des Milieus auf die Absterberate ( $\log(N/N_0)$ ) von *E. coli* K12. Ein Vergleich ist in Abb. 5.39 dargestellt.

Wie in Abb. 5.39 ersichtlich, hat *E. coli* K12 im LB-Medium die niedrigste Absterberate. Sie ist vergleichbar mit der der Emulsion mit großen Tropfen (55,2  $\mu\text{m}$ ) und der Emulsion mit hohem Wassergehalt (87 %). Eine hohe Absterberate haben die Mikroorganismen in Emulsionen mit kleinen Tropfen und niedrigem Dispersphasenanteil ( $\varphi = 30 \%$ ,  $x_{1,3} = 0,8 \mu\text{m}$ ). Wie erwartet, wurde die höchste Absterberate in Pflanzenöl beobachtet.

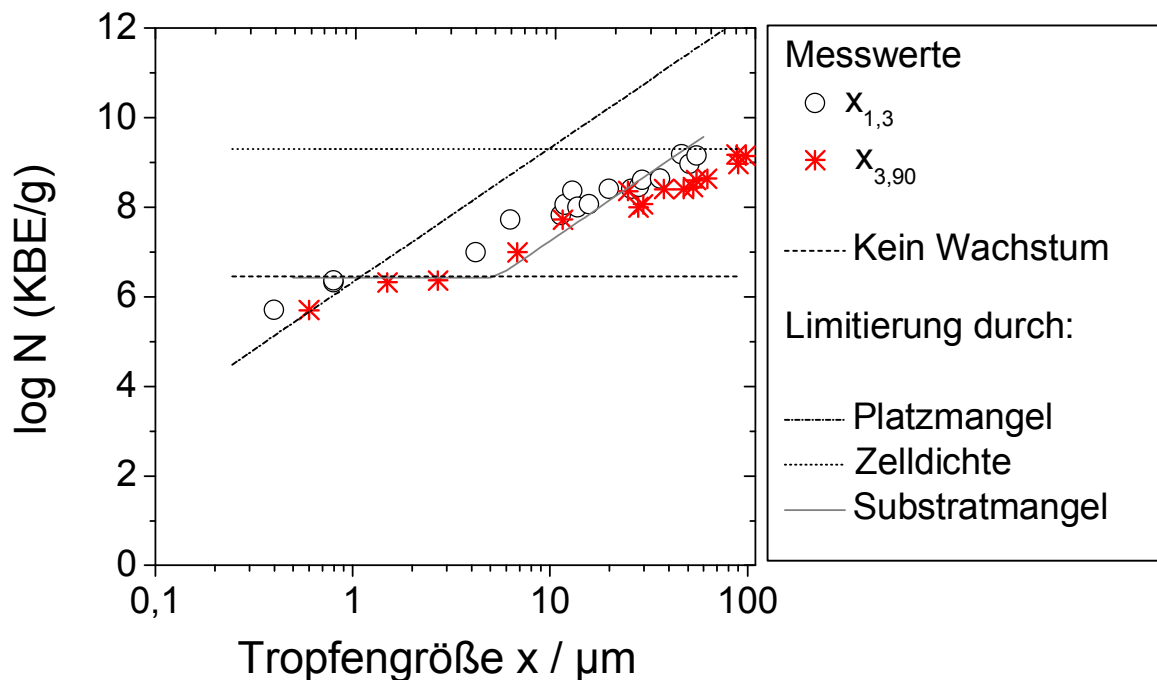


**Abb. 5.39:** Absterberaten in LB-Medium, in Pflanzenöl, in W/O-Emulsionen und in Biliquid Foams über der Lagerungszeit bei 30 °C.  $\varphi$  ist der Anteil der dispersen (wässrigen) Phase.

### 5.2.7 Vergleich der experimentellen und theoretischen Ergebnisse des Mikroorganismenwachstums in W/O-Emulsionen

In diesem Abschnitt wurden experimentell ermittelte Werte für die maximale Keimzahl in Emulsionen mit berechneten Werten (Abschnitt 5.2.2) bei gleichen Ausgangsbedingungen verglichen. Das Wachstum wurde für eine Limitierung durch Platzmangel, Zelldichte und Substratmangel berechnet und dargestellt (Abb. 5.40 bis Abb. 5.43).

Zur Berechnung der maximalen Keimzahl hinsichtlich der Substratmenge dienen die Wachstumsergebnisse in Suspensionen als Grundlage. Abb. 5.40 zeigt den Vergleich zwischen den berechneten und den experimentell ermittelten Werten aus Abb. 5.28. Zusätzlich sind die ermittelten Werte für die Emulsionstropfengröße  $x_{3,90}$  dargestellt.



**Abb. 5.40:** Maximale Keimzahlkonzentration in Abhängigkeit des Tropfendurchmessers. Vergleich der Messwerte und der theoretischen Modellberechnungen. Ausgangswerte:  $c_{\text{LB-Medium}} = 25 \text{ g/l}$ ,  $\log N_0 \text{ (KBE/g)} = 6,43$ .

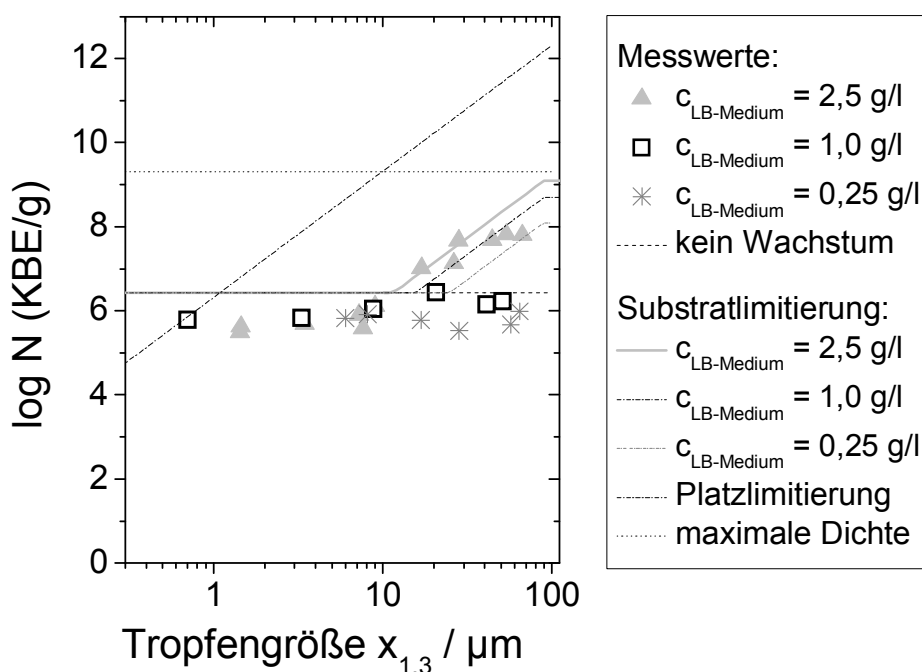
Durch die konstante Anfangskeimzahl ( $\log N_0$ ) sind die Ergebnisse zuverlässiger als die in Abb. 5.27 dargestellten. Aus dem Diagramm Abb. 5.40 ist zu erkennen, ab wann ein Wachstum möglich ist.

Der Vergleich der Messwerte mit der Modellrechnung zeigt, dass das Wachstum der Mikroorganismen durch den Substratmangel in den Tropfen limitiert ist, solange die maximale Zelldichte noch nicht erreicht ist. Die Darstellung der maximalen Keimzahl über der Tropfengröße  $x_{3,90}$  liegt näher an der Modellrechnung und sollte daher dafür als Tropfengrößemaß verwendet werden. In größeren Tropfen ist das Wachstum geringer als erwartet. Dies kann daran liegen, dass je größer der Tropfen sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tropfen mit mehreren Anfangskeimen belegt ist. Tab. 5-3 zeigt den berechneten Anteil der mit einem Mikroorganismus belegten Tropfen in Abhängigkeit der Tropfengröße bei einer Anfangskeimzahl  $\log N_0 = 6,43$ .

**Tab. 5-3:** Tropfengröße und entsprechender Anteil der Tropfen, die mit mindestens einem Mikroorganismus belegt sind.

x / $\mu\text{m}$	% der mit Mikroorganismen belegten Tropfen
100	100
70	48
50	18
10	0,14
5	0,018
1	0,00014

Um die Limitierung durch die Substratkonzentration genauer zu betrachten, wurden die Berechnungen mit den experimentellen Messergebnissen (aus Abb. 5.29) der maximalen Keimzahlen in Abhängigkeit der Tropfengröße und der Substratkonzentration verglichen (Abb. 5.41).



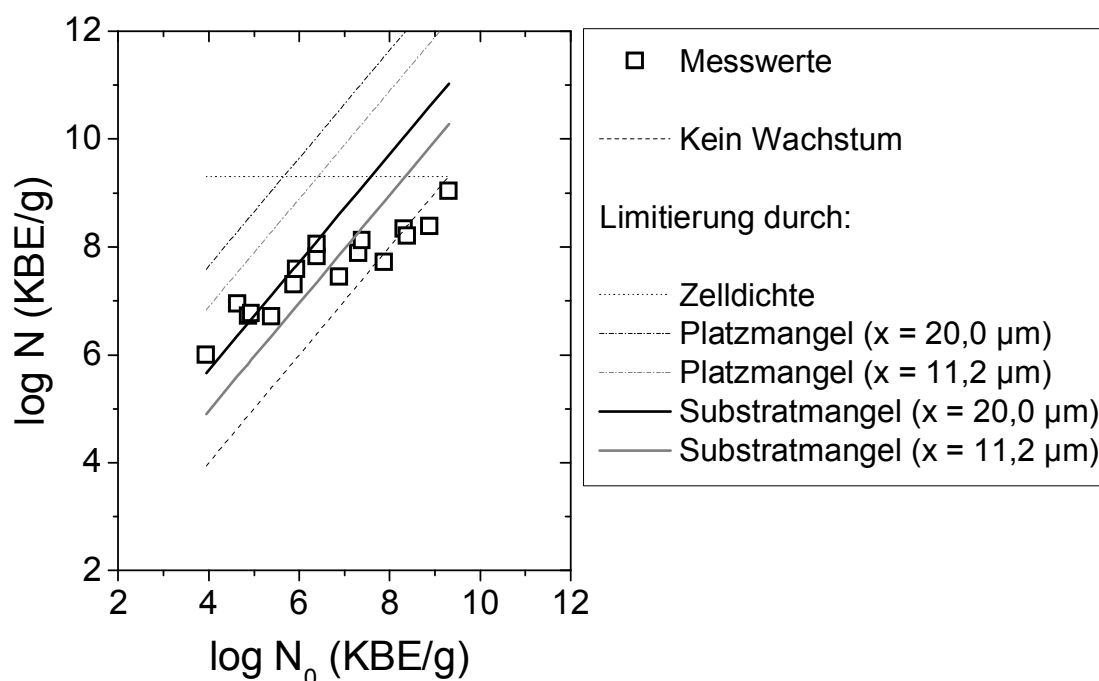
**Abb. 5.41:** Maximale Keimzahlkonzentration in Abhängigkeit des Tropfendurchmessers und der Substratausgangskonzentration ( $c_{\text{LB-Medium}}$  von 0,25 bis 2,5 g/l). Vergleich der Messwerte und theoretischen Modellberechnungen. Ausgangswert Keimzahl:  $\log N_0 \text{ (KBE/g)} = 6,45$ .

Die Messwerte zeigen, dass mit geringer Anfangssubstratmenge das Wachstum der Mikroorganismen weiter eingeschränkt wird als nach dem

Modell vorhergesagt wurde. Für  $c_{\text{LB-Medium}} \leq 1$  g/l findet unabhängig von der Tropfengröße kein Mikroorganismenwachstum in den Tropfen statt. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die Substratlimitierung für das Mikroorganismenwachstum maßgeblich ist.

Die Ergebnisse aus Abb. 5.30 wurden mit den berechneten Werten (für  $x = x_{1,3} = 11,2$   $\mu\text{m}$  und  $x = x_{3,90} = 20,0$   $\mu\text{m}$ ) verglichen und in Abb. 5.42 dargestellt.

Auch diese Werte liegen unterhalb der berechneten Werte für Platzlimitierung und Limitierung durch die maximale Zelldichte. Für Anfangskonzentrationen von bis zu  $\log N_0 = 6,5$  KBE/g liegen die experimentell ermittelten maximalen Keimzahlen genau über der berechneten Kurve der Limitierung durch Substratmangel (für  $x = x_{3,90} = 20,0$   $\mu\text{m}$ ). Für  $\log N_0 \geq 8$  findet hingegen kein Wachstum mehr statt.



**Abb. 5.42:** Maximale Keimzahlkonzentration in Abhängigkeit der Anfangs-keimzahl in Emulsionen mit  $c_{\text{LB-Medium}} = 25$  g/l. Vergleich der Messwerte und der theoretischen Modellberechnungen. Mittlere Tropfengröße  $x_{1,3} = 11,2$   $\mu\text{m}$  ( $x_{3,90} = 20,0$   $\mu\text{m}$ ).

### 5.2.8 Zusammenfassung und Schlussfolgerung zur Stabilisierung von W/O-Emulsionen durch Herstellung hinreichend feiner Tropfen

Das Wachstum von *E. coli* K12 wurde zuerst in den einzelnen Phasen einer Emulsion untersucht.

Bei der Kultivierung von *E. coli* K12 unter Rühren in LB-Medium im Erlenmeyerkolben lag die maximale Keimzahlkonzentration bei ca.  $\log N = 9,3$  KBE/g. Bei gleichen Bedingungen aber ohne Rühren, wodurch den Mikroorganismen weniger Sauerstoff zur Verfügung steht, lag die maximale Keimzahlkonzentration bei ca.  $\log N = 8,6$  KBE/g. Für dieses System ist die maximale Keimzahlkonzentration unabhängig von der Anfangskeimzahl aber abhängig von der Substratmenge. Konzentrationen des LB-Mediums kleiner als 2,5 g/l limitieren das Wachstum. Weiterhin wurde festgestellt, dass das Wachstum nicht durch die Produktion von giftigen Nebenprodukten oder Metaboliten gestoppt wird.

Untersuchungen in Pflanzenöl im Erlenmeyerkolben zeigten, dass Mikroorganismen (*E. coli* K12 hydrophil und *L. casei* 6126 hydrophob) sich nicht vermehren, aber lange überleben können.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die mikrobiologische Stabilität von Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen ohne Zusatz von Konservierungsstoffen und/oder zu Hilfenahme von Sterilisationsverfahren bei geeigneter Mikrostruktur erreicht werden kann. Wie bereits festgestellt wurde, können sich Mikroorganismen in Öl nicht vermehren. Für kleine Wassertropfen wurde untersucht, auf welche Weise das Wachstum limitiert wird und bis zu welchem Tropfendurchmesser  $d_{\text{krit}}$  die Emulsion mikrobiologisch stabil ist. Außerdem wurden die experimentell ermittelten Messwerte mit den berechneten Werten für die maximale Keimzahl verglichen.

Da der Mikroorganismus *E. coli* K12 sehr hydrophil ist, wurde er für die Versuche ausgewählt. Das untersuchte System basiert auf Wasser-in-Pflanzenöl-Emulsionen mit einer Bakteriensuspension (*E. coli* K12 in LB-Medium) als disperse wässrige Phase. Zur Untersuchung der Keimvermehrung wurden Proben nach definierten Lagerungszeiten und Bebrütungsbedingungen gezogen und deren Keimzahl bestimmt. Zur Bestimmung der Keimzahl wurde durch Phaseninversion eine O/W-Emulsion erzeugt und nach einer Variante der Spatelplattentechnik ausplattiert.

Zur Berechnung der maximalen Keimzahl bezüglich der Limitierung durch Platzmangel (räumliche Begrenzung) in einem Tropfen wurde die Größe von *E. coli* K12 mit Hilfe der Laserbeugung bestimmt. Der mittlere Durchmesser von *E. coli* K12 beträgt  $x_{1,3} = 1,1 \mu\text{m}$ .



Des Weiteren wurde überprüft, ob Diffusion zwischen den Tropfen ausgeschlossen werden kann. Dazu wurden die Tropfengrößenverteilungen einiger Emulsionen nach ihrer Herstellung und nach einer Lagerung über 24 Stunden bei 30 °C verglichen. Es wurde nahezu kein Unterschied festgestellt. Dementsprechend kann die Diffusion zwischen den Tropfen vernachlässigt werden.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das Wachstum von *E. coli* K12 in den Tropfen einer W/O-Emulsion durch deren Tropfengröße beeinflusst wird. Bereits bei Emulsionen mit der größten untersuchten mittleren Tropfengröße ( $x_{1,3} = 22 \mu\text{m}$ ,  $x_{3,99} = 71 \mu\text{m}$ ) ist das Wachstum limitiert. Bei Emulsionen mit Tropfengrößen kleiner oder gleich der Größe der Keime ( $x_{1,3} = 1 \mu\text{m}$ ) findet kein Mikroorganismenwachstum mehr statt und die Emulsion kann als mikrobiologisch stabil angesehen werden.

Für das Wachstum von Mikroorganismen in Tropfen einer W/O-Emulsion wurde ein einfaches Modell entwickelt. Es enthält die Limitierung des Wachstums durch Platzmangel bei sehr kleinen Tropfen mit dem mittleren Durchmesser  $x_{1,3} \approx 1 \mu\text{m}$ , durch die maximale Zelldichte sowie durch Substratmangel. Der Vergleich der Daten für die Modellrechnungen mit den experimentellen Werten zeigt, dass das Mikroorganismenwachstum in den Emulsionstropfen hauptsächlich durch Substratmangel limitiert ist, sofern die maximale Zelldichte nicht erreicht wird. Experimente mit geringer Anfangskonzentration des Substrats bestätigen diese Aussage. In Emulsionen mit niedrigen LB-Medium-Konzentrationen kleiner 1 g/l kann das Wachstum von *E. coli* K12 sogar vernachlässigt werden. Nach 24 Stunden Lagerung lagen die Messwerte unterhalb der Anfangskeimzahl.

Im Gegensatz zu Suspensionen ist für das Wachstum der Mikroorganismen in W/O-Emulsionen die Anfangskonzentration der Mikroorganismen von großer Bedeutung. Sie entscheidet darüber, wie viele Tropfen überhaupt Keime enthalten und wie viele Mikroorganismen sich in jedem Tropfen befinden. Dies ist einer der bestimmenden Parameter zur Beeinflussung der maximal erreichbaren Keimzahl in Emulsionen nach langen Lagerzeiten.

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Langzeitstabilität von Emulsionen wurden Emulsionen mit unterschiedlichen Tropfengrößen über einen Zeitraum von ca. 88 Tagen bei 30 °C gelagert. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass *E. coli* K12 über einen längeren Zeitraum überlebensfähig ist. In Emulsionen mit Tropfendurchmessern von  $x_{1,3} \geq 6,3 \mu\text{m}$  ist die Keimzahlreduktion über den gesamten Zeitraum gering ( $\approx 1$  Zehner-Potenz). In Emulsionen mit einem mittleren Durchmesser von  $x_{1,3} \leq 0,8 \mu\text{m}$  ist die Keimzahlreduktion höher als 2 Zehner-Potenzen. Je kleiner die Tropfen der Emulsion sind, desto höher ist die Absterberate während der Lagerungszeit.

Die mikroskopische Untersuchung von W/O-Emulsionen zeigte, dass für den Aufenthalt von Mikroorganismen in den Tropfen ein Mindestdurchmesser der Tropfen in der Größenordnung der Mikroorganismenabmessung notwendig ist. Werden die Tropfen weiter zerkleinert, werden die Mikroorganismen wahrscheinlich in die Ölphase verdrängt.

Die Untersuchungen von hochkonzentrierten Emulsionen (Biliquid Foams) zur mikrobiologischen Stabilität ergaben, dass die maximale Keimzahl bei einem Biliquid Foam mit einem Dispersphasenanteil von 90 % vergleichbar ist zu einer Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil. In Biliquid Foams mit kleinen Tropfendurchmessern ( $x_{1,3} = 0,8 \mu\text{m}$ ) und einem Wassergehalt von 87 % wurde wie bei den Emulsionen die mikrobiologische Stabilität erreicht. Dies bedeutet, dass Lebensmittel mit hohem Wasseranteil eine intrinsische mikrobiologische Stabilität besitzen können, wenn sie in Form eines Biliquid Foam gestaltet werden.

In verschiedenen Medien weist *E. coli* K12 unterschiedliche Absterberaten auf. Die höchste Absterberate wurde in Pflanzenöl beobachtet, gefolgt von Emulsionen mit kleinen Tropfengrößen (unter ca.  $6 \mu\text{m}$ ). Die Absterberate im LB-Medium, in Emulsionen mit größeren Tropfen und hochkonzentrierten Emulsionen sind ähnlich und liegen bei einer Reduktion von ca. 1 Zehner-Potenz bei einer 3-monatigen Lagerung bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Die maximale Keimzahl in Emulsionen wurde berechnet unter Berücksichtigung der Platzverhältnisse in den Tropfen und der Substratmenge. Die berechneten Verläufe sind nach unten durch „kein Wachstum“ und nach oben durch die maximale Zelldichte beschränkt. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Berechnungen bezüglich der Limitierung durch die Substratmenge in den Tropfen sowie die maximale Zelldichte auf den Ergebnissen von Kolbenkultivierung von *E. coli* K12 im LB-Medium auf idealen Bedingungen basieren.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Schlussfolgerung für das Wachstum von hydrophilen Mikroorganismen in W/O-Emulsionen:

- Ein Mikroorganismen-Wachstum findet nur in der wässrigen Phase statt, nicht in der öligen Phase.
- Selbst bei hohen Anfangskeimkonzentrationen ( $N_0 = 10^{6,5}$  KBE/g) kann davon ausgegangen werden, dass die Tropfen anfänglich höchstens 1 Mikroorganismus enthalten, da die Zahl der Tropfen wesentlich größer ist als die Zahl der Mikroorganismen (für Tropfengrößen  $x < 50 \mu\text{m}$ ).
- Das Wachstum von Mikroorganismen in Tropfen ist hauptsächlich durch Substratmangel limitiert, sofern bei großen Tropfen ( $x_{1,3} > 40 \mu\text{m}$ ) keine Limitierung durch die maximale Zelldichte erreicht wird. Eine Begrenzung des Wachstums durch Platzmangel bei kleinen Tropfen ist unbedeutend, da zuvor die Limitierung durch

Substratmangel greift. Eine Diffusion des Substrats durch die Lipidphase kann ausgeschlossen werden.

- Im untersuchten Bereich des Dispersphasenanteils von etwa 30 bis 90 % ist kein Einfluss des Wassergehalts auf das Mikroorganismenwachstum erkennbar.
- W/O-Emulsionen lassen sich durch geeignete Gestaltung mikrobiologisch dadurch stabilisieren, dass man abhängig von der anfänglichen Substratmenge eine hinreichend kleine Tropfengröße einstellt, die im Bereich von einigen Mikrometern liegen. Bei Substratkonzentrationen in der wässrigen Phase unterhalb von 1 g/l ist eine intrinsische mikrobiologische Stabilität bis zu Tropfengrößen unterhalb von 60  $\mu\text{m}$  gegeben.



### 5.3 Thermische Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen

In diesem Teil der Arbeit wird überprüft, ob es tatsächlich einen Schutzeffekt gegen eine thermische Behandlung gibt, wenn sich die Mikroorganismen in Öl befinden und ob sie eine hohe Resistenz in Lebensmitteln mit hohem Fettgehalt aufweisen. Mögliche Gründe dafür könnten durch die geringe Wasserverfügbarkeit, die niedrige Wärmeleitfähigkeit von Öl im Vergleich zu Wasser und einer daraus resultierenden langsameren Erwärmung oder einen Übergang der Mikroorganismen von der wässrigen in die ölige Phase begründet werden.

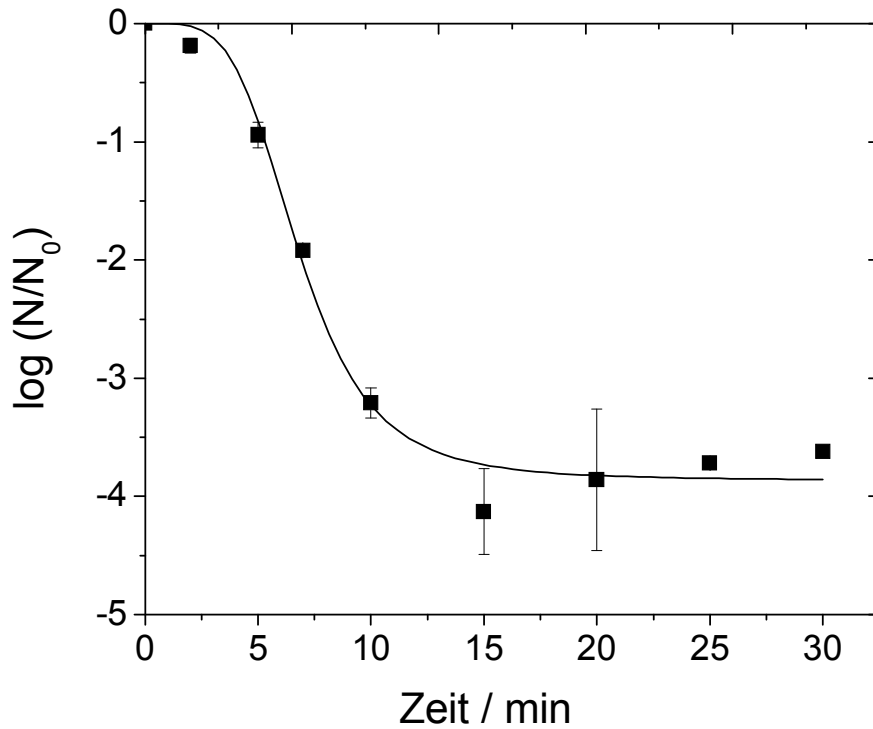
Die Abtötungskinetik von hydrophilen (*E. coli* K12) und hydrophoben Mikroorganismen (*L. casei* 6126) wurde in Abhängigkeit der Emulsioneigenschaften untersucht.

#### 5.3.1 Thermische Inaktivierung von hydrophilen Mikroorganismen in der wässrigen und öligen Phase

Die Inaktivierung von *E. coli* K12 wurde zuerst in Ringerlösung bei 57 °C durchgeführt. Es wurden jeweils 9 g Ringerlösung in Reagenzgläsern erwärmt. Für jede Probenahme wurde ein Reagenzglas eingesetzt. Nach Erreichen der erwünschten Temperatur konnte der Versuch begonnen werden. Die Reagenzgläser wurden aus dem Wasserbad herausgeholt und je 1 g der Mikroorganismensuspension (*E. coli* K12 in Ringerlösung) zugegeben. Der Inhalt des Reagenzglases wurde kurz mit dem Vortex gemischt und das Reagenzglas zurück ins Wasserbad gestellt. Nun wurde die Stoppuhr mit der gewünschten Inaktivierungszeit gestartet. Die Inaktivierungskinetik, d.h. die Überlebensrate in Abhängigkeit der Zeit, ist in Abb. 5.43 dargestellt.

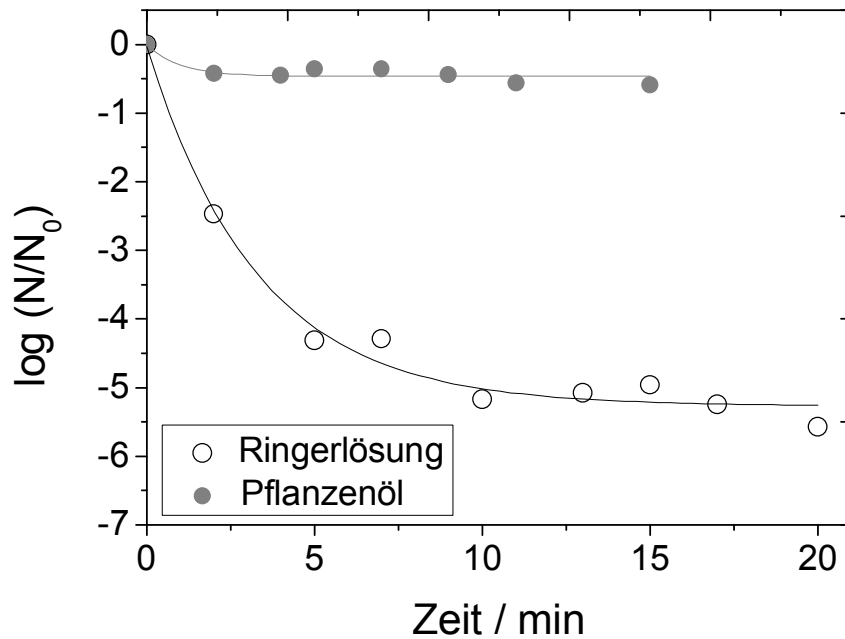
Bei dieser Methode zeigt die Überlebenskurve bei einer Inaktivierungstemperatur von 57 °C einen sigmoiden Verlauf, das heißt die Kurve besitzt eine Schulter, aber weist auch ein Tailing auf. Die Schulter kann durch den langsameren Erhitzungsprozess (instationär) und die dadurch niedrigeren Temperaturen erklärt werden. Bei höheren Temperaturen (63 °C) entfällt dieser Effekt und daher auch die Schulter (Abb. 5.44).

In Abb. 5.43 nimmt die Zerstörungsrate mit steigender Inaktivierungszeit zu. Die empfindlichen Mikroorganismen werden inaktiviert. Es bleibt bei der gewählten Inaktivierungstemperatur eine konstante Konzentration von resistenten Mikroorganismen erhalten, die nicht inaktiviert werden können. Die Kurve kann nach *Peleg, 2000* entsprechend der Resistenzverteilung der Mikroorganismen beschrieben werden (Gl. 2.23- Kap. 2).



**Abb. 5.43:** Überlebenskurve von *E. coli* K12 in Ringerlösung bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30 \text{ °C}$ ,  $T_{\text{Inaktivierung}} = 57 \text{ °C}$ .

In Abb. 5.44 wurde die Überlebenskurve von *E. coli* K12 in Ringerlösung und in Pflanzenöl bei einer Temperatur von  $63 \text{ °C}$  verglichen.



**Abb. 5.44:** Überlebenskurve von *E. coli* K12 in Ringerlösung und in Pflanzenöl bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30 \text{ °C}$ ,  $T_{\text{Inaktivierung}} = 63 \text{ °C}$ .

Erhöht man die Inaktivierungstemperatur, wird die Überlebenskurve von *E. coli* K12 in Ringerlösung durch einen Tailing-Verlauf beschrieben (Abb. 5.44). In diesem Fall sind die schwachen bzw. empfindlichen Bakterien der Bakterienpopulation in einer relativ kurzen Zeit abgetötet und die Überlebenden besitzen eine immer höhere Widerstandskraft. Im Pflanzenöl ist die Inaktivierung wegen der geringen Wasserverfügbarkeit nur sehr gering. Dieses Verhalten stimmt mit den Ergebnissen von anderen Autoren [Senhaji u. Loncin, 1977; Cerny u. Fink, 1986; Miller, 2006] überein.

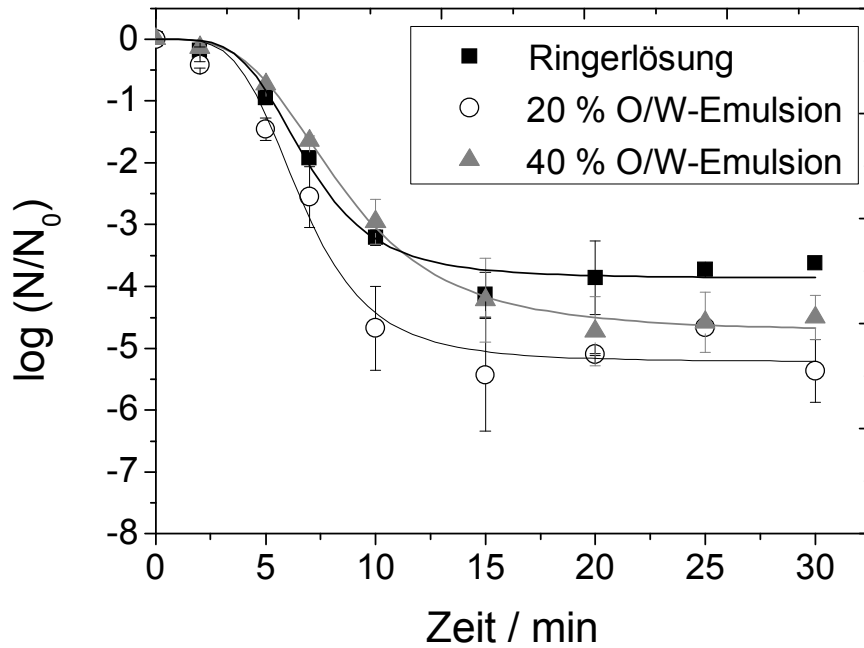
### 5.3.2 Vorversuche zur Anpassung der Inaktivierungs-Methode für O/W-Emulsionen

Weiterhin wurden die Überlebenskurven in Emulsionen mit 20 % und 40 % Dispersphasenanteilen bei gleicher Methode aufgenommen. Die Zusammensetzung der Emulsionen bestand aus Pflanzenöl und Ringerlösung mit 2 % Tween 80. Bei diesen Versuchen wurden die Reagenzgläser zuerst mit 9 g Emulsion im Wasserbad bei 57 °C vorgewärmt. Die Reagenzgläser wurden aus dem Wasserbad herausgenommen und 1 g der entsprechenden mit *E. coli* K12 versetzten Emulsion zugegeben. Das Reagenzglas wurde kurz mit dem Vortex gemischt und zurück in das Wasserbad gestellt. Die Stoppuhr mit der gewünschten Inaktivierungszeit wurde nun gestartet. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.45 dargestellt.

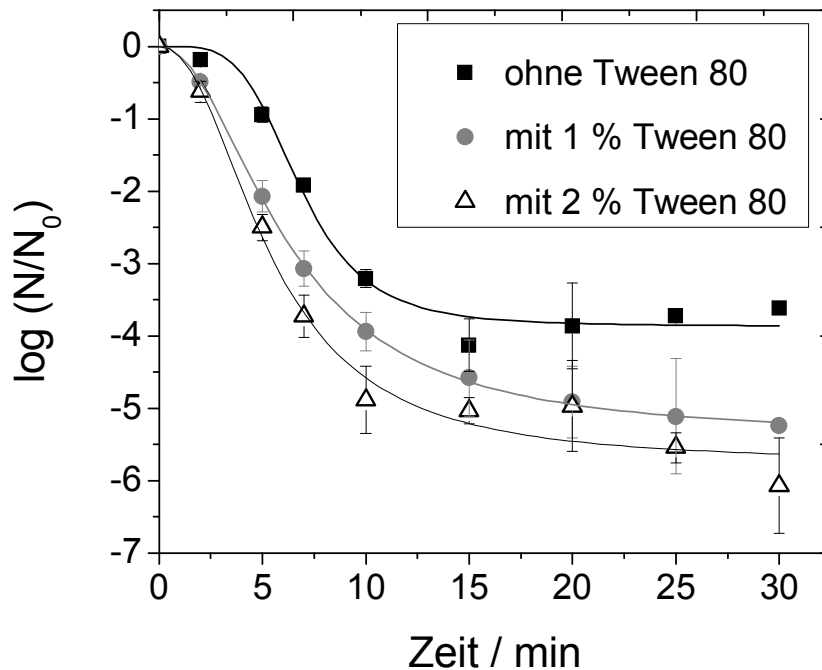
Die Inaktivierung in der O/W-Emulsion mit 40 % Dispersphasenanteil stellte sich als weniger effizient heraus als in der Emulsion mit 20 % Dispersphasenanteil. Für kurze Inaktivierungszeiten benötigt die Emulsion mit hohem Dispersphasenanteil längere Zeit, um nach der Zugabe der Mikroorganismensuspension die Inaktivierungstemperatur zu erreichen. Erstaunlicherweise liegt die Überlebenskurve in Ringerlösung über den beiden Inaktivierungskurven der Emulsionen. Was die Systeme unterscheidet ist, dass die Ringerlösung keinen Emulgator Tween 80 enthält. Daher wurde der Einfluss von Tween 80 auf das Inaktivierungsverhalten untersucht. Eine toxische Wirkung von Tween 80 auf die Mikroorganismen wurde ausgeschlossen (s. Anhang A7).

Tatsächlich hat der Emulgator Tween 80 Einfluss auf die Inaktivierungskinetik, indem er den pH-Wert der Ringerlösung verändert. In Abb. 5.46 sind die Überlebenskurven für Ringerlösungen ohne, mit 1 % und mit 2 % Tween 80 dargestellt. Die entsprechenden pH-Werte der Ringerlösungen lagen bei 7,1, 5,5 bzw. 5,2. Es ist ein Effizienzanstieg des Inaktivierungsprozesses mit der Absenkung des pH-Werts zu erkennen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Tween 80 einen Einfluss auf die Inaktivierung durch die Veränderung der pH-Wertes nimmt. Um diesen

Effekt zu minimieren, wurde in der wässrigen Phase eine Pufferlösung (nach *Buranasompob, 2005*) eingesetzt.



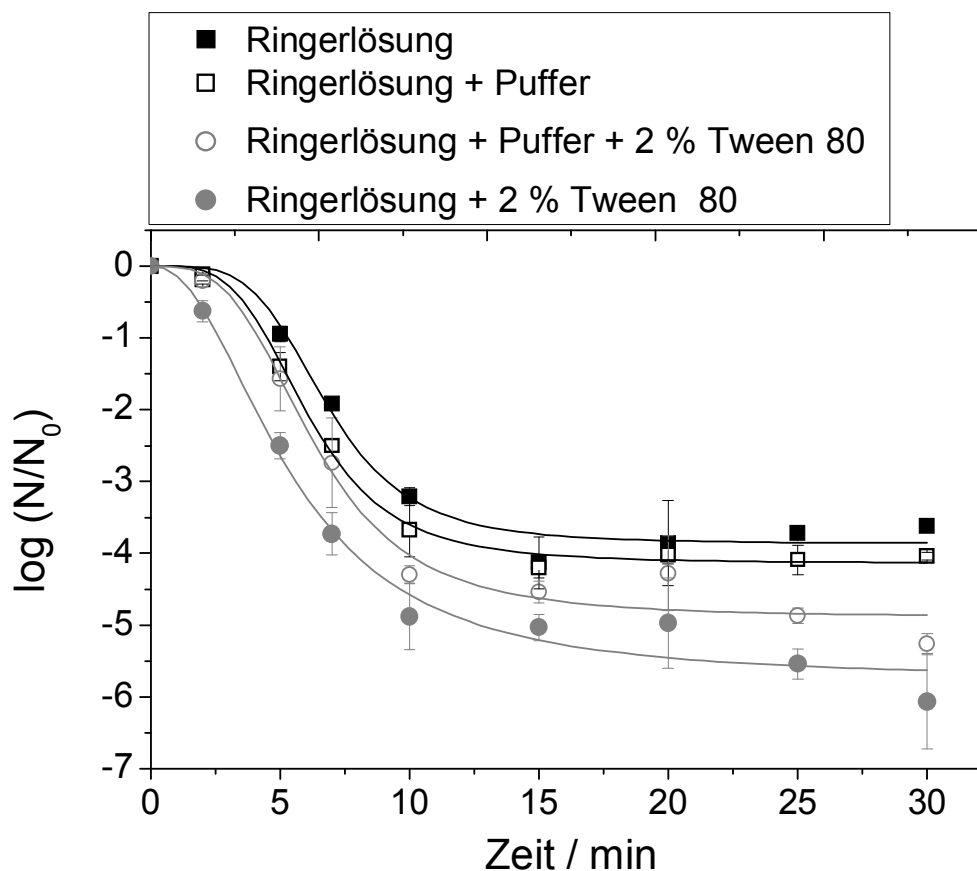
**Abb. 5.45:** Überlebenskurven von *E. coli* K12 in Ringerlösung (ohne Tween 80) und in Emulsionen mit unterschiedlichen Dispersphasenanteilen von  $\varphi = 20\%$  und  $\varphi = 40\%$  und 2 % Tween 80 bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30\text{ °C}$  und  $T_{\text{Inaktivierung}} = 57\text{ °C}$ .



**Abb. 5.46:** Überlebenskurven von *E. coli* K12 in reiner Ringerlösung und in Ringerlösungen mit 1 % und 2 % Emulgator Tween 80 bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30\text{ °C}$ ,  $T_{\text{Inaktivierung}} = 57\text{ °C}$ .



Eine Wiederholung der Inaktivierungsversuche für Ringerlösungen mit Puffer und mit 2 % Tween 80 sind in Abb. 5.47 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 5.47:** Überlebenskurven von *E. coli* K12 in Ringerlösung und in Ringerlösung mit 2 % Emulgator Tween 80 mit und ohne Puffer bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $T_{\text{Inaktivierung}} = 57 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Verwendung von Pufferlösung resultiert zwar nicht in identischen Überlebenskurven, sie rücken jedoch wesentlich näher aneinander. Die folgenden Versuche wurden daher mit der Pufferlösung durchgeführt.

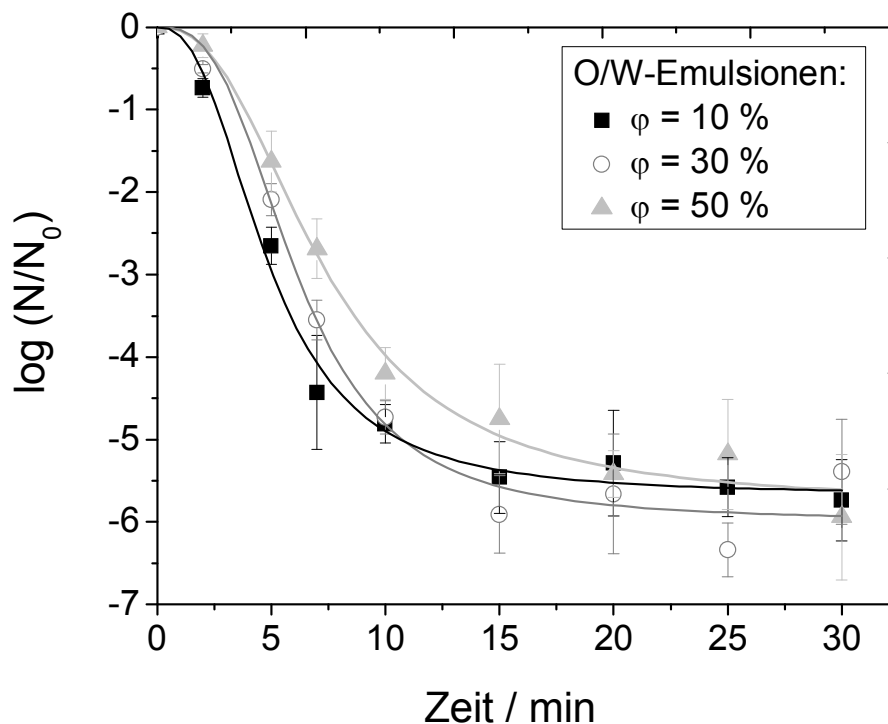
### 5.3.3 Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Inaktivierung

Um die isothermischen Bedingungen zu Beginn der Inaktivierungsversuche zu verbessern, wurde anstatt 1 g MO-Suspension in 9 g Emulsion nur noch 0,1 g in 9,9 g Emulsion zugegeben (vgl. Kap. 4.5.4).

Unter den modifizierten Bedingungen wurden die Überlebenskurven in Emulsionen mit unterschiedlichem Dispersphasenanteil ermittelt und verglichen (Abb. 5.48). Die Emulsionen wurden durch Verdünnung der wässrigen Phase hergestellt, um eine gleiche Tropfengröße ( $x_{1,2} = 0,9 \text{ } \mu\text{m}$ )

zu erhalten. Aus Abb. 5.48 erkennt man keinen eindeutigen Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Inaktivierungsrate.

Durch die unterschiedlichen Dispersphasenanteile der Emulsionen kann die Erwärmungszeit, aufgrund der höheren Wärmekapazität des Öls, variieren. Für Inaktivierungszeiten von mehr als 10 min unterscheiden sich die Inaktivierungsergebnisse für die verschiedenen Emulsionen kaum. Weiterhin ist die Schulter der Inaktivierungskurve weniger ausgeprägt als in Abb. 5.45, was wahrscheinlich an der Änderung der Methode und der dadurch konstanteren Inaktivierungstemperatur zu Beginn der Untersuchungen liegt.



**Abb. 5.48:** Überlebenskurven von *E. coli* K12 in Emulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen bei  $T_{\text{Wachstum}} = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $T_{\text{Inaktivierung}} = 57 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.3.4 Versuchsplan zur Untersuchung des Einflusses der Emulsionseigenschaften auf die Inaktivierung in O/W-Emulsionen

Zur Untersuchung des Einflusses der Emulsionseigenschaften auf die Inaktivierungsergebnisse wurde ein Versuchsplan erstellt und durchgeführt. Als Einflussfaktoren wurden die Tropfengröße, der SPAN-Wert, der Dispersphasenanteil und die Emulgatorkonzentration untersucht. Die Inaktivierungstemperatur wurde auf  $63 \text{ }^{\circ}\text{C}$  konstant gehalten. Um den zu untersuchenden Bereich für die Tropfengröße und den SPAN zu definieren, wurden die Tropfengrößenverteilungen einiger kommerziell erhältlicher Produkte bestimmt (Anhang A8).

Die Tropfengröße der Emulsion wurde von 2 µm bis 10 µm, der SPAN-Wert von 1,2 bis 2, der Dispersphasenanteil von 0,3 % bis 60 % und die Überschusskonzentration des Emulgators von 0 % bis 200 % variiert. Die notwendigen Emulgatorkonzentrationen wurden nach *Stang, 1998* berechnet. Die erhaltenen Werte für den Sauterdurchmesser und den SPAN sowie die Beschreibung der Herstellung der Emulsionen befinden sich im Anhang A9.

Als Werkzeug zur Planung der Experimente und Auswertung der Ergebnisse wurde die Design-Expert<sup>®</sup> Software benutzt. Ein Teilfaktorplan "2 Level fractional factorial design" mit Mittelpunkt wurde für diesen Versuchsplan ausgewählt. Er besteht aus 9 Experimenten, die aus den 4 Faktoren resultieren, die bei „2-Level“ variiert werden ( $2^{4-1} = 8$ ) plus einem Mittelpunkt ( $8+1 = 9$ ). Die Reihenfolge der Versuchsdurchführung wurde per Zufall ermittelt.

Die zu untersuchenden Einflussfaktoren sind in Tab. 5-4 und die geplanten Experimente in Tab. 5-5 zusammengefasst.

**Tab. 5-4:** Zu untersuchende Einflussfaktoren auf die Inaktivierung von Mikroorganismen

<b>Faktor</b>	<b>Einheit</b>	<b>Art</b>	<b>Min. Wert</b>	<b>Max. Wert</b>
Dispersphasenanteil	%	numerisch	0,3	60
Tropfengröße, x <sub>1,2</sub>	µm	numerisch	2	10
Emulgator im Überschuss	%	numerisch	0	200
SPAN	-	numerisch	1,2	2

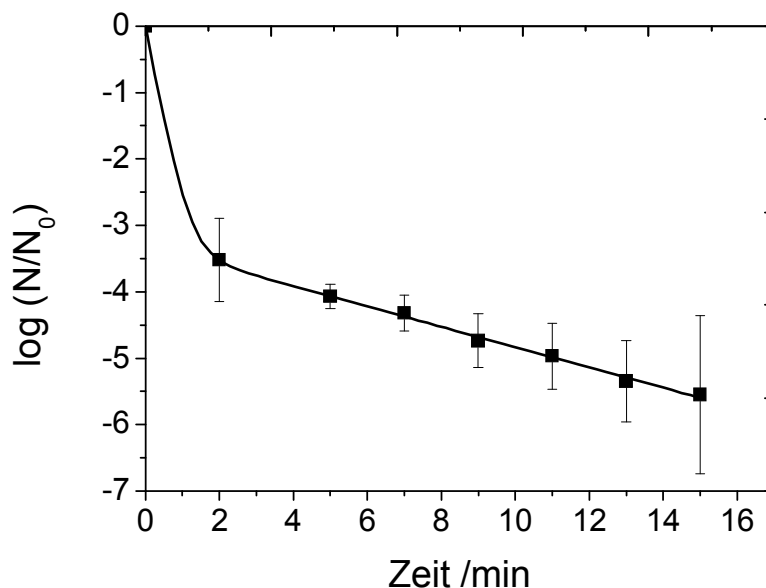
**Tab. 5-5:** Versuchsplan

<b>Exp.</b>	<b>Exp. randomisiert</b>	<b>A Ölanteil %</b>	<b>B Tropfengröße x<sub>1,2</sub> / µm</b>	<b>C Emulgatorkonz. Überschuss / %</b>	<b>D SPAN</b>
1	1	0,30	2	0	1,20
2	9	30,15	6	100	1,60

<b>Exp.</b>	<b>Exp. randomisiert</b>	<b>A Ölanteil %</b>	<b>B Tropfengröße <math>x_{1,2} / \mu\text{m}</math></b>	<b>C Emulgatorkonz. Überschuss / %</b>	<b>D SPAN</b>
3	5	60,00	2	0	2,00
4	4	0,30	10	0	2,00
5	6	60,00	10	0	1,20
6	3	0,30	2	200	2,00
7	8	60,00	2	200	1,20
8	7	0,30	10	200	1,20
9	2	60,00	10	200	2,00

Auf Basis des Versuchsplans wurden die Überlebensraten der Mikroorganismen ( $\log N/N_0$ ) nach 2, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 min Inaktivierungszeit ermittelt. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert wurde zur Ermittlung der Überlebenskurve eingesetzt.

In Abb. 5.49 ist ein Beispiel einer Überlebenskurve von MO in einer O/W-Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von  $\varphi = 60\%$ , Tropfengröße  $x_{1,2} = 2 \mu\text{m}$ , ohne Überschuss von Emulgator und  $\text{SPAN} = 2$  (Experiment 3) dargestellt.



**Abb. 5.49:** Beispiel einer Überlebenskurve für *E. coli* K12 in einer O/W-Emulsion mit:  $\varphi = 60\%$ ,  $x_{1,2} = 2\ \mu\text{m}$ , Überschusskonzentration des Emulgators = 0 und SPAN = 2 (Experiment 3).  $T_{\text{Wachstum}} = 30\ \text{°C}$  und  $T_{\text{Inaktivierung}} = 63\ \text{°C}$ .

Die Kurve folgt dem Modell von *Cerf, 1977* (Gl. 5.5), worin  $f$  der Anteil der empfindlichen Mikroorganismen ist und  $k_{\text{max}1}$  bzw.  $k_{\text{max}2}$  die Inaktivierungsrate der jeweils empfindlichen bzw. resistenten Mikroorganismen sind. Das zweiphasige Verhalten bei der Inaktivierung von *E. coli* K12 unter dem Einfluss einer niedrigen Wasseraktivität wurde ebenfalls durch *Shadbolt et al., 1999* beobachtet.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = \log(f \cdot e^{-k_{\text{max}1}t} + (1-f) \cdot e^{-k_{\text{max}2}t}) \quad (5.5)$$

In dem Beispiel aus Abb. 5.49 sind die folgenden Fitparameter enthalten:

$$f = 0,994$$

$$k_{\text{max}1} = 6,01\ \text{min}^{-1}$$

$$k_{\text{max}2} = 0,36\ \text{min}^{-1}$$

Die Auswertung der Ergebnisse des Versuchsplans ( $\log(N/N_0)$  in Abhängigkeit der Inaktivierungszeit) wurde mit Hilfe der Design-Expert<sup>®</sup> Software analysiert. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch den p-Wert beurteilt. Der p-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, eine

Nullhypothese zu verwerfen, wenn die Nullhypothesen abgelehnt wurden. Je kleiner der p-Wert, umso eher sollte die Nullhypothese verworfen werden und je höher ist die Evidenz der Richtigkeit der Alternativhypothese. Für die Interpretation der Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha$ , normalerweise 0,01 oder 0,05, ausgewählt und festgelegt. In dieser Arbeit wurde als Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  ausgewählt.

Die Korrelationsparameter der statistischen Analyse der Ergebnisse befinden sich in Tab. 5-6. Die gesamten Ergebnisse des Versuchsplans befinden sich in Anhang A10. Für die Ergebnisse, welche statistisch signifikant sind, liegt der p-Wert unter 0,05. Diese sind grau hinterlegt.

**Tab. 5-6:** p-Werte für die Inaktivierungsergebnisse und die signifikanten Faktoren

Inaktivierungszeit / min	Mittelwert $\log(N/N_0)$	Stabw	p-Wert	Signifikante Faktoren
2	-3,5	0,3	0,0785	-
5	-4,2	0,4	0,0408	B, C, D, AD
7	-4,4	0,4	0,1224	-
9	-4,5	0,4	0,0433	A, B, AB, AD
11	-4,7	0,5	0,0206	A, B, AB, AD
13	-4,9	0,6	0,098	A, B, AB, AD
15	-5,0	0,7	0,0068	A, B, AB, AD
Fitparameter	Mittelwert	Stabw	p-Wert	Signifikante Faktoren
f / -	0,9996	0,0004	0,0268	B, C
$k_{\max 1} / \text{min}^{-1}$	5,3	1,4	0,0109	A, C, AB, AC, AD
$k_{\max 2} / \text{min}^{-1}$	0,2	0,2	0,1585	-

Die Überlebensrate zeigt für Inaktivierungszeiten zwischen 9 und 15 min einen signifikanten Einfluss auf die beiden folgenden unabhängigen Variablen bzw. Einflussfaktoren:

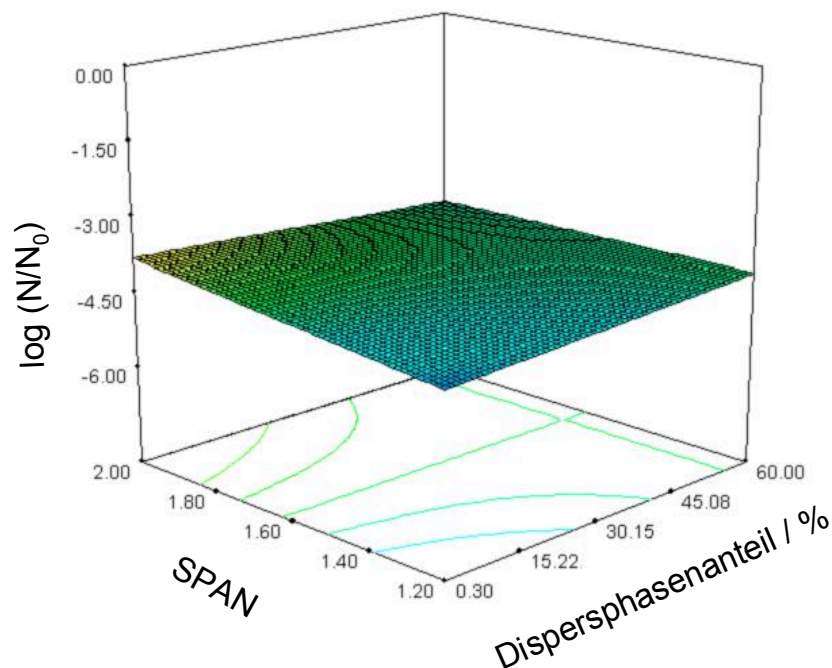
- A – Dispersphasenanteil
- B – Tropfengröße

In diesem Bereich zeigen auch die beiden folgenden Interaktionen von Parametern einen signifikanten Einfluss:

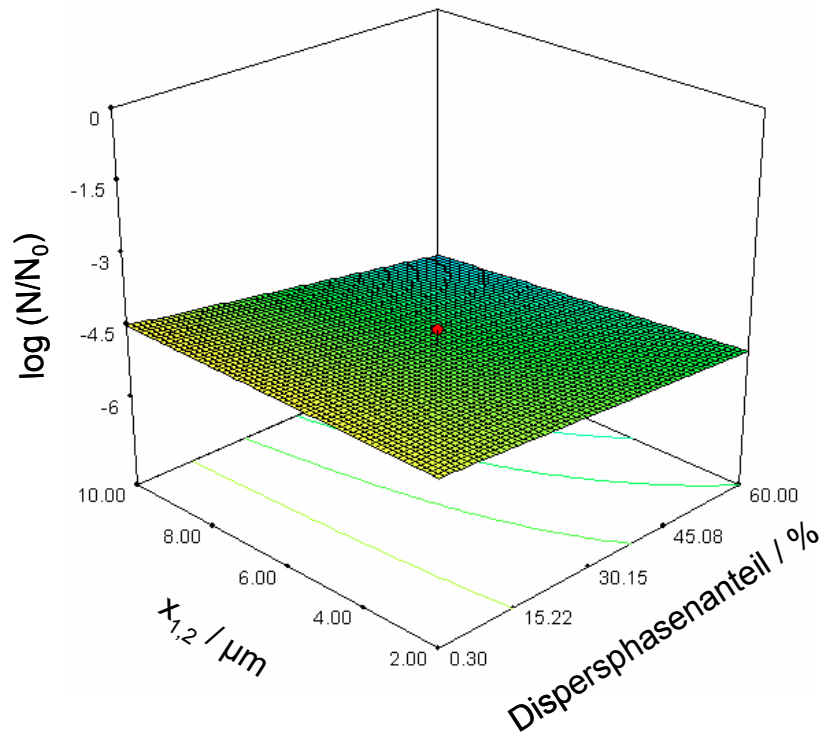
- AB – Dispersphasenanteil x Tropfengröße
- AD – Dispersphasenanteil x SPAN

Obwohl diese Faktoren statistisch signifikant sind, haben sie keinen nennenswerten Einfluss auf die Inaktivierungsergebnisse. Beispiele für die Interaktionen der Faktoren AD und AB sind in Abb. 5.50 und Abb. 5.51 dargestellt.

Verallgemeinernd lässt sich daraus schließen, dass die Inaktivierung von hydrophilen Mikroorganismen in der kontinuierlichen Phase einer O/W-Emulsion erwartungsgemäß nicht vom Dispersphasenanteil, von der Tropfengröße und -verteilung sowie von der Emulgatorkonzentration abhängt, sofern die in Tab. 5-4 genannten maximalen und minimalen Werte nicht über- bzw. unterschritten werden.



**Abb. 5.50:** Einfluss des SPAN-Werts und des Dispersphasenanteils auf die Inaktivierung von *E. coli* K12 (63 °C, 5 min).

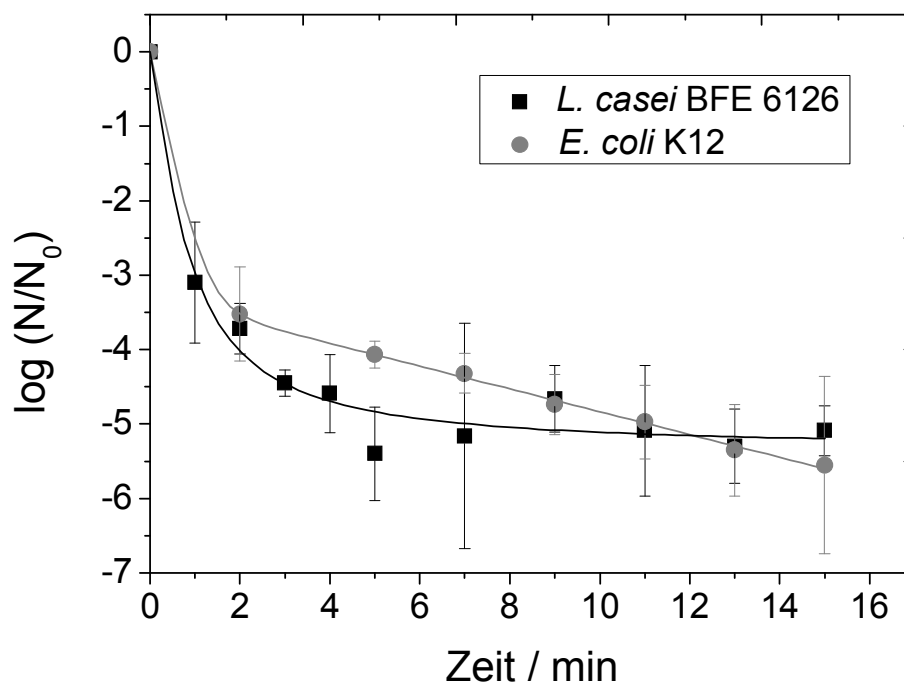


**Abb. 5.51:** Einfluss der Tropfengröße  $x_{1,2}$  und des Dispersphasenanteils auf die Inaktivierung von *E. coli* K12 (63 °C, 13 min).

### 5.3.5 Vergleich der Inaktivierung von hydrophilen und hydrophoben Mikroorganismen in der wässrigen Phase einer O/W-Emulsion

In diesem Abschnitt wurde das Inaktivierungsverhalten von hydrophilen Mikroorganismen (am Beispiel von *E. coli* K12) und von hydrophoben Mikroorganismen (*L. casei* 6126) in einer O/W-Emulsion mit 60 % Dispersphasenanteil und  $x_{1,2} = 2 \mu\text{m}$  bei 63 °C untersucht und verglichen (Abb. 5.52).





**Abb. 5.52:** Vergleich der Überlebenskurven von einem hydrophilen und einem hydrophoben Mikroorganismus (*E. coli* K12 bzw. *L. casei* 6126) in einer O/W-Emulsion.

Obwohl die Mikroorganismen eine unterschiedliche Hydrophobizität besitzen, liegen die Überlebenskurven nahe beieinander. Ein signifikanter Einfluss der Hydrophobizität ist in diesem Beispiel nicht zu erkennen.

### 5.3.6 Zusammenfassung zur thermischen Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen

In diesem Teil der Arbeit wurde hauptsächlich die thermische Inaktivierung von *E. coli* K12 in den Einzelphasen und in O/W-Emulsionen mit unterschiedlichen Eigenschaften erforscht. Zu diesen Untersuchungen wurde die Methode von Pardey, 2007 verwendet, die im Laufe der Forschungsarbeit leicht modifiziert wurde. Um die isothermische Bedingung während des Inaktivierungsversuches zu verbessern, wurden die Reagenzgläser während der gesamten Experimentdurchführung im Wasserbad gehalten.

Es wurde gezeigt, dass bei einer thermischen Behandlung *E. coli* K12 eine höhere Resistenz in Pflanzenöl als in wässrigen Systemen besitzt.

Die Rolle des Ölteils bei der Inaktivierung von Mikroorganismen in Emulsionen konnte durch den Vergleich eines wässrigen Systems mit Emulsionen untersucht werden, deren wässrige Phase die gleiche Zusammensetzung hatte. Da diese Voraussetzung bei Miller 2006 nicht

gegeben war, wurde im Gegensatz zu *Miller 2006* in dieser Arbeit nur ein geringer Einfluss des Ölanteils auf die Inaktivierung von hydrophilen Mikroorganismen in O/W-Emulsionen beobachtet.

Bei der Inaktivierung von *E. coli* K12 in O/W-Emulsionen unter isothermischer Bedingung wurde festgestellt, dass die untersuchten Emulsionseigenschaften keinen nennenswerten Einfluss auf das Inaktivierungsergebnis nehmen.

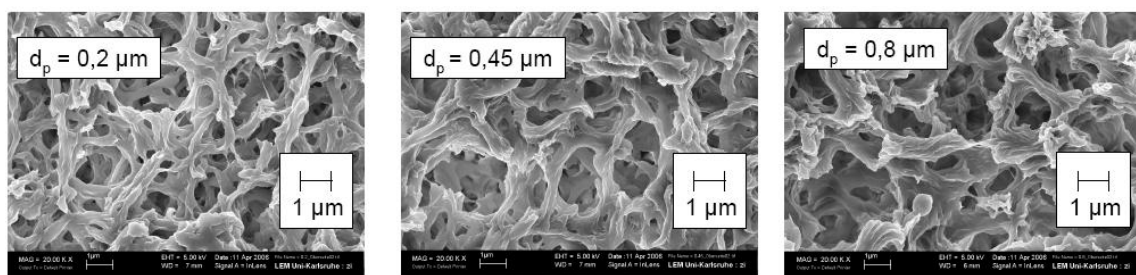
Eine vermutete, niedrigere Inaktivierung von hydrophoben Mikroorganismen (durch eine Verdrängung in die Ölphase) im Vergleich zu hydrophilen Mikroorganismen konnte nicht festgestellt werden.

## 5.4 Herstellen von sterilen Emulsionen durch Premix-Membranemulgieren

Zur experimentellen Untersuchung des Herstellens von sterilen O/W-Emulsionen wurde eine Anlage für das Premix-Membranemulgierverfahren nach *Suzuki et al., 1998* im Institut gebaut. Das Premix-Membranemulgieren sollte nicht nur zum Emulgieren dienen, sondern durch gleichzeitiges Abtrennen vorhandener, insbesondere pathogener Mikroorganismen sterile Emulsionen liefern. Die Sterilfiltration ist insbesondere wichtig für Pharmaprodukte, die erstens steril sein müssen und zweitens häufig temperaturempfindliche Substanzen enthalten, wodurch eine nachträgliche Hitzesterilisation ausgeschlossen ist. Von daher wurde in dieser Arbeit auch das Herstellen von parenteralen Modellemulsionen untersucht.

### 5.4.1 Charakterisierung des Verfahrens

Da das Premix-Membranverfahren noch kaum erforscht ist, wurden als Vorversuche systematische Untersuchungen zum Herstellen von Emulsionen mit Flachmembranen durchgeführt. Zuerst wurden geeignete Membranen ausgesucht. Hydrophile Membranen aus Polyamid (s. Abschnitt 4.6.1) haben sich als sehr geeignet erwiesen, obwohl sie keine definierte Porenform besitzen (Abb. 5.53). Sie stehen mit mittleren Porengrößen von 0,8, 0,45 und 0,2  $\mu\text{m}$  zur Verfügung.

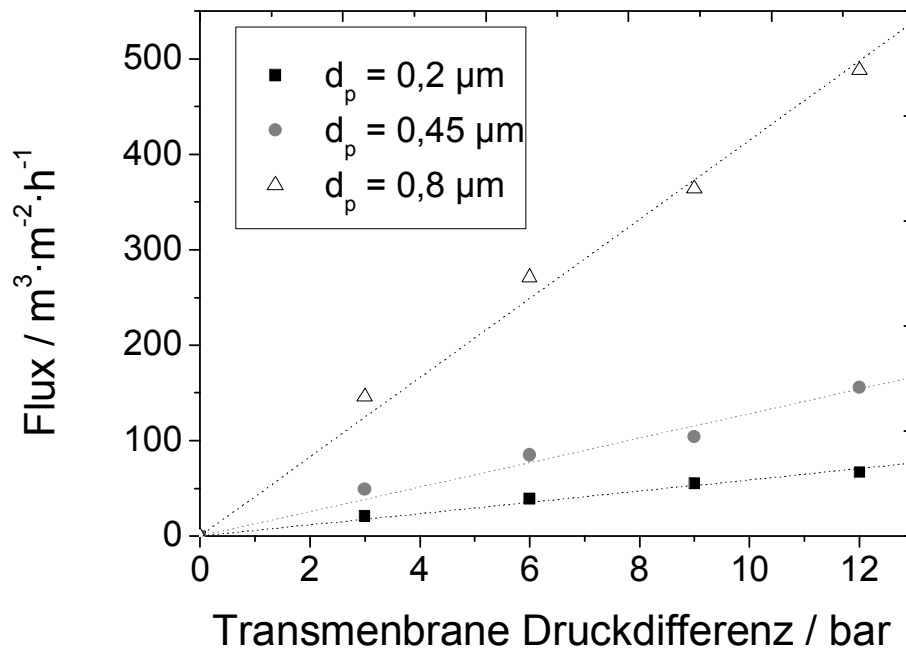


**Abb. 5.53:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Polyamid Membranen mit verschiedenen mittleren Porendurchmessern.

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde der Flux des Wassers, welcher das Durchflussvolumen des Prozesses ( $\text{m}^3/\text{h}$ ) per beanspruchte Membranfläche ( $\text{m}^2$ ) in Abhängigkeit der transmembranen Druckdifferenz beschreibt, ermittelt, Abb. 5.54. Im Bereich der transmembranen Druckdifferenz von 0 bis 12 bar zeigte der Flux, unabhängig von der mittleren Porengröße ( $d_p$ ) der Membran, eine lineare Abhängigkeit, was mit

dem Darcy-Gesetz übereinstimmt (Gl. 2.3). Zudem wurde mit steigender Porengröße der Membran ein Anstieg des Fluxes im Prozess beobachtet.

Im untersuchten Druckbereich sollte daher keine Beschädigung der Membran zu erwarten sein. In den weiteren Versuchen wurde daher mit Druckdifferenz bis zu 12 bar gearbeitet.



**Abb. 5.54:** Flux des Prozesses in Abhängigkeit der Druckdifferenz für Membranen mit verschiedenen mittleren Porengrößen.

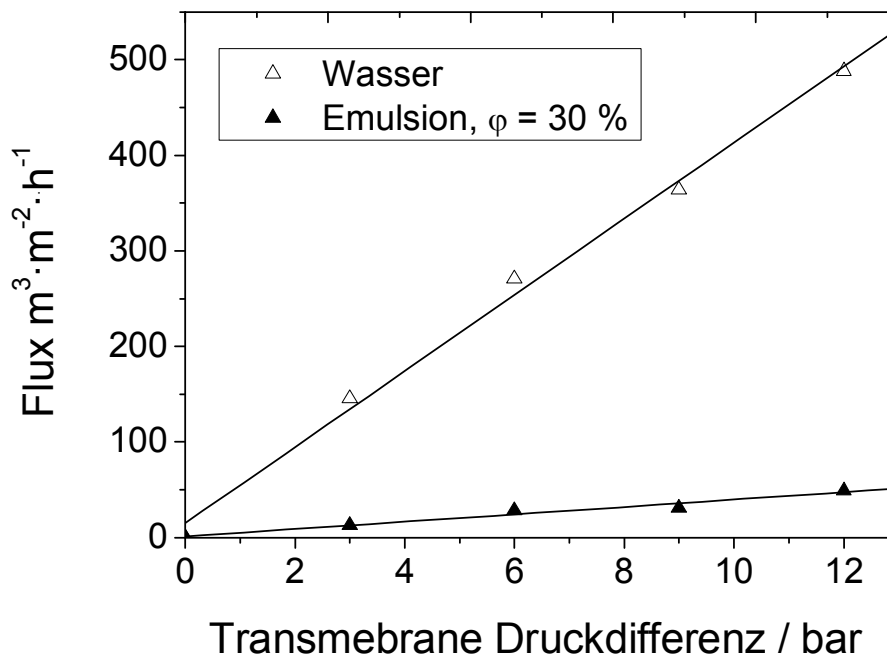
Anhand der Steigung der Geraden (Tab. 5-7) lässt sich die Durchlässigkeit der Membranen nach *Darcy, 1856* (siehe Gl. 2.3) berechnen.

**Tab. 5-7:** Durchlässigkeit der Membranen nach *Darcy, 1856*

Mittlere Porengröße $d_p / \mu\text{m}$	Dicke der Membran (Mittelwert) / $\mu\text{m}$	Durchlässigkeit / $\text{m}^2$
0,2	169	$2,6 \cdot 10^{-12}$
0,45	169	$5,6 \cdot 10^{-12}$
0,8	169	$1,8 \cdot 10^{-11}$

In Abb. 5.55 ist der Flux des Prozesses in Abhängigkeit der transmembranen Druckdifferenz von einer Pflanzenöl/Wasser-Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil im Vergleich zum Flux von Wasser, für eine Membran mit einer mittleren Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$ , dargestellt. Man sieht,

dass der Flux des Wassers sehr viel höher ist als der der Emulsion. Bei einer Druckdifferenz von 12 bar erhält man für die Emulsion einen Flux von ca.  $50 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ , was ungefähr einem Zehntel des Fluxes von Wasser entspricht.



**Abb. 5.55:** Flux des Prozesses in Abhängigkeit der transmembranen Druckdifferenz von Wasser und von einer Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil unter Verwendung einer Membran mit einer mittleren Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$ .

Da für Membranen mit mittleren Porengrößen von  $0,2 \mu\text{m}$  und  $0,45 \mu\text{m}$  der Flux des Prozesses bereits für Wasser sehr niedrig im Vergleich zur Membran mit einer mittleren Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$  ist, wurde in den folgenden Untersuchungen für diese zwei Membranen die Druckdifferenz bei 12 bar konstant gehalten.

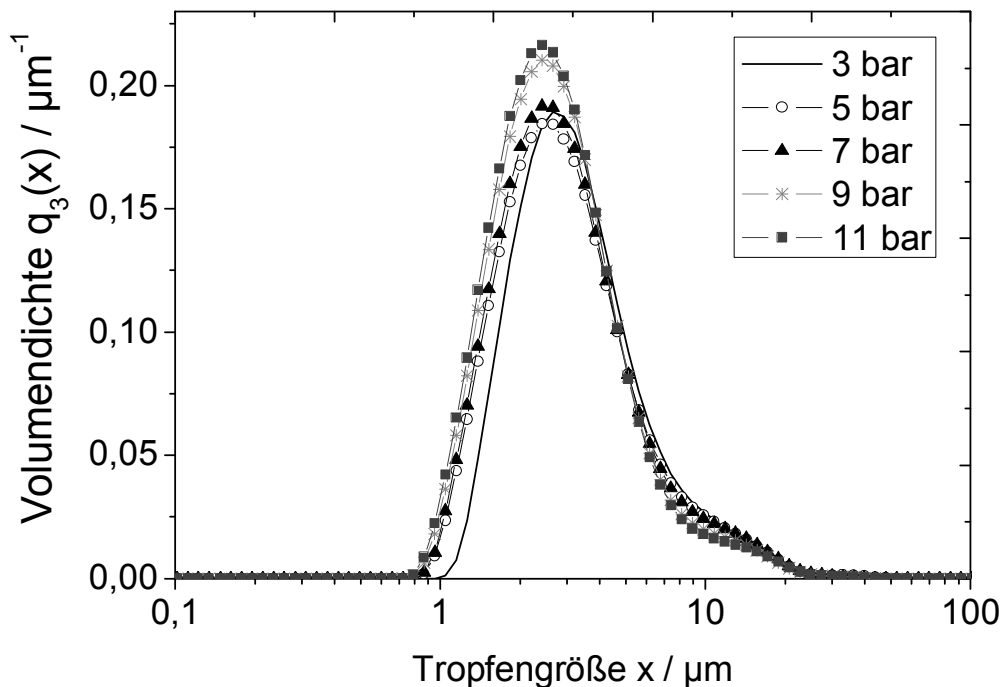
#### 5.4.1.1 Einfluss der Prozessparameter auf das Emulgierergebnis

Im Folgenden wurden relevante Prozessparameter, wie die transmembrane Druckdifferenz, das Mehrfachemulgieren und die mittlere Porengröße der Membran untersucht.

Es wurde eine O/W-Rohemulsion aus Pflanzenöl als Dispersphase und demineralisiertem Wasser als kontinuierliche Phase eingesetzt. Als Emulgator wurde 2 % Tween 80, ein gebräuchlicher Emulgator im Lebensmittelbereich, ausgewählt.

### Transmembrane Druckdifferenz: 3 bis 12 bar

Bei der Untersuchung der transmembranen Druckdifferenz hat sich gezeigt, dass dieser Parameter nur wenig Einfluss auf das Emulgierergebnis nimmt. In Abb. 5.56 sind die Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen dargestellt, welche unter Verwendung der Membran mit mittlerer Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$ , bei Differenzdrücken von 3 bar, 5 bar, 7 bar, 9 bar und 11 bar hergestellt wurden. Ausgehend von der gleichen Rohemulsion ( $\varphi = 20 \%$ ,  $x_{1,2} = 25 \mu\text{m}$ ) wurde nur wenig Einfluss des Druckes auf die Emulgierergebnisse beobachtet. Der Sauterdurchmesser der Emulsion lag bei allen Versuchen bei ca.  $4 \mu\text{m}$ . Betrachtet man die Tropfengrößenverteilung, ist ein hoher Anteil an größeren Tropfen um  $10 \mu\text{m}$  zu erkennen. Eine eindeutige Erklärung dafür ist nicht bekannt. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der Porengrößenverteilung der Membran, wodurch Tropfen der Rohemulsion durch Bereiche mit großen Poren passieren können. Eine zweite Erklärung könnte die Koaleszenz von Tropfen während des Emulgiervorganges sein, verursacht durch die hohe Porosität der Membran (vgl. in diesem Kapitel die Ausführungen unter Emulgatorkonzentration).

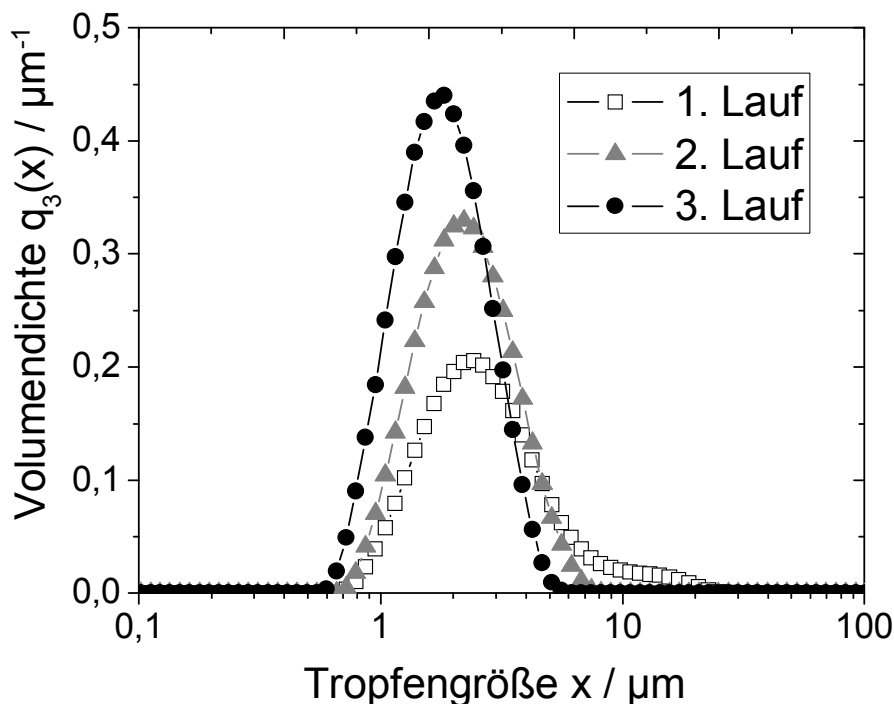


**Abb. 5.56:** Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen, hergestellt bei unterschiedlichen transmembranen Druckdifferenzen von 3 bis 11 bar.

Um den Anteil an großen Tropfen zu verringern, wurde der Prozess wiederholt, indem die Emulsion mehrfach durch die Membran gepresst wurde.

### Mehrfachemulgieren:

Der Prozess des Membranemulgierens wurde hierfür 2-mal wiederholt, also 3-fach durchgeführt. In Abb. 5.57 sind die Tropfengrößenverteilungen einer Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von 30 % nach dem ersten, zweiten und dritten Lauf bei einer Druckdifferenz von 9 bar durch eine Membran ( $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ ) dargestellt. Bereits beim 2. Lauf durch die Membran wurde eine engere Tropfengrößenverteilung und eine Verringerung des Anteils an großen Tropfen erzielt. Nach drei Läufen der Emulsion durch die Membran lag der Sauterdurchmesser bei ca. dem doppelten mittleren Porendurchmesser der Membran.



**Abb. 5.57:** Tropfengrößenverteilungen einer Emulsion nach dem ersten, zweiten und dritten Membrandurchlauf.

### Mittlere Porengröße der Membran:

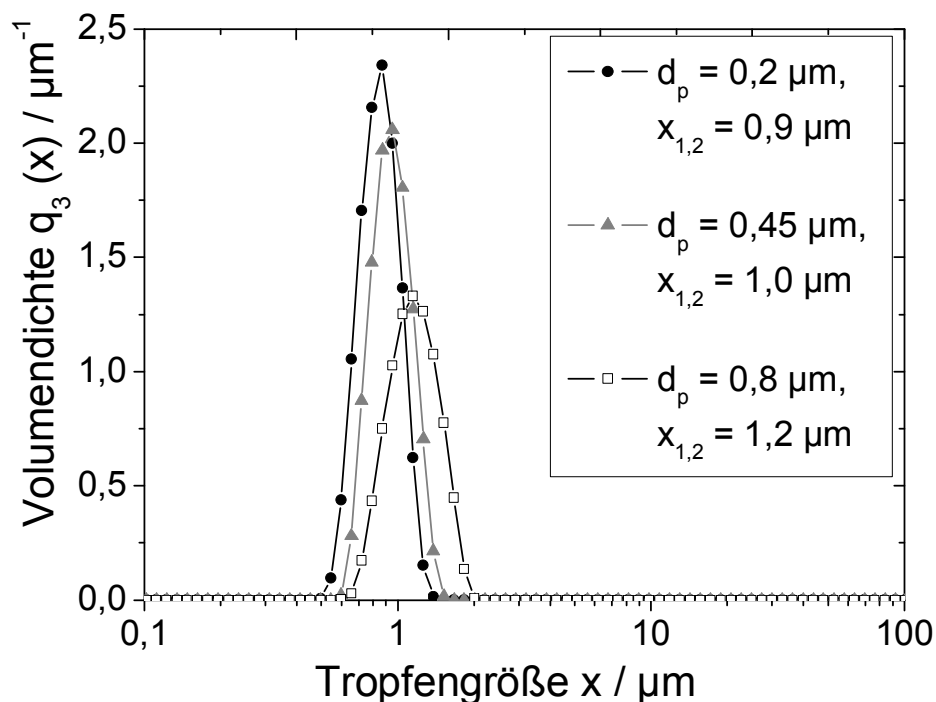
Die Membran mit der mittleren Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$  hat sich als geeignet zum Emulgieren erwiesen. Als nächstes wurden die Membranen mit kleineren mittleren Porengrößen von  $0,2 \mu\text{m}$  und  $0,45 \mu\text{m}$  getestet.

Zur Untersuchung des Einflusses der Porendurchmesser auf die Emulgierergebnisse wurde eine Emulsion mit 5 % Dispersphasenanteil ausgewählt. Bei Emulsionen mit niedrigem Dispersphasenanteil und hoher

Emulgatorkonzentration (2 % Tween 80) sollte keine oder nur wenig Koaleszenz stattfinden und die Zerkleinerung der Tropfen kann besser untersucht werden. In Abb. 5.58 sind die Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen dargestellt, die mit den drei verschiedenen Porengrößen durch dreifaches Emulgieren bei 12 bar hergestellt wurden. Die Rohemulsion hatte einen Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$  von 12  $\mu\text{m}$ . Mit Abnahme der Porengröße der Membran wurde eine Abnahme des Sauterdurchmessers festgestellt.

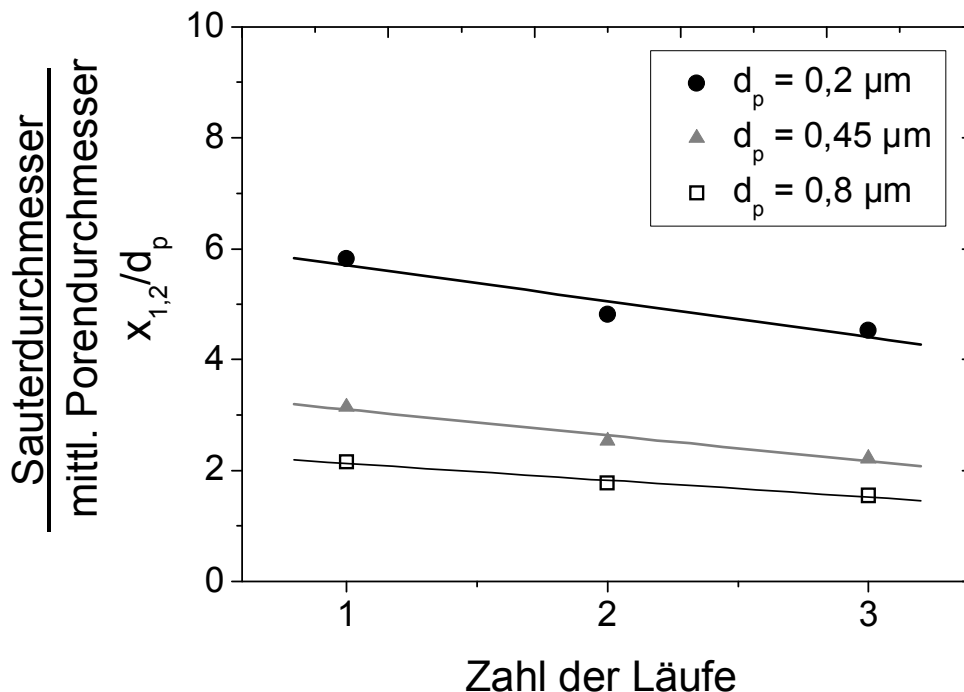
Unter diesen Bedingungen erhielten die Emulsionen nach drei Läufen durch die Membran eine sehr enge Tropfengrößenverteilung. In diesem Fall ist die Breite der Verteilung unabhängig von der Membranporengröße ( $\text{SPAN} = (x_{3,90} - x_{3,10})/x_{3,50} = 0,5$ ).

In Abb. 5.59 ist das Verhältnis des Sauterdurchmessers der Emulsion zum mittleren Porendurchmesser der Membranen ( $d_p$ ) über die Anzahl der Läufe aufgetragen. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit. Mit der Erhöhung der Anzahl der Läufe nahmen die Verhältniswerte ab. Außerdem stellte sich heraus, dass je kleiner die Porengröße der Membran ist, desto höher war das Verhältnis zwischen Tropfengröße und mittlerer Porengröße der Membran ( $x_{1,2}/d_p$ ).



**Abb. 5.58:** Tropfengrößenverteilungen der Emulsionen nach dem dritten Lauf durch Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen.





**Abb. 5.59:** Verhältnis des Sauterdurchmessers zum mittleren Porendurchmesser über der Zahl der Läufe.

#### 5.4.1.2 Einfluss der Zusammensetzung der Emulsion auf das Emulgierergebnis

Relevante Einsatzstoffe für den Emulgierprozess sind die Art des Emulgators, die Emulgatorkonzentration und der Dispersphasenanteil. Die Viskosität der Fluide hat ebenfalls einen Einfluss auf das Emulgierergebnis. Beispiele hierfür sind in Abschnitt 5.4.2 gezeigt.

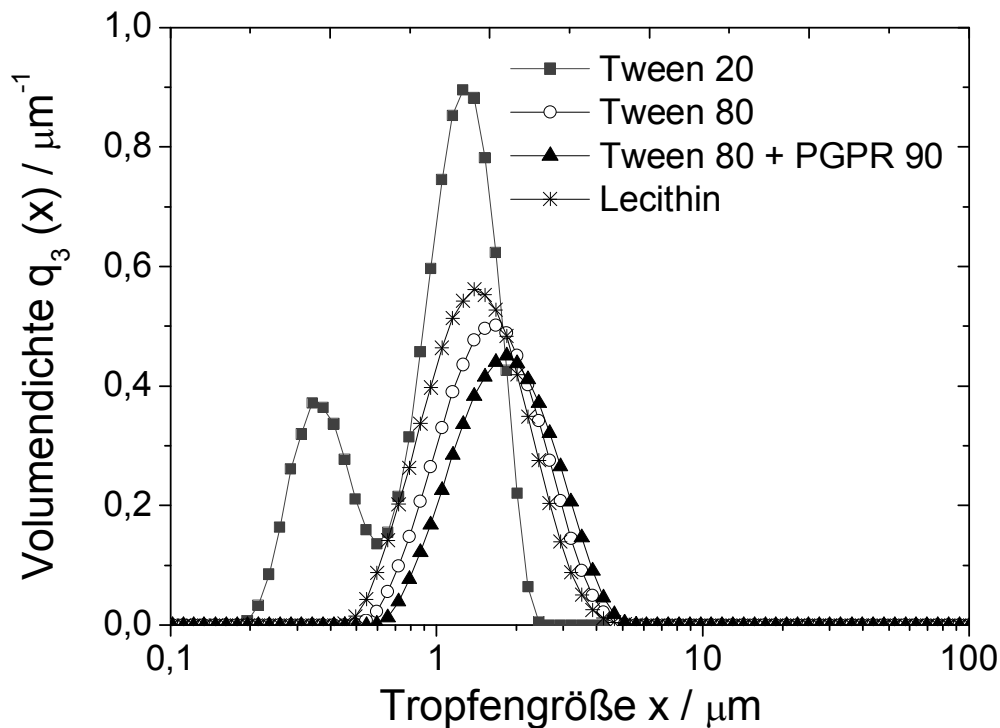
#### Emulgator:

Im Vordergrund steht die noch offene Frage, welche Emulgatoren für das Premix-Membranverfahren in Frage kommen. Verschiedene Emulgatoren bzw. Emulgatormischungen wurden untersucht:

- Tween 80 (2 %)
- Tween 20 (2 %)
- Lecithin (5 %)
- Tween 80 + PGPR 90 (je 2 % in Wasser bzw. Öl)

Die zu dieser Untersuchungsreihe verwendete Rohemulsion besaß einen Sauterdurchmesser von ca.  $25 \mu\text{m}$ . Die Druckdifferenz über die Membran betrug 9 bar. Die Emulsionen wurden drei Mal durch die Membran gepresst. In Abb. 5.60 sind die Volumendichteverteilungen der erzeugten

Emulsionen mit den unterschiedlichen Emulgatoren bzw. Emulgatormischungen dargestellt.

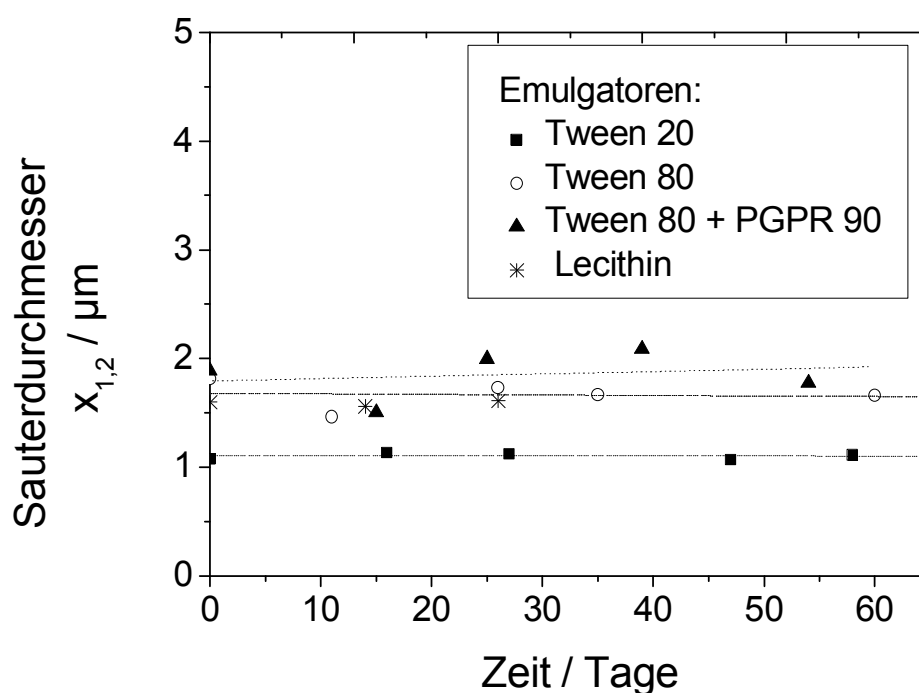


**Abb. 5.60:** Einfluss des Emulgators auf die Volumendichteverteilung der Emulsionen nach drei Läufe durch die Membran.

Die Emulsionen mit den Emulgatoren Tween 80, Tween 80 + PGPR 90 und Lecithin zeigten nach dem 3. Lauf annähernd die gleiche Verteilung. Die Emulsion mit dem Emulgator Tween 20 (mit dem größten HLB-Wert) hatte zwar den kleinsten Sauterdurchmesser, zeigte aber eine bimodale Verteilung. Erklärungen für die kleinen Tropfen der bimodalen Verteilung können in der Bildung von Satelliten-Tropfen oder der unhomogenen Struktur der Membran (Vorhandensein von kleinen Poren), kombiniert mit einer schnellen Stabilisierung der Tropfen nach ihrer Zerkleinerung, liegen.

Unabhängig vom eingesetzten Emulgator waren alle Emulsionen physikalisch stabil, d.h. es traten keine Veränderungen des Sauterdurchmessers über eine Lagerungszeit von ca. 60 Tagen auf (siehe Abb. 5.61). Die Untersuchung der Emulsion mit Lecithin musste nach ca. 25 Tagen abgebrochen werden, da die Emulsion mit Schimmelpilzen befallen war.

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass für das Premix-Membranverfahren keine speziellen Emulgatoren notwendig sind. Insbesondere ist es – entgegen der von *Suzuki et al.*, 1998 publizierten Forderung – unnötig, sowohl einen öl- als auch einen wasserlöslichen Emulgator einzusetzen.

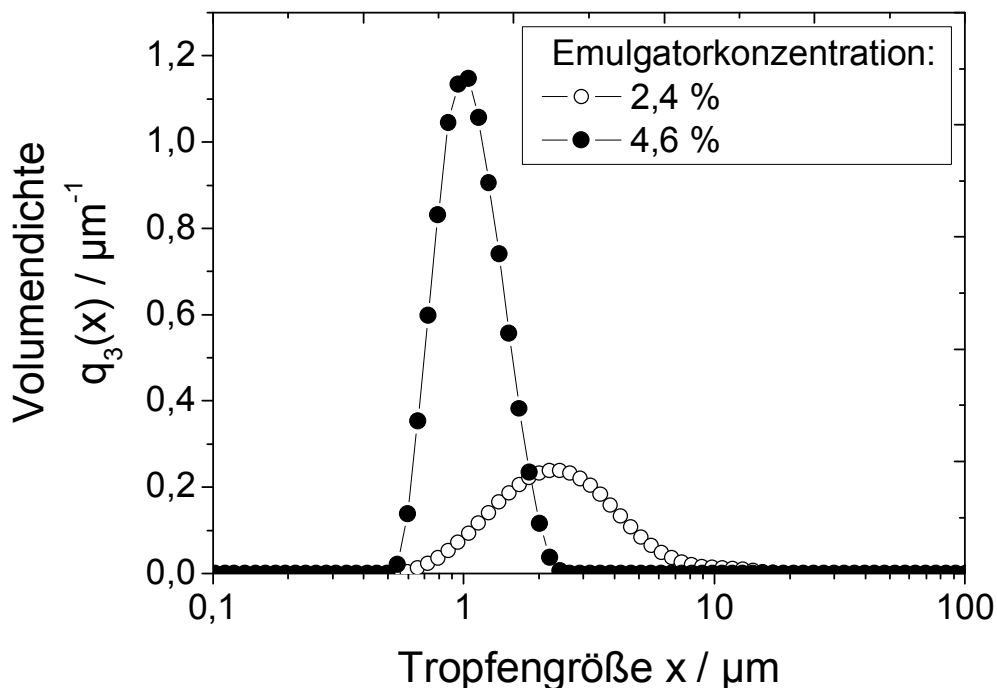


**Abb. 5.61:** Sauterdurchmesser der Emulsionen mit verschiedenen Emulgatoren in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

#### Emulgatorkonzentration:

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Emulgatorkonzentration oberhalb der CMC (critical micelle concentration) auf das Emulgierergebnis untersucht. In Abb. 5.62 (vgl. Badolato et al., 2009<sup>2</sup>) ist ein Beispiel für die Tropfengrößenverteilung einer Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von 72 % unter Verwendung zweier Emulgatorkonzentrationen (2,4 und 4,6 %) dargestellt. Als Emulgator wurde Tween 80 eingesetzt. Es ist zu erkennen, dass die Emulsion mit der hohen Emulgatorkonzentration eine engere Tropfengrößenverteilung mit kleineren Tropfendurchmessern besitzt. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit höherer Emulgatorkonzentration die Tropfen nach der Zerkleinerung schneller stabilisiert werden, also eine geringere Tropfenkoaleszenz stattfindet.

<sup>2</sup>Badolato et al.: Membrane emulsification processes and characterization methods. In: Güell, C.; Monserrat F.; Lopez, F.: Monitoring and Visualizing Membrane-based processes. Page 294. 2009. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.



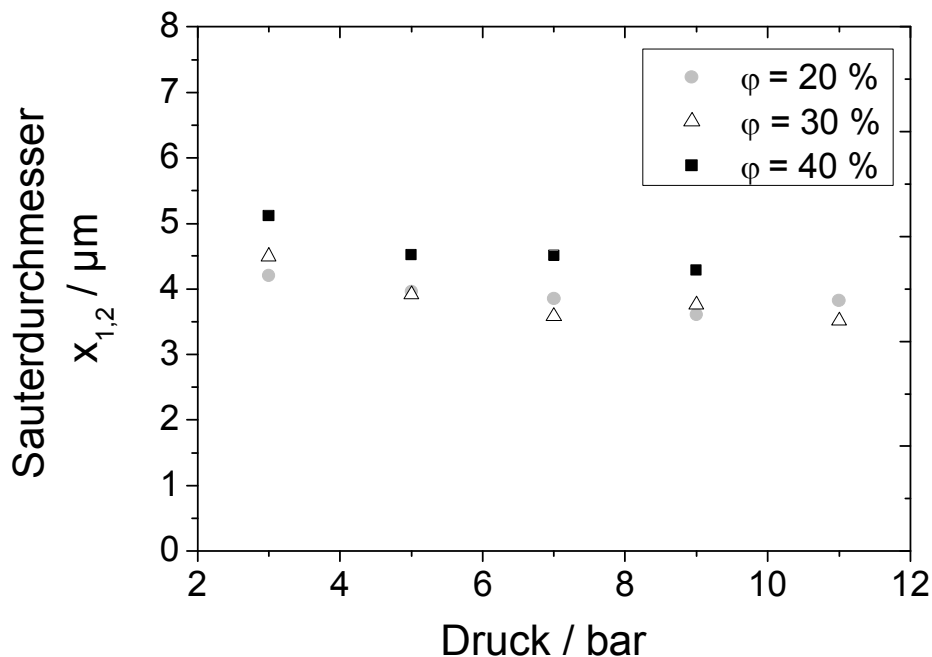
**Abb. 5.62:** Tropfengrößenverteilungen von Emulsionen nach dem dritten Lauf durch eine Membran ( $0,8 \mu\text{m}$ ) mit unterschiedlichen Emulgatorkonzentrationen.

Ähnliche Untersuchungen verschiedener Emulgatoren und Emulgatorkonzentrationen wurden von *Vladisavljevic' et. al., 2006* mittels einer Art Premix-Verfahren durchgeführt. Anstatt Plattenmembranen wurde dabei eine Rohrmembran aus SPG (Shirasu porous glass) eingesetzt. Untersucht wurden die Emulgatoren Tween 20 (0,1 - 2 %), SDS (sodium dodecyl sulfate - 0,01 - 2 %) und  $\beta$ -Lactoglobulin (0,5 - 2 %). Der kleinste Wert der mittleren Tropfengröße wurde in Emulsionen mit SDS erreicht. Dies wurde durch die Herabsetzung der Grenzflächenspannung, wodurch kleinere Tropfen erzielt werden konnten und die Geschwindigkeit durch die Poren erhöht wurde, erklärt. Emulsionen mit Tween 20 lieferten einen etwas größeren Wert und  $\beta$ -Lactoglobulin den größten Wert für die mittlere Tropfengröße. Auch bei *Vladisavljevic' et. al., 2006* zeigte die Emulgatorkonzentration einen Einfluss auf die Tropfengröße der Emulsion, insbesondere nach dem ersten und zweiten Lauf durch die Membran.

#### Dispersphasenanteil:

Der Dispersphasenanteil hat einen geringen Einfluss auf das Emulgierergebnis. Tendenziell lässt sich jedoch sagen, dass eine Erhöhung des Dispersphasenanteils eine Tropfenvergrößerung zur Folge hat. Abb. 5.63 zeigt die Sauterdurchmesser für Emulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen (20 %, 30 % und 40 %) nach einem Lauf durch die

Membran mit einer Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$ . Die Emulsionen stammen von der gleichen Rohemulsion. Die verschiedenen Dispersphasenanteile wurden durch Verdünnung der Rohemulsion (40 % Dispersphasenanteil) mit Wasser und 2 % Emulgator hergestellt. Der Sauterdurchmesser der Rohemulsion betrug ca.  $25 \mu\text{m}$ . Zusätzlich wurde der Druck zwischen 3 und 11 bar variiert. Wie bereits erwähnt, zeigt auch hier der Druck nur einen geringen Einfluss auf die Emulgierergebnisse.

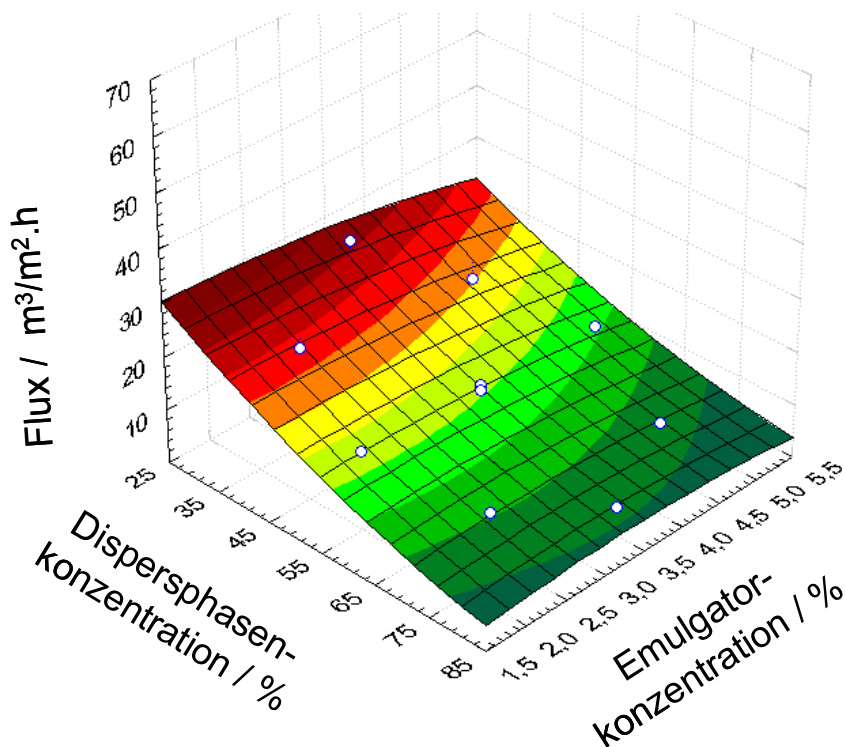


**Abb. 5.63:** Sauterdurchmesser in Abhängigkeit des Drucks für Emulsion mit verschiedenen Dispersphasenanteilen.

Mit Hilfe des Premix-Membranemulgierens und unter Verwendung von Membranen mit einer mittleren Porengröße von  $0,8 \mu\text{m}$  können Emulsionen mit Dispersphasenanteilen von bis zu 90 % (O/W-Emulsion) hergestellt werden.

Mit der Erhöhung der Dispersphase der Emulsion erfolgt eine Abnahme des Prozessfluxes. In Abb. 5.64 (vgl. Badolato et al., 2009<sup>3</sup>) ist die Abhängigkeit des Dispersphasenanteils der Emulsionen auf den Prozessflux bei einer konstanten Druckdifferenz von 12 bar dargestellt. Der Prozessflux variiert zwischen  $5 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  und  $30 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  für Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von 80 % bzw. 30 %, unabhängig von der Emulgatorkonzentration (2 % bis 5 %).

<sup>3</sup>Badolato et al.: Membrane emulsification processes and characterization methods. In: Güell, C.; Monserrat F.; Lopez, F.: Monitoring and Visualizing Membrane-based processes. Page 296. 2009. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.



**Abb. 5.64:** Prozessflux in Abhängigkeit des Dispersphasenanteils und der Emulgatorkonzentration.

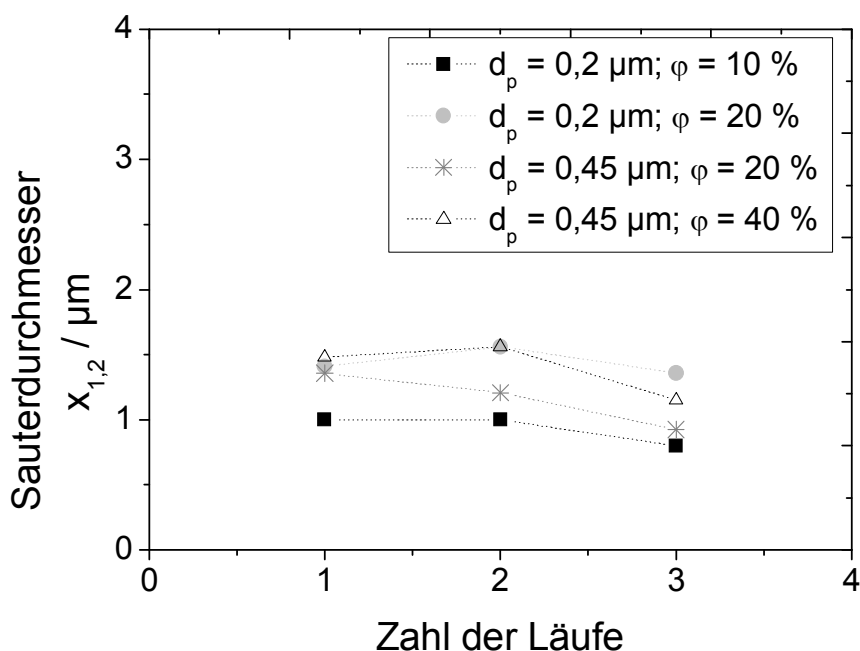
#### 5.4.1.3 Einsatzbereiche für Membranen mit mittlerer Porengröße von 0,2 µm und 0,45 µm

Die Nutzung von Membranen mit mittlerer Porengröße von 0,2 µm und 0,45 µm ist begrenzt, wenn eine bestimmte Druckdifferenz nicht überschritten werden kann. In dieser Arbeit wurde diese Druckdifferenz auf 12 bar festgelegt, da dies der maximalen mechanischen Beanspruchung der Membran entspricht.

Die im folgenden hergestellten Emulsionen stammen von der gleichen Rohemulsion ( $x_{1,2} = 51 \mu\text{m}$ ,  $x_{3,99} = 153 \mu\text{m}$ ).

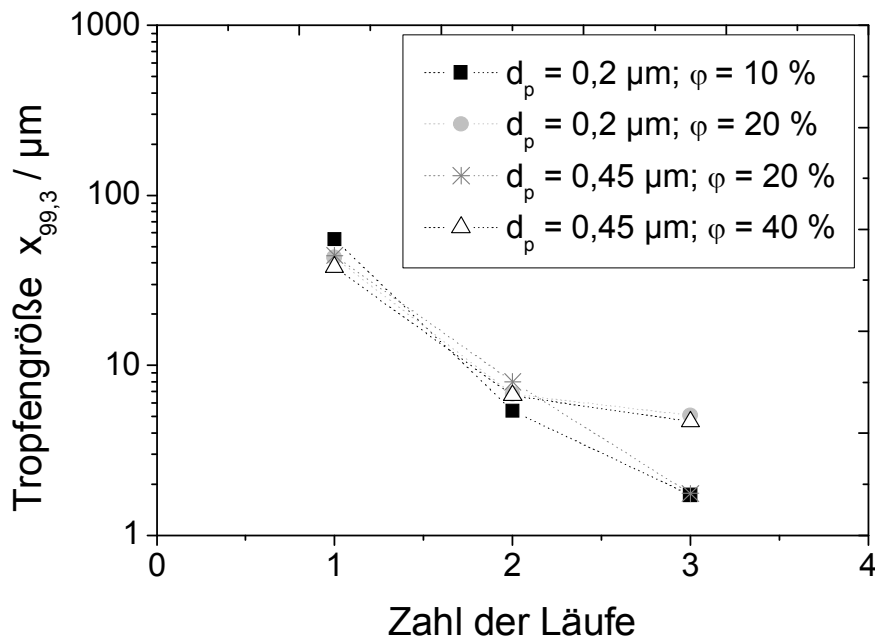
Die Rohemulsionen mit verschiedenen Dispersphasenanteilen wurden durch Verdünnung der Rohemulsion (40 % Dispersphasenanteil) mit Wasser und 2 % Emulgator hergestellt. Für Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,2 µm wurden Emulsionen mit 10 und 20 % Dispersphasenanteil und für Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,45 µm wurden Emulsionen mit 20 und 40 % Dispersphasenanteil getestet.

Abb. 5.65 und Abb. 5.66 zeigen jeweils die Verläufe des Sauterdurchmessers  $x_{1,2}$  bzw. der Tropfengröße  $x_{3,99}$  in Abhängigkeit der Zahl der Läufe durch die Membranen.



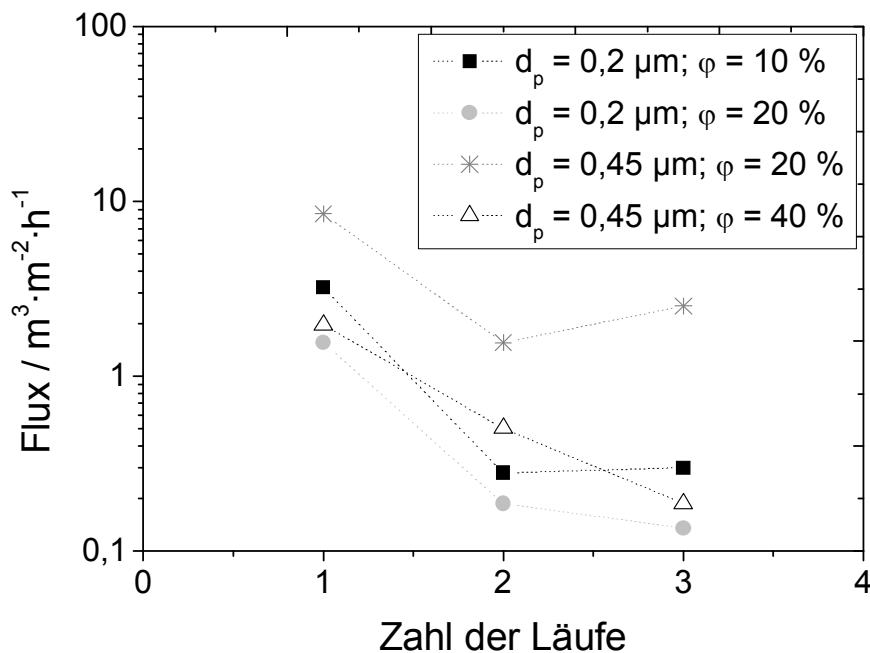
**Abb. 5.65:** Sauterdurchmesser der Emulsionen nach dem ersten, zweiten und dritten Lauf durch die Membran. Einfluss der Porengröße und des Dispersphasenanteils.

Dabei zeigte der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$  keine deutliche Abhängigkeit von der Anzahl der Läufe durch die Membran (Abb. 5.65). Eine Tendenz der Verkleinerung der Tropfen durch das Mehrfachemulgieren erkennt man jedoch, wenn man die maximale Tropfengröße ( $x_{3,99}$ ) betrachtet (Abb. 5.66). Mit niedrigen Dispersphasenanteilen der Emulsionen und unter Verwendung von Membranen mit kleineren Porengrößen können Emulsionen mit kleineren Tropfen hergestellt werden.



**Abb. 5.66:** Tropfengröße  $x_{3,99}$  nach dem ersten, zweiten und dritten Lauf durch die Membran. Einfluss der Porengröße und des Dispersphasenanteils.

Ein Parameter, der entscheidenden Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit des Membranemulgiervorgangs nimmt, ist der Flux des Prozesses. Abb. 5.67 zeigt den Flux in Abhängigkeit der Durchläufe durch die Membran.



**Abb. 5.67:** Flux des Prozesses während des ersten, zweiten und dritten Laufes durch die Membran. Einfluss der Porengröße und des Dispersphasenanteils.



Bereits durch das Mehrfachemulgieren gab es eine Abnahme des Prozessfluxes. Die Ursache dafür kann das Fouling der Membran sein. Der niedrigste Flux wurde unter Verwendung der 0,2  $\mu\text{m}$  Membranporengröße und einer Emulsion mit 20 % Dispersphasenanteil erreicht. Für die Membranporengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  ist der Flux noch akzeptabel.

Durch den niedrigen Produktdurchsatz sollten die Membranen mit mittlerer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  und 0,45  $\mu\text{m}$  in erster Linie für hochwertige Produkte mit niedrigem Dispersphasenanteil eingesetzt werden.

Um eine genauere Aussage über den Flux des Prozesses zu treffen, wären Untersuchungen zum kontinuierlichen Betrieb des Verfahrens notwendig.

#### 5.4.2 Herstellung von parenteralen Emulsionen mittels des Premix-Membranemulgierens

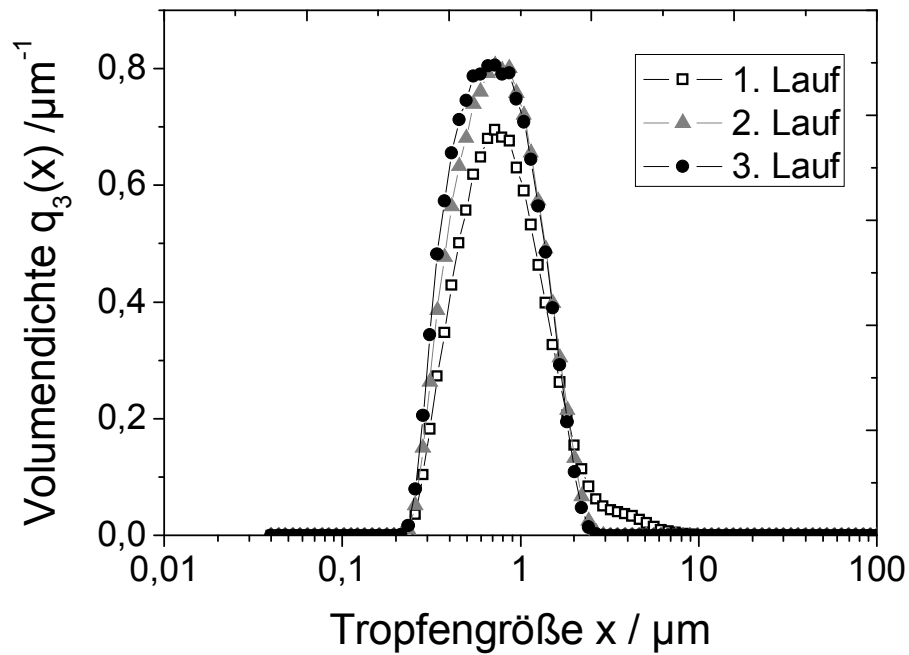
Eine weitere mögliche Anwendung des Premix-Membranemulgierens ist die Herstellung von parenteralen Emulsionen. Diese Emulsionen müssen zwei Eigenschaften erfüllen: Erstens, sie müssen steril sein und zweitens, sie dürfen keine Tropfen enthalten, die größer sind als die Durchmesser der Blutkapillaren (3  $\mu\text{m}$  bis 8  $\mu\text{m}$ ). Ziel war es also, Tropfengrößen kleiner als 3  $\mu\text{m}$  zu erhalten.

Für die geplanten Untersuchungen sollten daher die bereits bekannten Nylon-Membranen mit geringeren Porengrößen (0,45  $\mu\text{m}$  und 0,2  $\mu\text{m}$ ) in der Premix-Membrananlage eingesetzt werden. Es wurde im ersten Schritt untersucht, ob die Membranen mit kleineren Poren zur Herstellung der parenteralen Emulsionen geeignet sind.

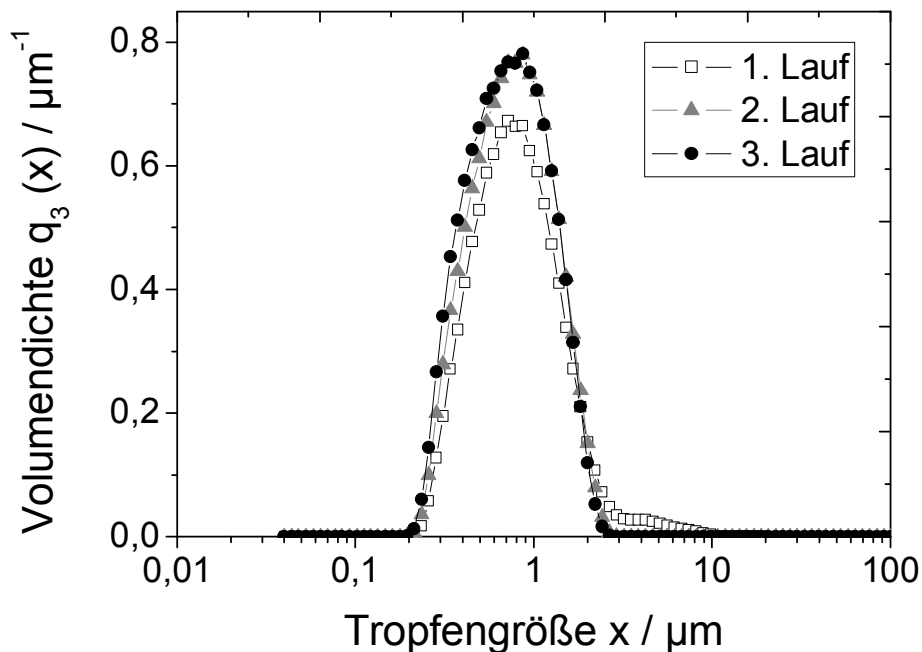
Die Herstellung der Rohemulsionen wurde bereits in Kap. 4.6.2 beschrieben. Der Vorlagebehälter der Premix-Membrananlage wurde mit dieser Rohemulsion gefüllt. Die Emulsionen wurden dreifach mit einer Druckdifferenz von 12 bar durch die Membran gepresst, und nach jedem Lauf wurde eine Probe zur Tropfengrößenbestimmung entnommen.

Beide Membranen haben sich für diese Anwendung als geeignet erwiesen. Die Emulgiererergebnisse waren gut reproduzierbar und obwohl die Membranen unterschiedliche mittlere Porengrößen besitzen, sind die Verteilungen sehr ähnlich. Die gleiche Tendenz wurde bereits im Abschnitt 5.4.1.1 gezeigt.

Abb. 5.68 und Abb. 5.69 zeigen die Volumendichteverteilungen der Emulsionstropfen, die mit Membranen der mittleren Porengrößen von 0,2  $\mu\text{m}$  bzw. 0,45  $\mu\text{m}$  erzeugt wurden.



**Abb. 5.68:** Volumendichteverteilung einer O/W-Emulsion, hergestellt mit einer Membran der mittleren Porengröße von  $0,2 \mu\text{m}$ , nach ein, zwei und drei nacheinander ausgeführten Durchläufen.



**Abb. 5.69:** Volumendichteverteilung einer O/W-Emulsion, hergestellt mit einer Membran der mittleren Porengröße von  $0,45 \mu\text{m}$ , nach ein, zwei und drei nacheinander ausgeführten Durchläufen.

Der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$  und der maximale Tropfendurchmesser  $x_{3,99}$  der Emulsionen nach jedem Durchlauf sind in Tab. 5-8 für beide Membranen zusammengefasst.

**Tab. 5-8:** Sauterdurchmesser und maximale Tropfendurchmesser der Emulsionen nach bis zu drei Läufen durch Membranen mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  und 0,45  $\mu\text{m}$

Membranporengröße $d_p / \mu\text{m}$	0,2			0,45		
	Zahl der Läufe	1	2	3	1	2
Sauterdurchmesser $x_{1,2} / \mu\text{m}$	1,0	0,9	0,8	1,0	0,9	0,9
Max. Tropfendurchmesser $x_{3,99} / \mu\text{m}$	7,2	2,4	2,3	10,6	2,4	2,3

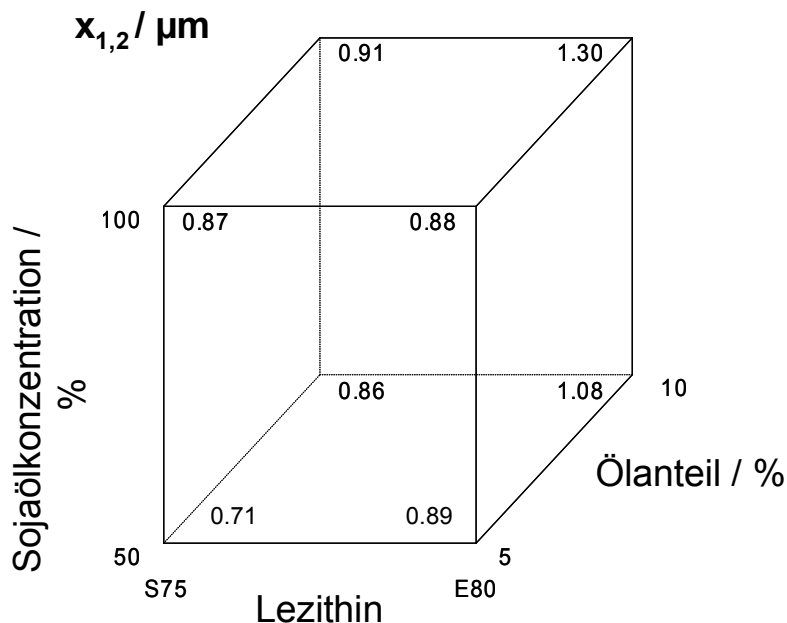
Bereits nach dem zweiten Membrandurchlauf waren die Tropfen der Emulsionen, unabhängig von der Porengröße der Membran, kleiner als 3  $\mu\text{m}$ , wodurch das geforderte Ziel erreicht wurde. Weiterhin wurden nur geringe Unterschiede in den Volumendichteverteilungen nach dem 2. und 3. Lauf beobachtet.

Die hier gezeigten Emulgiererergebnisse stimmen grundsätzlich mit den vorher gezeigten Ergebnissen überein, auch wenn bei den früheren Untersuchungen Membranen mit einer mittleren Porengröße von 0,8  $\mu\text{m}$  verwendet wurden. In beiden Fällen ist ein zweiter Durchlauf erforderlich. Dagegen liefert ein dritter Durchlauf keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse.

Mit der Membran der mittleren Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  wurde eine Versuchsplanung durchgeführt. Der Differenzdruck wurde auf 12 bar festgelegt und die Emulsionen wurden zweimal durch die Membran gepresst. Als Prozessparameter wurde der Anteil der dispersen Phase der Emulsion (5 oder 10 %), der eingesetzte Emulgator (Soja-Lezithin Lipoid S75 oder Ei-Lezithin Lipoid E80) und die Zusammensetzung der öligen Phase, 100 % Sojaöl oder eine Mischung aus 50 % Sojaöl und 50 % MCT (Medium chain triglyceride) untersucht. Im „Experimental Design“ wurden der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$ , die Tropfengröße  $x_{3,99}$ , die Breite der Verteilung (SPAN) und der Flux des Prozesses analysiert.

Abb. 5.70 zeigt den Sauterdurchmesser in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Emulsionen. Die kleinsten Sauterdurchmesser wurden für Emulsionen mit 5 % Dispersphasenanteil erreicht. Emulsionen mit dem Emulgator S75 zeigen geringfügig kleinere Sauterdurchmesser als Emulsionen mit dem Emulgator E80. Nur geringe Unterschiede zeigten die Sauterdurchmesser für Emulsionen mit Sojaöl im Vergleich zu Emulsionen

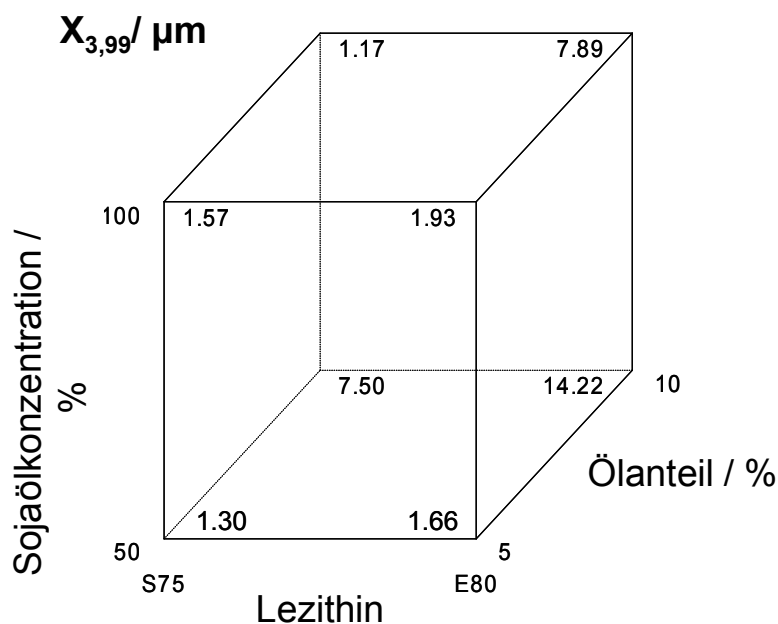
mit der Ölmischung, wobei der Sauterdurchmesser der Emulsion mit der Ölmischung geringfügig kleiner war.



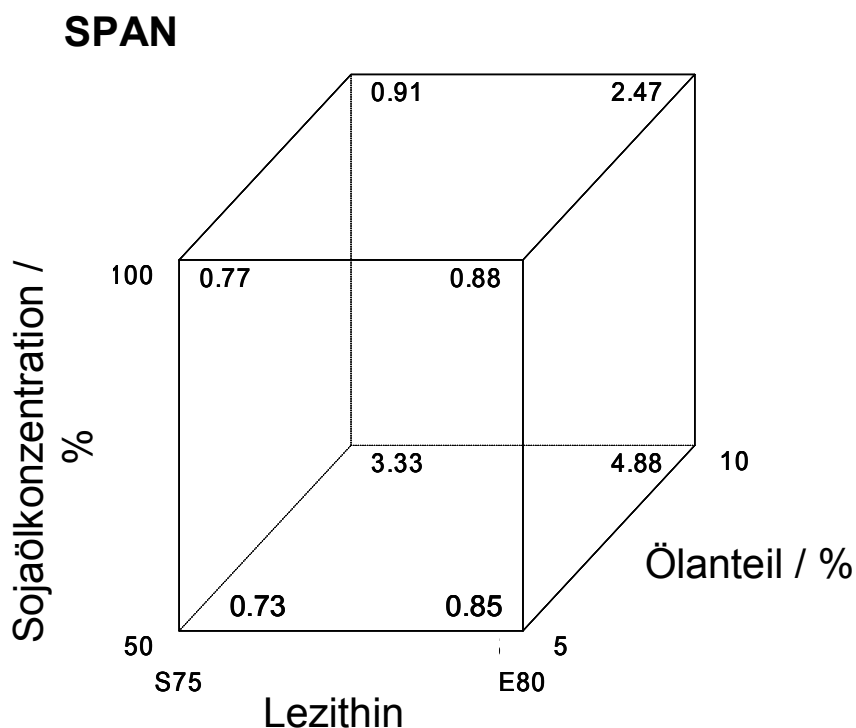
**Abb. 5.70:** Darstellung des Sauterdurchmessers  $x_{1,2}$  in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Emulsionen.

Betrachtet man die Tropfengröße  $x_{3,99}$ , so wird der Einfluss der Zusammensetzung auf das Emulgierergebnis deutlicher (Abb. 5.71). Große  $x_{3,99}$ -Werte wurden für Emulsionen mit der Ölmischung (50 % Sojaöl und 50 % MCT) und 10 % Ölanteil sowie für Emulsionen mit dem Emulgator E80 und 10 % Ölanteil ermittelt. Kleinere  $x_{3,99}$ -Werte wurden, mit Ausnahme der Rezepturen mit der Ölmischung, in Emulsionen mit dem Emulgator S75 erzielt.

Des Weiteren wurde die Breite der Verteilung (SPAN) für die verschiedenen Rezepturen berechnet und verglichen (Abb. 5.72). Engere Verteilungen zeigten die Emulsionen mit niedrigem Dispersphasenanteil (5 %) und Emulsionen mit dem Emulgator S75. Einzige Ausnahme ist wieder der Einsatz der Ölmischung in der Emulsionsrezeptur.

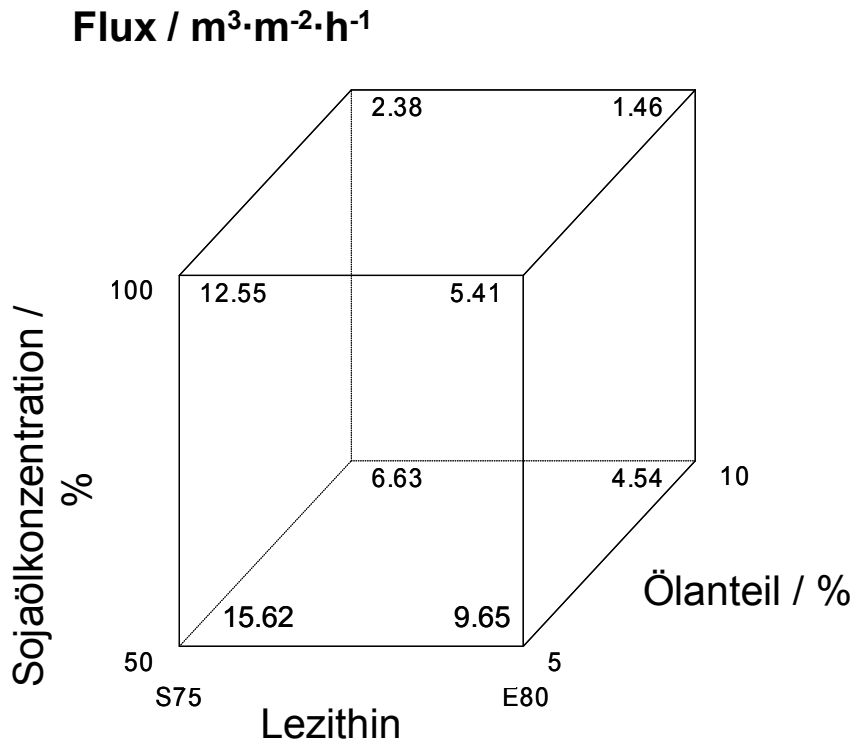


**Abb. 5.71:** Darstellung der Tropfengröße  $x_{3,99}$  in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Emulsionen.



**Abb. 5.72:** Darstellung der Breite der Verteilung (SPAN) der Emulsionen in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Emulsionen.

Wie erwartet zeigten die Rezepturen mit der Ölmischung einen höheren Flux des Prozesses im Vergleich zu den Rezepturen mit reinem Sojaöl, da das MCT eine niedrigere Viskosität als das Sojaöl besitzt (Abb. 5.73). Die Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse von Abschnitt 5.4.1.2. Die Emulsionen mit dem niedrigen Dispersphasenanteil (5 %) ermöglichen einen höheren Flux des Prozesses im Vergleich zu den Emulsionen mit hohem Dispersphasenanteil (10 %). Emulsionen mit Emulgator S75 zeigten einen etwas höheren Prozessflux als Emulsionen mit dem Emulgator E80.



**Abb. 5.73:** Darstellung des Prozessfluxes in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Emulsion.

Betrachtet man das hier angestrebte Zielergebnis bezüglich der kleineren Tropfen, engeren Verteilung und des höheren Fluxes, so sind die Rezepturen mit Emulgator S75 und Ölmischung wesentlich günstiger. Ein Dispersphasenanteil von 5 % wäre von Vorteil, ein Anteil von 10 % ist allerdings für diese Art des Produktes üblich.

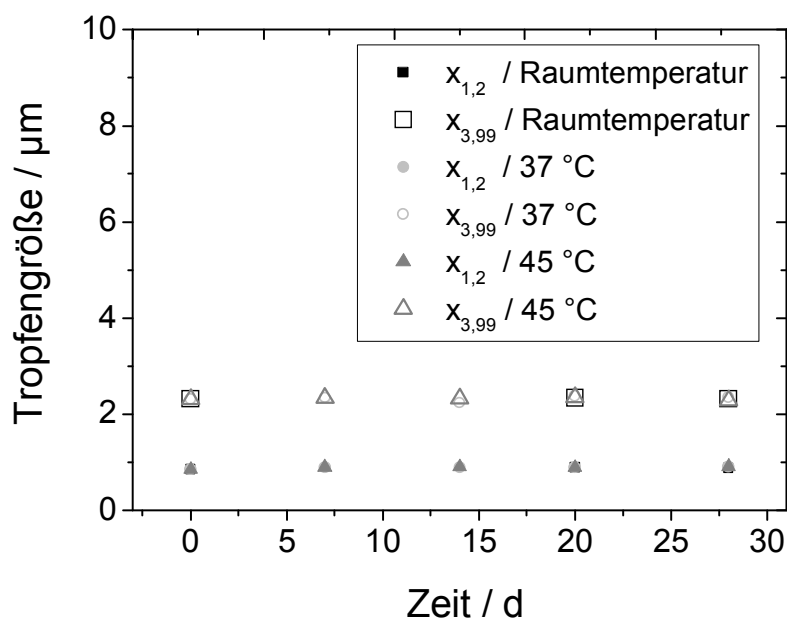
Im Verlauf der Untersuchung mussten neue Membranen mit der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  angeschafft werden. Aus bisher noch nicht geklärten Gründen hatten diese Membranen andere Eigenschaften als diejenigen der ersten Lieferung und erwiesen sich als ungeeignet; die Emulsionen brachen unmittelbar nach der Herstellung. Die Ursache für dieses Verhalten ist bisher nicht geklärt. Denkbar wäre eine veränderte Oberflächenladung oder eine andere Benetzung der neuen Membranen gegenüber den früher

verwendeten. Für weitere Versuche wurden daher nur Membranen mit einer mittleren Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$  eingesetzt.

#### 5.4.2.1 Physikalische Stabilität der Emulsion

In Abb. 5.74 ist der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$  und der maximale Tropfendurchmesser  $x_{3,99}$  einer Emulsion über die Lagerungszeit bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur,  $37\ ^\circ\text{C}$  und  $45\ ^\circ\text{C}$ ) dargestellt.

Der Sauterdurchmesser  $x_{1,2}$  und der maximale Tropfendurchmesser  $x_{3,99}$  der Emulsion bleiben während der Lagerungszeit unverändert, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei höheren Temperaturen. Damit kann die Emulsion als physikalisch stabil angesehen werden.



**Abb. 5.74:** Tropfengrößen  $x_{1,2}$  und  $x_{3,99}$  einer Emulsion, die mit dem Premix-Membranemulgieren ( $d_p = 0,45\ \mu\text{m}$ ) und zwei Durchläufen hergestellt wurde, in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

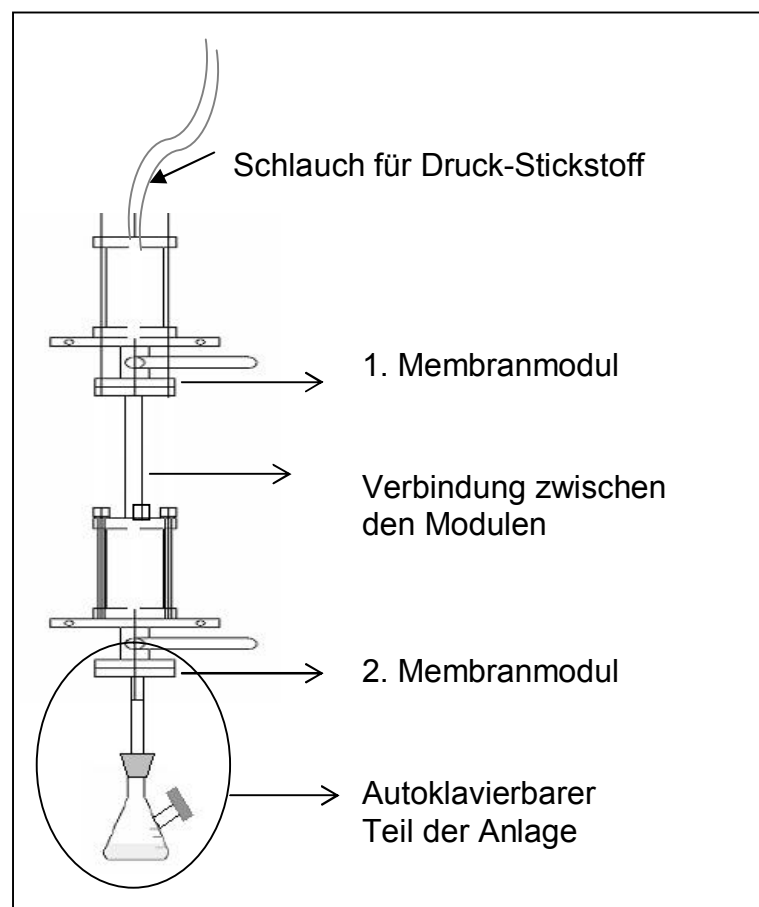
#### 5.4.2.2 Mikrobiologische Stabilität der Emulsion

In einem weiteren Schritt zur Stabilitätsuntersuchung wurden gezielt verkeimte Rohemulsionen mittels des Premix-Verfahrens emulgiert, wobei insbesondere zu prüfen war, ob die Feinemulsionen am Ende des Prozesses keimreduziert oder sogar steril sind.

Hierzu wurde die hydrophile Phase vor dem Emulgieren gezielt mit hydrophilen Mikroorganismen verkeimt. Es wurden vorzugsweise kugelförmige Mikroorganismen ausgewählt, da die Größe genauer durch

den Sauterdurchmesser charakterisiert werden kann. Die Größe der Mikroorganismen wurde mit einem Laserlichtbeugungsspektrometer (Couter LS 230) analysiert. Die Keimzahl wurde mittels Ausplattieren vor und nach dem Premix-Membranemulgieren bestimmt. Die Emulsionsrezeptur bestand aus 10 % Sojaöl für parenterale Anwendungen und Emulgator S75.

Da die vorangegangenen Versuchsergebnisse gezeigt haben, dass zwei Durchläufe durch die Membran genügen, um hinreichend feine Emulsionen herzustellen, wurde das Verfahren so verändert, dass ein kontinuierlicher Betrieb grundsätzlich möglich ist. Anstelle von zwei Durchläufen wurden zwei Module entsprechend Abb. 5.75 in Serie geschaltet. Bei der ursprünglichen Konfiguration war wegen einer noch fehlenden Druckregleinheit kein kontinuierlicher Betrieb möglich. Daher wurde der Schlauch für Druck-Stickstoff zunächst mit dem ersten Gefäß verbunden und die Emulsion bei 12 bar durch die Membran in das zweite Gefäß gepresst. Danach wurde das zweite Gefäß mit Druck beaufschlagt und die Emulsion wieder bei 12 bar durch die zweite Membran gepresst.



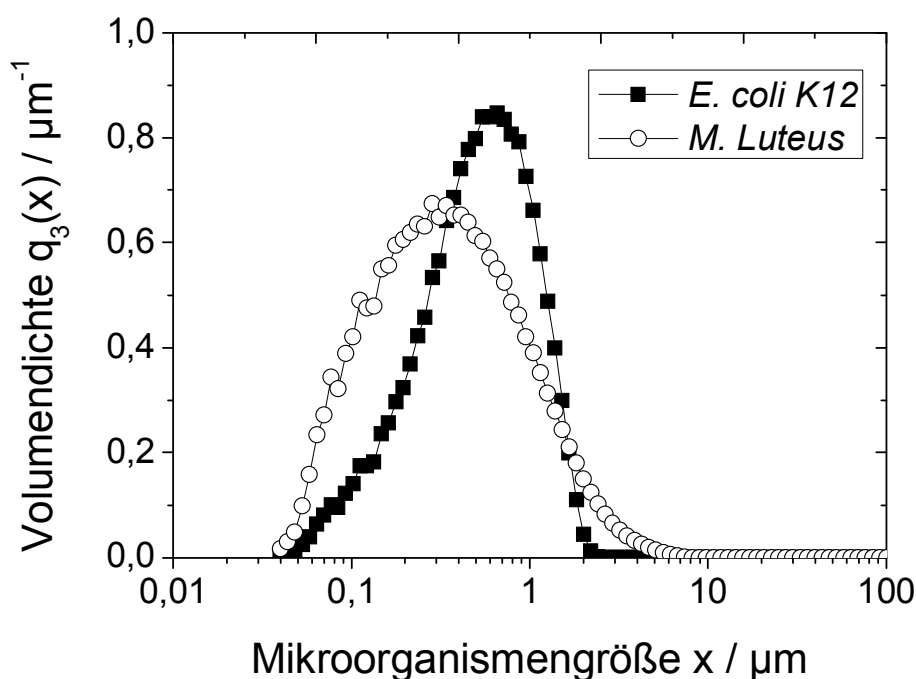
**Abb. 5.75:** Zweistufige Premix-Membrananlage - neue Konfiguration bei der die Emulsion durch zwei Membranmodule geleitet wird. Der gekennzeichnete Teil der Anlage wird vor jedem Versuch autoklaviert.



Nach dem zweiten Membranmodul wurde die Emulsion durch einen Schlauch in einen Erlenmeyerkolben geleitet. Der in Abb. 5.75 gekennzeichnete Teil der Anlage, also das zweite Membranmodul, Verbindungsschlauch und Erlenmeyerkolben, wurde vor jedem Versuch autoklaviert. Dadurch sollte eine unerwünschte Kontamination durch den nicht sterilen Teil der Versuchsanlage nach Möglichkeit verhindert werden.

### Größenverteilung der Mikroorganismen

Abb. 5.76 zeigt die Volumendichteverteilungen der hier untersuchten Mikroorganismen. *E. coli* K12 haben den über das Volumen der Keime gemittelten Durchmesser  $x_{1,3} = 0,7 \mu\text{m}$ , wobei es sich um Bakterien in Stäbchenform handelt. *M. luteus* zeigen eine etwas breitere Größenverteilung als *E. coli* K12. Ursache für dieses Verhalten sind kettenförmige Anlagerungen der ansonsten kugelförmigen Mikroorganismen. Aus diesem Grund sind *M. luteus* schwieriger zu dispergieren bzw. zu vereinzeln als *E. coli* K12. Die Verteilungen der beiden Mikroorganismen erstrecken sich über einen Durchmesserbereich von  $0,04 \mu\text{m}$  bis  $6 \mu\text{m}$ .



**Abb. 5.76:** Volumendichteverteilungen der untersuchten Mikroorganismen.

Die Abtrennung der Keime durch die zwei Membranmodule mit Membranen der Porengröße von  $d_p = 0,45 \mu\text{m}$  wurde für jeden Mikroorganismus getrennt untersucht. Die Anfangskonzentration der Mikroorganismen wurde zwischen  $10^6$  und  $10^7$  KBE / ml gewählt.

Die Untersuchungen mit *M. luteus* zeigten, dass die Sterilfiltration grundsätzlich erfolgreich ist, auch wenn die Anlage zum Zeitpunkt der

Untersuchungen noch nicht vollständig steril betrieben werden konnte. Es wurde eine Reduktion von 99,99 %, bzw. 4 Zehner-Potenzen ermittelt. Da Standard1-Agar verwendet wurde, konnten auch andere Keimarten auf der Agarplatte wachsen.

Dies bestätigen auch Experimente mit *E. coli* K12, bei denen spezifische Agarplatten für den Nachweis von Enterobakterien verwendet wurden. In diesen Fällen war die Sterilfiltration von *E. coli* K12 mit 100 % Reduktion erfolgreich. Verunreinigungen durch Keime infolge einer nicht vollständig sterilen Arbeitsweise waren auf den Agarplatten nicht erkennbar.

#### 5.4.3 Zusammenfassung zur Untersuchung der Abtrennung von Mikroorganismen mit Hilfe des Premix-Membranemulgierens

Der Einfluss der Prozessparameter auf die Emulgiererergebnisse ist in Tab. 5-9 zusammengefasst.

**Tab. 5-9:** Einfluss der Prozessparameter auf die Emulgiererergebnisse

Parameter Ergebnisse	Druck- differenz (3 - 12 bar)	Mehrfach Emulgieren (1 - 3 Läufe)	Porengröße Membrane (0,2; 0,45; 0,8 µm)	Emulgator- konzentration (2 - 4,6 %)
Sauter- durchmesser	+	++	+	+
Tropfengrößen- verteilung	0	++	0	++
Flux	++	0	++	0

Wobei:

0 = kein Einfluss

+ = Einfluss

++ = größerer Einfluss

Die Untersuchung der Prozessparameter hat ergeben, dass ein einziger Lauf durch die Membran zu Emulsionen mit kleinen Anteilen an großen Tropfen führt, die zur verstärkten Sedimentation neigen. Erst ein zweiter Lauf durch die Membran gewährleistet, dass enge Tropfengrößenverteilungen ohne Grobgutanteile entstehen. Der Mittelwert der Tropfengrößenverteilung (Sauterdurchmesser) liegt dann ungefähr beim doppelten mittleren Porendurchmesser der Membran für eine Membran mit der Porengröße von 0,8 µm. Das Verhältnis zwischen der Tropfengröße der Emulsion und der Porengröße der Membran  $x/d_p$  ist von der Porengröße der Membran sowie anderen Prozessparametern abhängig. Einen

vergleichsweise geringen Einfluss auf den Tropfendurchmesser der Feinemulsion hat das Erhöhen des Drucks (Untersuchungsbereich: 3 bis 12 bar).

Das Herstellen von parenteralen Emulsionen durch Premix-Membranemulgieren wurde mit Membranen mittlerer Porengrößen von  $0,45\ \mu\text{m}$  erfolgreich realisiert. Die Emulsion muss mindestens zweifach durch die Membran bei 12 bar gepresst werden, um das gewünschte Ergebnis (max. Tropfendurchmesser  $x_{3,99} < 3\ \mu\text{m}$ ) zu erhalten. Allerdings ist der Sauterdurchmesser der Emulsion mit  $x_{1,2} = 0,9\ \mu\text{m}$  etwas größer als bei üblichen parenteralen Emulsionen.

Die Emulsionen sind unabhängig von der Lagerungstemperatur (Raumtemperatur,  $37\ ^\circ\text{C}$  und  $45\ ^\circ\text{C}$ ) während der untersuchten Lagerungszeit von 30 Tagen physikalisch stabil.

Beim zweistufigen Premix-Membranemulgieren findet gleichzeitig eine Sterilfiltration statt. Die in die Voremulsion eingebrachten Mikroorganismen waren in der Feinemulsion nicht nachweisbar, wurden also vollständig zurückgehalten. Grundsätzlich ist damit das Premix-Membranemulgieren zur Herstellung parenteraler Emulsionen geeignet. Da bisher aber nur Laborversuche vorliegen, sind weitere Experimente nötig, um auch Fragen des Membranfouling und der Prozessstabilität während längerer Laufzeiten klären zu können.



## 6 Zusammenfassung

Generell sind Emulsionen mikrobiologisch instabil und brauchen daher ein geeignetes Verfahren, um diese Stabilität zu erreichen. Ein oft verwendetes Verfahren ist die thermische Inaktivierung, die von hoher Akzeptanz des Verbrauchers, zudem kostengünstig, aber für einige empfindliche Substanzen nicht geeignet ist. Für diese Produktkategorie sind alternative Verfahren notwendig. Da sich die Mikroorganismen nur in der wässrigen Phase vermehren können, ist der Aufbau der Emulsion entscheidend. In O/W-Emulsionen ist das Wachstum in der kontinuierlichen wässrigen Phase uneingeschränkt möglich. In W/O-Emulsionen können sich die Mikroorganismen nur in den räumlich beschränkten Tropfen vermehren. Die Tropfengröße ist daher von entscheidender Bedeutung für die mikrobiologische Stabilität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intrinsische mikrobiologische Stabilität von W/O-Emulsionen untersucht. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, die Stabilität durch Erzeugung hinreichend kleiner Tropfen und damit verbundenem Substratmangel zu erreichen.

Zur Untersuchung der mikrobiologischen Stabilität von O/W-Emulsionen wurden zwei Verfahren betrachtet, die thermische Inaktivierung und die Emulsionsherstellung durch das Premix-Membranemulgieren.

Die Oberflächen von Mikroorganismen können wie im Falle von *E. coli* K12 hydrophil oder wie bei *L. casei* BFE 6126 hydrophob sein. Hydrophile Mikroorganismen zeigen die Tendenz, während des Emulgierens in der wässrigen Phase zu verbleiben. Gelangen diese Mikroorganismen ins Öl, sterben sie innerhalb einiger Tage. Befinden sie sich hingegen in der wässrigen Phase, ist das Wachstum von der Tropfengröße abhängig unter den Voraussetzungen, dass die Mikroorganismen keine Enzyme besitzen, die die Grenzfläche verändern können und die Emulsion physikalisch stabil ist. Da das Mikroorganismenwachstum im Allgemeinen durch Substratmangel limitiert wird, ist das Wachstum erst ab einer Tropfengröße von ca. 4 µm möglich. Das Wachstum in Emulsionen mit größeren Tropfen (bis zu ca. 60 µm) ist im Vergleich zu wässrigen Systemen begrenzt. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Initialkeimzahl bzw. die Kontamination der wässrigen Phase, welche darüber entscheidet, wie viele Tropfen Mikroorganismen enthalten.

Die mikrobiologische Stabilität von W/O-Systemen kann unabhängig vom Dispersphasenanteil erhalten werden. So können hoch konzentrierte Emulsionen (bis 90 %) oder so genannte Biliquid Foams mikrobiologisch stabil sein. Dies ist ein Lösungsansatz, um die Haltbarkeit von fettarmen Produkten zu erhöhen.

Die Untersuchung von W/O-Emulsionen über eine lange Zeit hat ergeben, dass kleinere Tropfen zu einer höheren Absterberate während der Lagerung führen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die thermische Inaktivierung von hauptsächlich *E. coli* K12 in O/W-Emulsionen nach der Methode von Pardey, 2007 untersucht. Die Wachstumstemperatur betrug 30 °C, die Inaktivierungsversuche wurden bei Temperaturen von 57 °C und 63 °C durchgeführt.

Zur thermischen Behandlung von Emulsionen müssen einige Faktoren berücksichtigt werden. Befinden sich die Mikroorganismen im Öl, können sie nicht über einen längeren Zeitraum überleben. Sie besitzen jedoch eine erhöhte Resistenz im Vergleich zu wässrigen Systemen gegenüber einer thermischen Behandlung. Dieses Verhalten wurde in dieser Arbeit und in andere Publikationen beobachtet. Eine Gefahr der Mikroorganismenvermehrung besteht auch dann, wenn z.B. die Mikroorganismen während des Transports von der öligen Phase in die wässrige Phase verdrängt werden. Dadurch können sie weiter wachsen. Einen weiteren Einfluss auf die Inaktivierung kann der Dispersphasenanteil eines Lebensmittels haben. Je höher der Dispersphasenanteil einer O/W-Emulsion ist, desto länger beträgt die Zeit, um die Inaktivierungstemperatur zu erreichen und desto kleiner ist die Wasserverfügbarkeit für die Mikroorganismen. Die Versuche haben aber auch gezeigt, dass es bei Inaktivierungszeiten über 10 min keinen erkennbaren Einfluss des Dispersphasenanteils auf das Inaktivierungsergebnis gibt. Unter verbesserten isothermischen Bedingungen wurden neben dem Dispersphasenanteil der Einfluss weiterer Emulsionseigenschaften (SPAN, Tropfengröße und Emulgatorkonzentration) untersucht. Auch hier wurden keine nennenswerten Einflüsse dieser Faktoren auf das Inaktivierungsergebnis festgestellt. Ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenskurve haben Mikroorganismen mit unterschiedlicher Hydrophobizität gezeigt. Anzumerken ist jedoch, dass hierzu nur wenige Experimente ausgeführt wurden, sodass eine Verallgemeinerung dieser Aussage bisher nicht möglich ist.

Im letzten Teil der Arbeit wurde das Premix-Membranemulgieren untersucht. Das Premix-Membranemulgieren ist ein mögliches Verfahren, um sterile Emulsionen herzustellen. Entscheidende Faktoren, um Emulsionen mit enger Tropfengrößenverteilung zu erhalten, sind die Auswahl der Membranen, die Rezeptur und die Prozessparameter. Als wichtige Prozessparameter zählen das Mehrfachemulgieren und die Membranporengröße. Der Druck ist insbesondere von Bedeutung, da er den Flux des Prozesses bestimmt. Das Premix-Membranemulgieren zeichnet sich im Vergleich zu konventionellen Membranemulgierv Verfahren durch einen ca. 10-fach höheren Flux aus.

Das Herstellen von parenteralen Emulsionen wurde mit einer Polyamid-Membran mit mittlerer Porengröße von 0,45 µm erfolgreich realisiert. Da

---

eine kleine Porengröße in einer Abnahme des Fluxes des Prozesses resultiert, ist die Anwendung des Verfahrens nur für hochwertige Produkte zu empfehlen.

Demzufolge wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Möglichkeiten aufgezeigt, um die mikrobiologische Stabilität von Emulsionen ohne Zugabe von Konservierungsstoffen zu erreichen.





## 7 Literaturverzeichnis

**Altenbach-Rehm, J.; Suzuki, K.; Schubert, H.:** *Production of o/w-emulsions with narrow droplet size distribution by repeated premix membrane emulsification.* Proceedings World Congress on Emulsions CME, 2002 (auf CD-ROM/ Abstracts Buch S. 212).

**Badolato, G.G.; Freudig, B.; Idda, P.; Lambrich, U.; Schubert, H.; Schuchmann, H.P.:** *Membrane emulsification processes and characterization methods.* In: **Güell, C.; Monserrat F.; Lopez, F. (Hrsg.):** Monitoring and Visualizing Membrane-based processes. Wiley-VCH, Weinheim, 2009. ISBN: 978-3-527-32006-6.

**Bast, E.:** *Mikrobiologische Methoden.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg/ Berlin, 1999. ISBN: 3-8274-0786-9.

**Bateman, J.B.; Wagman, J.; Carstensen, E.L.:** *Refraction and Absorption of light in Bacterial Suspension.* Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere, Band 208, Heft 1, 1965, S. 44 - 58.

**Baumgart, J.:** *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln.* Behr's Verlag, 9. Aktualisierungs-Lieferung, 1999.

**Bell, C.; Kyriakides, A.:** *E. coli – A practical approach to the organism and its control in food.* Blackie Academic & Professional, 1998.

**Behrend, O.:** *Mechanisches Emulgieren mit Ultraschall.* Dissertation Universität Karlsruhe, GCA-Verlag, Herdecke, 2002. ISBN: 3-89863-099-4.

**Botsford, J.L.; Harman, J.G.:** *Cyclic AMP in prokaryotes.* Microbiological Reviews, 56, 1, 1992, S. 100 - 122.

**Brendel-Thimmel, U.; Jaenchen, R.; Schlamp, F.:** *Sterilfiltration von Flüssigkeiten und Gasen.* Chemie Ingenieur Technik, 2006, 78, S. 1655 - 1665.

**Briceño, M.I.:** *Modification of the droplet size and distribution of parenteral emulsions by tangential microfiltration.* Journal of Membrane Science, 2003, 221, S. 199 - 206.

**Brocklehurst, T.F.; Parker, M.L.; Gunning, P.A.; Coleman, H.P.; Robins, M.M.:** *Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of grow.* Journal of applied Bacteriology, 1995, 78, S. 609 - 615.

**Brouillet, F.; Bullón, J.; Cárdenas, A.; Sánchez, J.; Marti-Mestres, G.; Buranasompob, A.:** *Kinetics of the inactivation of microorganisms by water insoluble polymers with antimicrobial activity.* Dissertation Fakultät III – Prozesswissenschaften – Institut für Lebensmitteltechnologie und -prozesstechnik der Technischen Universität Berlin, 2005.

**Cerf, O.:** *A review. Tailing of survival curves of bacterial spores.* Journal of Applied Microbiology, 1977, 42, S. 1 - 19.

**Cerny, G.; Fink, A.:** *Untersuchung zur Abhängigkeit der thermischen Abtötung von Mikroorganismen von Viskosität und Wasseraktivität der Erhitzungsmedien.* ZFL, 2, 1986, S. 609 - 615.

**Chan Ik Park; Wan-Gu Cho; Seong Jae Lee:** *Emulsion stability of creams based on water-in-oil high internal phase emulsions.* Korea-Austria Rheologie Journal, 2003, Vol. 15, S. 125 -130.

**Darcy, H.P.G.:** *Les Fontaines publiques de la ville Dijon.* Victor Dalmont éditeur, Paris, 1856.

**Dataphysics:** *Betriebsanleitung DataPhysics DCAT (Dynamisches Kontaktwinkelmessgerät und Tensiometer) Serie 11 und 21,2005.*

**DiLiello, L.R.:** *Methods in Food and Dairy Microbiology.* Avi Publishing Company, Inc.,1982.

**Dorabantu, L.S.; Yeung, A.K.C.; Foght, J.M.; Gray, M.R.:** *Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic Bacteria.* Applied and enviromental Microbiology, 2004, 70, 10, S. 6333 - 6336.

**Doyle, R.J.:** *Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection.* Microbes and Infection, 2000, 2, S. 391 - 400.

**Dubbel, H. in Beiz W. (Hrsg.):** *Taschenbuch für den Maschinenbau.*15. Auflage, Springer Verlag Berlin, 1983.

**Esquena, J.; Sankar, GSR R.; Solans, c.:** *Highly concentrated w/o emulsion prepared by the PIT method as templates for solid foams.* Langmuir, 19, 2003, S. 2883 - 2988.

**Flores, M.; Morillo, M.; Crespo, M.L.:** *Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms.* International Biodeterioration & Biodegradation, 1997, 40, 2 - 4, S. 157 - 160.

**Floyd, A.G.:** *Top ten considerations in the development of parenteral emulsions.* PSTT, 1999, 2, 4, S. 134 - 143.

**Fritsche, W.:** *Mikrobiologie.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg·Berlin, 2002, ISBN 3-8274-1107-6.

**Fuchs, G.; Schlegel, H.G. (Hrsg.):** *Allgemeine Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, 8.Auflage, 2006, ISBN 978-3-13-444608-1.

**Geerken, M.J.:** *Emulsification with micro-engineered devices.* PhD thesis, University of Twente, Printed by Wöhrmann Print Service, Zutphen, 2006. ISBN: 90-365-2432-6.

**Geertsema-Doornbusch, G.I., van der Mei, H.C., Busscher, H.J.:** *Microbial cell surface hydrophobicity.* Journal of Microbiological Methods, 1993, Vol. 18, S. 61 - 68.

**Hegewald, E.; Knorre, W.A.:** *Kinetics of growth and substrate consumption of Escherichia coli ML 30 on two carbon sources.* Z. Allg. Mikrobiol., 18, 1978, S. 415 - 426.

**Hengge-Aronis, R.:** *The Role of rpoS in Early Stationary-Phase Gene Regulation in Escherichia coli K12.* S. 171. In: **Kjelleberg, S.** (Hrsg.): *Starvation in bacteria.* Springer Verlag, US, 1993. ISBN: 0306444305.

**Hugo, W.B.:** *The degradation of preservatives of microorganisms.* International Biodeterioration & Biodegradation, 48, 2001, S. 225 - 232.

**Itzhak, O. ; Whitnack, E. ; Beachey, E.H. :** *Hydrophobic Interactions of group A Streptococci with hexadecane droplets.* Journal of Bacteriology, Vol. 154, No. 1, 1983, S. 139 - 145.

**Jacobsen:** Internal Unilever Report, 1931.

**Juneja, V.K.; Eblen, B.S.; Marks, H.M.:** *Modeling non-linear survival curves to calculate thermal inactivation of Salmonella in poultry of different fat levels.* International Journal of Food Microbiology, 2001, 70, S. 37 - 51.

**Kaprelyants, A.S.; Kell, D.B.:** *Do bacteria need to communicate with each other for growth?* Trends in microbiology, 1996, 4, S. 237 - 242.

**Karbstein, H.:** *Untersuchung zum Herstellen und Stabilisieren von Öl-in-Wasser-Emulsionen*. Dissertation, Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Universität Karlsruhe, 1994.

**Kawakatsu, T.; Kikuchi, Y.; Nakajima, M.:** Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method”, *JAOCS*, 74,1997, S. 317 - 321.

**Kessler:** *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik Molkereitechnologie*. Verlag A. Kessler, München, 1996. ISBN: 3-9802378-4-2.

**Keweloh, H.:** *Mikroorganismen in Lebensmitteln. Theorie und praxis der Lebensmittelhygiene*. Pfanneberg, ISBN: 3-8057-0527-1, 2006.

**Kobayashi, I.; Nakajima, M.:** *Generation and Multiphase Flow of Emulsions in Microchannels*. In: Kockmann, N. (Hrsg.) *Micro process engineering: fundamentals, devices, fabrication, and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006. ISBN 3-527-31246-3. S. 149 - 172.

**Lambrich, U.; Vladisavljevic, G. T :** *Emulgieren mit mikrostrukturierten Systemen*. *Chemie Ingenieur Technik*, 2004, 76, 4, S. 376 - 383.

**Lambrich, U.; Schröder, V.; Vladisavljevic, G. T.:** *Emulgieren mit mikroporösen Systemen*. In: Schubert, H. (Hrsg): *Emulgiertechnik. Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*. Behr's Verlag, 2005.

**McClemens, J.Li,D.J.; and McLandsborough, L.A.:** *Interation between emulsion droplets and Escherichia coli cells*. *Journal of Food Science*, 2001, 66, 4, S. 570 - 574.

**Miller, R.J.:** *Verteilung und Inaktivierung von Mikroorganismen in binären Systemen (Öl-in-Wasser-Emulsionen)*. Dissertation Technische Universität München, 2006.

**Monod, J.:** *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Thesis, Hermann et Cie, Paris, France, 1942.

**Müller, G.:** *Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie*. VEB Fachbuchverlag Leipzig, 1974.

**Müller, G.; Weber, H.:** *Mikrobiologie der Lebensmittel – Grundlagen*. Behrs Verlag, 8. Auflage, 1996.

**Munk, K. (Hrsg.):** *Grundstudium Biologie - Mikrobiologie*, Heidelberg ; Berlin Spektrum, Akad. Verl., 2000. ISBN-10: 3827407958.

**Murrell, W.G.; Scott, W.J.:** The heat resistance of bacterial spores at various water activities. *Journal of General Microbiology*, 43, 1966, S. 411 - 425.

**Pardey, K.K.:** *Prinzipien der Inaktivierung von vegetativen Mikroorganismen auf der Basis von Resistenzverteilungen und unter Berücksichtigung ihrer Vorgeschichte*. Dissertation Universität Karlsruhe, Shaker Verlag, Aachen, 2007. ISBN: 978-3-8322-6032-3.

**Parker, M.L.; Brocklehurst, T.F.; Gunning, P.A.; Coleman, H.P.; Robins, M.M.:** *Grow of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water-emulsions: I – Methods for investigating the form of growth*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 1995, S. 601 - 608.

**Peleg, M., Cole, M.B.:** *Reinterpretation of Microbial Survival Curves*. *Critical Reviews in Food Science* 38, 5, 1998, S. 353 - 380.

**Peleg, M.:** *Microbial survival curves - the reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times*. *Food Research International*, 33, 2000, S. 531 - 538.

**Peleg, M:** *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems*. CRC Press, USA, 2006. ISBN: 9780849336454.

**Pelletier, C. ; Bouley, C. ; Cayuela, C.; Bouttier, S. ; Bourlioux, P. ; Bellon-Fontaine, M.-N. :** *Cell surface Characteristics of Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, and Lactobacillus rhamnosus strains*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 5, 1997, S. 1725 - 1731.

**Pfeiffer:** *Der Werkzeugkatalog*. Adolf Pfeiffer GmbH, Mannheim, 1999/2000.

**Pichhardt, K.:** *Lebensmittelmikrobiologie : Grundlagen für die Praxis*. - 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989.

**Pichhardt, K:** *Lebensmittelmikrobiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998.

**Posten, C.:** *Praktikum Batch-Kultivierung von Mikroorganismen*. Universität Karlsruhe, 2004.

**Princen, H.M.; Aronson, M.P.; Moser, J.C.:** *Highly concentrated emulsions. II. Real Systems. The effect of film thickness and contact angle on the volume fraction in creamed emulsions.* Journal of Colloid and Interface Science, 1980, Vol. 75, Nr.1, S. 246 - 270.

**Regier, M.; Schuchmann, H.P.:** *Thermisches Inaktivieren von Mikroorganismen und Enzymen.* In: Schuchmann, H.P., Schuchmann, H. (Hrsg.) :*Lebensmittelverfahrenstechnik*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005. ISBN 3-527-31230-7.

**Ribeiro, H.S.; Cruz, R.C.D.; Schubert, S.:** *Hochkonzentrierte carotinoidhaltige Emulsionen.* Chemie Ingenieur Technik 75, 4, 2004. S. 443 - 447.

**Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E.:** *Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity.* FEMS Microbiology Letters, 1980, Vol. 9, S. 29 - 33.

**Russel, A.D.:** *The Destruction of bacterial spores.* London: Academic Press, 1982.

**Sang Yup Lee, 1996:** High cell-density culture of *Escherichia coli*. IBTECH, 14, 1996. S. 98 - 105.

**Shadbolt, C.T.; Ross, T.; McMeekin, T.A.:** *Nonthermal death of Escherichia coli.* International Journal of food Microbiology, 49, 1999, S. 129 - 138.

**Schadler, V.; Windhab, E.J.:** Continuous membrane Emulsification by using a membrane system with controlled pore distance. Book of abstracts 10<sup>th</sup> Aachen membrane colloquium 16 - 17 march 2005, Aachen. ISBN: 3-86130-409-0. S. 585 - 591.

**Schlegel, H. G.:** *Allgemeine Mikrobiologie.* George Thieme Verlag Stuttgart, 6. Überarbeitete Auflage, 1985.

**Schlegel, H. G.:** *Allgemeine Mikrobiologie.* George Thieme Verlag Stuttgart, 7. Überarbeitete Auflage, 1992.

**Scholz, E.:** *Karl Fischer titration.* Springer, Berlin, 1983.

**Schröder, V.; Schubert H.:** *Einsatz querüberströmter, mikroporöser Membranen zum Emulgieren.* DECHEMA-Jahrestagungen, Wiesbaden 1996, Band II, S. 247 - 248.

**Schröder, V.:** *Herstellen von Öl-in-Wasser-Emulsionen mit mikroporösen Membranen.* Dissertation, Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Universität Karlsruhe. Berichte aus der Verfahrenstechnik. Shaker Verlag, Aachen, 1999. ISBN 3-8265-4901-5.

**Schubert, H.:** *Vorlesung Lebensmittelverfahrenstechnik I,* Universität Karlsruhe, 2002.

**Schubert, H.; Ax, K.:** *Engineering Food Emulsions.* In: McKenna, B.: *Texture in Food*, Vol. 1. Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, UK, 2003.

**Schubert, H.:** *Hochschulkurs Emulgiertechnik,* Universität Karlsruhe, 2004.

**Schubert, H.:** *Kausalität in der Verfahrenstechnik, dargestellt am Beispiel der Bio- und Lebensmittelverfahrenstechnik.* In: Schügerl, K. (Hrsg): *Kausalität in der Technik.* Vorträge im Rahmen der Wissenschaften Sitzungen der Technikwissenschaftlichen Klasse, 2006. Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, Berlin 2007.

**Schuchmann, H.P.; Badolato, G.G.; Lambrich, U.; Schubert, H.:** Emulsification using microporous systems. Book of abstracts 10<sup>th</sup> Aachen membrane colloquium 16 - 17 march 2005, Aachen. ISBN: 3-86130-409-0. S. 171 - 184.

**Schultze, K.K.; Linton, R.H.; Cousin, M.A.; Luchansky, J.B.; Tamplin, M.L.:** *Effect of preinoculation growth media and fat levels on thermal inactivation of a serotype 4b strain of Listeria monocytogenes in frankfurter slurries.* Food Microbiology 24, 2007, S. 352 - 361.

**Senhaji, A.F.; Loncin, M.:** The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). Journal of Food Technology, 12, 1977, S. 203 - 216.

**Siegele, D.A.; Almirón, M.; Kolter, R.:** *Approches to the study of survival and death in Stationary-Phase Escherichia coil.* S- 151-169. In: Kjelleberg, S. (Hrsg.): *Starvation in bacteria.* Springer Verlag, US, 1993. ISBN: 0306444305.

**Sigg, J.:** *Herstellung pharmazeutischer Emulsionen.* In: Schubert, H. (Hrsg): *Emulgiertechnik.* Behr's Verlag, 2005. ISBN: 3-89947-086-9. S. 595 - 637.

**Smith, J.L.; Metzger, V.; Palumbo, S.A.:** *Der Einfluss des fettes auf die thermische Destruktion von Bakterien in Brühwurstwaren.* Die Fleischwirtschaft, 1976, 56, 5, S. 687 - 690.

**Sonneville-Aubrun, O.; Bergeron, V.; Gulik-Krzywicki, T.; Bo Jönsson; Wennerström; H.; Lindner, P.; Cabane, B.:** *Surfactant films in biliquid foams.* Langmuir, 2000, 16, S. 1566 - 1579.

**Stang, M.:** *Zenkleinern und Stabilisieren von Tropfen beim mechanischen Emulgieren.* Dissertation, Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, Universität Karlsruhe, 1998.

**Suzuki, K.; Shuto, I.; Hagura Y.:** *Characteristics of the membrane emulsification method combined with preliminary emulsification for preparing corn oil-in-water emulsions.* . Food Science Technology, 2, Nr.1, 1996, S. 43 - 47.

**Suzuki, K.; Fujiki, I.; Hagura Y.:** *Preparation of Corn Oil/ Water and Water/ Corn Oil Emulsions Using PTFE Membranes.* Food Science Technology, 4, Nr.4, 1998, S. 164 -167.

**Suzuki, K.; Hayakawa, K.; Hagura, Y.:** *Preparation of High Concentration O/W and W/O Emulsions by the Membrane Phase Inversion Emulsification Using PTFE Membranes.* Food Science Technology, Res., 1999, 5 (2), S. 234 - 238.

**Tesch, S.:** *Charakterisieren mechanischer Emulgierverfahren: Herstellen und Stabilisieren von Tropfen als Teilschritte beim Formulieren von Emulsionen.* Dissertation Universität Karlsruhe, Shaker Verlag, Aachen, 2002. ISBN: 3-8322-0194-7.

**Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P.:** *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 4. Aufl., Stuttgart, 1991. Zitiert nach Kohlrausch, A.: *Öl-in-Wasser-Emulsionen als intravenöse Applikationsformen für schwer lösliche Wirkstoffe.* Dissertation der Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 1998, Bonn.

**Thi Lam An, Vu:** *Incidence of Clostridium botulinum Spores in honey and Infant food Samples Collected from Vietnam and Germany.* Dissertation, Fakultät für Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität, Göttingen, 2006.



**Valderrama, M.J.; Marquina, D. Peinado, J.M.:** *Isolation, Characterization and effect of Candida parapsilosis isolated from a deteriorated cosmetic.* International Biodeterioration & Biodegradation, 40, 2 - 4, 1997, S. 151 - 155.

**van der Mei, H.C, Rosenberg, M., Busscher, H.J.:** *Assessment of Microbial Cell Surface Hydrophobicity.* aus "Microbial Cell Surface Analysis". VCH Publisher, Inc. 1991, S. 265 - 287.

**van der Mei, H.C, Bos, R., Busscher, H.J.:** *A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 11, 1998, S. 213 - 221.

**Verrips, C.T.; Zaalberg, J.:** *The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions I, Theory.* European Journal of applied Microbiology and Biotechnology, 1980, 10, S. 187 - 196.

**Verrips, C.T.; Smid, D.; Kerkhof, A.:** *The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions II, Experimental.* European Journal of applied Microbiology and Biotechnology, 1980, 10, S. 73 - 85.

**Verrips, C.T.:** *Growth of microorganisms in compartmentalized products.* In: Gold G.W. (Ed.), Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier, London, 1989, S. 363 - 399.

**Vladisavljević, G. T.; Lambrich, U.; Nakajima, M.; Schubert, H.:** *Production of o/w emulsions using SPG membranes, ceramic alpha-aluminium oxide membranes, microfluidizer and a silicon microchannel plate a comparative study".* Colloids and Surfaces A, 232, 2 - 3, 2003, S. 199 - 207.

**Vladisavljević, G.T.; Suhr, J.; McClemens, J.D.:** *Effect of emulsifier type on droplet disruption in repeated porous membrane homogenization.* Langmuir, 2006, 22, S. 4526 - 4533.

**Waites, M. J.; Morgan, N.L.; Rockey, J.S.; Higton. G. :** *Industrial microbiology : an introduction.* Oxford : Blackwell Science, 2001. ISBN 0-632-05307-0.

**Zwan, E.; Schröen, K.; Dijke, K.; Bomm, R.:** *Vizualization of droplet break-up in pre-mix membrane emulsification using microfluidic devices.* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 277, 1 - 3, 2006, S. 223 - 229.



## 8 Anhang

### A1 Zusammensetzungen der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendeten Medien

Die Zusammensetzungen der Medien sind in der Tab. A-1 dargestellt. Alle Komponenten eines Mediums wurden in eine 500 ml-Schottflasche gegeben, mit bi-demineralisiertem Wasser auf 500 g aufgefüllt und im Anschluss bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**Tab. A-1:** Zusammensetzung der verwendeten Medien

<b>Medium</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration g/l</b>
<b>LB (Luria-Bertani)- Medium</b>	Pepton (aus Casein)	10
	Hefeextrakt	5
	NaCl	10
<b>MRS-Medium (Merck)</b>	Pepton (aus Casein)	10
	Fleischextrakt	8
	Hefeextrakt	4
	D(+) - Glucose	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
	Tween 80	1
<b>Nutrient-Medium</b>	Pepton (aus casein)	5
	Hefeextrakt	3
	NaOH	Bis pH-Wert 7
<b>Ringerlösung pH- Wert 7 (1/4 stark)</b>	NaCl	2,25
	KCl	0,105
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,08
	NaHCO <sub>3</sub>	0,01
	NH <sub>4</sub> Cl	0,8
<b>Standard I – Nähragar (Merck)</b>	Pepton	15
	Hefeextrakt	3

	NaCl	6
	D(+) - Glucose	1
	Agar	15
<b>Endo-Agar (Sigma-Aldrich)</b>	Agar	15
	Fleischpepton	10
	Lactose	10
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5
	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2,5
	alkalisches Fuchsin	0,5
<b>MRS-Agar (Merck)</b>	Pepton aus Casein	10
	Fleischextrakt	10
	Hefeextrakt	4
	D-Glucose	20
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
	Tween 80	1
	di-Ammoniumhydrogencitrat	2
	NaCH <sub>3</sub> COO	5
	MgSO <sub>4</sub>	0,2
	MnSO <sub>4</sub>	0,04
	Agar-Agar	14

## A2 Zusammensetzung der Pufferlösung

Bei den Inaktivierungsversuchen wurde eine NaCl-Pepton Pufferlösung nach *Buranasompob, 2005* eingesetzt. Die genaue Konzentration dieses Puffers befindet sich an Tab. A-2:

**Tab. A-2:** Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösung

<b>NaCl-Pepton Pufferlösung (pH 7)</b>	<b>Komponente</b>	<b>Konzentration g/l</b>
	Kaliumhydrogenphosphat	3,56
	$\text{Na}_2\text{HPO} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,23
	NaCl	4,3
	Tryptone	1

### A3 Konstruktionszeichnungen des Premix-Membranemulgierens

Die hier untersuchte Premix-Membranemulgieranlage wurde am Institut aus nichtrostendem Stahl der Legierung X5CrNi18-10, Werkstoffnummer 1.4301 gefertigt.

Der maximale Überdruck  $p$  wurde für einen Behälter nach *Dubbel, 1983* berechnet (Gl. A.1):

$$p = \frac{s_v \cdot 2 \cdot K}{d_a \cdot S \cdot v_N} \quad (\text{A.1})$$

Wobei:

$s_v$  = Wanddicke

$d_a$  = Außendurchmesser

$v_N$  = Beiwert für die Qualität der Längsschweißnaht (1 für nahtlose Rohre)

$K$  = gewährleisteter Werkstoffkennwert

$S$  = Sicherheitsbeiwert

Die Röhre des Premix-Membranemulgierens hat eine Wanddicke von  $s_v = 4$  mm und einen Außendurchmesser von  $d_a = 60$  mm. Als gewährleisteter Werkstoffkennwert wurde die Streckgrenze des Materials mit  $K = 200$  N/mm<sup>2</sup> angenommen. Im Vergleich zu *Tesch, 2002* wurde ein Sicherheitsbeiwert von 1,5 angenommen. Die Berechnung ergibt einen maximal erlaubten Überdruck von 178 bar.

Der maximale Druck bezüglich der eingesetzten Schrauben kann folgendermaßen (Gl. A.2) berechnet werden:

$$p = \frac{n \cdot F_{sp}}{2 \cdot A} \quad (\text{A.2})$$

Wobei:

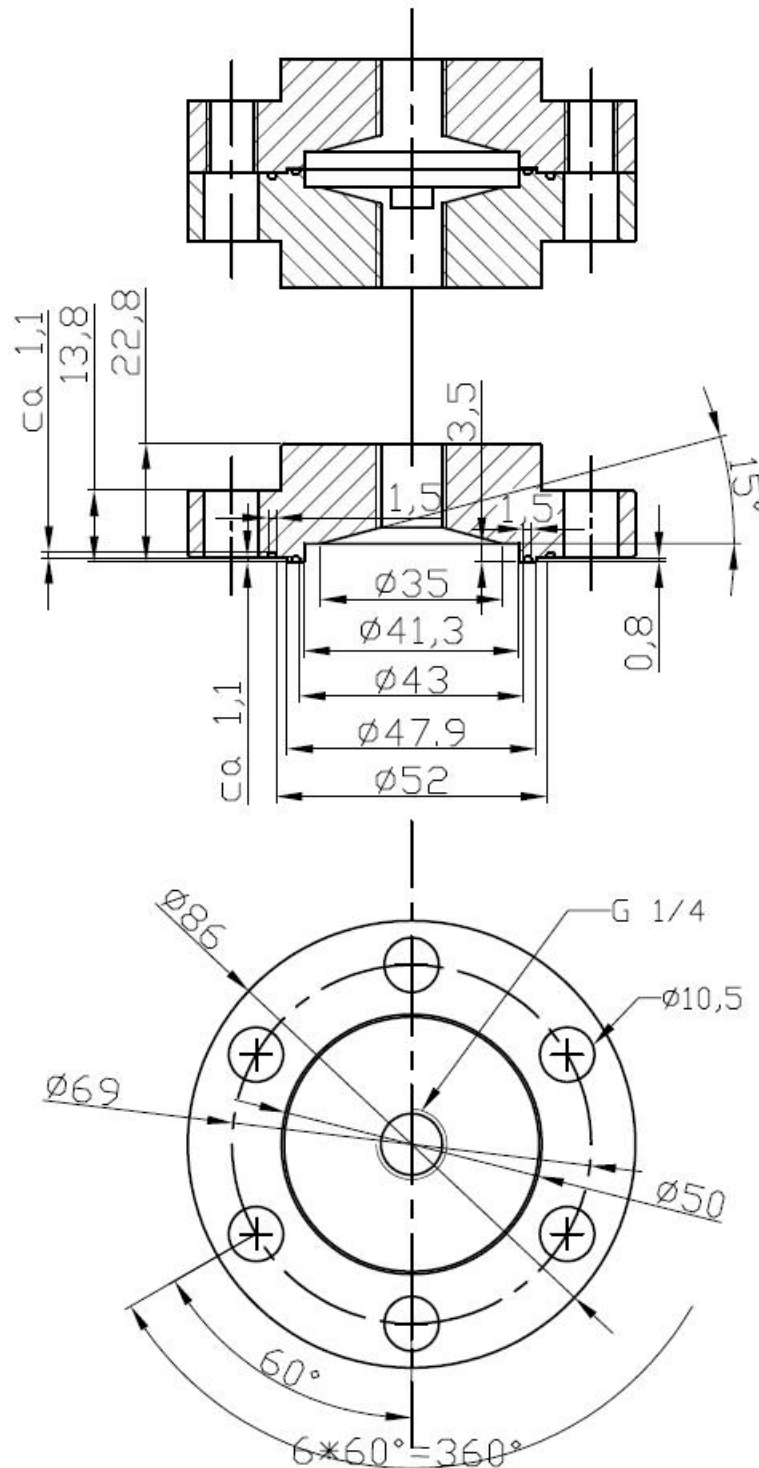
$n$  = Zahl der Schrauben

$F_{sp}$  = Spannkraft

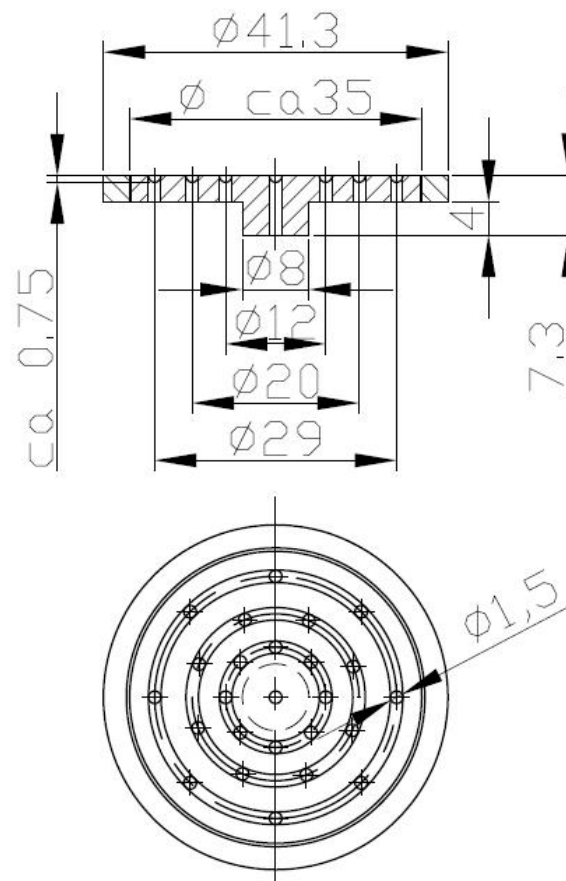
$A$  = die vom Druck beaufschlagte Fläche

Die Spannkraft für Schrauben M8 mit der Festigkeitsklasse 8,8 liegt bei einem Wert von  $F_{sp} = 15550$  N (Pfeiffer, 1999/2000), was einem maximalen Überdruck von 165 bar entspricht.

Die Einheit wurde zu Testzwecken bis 40 bar Druckdifferenz abgedrückt.  
In Abb. A1 und Abb. A2 sind die Konstruktionszeichnungen dargestellt.



**Abb. A1:** Membranmodule für Filtermembrane. Ansicht im Schnitt und von oben.

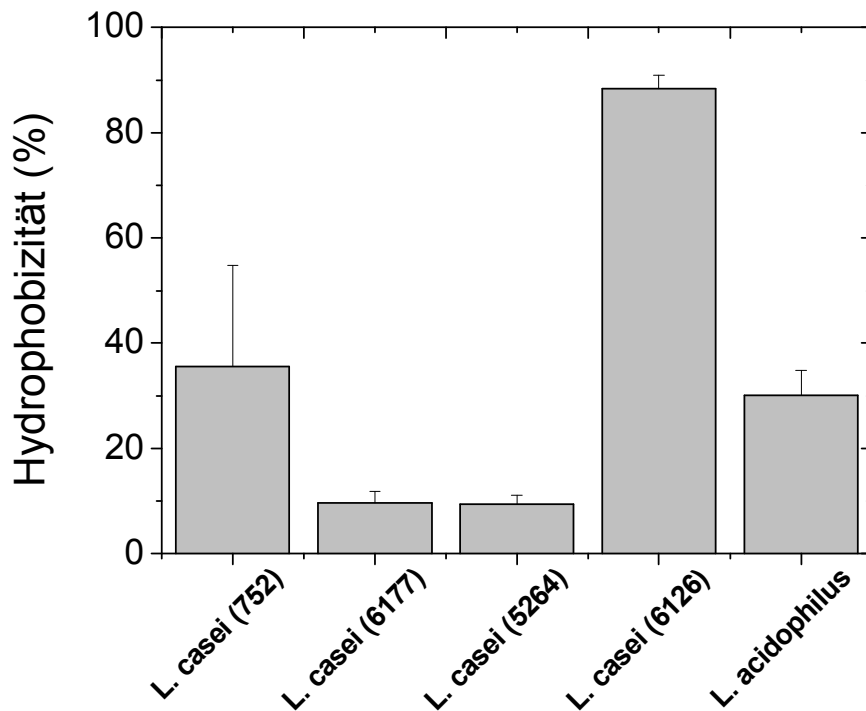


**Abb. A2:** Schutzgitter für Filtermembrane. Ansicht im Schnitt und von oben.



#### A4 Hydrophobizität einiger probiotischer Mikroorganismen

Zur Auswahl eines hydrophoben Mikroorganismus wurde die Hydrophobizität von einigen probiotischen *Lactobacillus* Stämmen nach dem BATH-Test [Rosenberg et. al, 1980] bestimmt (Abb. A3). Der Mikroorganismus *L. Casei* 6126 wurde wegen seiner hohen Hydrophobizität für weitere Untersuchungen ausgewählt.



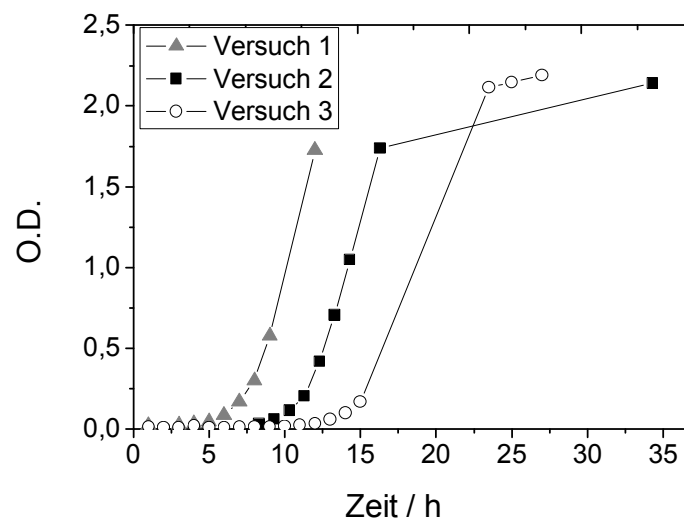
**Abb. A3:** Hydrophobizität von einigen *Lactobacillus*-Stämmen nach dem BATH-Test.

## A5 Wachstum von *E. coli* K12 in synthetischem Medium

Zur Untersuchung des Mikroorganismenwachstums wurde zuerst *E. coli* K12 in einem synthetischen Medium nach *Hegewald und Knorre*, 1978 kultiviert. Ein synthetisches Medium hat den Vorteil, dass die exakte Zusammensetzung bekannt ist (Tab. A-3). Die Vorversuche haben gezeigt, dass *E. coli* K12 in diesem Medium eine längere Zeit als in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase benötigt. Das Problem des synthetischen Mediums war, dass in drei Versuchen drei unterschiedliche Zeiten für die lag-Phase nachgewiesen wurden. Daher wurde das LB-Medium für diese Arbeiten ausgewählt. Abb. A4 zeigt die drei Wachstumskurven, die als O.D. in Abhängigkeit der Zeit bestimmt wurden. Die Kultivierung wurde in Kolben bei 37 °C unter Rühren (250 rpm) durchgeführt.

**Tab. A-3:** Zusammensetzung des synthetischen Mediums nach *Hegewald und Knorre*, 1978

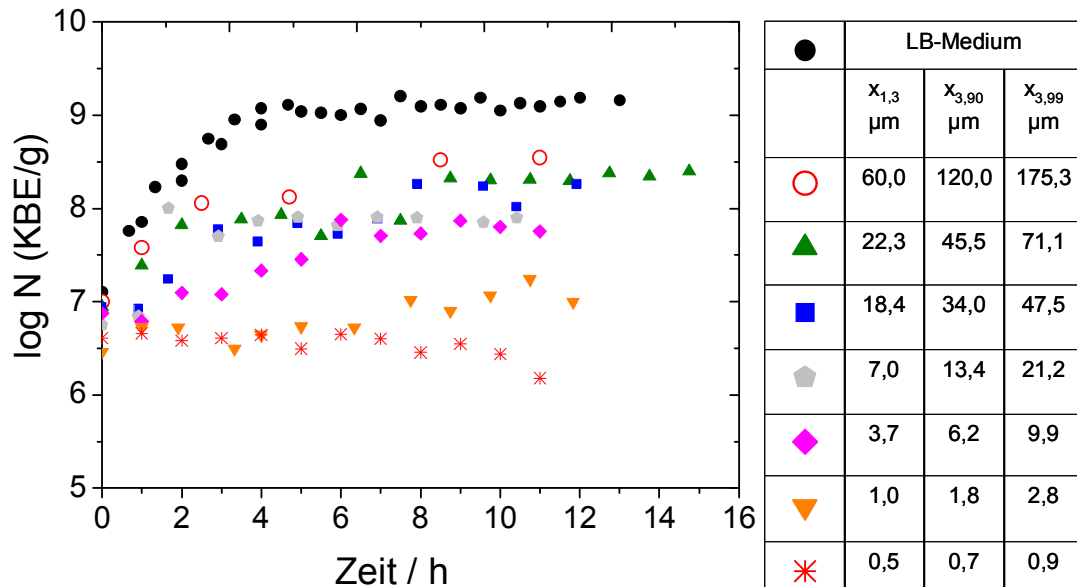
synthetisches Medium	Komponente	Konzentration g/l
	Kaliumhydrogenphosphat	3,56
	di- Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	7,23
	Natriumchlorid	4,3
	Tryptone	1



**Abb. A4:** Wachstumskurven von *E. coli* K12 in synthetischem Medium.

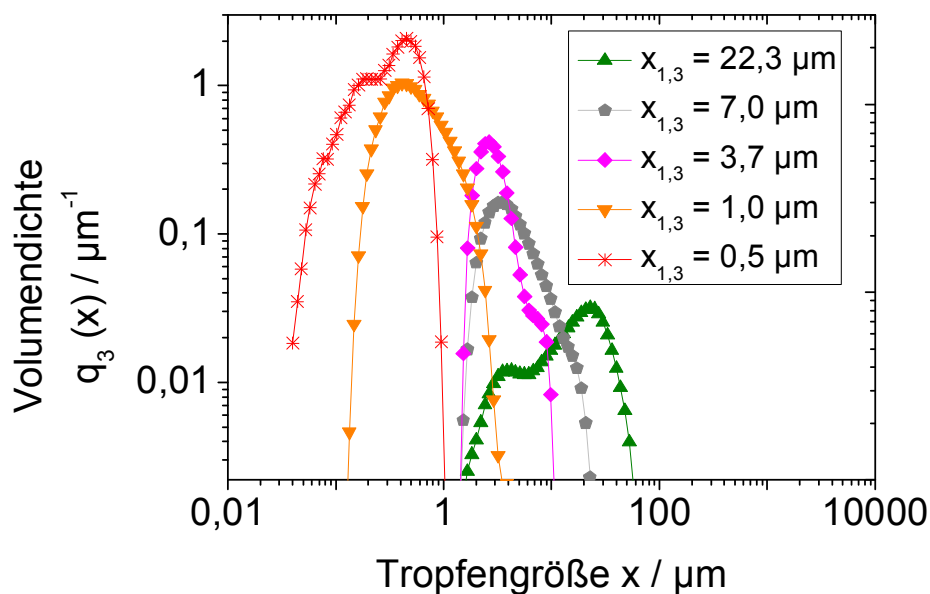
## A6 Wachstumskurve von *E. coli* K12 in W/O-Emulsionen mit der Auftragung von $\log N$ über der Zeit und Volumendichteverteilungen der Emulsionen

Abb. A5 zeigt die Wachstumskurve von *E. coli* K12 in W/O-Emulsionen mit der Auftragung von  $\log N$  über der Zeit (vgl. Abb. 5.27).



**Abb. A5:** Keimzahlkonzentration ( $\log N$ ) in Abhängigkeit der Zeit in Emulsionen mit verschiedenen mittleren Tropfengrößen.

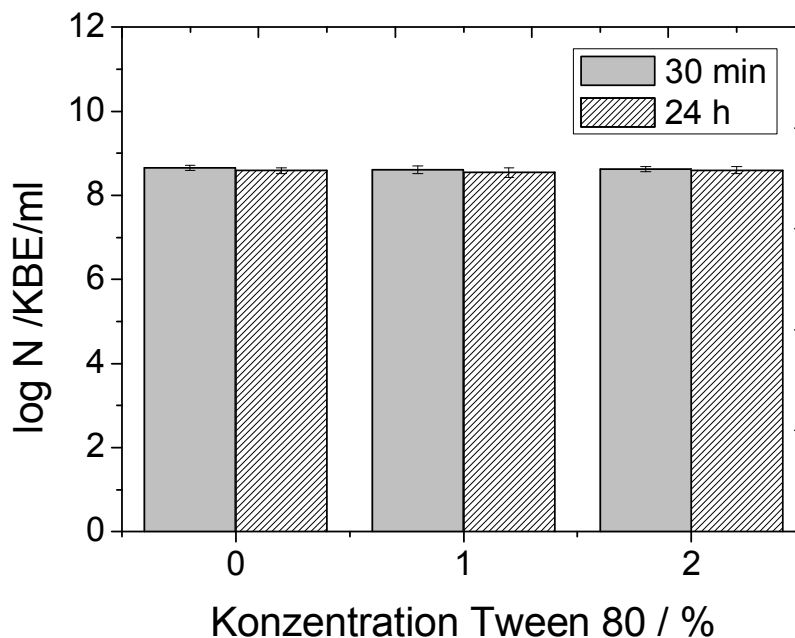
Die Volumendichteverteilungen der Emulsionen sind in Abb. A6 dargestellt.



**Abb. A6:** Volumendichteverteilungen der Emulsionen (vgl. Abb. 5.27 und Abb. A5).

### A7 Untersuchung der Toxizität des Emulgators Tween 80 für *E. coli* K12

Als bemerkt wurde, dass der Emulgator Tween<sup>®</sup>80 Einfluss auf die Inaktivierungsergebnisse hat, wurden Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob Tween 80 tatsächlich nicht toxisch auf die Mikroorganismen wirkt. Für diesen Versuch wurde *E. coli* K12 in LB-Medium bis zur stationären Phase kultiviert. Die Suspension wurde zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden abgetrennt und in Ringerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen von 0 %, 1 % und 2 % Tween 80 dispergiert. Eine Probe von jeder Suspension wurde nach 30 min und nach 24 Stunden verdünnt und ausplattiert. Die ermittelten Zellkonzentrationen wurden dann als log N verglichen (Abb. A7).

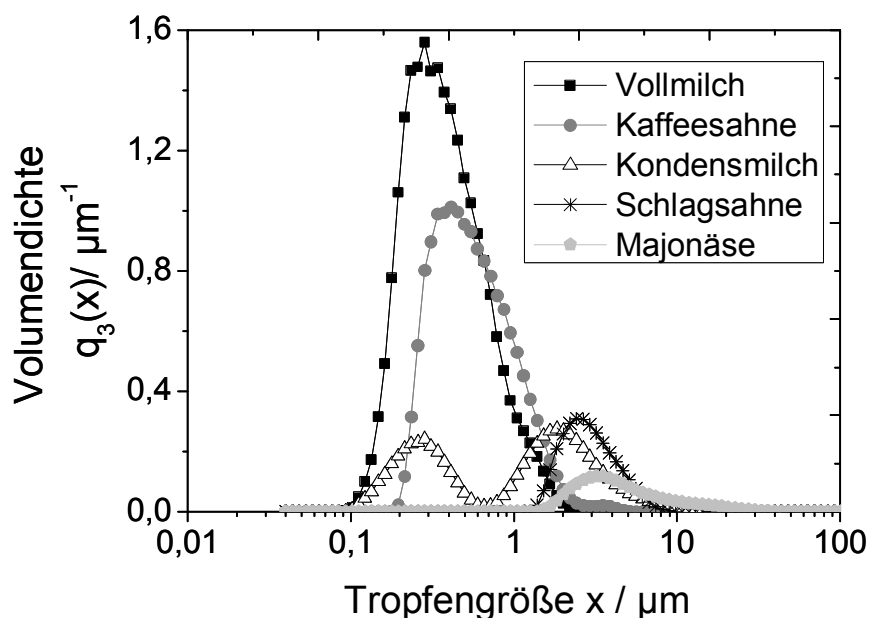


**Abb. A7:** Keimzahlkonzentration in Abhängigkeit der Konzentration von Tween 80.

## A8 Volumendichteverteilung der Tropfen einiger handelsüblicher Lebensmittel-Emulsionen auf dem Markt

Für die Auswahl des zu untersuchenden Bereichs wurden handelsübliche O/W-Lebensmittelemlusion bezüglich Fettgehalt, Tropfengröße und Verteilungsbreit (SPAN) untersucht. In Abb. A8 sind die Volumendichteverteilungen für Vollmilch, Kaffeesahne, Kondensmilch, Schlagsahne und Majonäse abgebildet. Von den untersuchten Produkten hat Vollmilch den niedrigsten Fettgehalt von 3,5 % und einen Sauterdurchmesser von 0,5  $\mu\text{m}$ . Die Verteilung ist relativ breit (SPAN = 2). Kaffeesahne hat 12 % Fettanteil, einen Sauterdurchmesser von 0,7  $\mu\text{m}$  und eine Verteilungsbreite ähnlich der Vollmilch. Kondensmilch besitzt einen ähnlichen Fettgehalt wie Kaffeesahne (10 %), aber einen Sauterdurchmesser von 1,7  $\mu\text{m}$  und eine Verteilungsbreite von 2,4. Schlagsahne besitzt einen Fettanteil von 30 %, einen Sauterdurchmesser von 3,4  $\mu\text{m}$  und einen SPAN von 1,3. Majonäse besitzt mit 82 % den höchsten Fettgehalt, mit 6,2  $\mu\text{m}$  den größten Sauterdurchmesser und mit einem SPAN von 2,7 die breiteste Verteilung.

Natürlich variieren die Produkteigenschaften unter den Lieferanten, aber allgemein kann man sagen, dass der Fettgehalt der Produkte von 0,3 % für Magermilch bis 82 % für Majonäse variiert. Der Sauterdurchmesser der untersuchten Produkte liegt in einem Bereich von 0,5  $\mu\text{m}$  bis 6,2  $\mu\text{m}$  und der SPAN zwischen 1,3 und 2,7.



**Abb. A8:** Volumendichteverteilungen von handelsüblichen Lebensmittel-Emulsionen.

### A9 Ermittelte Werte für den Sauterdurchmesser und den SPAN der Emulsionen und deren Herstellungsbeschreibung

Die Zusammensetzung der Emulsionen zur Untersuchung des Einflusses der Emulsionseigenschaften auf das Inaktivierungsverhalten von *E. coli* K12 sowie die Herstellungsbeschreibung befinden sich in Tab. A-4. Es wurden Emulsionen mit hohen Dispersphasenanteilen hergestellt (60 %). Emulsionen mit niedrigen Dispersphasenanteilen wurden entsprechend mit der wässrigen Phase verdünnt (z.B. wurde Emulsion 1 durch Verdünnung der Emulsion 3 hergestellt).

**Tab. A-4:** Eigenschaften der Emulsionen für den Versuchsplan und deren Herstellungsbeschreibung

Experiment	Sauter- durchmesser $x_{1,2}$ / $\mu\text{m}$		SPAN / -		Herstellung
	soll	ist	soll	ist	
1	2,00	1,8	1,2	1,3	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 12 \text{ bar}$ , 2 Läufe
2	2,00	1,9	2	1,8	Ultra-Turrax <sup>®</sup> ( $u = 8,5 \text{ m/s}$ , $t = 8 \text{ min}$ ) + PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 12 \text{ bar}$ , 2 Läufe
3	10,00	12,0	2	1,6	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 1,2 \text{ bar}$ , 3 Läufe
4	10,00	10,7	1,2	1,3	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 1,2 \text{ bar}$ , 1 Lauf
5	2,00	1,9	2	1,8	Ultra-Turrax <sup>®</sup> ( $u = 8,5 \text{ m/s}$ , $t = 8 \text{ min}$ ) + PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 12 \text{ bar}$ , 2 Läufe

Experiment	Sauter- durchmesser $x_{1,2}$ / $\mu\text{m}$		SPAN / -		Herstellung
	soll	ist	soll	ist	
6	2,00	1,8	1,2	1,3	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 12 \text{ bar}$ , 2 Läufe
7	10,00	10,7	1,2	1,3	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 1,2 \text{ bar}$ , 1 Lauf
8	10,00	12,0	2	1,6	PME, $d_p = 0,8 \mu\text{m}$ , $\Delta p = 1,2 \text{ bar}$ , 3 Läufe
9	6,00	7,2	1,6	1,7	Ultra-Turrax <sup>®</sup> ( $u = 12,9 \text{ m/s}$ , $t = 3 \text{ min}$ )

## A10 Detaillierte Ergebnisse des ausgeführten Versuchsplans zur Untersuchung der Inaktivierung von *E. coli* K12 in O/W-Emulsionen

In Tab. A-5 befindet sich die Ergebnisse der Experimente des Versuchsplans.

**Tab. A-5: Ergebnisse der Experiment des Versuchsplan**

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dispersphasenanteil / %	0,30	30,15	60,00	0,30	60,00	0,30	60,00	0,30	60,00
Tropfengröße $x_{1,2}$ / $\mu\text{m}$	2	6	2	10	10	2	2	10	10
Emulgator im	0	100	0	0	0	200	200	200	200
SPAN / -	1,2	1,6	2,0	2,0	1,2	2,0	1,2	1,2	2,0
$\log(N/N_0)$ , t = 2 min	-3,5	-3,3	-3,6	-3,0	-3,5	-3,2	-3,3	-4,0	-3,7
$\log(N/N_0)$ , t = 5 min	-4,6	-4,6	-4,0	-4,0	-4,6	-3,5	-3,7	-4,3	-4,3
$\log(N/N_0)$ , t = 7 min	-4,7	-4,6	-4,4	-4,0	-4,7	-3,7	-4,0	-4,4	-4,7
$\log(N/N_0)$ , t = 9 min	-4,7	-4,6	-4,7	-4,0	-4,9	-3,9	-4,2	-4,6	-5,1
$\log(N/N_0)$ , t = 11 min	-4,8	-4,6	-5,0	-4,0	-5,1	-4,1	-4,5	-4,7	-5,5
$\log(N/N_0)$ , t = 13 min	-4,8	-4,6	-5,3	-4,0	-5,2	-4,2	-4,7	-4,9	-5,9
$\log(N/N_0)$ , t = 15 min	-4,9	-4,6	-5,6	-4,0	-5,4	-4,4	-5,0	-5,1	-6,3
f / -	0,999965	0,999973	0,999438	0,999907	0,999923	0,999075	0,999057	0,999866	0,999545
$K_{1\text{max}}$ / $\text{min}^{-1}$	4,098	3,80567	6,007	3,46182	4,11988	5,60905	6,3543	7,12863	6,68535
$K_{2\text{max}}$ / $\text{min}^{-1}$	0,07	0	0,36268	0	0,199371	0,214191	0,298583	0,180909	0,454384
$R^2$	0,95	0,94	1	0,95	0,97	0,90	0,98	0,93	0,99





ISBN: 978-3-86644-407-2

---

[www.uvka.de](http://www.uvka.de)

