



Masterarbeit  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Diplomingenieur/in (Dipl. Ing.)

**Sicherheit und Kontrolle von bovinem Kolostrum  
und daraus hergestellten Produkten mit nativer  
Charakteristik**

eingereicht von  
Uta WEBER, Bakk. techn.

durchgeführt am  
Institut für Lebensmittelwissenschaften des  
Departments für Lebensmittelwissenschaften und –technologie der  
Universität für Bodenkultur Wien

betreut von  
Univ. Prof. DI Dr.nat.techn. Wolfgang KNEIFEL und  
DI Dr.nat.techn. Silvia APPRICH

Wien, im Februar 2013

*Angenehm sind die erledigten Arbeiten.*

*Marcus Tullius Cicero*

# INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XI
TABELLENVERZEICHNIS .....	XII
1 Einleitung .....	1
1.1 Zur Geschichte der Milchhygiene in Europa .....	2
1.2 Definition Konsummilch.....	3
1.2.1 Pasteurisierte Milch (Frischmilch).....	4
1.2.2 Hoherhitzte / Hochpasteurisierte Milch (ESL-Milch) .....	5
1.2.3 Ultrahoherhitzte Milch (UHT-Milch).....	5
1.2.4 Sterilisierte Milch (Sterilmilch) .....	6
1.3 Auswirkungen der Hitzebehandlung auf den Nährstoffgehalt der Milch .....	6
1.4 Alternative physikalische Haltbarmachungsverfahren für Milch .....	7
1.4.1 Baktofugierung .....	7
1.4.2 Mikrofiltration.....	8
1.4.3 Tiefenfiltration.....	8
1.4.4 Hochdruckbehandlung .....	9
1.4.5 Gepulste elektrische Felder (Pulsed Electric Fields, PEF).....	10
1.4.6 Ultraschall .....	11
1.5 Definition Rohmilch und Rohmilchkäse .....	12
1.6 Definition Vorzugsmilch.....	14
1.7 Mikrobiologische Beschaffenheit von Rohmilch.....	16
1.8 Eutergesundheit und Mastitis .....	18
1.9 Gesundheitsgefährdende mikrobiologische Potentiale in Rohmilch.....	19
1.9.1 Salmonellen .....	20
1.9.2 Verotoxin-bildende Escherichia coli (VTEC).....	23
1.9.3 Campylobacter .....	25
1.9.4 Listerien .....	27
1.9.5 Brucellen .....	29
1.9.6 Tuberkulose und Mycobacterium bovis .....	30
1.9.7 Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA).....	33
1.10 Untersuchungsverfahren der mikrobiellen Belastung von Milch.....	35

1.11	Kolostrum.....	36
1.11.1	Definition.....	36
1.11.2	Inhaltsstoffe.....	38
1.11.3	Wirtschaftliche Bedeutung von Kolostrum .....	42
1.11.4	Mikrobiologische Risiken von Kolostrum .....	45
1.12	Kontrollmechanismen und Methoden .....	48
1.12.1	Milchhygienische Rechtsvorschriften.....	48
1.12.2	Nahrungsergänzungsmittel.....	63
1.12.3	Diätetische Lebensmittel .....	64
1.12.4	Funktionelle Lebensmittel (Functional Foods, Nutraceuticals).....	65
1.12.5	Neuartige Lebensmittel (Novel Foods) .....	66
1.12.6	Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)-Konzept.....	67
2	Problemstellung.....	69
3	Material und Methoden.....	70
3.1	Probe .....	70
3.2	Mikrofiltration.....	71
3.3	Hochdruckbehandlung .....	71
3.4	Hitzebehandlung .....	71
3.5	Mikrobiologische Untersuchungen von unbehandeltem und behandeltem Kolostrum .....	72
3.5.1	Herstellung der Übernachtskulturen für die Inokulation .....	72
3.5.2	Hitzebehandlung .....	75
3.5.3	Nachweis der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl nach DIN EN ISO 4833-1:2003 und GRAM-Färbung .....	76
3.5.4	Nachweis von Escherichia coli mit ChromoCult Coliformen Agar .....	79
3.5.5	Nachweis von Listeria ssp. nach DIN EN ISO 11290-2: 2005 und Identifizierung mittels API® Listeria Testsystem .....	80
3.5.6	Nachweis von Bacillus ssp.mit HiCrome™ Bacillus Agar .....	86
3.5.7	Immunologische Untersuchungen mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	87
3.6	Das HACCP-Konzept.....	90
3.6.1	Die fünf vorbereitenden Schritte .....	92
3.6.2	Die sieben HACCP-Grundsätze .....	93
4	Ergebnisse .....	94
4.1	Analyse des Keimspektrums .....	94
4.1.1	Analyse des Keimspektrums der Kolostrumprobe I .....	96

4.1.2	Analyse des Keimspektrums der Kolostrumprobe II .....	97
4.1.3	Analyse des Keimspektrums der Kolostrumprobe III .....	99
4.1.4	Analyse des Keimspektrums der Kolostrumprobe IV .....	100
4.2	Analyse des IgG-Gehaltes.....	102
4.3	Umsetzung des HACCP-Konzeptes .....	107
4.3.1	Beschreibung des Produktes.....	107
4.3.2	Fließdiagramm des Herstellungsprozesses eines flüssigen Kolostrumproduktes mit bioaktiven Komponenten .....	108
4.3.3	Analyse der mikrobiologischen Gefahren während des Herstellungsprozesses .....	110
4.3.4	Bewertung der kritischen Lenkungspunkte .....	113
5	Diskussion.....	115
6	Zusammenfassung .....	125
7	Summary.....	126
8	Literaturverzeichnis .....	128
9	Anhang.....	143

# DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ. Prof. DI Dr.nat.techn. Wolfgang Kneifel, Leiter des Departments für Lebensmittelwissenschaften und –technologie, der diese Masterarbeit ermöglicht hat und mir immer mit seinen Ratschlägen und Anregungen zur Seite gestanden ist.

Weiters danke ich Frau DI Dr.nat.techn. Silvia Apprich für die Betreuung der praktischen und theoretischen Realisierung meiner Masterarbeit sowie für das Korrekturlesen.

Herrn DI Thomas Gosch von der Arbeitsgruppe Prozesstechnik möchte ich für die Durchführung der Mikrofiltrationen und Hochdruckbehandlungen danken.

Vielen Dank auch an Frau DI Dr.nat.techn. Marija Zunabovic, die ihr schier unendliches Wissen über die Mikrobiologie mit mir geteilt hat, wann immer ich eine Frage hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Mag. Dr.nat.techn. Sigrid Mayrhofer und Frau Nicole Frind von der Arbeitsgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene für ihre freundliche Unterstützung und die Bereitstellung von Bakterien aus der Stammsammlung bedanken.

Ein aufrichtiger Dank auch an Frau Dr. med. Ulrike Schauer vom Amt der niederösterreichischen Landesregierung, Abteilung Umwelthygiene, für die Übersendung von interessanter Literatur über Rohmilchhygiene.

Zu guter Letzt noch ein großes Dankeschön an alle Angehörigen der Arbeitsgruppe Lebensmittelqualitätssicherung, alle Freunde, Kollegen und an meine Eltern, die mir das ganze Studium über eine wertvolle Hilfe und Unterstützung waren.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µS	Mikrosiemens
Abs.	Absatz
AG	Aktiengesellschaft
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALP	Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux
API	Analytical Profile Index
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATCC	American Type Culture Collection
BAG	Bundesamt für Gesundheit (Schweiz)
BGBI.	Bundesgesetzblatt
BMG	Bundesministerium für Gesundheit (Österreich)
BOKU	Universität für Bodenkultur Wien
BRC	British Retail Consortium
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa

Cat. No.	Catalogue Number
CCP	Critical Control Point
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDFA	California Department of Food and Agriculture
CIP	Cleaning in Place
CVUAS	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart
d.h.	das heißt
DIN	Deutsches Institut für Normen
DNA	Desoxyribunucleic Acid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EFSA	European Food Safety Agency
EG	Europäische Gemeinschaft
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
ESL	Extended Shelf Life
et al.	et alii/aliae
etc.	etcetera
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EU	Europäische Union
Fab	antigen-binding fragment
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fc	crystallisable fragment
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GAP	Good Agricultural Practice
GHP	Good Hygiene Practice
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP	Good Manufacturing Practice
GRAS	Generally Recognized As Safe
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HRP	Horse Radish Peroxidase
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IDF	International Dairy Federation
idgF.	in der geltenden Fassung
IFS	International Food Standard
Ig	Immunoglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
Inc.	Incorporated
ISO	International Organization for Standardization
KbE	koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
L	Liter
LA-MRSA	Livestock Associated Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LAVES	Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Gent
LMHV	Lebensmittelhygiene-Verordnung
LMSVG	Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz
Ltd.	Limited
mg	Milligramm
Min.	Minute
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSAID	Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs
OBF	Officially Brucellosis Free
OCLA	Oxoid Chromogenic <i>Listeria</i> Agar
OD	Optische Dichte
OTF	Officially Tuberculosis Free
PCA	Plate Count Agar
PEF	Pulsed Electric fields
pH	potentia Hydrogenii
ppb	parts per billion
®	registered trade mark
RO	Reverse Osmose
SA	Société anonyme
Sek.	Sekunde
SIP	Sterilization in Place
sp.	Species
spp.	Species (Plural)
Std.	Stunde
STEC	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxin
t	Tonne
TBC	Tuberkulose

TGAM	Tiroler Gesellschaft für Allgemeinmedizin
™	unregistered trade mark
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TOC	Total Organic Carbon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSYEA	Tryptone Soy Yeast Extract Agar
UHT	Ultra High Temperature
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV-VIS	Ultraviolet-Visible
V	Volt
VO	Verordnung
VSB	Verbraucher Service Bayern
VTEC	Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
W	Watt
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZoonG	Zoonosengesetz
z.T.	zum Teil

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Prozessablauf für die Herstellung von ESL-Milch mittels Mikrofiltration oder Tiefenfiltration (STRAHM und EBERHARD, 2009) .....	9
Abbildung 2. Schema eines Immunglobulin G (IgG) Moleküls (GAPPER et al., 2007).....	41
Abbildung 3. Probenschema unbehandeltes und behandeltes Kolostrum.....	97
Abbildung 4. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung von Mikrofiltration und Hochdruckbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe I.....	98
Abbildung 5. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hitzebehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II.....	100
Abbildung 6. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hochdruck- und der Mikrofiltrationsbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II.....	99
Abbildung 7. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Mikrofiltrations- und der Hochdruckbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe III.....	103
Abbildung 8. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hitzebehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV .....	101
Abbildung 9. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hochdruck- und Mikrofiltrationsbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV.....	102
Abbildung 10. Graphische Darstellung des IgG-Gehalts von Magerkolostrum vor und nach den Hitzebehandlungen.....	103
Abbildung 11. Graphische Darstellung des IgG-Gehalts von Magerkolostrum vor und nach den Behandlungen mit Hochdruck, Mikrofiltration und Kombinationen daraus.....	104
Abbildung 12. Prozentuelle Restanteile von IgG im Kolostrum nach den Hitzebehandlungen.....	105
Abbildung 13. Prozentuelle Restanteile von IgG im Kolostrum nach Mikrofiltration, Hochdruckbehandlungen und Kombinationen daraus.....	106

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Einteilung von wärmebehandelter Konsummilch (Österreichisches Lebensmittelbuch, 2011) .....	4
Tabelle 2. Unterschiede zwischen Rohmilch und Vorzugsmilch (THIELKE, 2009).....	15
Tabelle 3. Kontaminationsquellen in frisch ermolkener Rohmilch (ZANGERL, 2007) .....	17
Tabelle 4. Zusammensetzung der Keimflora von frischer Rohmilch (FRANK und HASSAN, 2002).....	17
Tabelle 5. Befunde von Viertelgemelksuntersuchungen in Österreich 2009 (KRÖMKER, 2010).....	19
Tabelle 6. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Salmonellosen.....	22
Tabelle 7. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von VTEC .....	24
Tabelle 8. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Campylobacteriosen.....	26
Tabelle 9. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Listeriosen.....	28
Tabelle 10. Veränderung von Rinderkolostrum in den ersten 60 Stunden nach Geburt des Kalbes (STEPHAN et al., 1990).....	38
Tabelle 11. Vergleich der durchschnittlichen Zusammensetzung von bovinem Kolostrum und Kuhmilch .....	39
Tabelle 12. Vergleich der bioaktiven Komponenten von bovinem Kolostrum und Kuhmilch..	40
Tabelle 13. empfohlene Dosierung von bovinem Kolostrum bei bestimmten körperlichen Bedingungen (KELLY, 2003).....	44
Tabelle 14. Übersicht über das EU-Lebensmittelhygienerecht.....	50
Tabelle 15. Gesetzliche Anforderungen für Rohmilch gemäß EG-VO 853/2004 .....	57
Tabelle 16. Voraussetzungen für Vorzugsmilch gemäß Tier-LMHV.....	61
Tabelle 17. Für die Inokulation des Magerkolostrums eingesetzte Stämme.....	74
Tabelle 18. Ablesetabelle für das API <sup>®</sup> <i>Listeria</i> Testsystem (BIOMÉRIEUX, 2010).....	85
Tabelle 19. Bestandteile des Bovine IgG ELISA Quantitation Sets (BETHYL, 2009).....	88
Tabelle 20. Beispiele für mögliche Gefahren in der Lebensmittelindustrie .....	91
Tabelle 21. mesophile Gesamtkeimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum.....	143

Tabelle 22. mesophile Gesamtkeimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums.....	144
Tabelle 23. mesophile Gesamtkeimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums .....	145
Tabelle 24. mesophile Gesamtkeimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate .....	146
Tabelle 25. <i>Listeria</i> -Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum.....	147
Tabelle 26. <i>Listeria</i> -Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums .....	148
Tabelle 27. <i>Listeria</i> -Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums.....	149
Tabelle 28. <i>Listeria</i> -Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate .....	150
Tabelle 29. <i>E.coli</i> -Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum.....	151
Tabelle 30. <i>E.coli</i> -Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums.....	152
Tabelle 31. <i>E.coli</i> -Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums.....	153
Tabelle 32. <i>E.coli</i> -Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate .....	154
Tabelle 33. <i>Bacillus</i> -Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum.....	155
Tabelle 34. <i>Bacillus</i> -Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums .....	156
Tabelle 35. <i>Bacillus</i> -Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums.....	157
Tabelle 36. <i>Bacillus</i> -Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate .....	158
Tabelle 37. IgG-Gehalte von Rohkolostrum, Magerkolostrum und hitzebehandeltem inokuliertem Magerkolostrum.....	159
Tabelle 38. IgG-Gehalte von hochdruckbehandeltem inokuliertem Magerkolostrum, membranfiltriertem inokuliertem Magerkolostrum und hochdruckbehandeltem Mikrofiltrationspermeat .....	160

# 1 EINLEITUNG

In Österreich gab es im Jahre 2011 etwa 40 000 Milchbauern mit rund 530 000 Milchkühen (MOOSBRUGGER, 2011). Deren durchschnittliche Jahresmilchleistung lag bei ca. 6 200 kg je Tier. Daraus resultierte ein Anstieg des Rohmilchanfalls auf 3 307 000 t im Vergleich zum Jahr 2010 (STATISTIK AUSTRIA, 2011). Die gewonnene Milch wurde an 92 Be- und Verarbeitungsbetriebe geliefert, die etwa 4 400 Mitarbeiter beschäftigten und einen Jahresumsatz von etwa zwei Milliarden Euro erwirtschafteten (MOOSBRUGGER, 2011).

Mit rund drei Millionen Tonnen (87,8% der Erzeugung) ging der größte Teil der Rohmilch an die Be- und Verarbeitungsbetriebe. Abgesehen von einem geringfügigen Schwund wurde die restliche Rohmilch hofseitig verwertet: 243 000 t Milch (7,4% der Erzeugung) dienten als Futter für Kälber oder sonstige Haustiere und 126 000 t (3,8% der Erzeugung) kamen direkt oder in verarbeiteter Form am oder ab Hof der menschlichen Ernährung zu Gute (STATISTIK AUSTRIA, 2012). Rund 5% (ALLERBERGER, 2008b) der in Österreich produzierten Milch werden zur menschlichen Ernährung nicht pasteurisiert abgegeben. Nicht wärmebehandelte Milch wird von Personen nachgefragt, die der Meinung sind, dass während der Wärmebehandlung die gesundheitsfördernden Eigenschaften, das natürliche Aroma und die Nährstoffe der Milch verloren gehen (SMITH DEWAAL et al., 2009). Diese Bedenken sind teilweise berechtigt. Einige Komponenten der Rohmilch können vorbeugend gegen Asthmaerkrankungen und Allergien wirken, die genauen Mechanismen sind aber noch unbekannt (WASER et al., 2006).

Rohmilch stellt aufgrund ihres hohen Gehalts an Proteinen und Nährstoffen einen exzellenten Nährboden für Mikroorganismen dar, in dem sie sich rasant vermehren und ggf. auch Toxine bilden können.

Generell gilt, dass die Abgabe von nicht wärmebehandelter Milch an den Verbraucher gesetzlich verboten ist. Dazu gibt es allerdings zwei Ausnahmen:

1. Rohmilch im Ab-Hof-Verkauf, für die in der EU spezielle gesetzliche Vorschriften gelten, und
2. Vorzugsmilch, die in Österreich derzeit jedoch nicht angeboten wird.

Kolostrum fällt laut EU-Gesetzgebung nicht unter die Definition von Milch, obwohl es ebenfalls von Milchkühen gewonnen wird. Es wird jedoch vom lebensmittelhygienischen Standpunkt aus mit Rohmilch gleichgesetzt.

Aus der Sicht der Lebensmittelindustrie ist die Suche nach Alternativen zur Wärmebehandlung von Milch bzw. Kolostrum, durch die die natürlichen Eigenschaften der Milch bzw. des Kolostrums erhalten bleiben und durch die gleichzeitig die Hygienrisiken ausgeschaltet werden, besonders interessant.

## 1.1 ZUR GESCHICHTE DER MILCHHYGIENE IN EUROPA

Noch bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts gab es in Mitteleuropa keine Einrichtungen zur Belieferung der städtischen Bevölkerung mit Kuhmilch. Die Milch wurde z.T. noch kuhwarm von einem Stall abgeholt. Technische Einrichtungen zur Erhaltung der Rohmilchqualität waren nicht vorhanden und die Milchkontrolle beschränkte sich auf die Sinnesprüfung durch den Konsumenten selbst. 1857 erkannte der französische Chemiker und Bakteriologe Louis Pasteur den Zusammenhang zwischen Milchsäurebakterien und den Fermentationsvorgängen in Milch und experimentierte auch mit der Sterilisierung von Milch (ORLAND, 2001). Die ersten städtischen Milchzentralen (Meiereien), die die Sammlung und Weiterverarbeitung der Milch organisierten, gehen auf privatwirtschaftliche Initiativen zurück, wie z.B. die Meierei C. Bolle, die 1879 in Berlin gegründet wurde oder die 1862 im schweizerischen Luzern entstandene Molkerei Galliker (STRAHM und EBERHARD, 2009). Diese Milchsammelstellen arbeiteten meist unter sehr schlechten hygienischen Bedingungen. Die Milch war unbehandelt, oft nicht einmal gekühlt. Aus dieser Milch stellten viele Meiereien auch Butter her (ORLAND, 2001). Die Übernahme der Milch von den Meiereien und der Verkauf an die Endverbraucher war Aufgabe der Milchhändler, einer selbständigen Berufsgruppe. Sie verfügten über gewisse Fachkenntnisse im Bereich der Hygiene, Sauberkeit und der lebensmittelrechtlichen

Vorschriften (STRAHM und EBERHARD, 2009). 1880 wurde in Dresden die Molkerei Gebrüder Pfund gegründet, die es sich zum Ziel setzte, der stetig wachsenden Stadtbevölkerung eine hygienisch einwandfreie Milch zu liefern. Durch ein Fenster im Verkaufsraum konnte die Kundschaft zusehen, wie die Kühe gemolken, die Milch zweimal durch feine Tücher geseiht und sofort gekühlt wurde (PFUNDS, 2012). Außerdem war der gesamte Betrieb auf größtmögliche Sauberkeit ausgerichtet. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte der deutsche Agrikulturchemiker Franz von Soxhlet einen Haushalts-Sterilisierapparat für Kindermilchflaschen, der zum Vorbild für die ersten Pasteurisierungsanlagen der Molkereiindustrie wurde (ORLAND, 2001). Die Pasteurisierung der Milch trat ihren Siegeszug erst nach dem 2. Weltkrieg an und war vor allem in den Städten verbreitet. Das UHT (Ultra High Temperature) – Verfahren wurde 1951 entwickelt und ermöglichte es erstmals, in einem kontinuierlichen Verfahren keimfreie Milch herzustellen. Erst durch die Möglichkeit der aseptischen Abfüllung breitete sich die UHT-Technologie in der Trinkmilchherstellung weiter aus (STRAHM und EBERHARD, 2009).

## 1.2 DEFINITION KONSUMMILCH

Unter dem Begriff Konsummilch werden in der EU diejenigen Milchsorten zusammengefasst, die als Trinkmilch an den Verbraucher abgegeben werden.

Als Basis für die Herstellung von Milchprodukten dient die Rohmilch. Die Milch wird als Konsummilch verkauft, nachdem mittels Erhitzungsverfahren die Haltbarkeit der Rohmilch durch Abtötung vorhandener pathogener Keime und Reduzierung anderer Mikroorganismen, wie zum Beispiel Milchsäurebakterien, verlängert wurde.

Die in den Handel kommende Konsummilch wird in folgende Sorten unterteilt:

- 1) Pasteurisierte Milch (Frischmilch)
- 2) Hoherhitzte / Hochpasteurisierte Milch (Extended Shelf Life- / ESL-Milch bzw. „länger haltbare Frischmilch“)
- 3) Ultrahocherhitzte Milch (Ultra High Temperature- / UHT-Milch, Haltbar- / H-Milch)
- 4) Sterilisierte Milch (Sterilmilch)

Konsummilch wird laut Österreichischem Lebensmittelbuch (IV. Auflage, Codexkapitel/B32/Milch und Milchprodukte, 2011) aus Rohmilch, deren Fettgehalt allenfalls verändert wurde, hergestellt. Die Fetteinstellung erfolgt durch Entrahmung oder Zumischung von Magermilch. Der Fettgehalt entspricht der Deklaration und der Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 Anhang XIII idgF.

**Tabelle 1. Einteilung von wärmebehandelter Konsummilch (Österreichisches Lebensmittelbuch, 2011)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Wärmebehandlung</b>	<b>Zeit/Temperatur</b>
Pasteurisiert	Dauerpasteurisation	30 Min. bei mind. 63°C <sup>b)</sup>
Pasteurisiert	Kurzzeiterhitzung	15 Sek. bei mind. 72°C <sup>b)</sup>
Hocherhitzt	Hocherhitzung	einige Sek. bei mind. 85°C <sup>b)</sup>
Ultrahoherhitzt <sup>a)</sup>	Ultrahoherhitzung	mind. 135°C <sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> auch Haltbarmilch oder H-Milch

<sup>b)</sup> oder einer Zeit/Temperaturkombination mit gleicher Wirkung

<sup>c)</sup> mikrobiologisch stabil

Pasteurisierte Konsummilch ist alkalische Phosphatase-negativ gemäß der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 idgF. „Hocherhitzte“ oder ähnlich gekennzeichnete Konsummilch ist Peroxidase-negativ. Pasteurisierte Milch schmeckt in Abhängigkeit vom Fettgehalt mehr oder weniger vollmundig. H-Milch und ESL-Milch können einen Kochgeschmack aufweisen. Zusätzlich zur Erhitzung können während der Herstellung wärmebehandelter Konsummilch physikalische Verfahren wie Zentrifugation und/oder Zentrifugationsentkeimung, Filtrationsentkeimung und Homogenisierung eingesetzt werden.

### **1.2.1 PASTEURISIERTE MILCH (FRISCHMILCH)**

Die Kurzzeiterhitzung im kontinuierlichen Durchfluss findet vor allem in Plattenwärmetauschern statt. Die Temperaturen betragen 72 bis 75°C mit einer Heißhaltezeit von 15 bis 30 Sekunden. Das milchoriginäre Enzym alkalische Phosphatase darf nach dieser Behandlung nicht mehr nachweisbar sein.

Die Haltbarkeit dieser pasteurisierten Frischmilch beträgt bei Kühlung sechs bis acht Tage (FRISTER, 2007a).

### *1.2.2 HOCHERHITZTE / HOCHPASTEURISIERTE MILCH (ESL-MILCH)*

Die Hocherhitzung wird im kontinuierlichen Durchfluss in einem Temperaturbereich von 85 bis 127°C mit variablen Zeiten im Sekundenbereich durchgeführt. Die Erhitzung kann in einer UHT-Anlage oder einem modifizierten Plattenwärmetauscher erfolgen. Dem modifizierten Plattenwärmetauscher wird zum Erreichen der hohen Temperatur noch ein Röhrenerhitzer zugeschaltet (STRAHM und EBERHARD, 2009). Das milchoriginäre Enzym Peroxidase darf nach dieser Behandlung nicht mehr nachweisbar sein. Bei Erhitzungsbedingungen von 120 bis 127°C für zwei bis vier Sekunden (FRISTER, 2007a) spricht man von ESL-Milch (Extended Shelf Life). Dieses auch als „länger haltbare Frischmilch“ bezeichnete Produkt kann gekühlt etwa drei Wochen gelagert werden. Die Milch wird bei der indirekten Erhitzung meist etwas stärker belastet als bei der direkten Erhitzung, was zu sensorischen Abweichungen führen kann. Für die Herstellung der ESL-Milch können neben der indirekten Erhitzung aber auch andere Technologien angewandt werden. In einer UHT-Direkt-Erhitzeranlage kann ESL-Milch durch direkte Erhitzung hergestellt werden. Mittels eines Dampfnebelinjektionssystemes oder eines Dampfnebelinfusionssystemes, bei dem die Milch in einem Dampfbehälter (Infuser) versprüht wird, wird die Milch innerhalb von Sekundenbruchteilen auf eine Temperatur von ca. 127°C (STRAHM und EBERHARD, 2009) erhitzt. Für den Dampf muss Trinkwasserqualität verwendet werden. Die Herstellung von ESL-Milch kann auch mit Hilfe der Mikrofiltration oder der Tiefenfiltration erfolgen.

### *1.2.3 ULTRAHOCHERHITZTE MILCH (UHT-MILCH)*

Durch UHT-Erhitzung im Durchfluss mittels indirekter Erhitzung in Platten- oder Röhrenwärmetauschern oder mittels direkter Erhitzung durch Dampfnebelinjektoren oder Dampfnebelinfusion bei mindestens 135°C im Sekundenbereich wird Milch hergestellt, die

ungekühlt in luftdichter Verpackung ca. drei bis vier Monate haltbar ist (FRISTER, 2007a).

#### 1.2.4 STERILISIERTE MILCH (STERILMILCH)

Die Sterilisierung erfolgt bei 110 bis 120°C mit Heißhaltezeiten von zehn bis 30 Minuten (FRISTER, 2007a) in luftdicht verschlossenen Behältern (Flaschen, Dosen). Sterilmilch ist ungekühlt ca. sechs Monate haltbar (FRISTER, 2007a).

### 1.3 AUSWIRKUNGEN DER HITZEBEHANDLUNG AUF DEN NÄHRSTOFFGEHALT DER MILCH

Die Änderungen des Nährstoffgehalts der Milch während der Pasteurisation und der UHT-Erhitzung sind meist gering und nicht besonders signifikant. Dennoch kann es während der Lagerung nach der Wärmebehandlung zu erheblichen Vitaminverlusten kommen. Die fettlöslichen Vitamine A, D und E sowie die wasserlöslichen Vitamine Biotin, Nicotinsäure, Pantothenensäure und Riboflavin sind relativ hitzestabil und es kommt während Pasteurisation und UHT-Erhitzung zu keinen messbaren Verlusten (VARNAM und SUTHERLAND, 2001). Während der Pasteurisation kommt es bei Folsäure, Thiamin, Vitamin B<sub>6</sub> und Vitamin B<sub>12</sub> zu Verlusten von weniger als 10%, wobei die Verluste an Vitamin B<sub>6</sub> durch UHT-Erhitzung ein wenig höher sind (VARNAM und SUTHERLAND, 2001). Am signifikantesten ist der Verlust an Vitamin C. Der Gehalt an Gesamt-Vitamin C (Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure) wird während der Pasteurisation um 10-25% reduziert, während der UHT-Erhitzung um 25% oder mehr (VARNAM und SUTHERLAND, 2001). Diese Werte sind deshalb so hoch, da die oxidierte Form des Vitamins C, Dehydroascorbinsäure, am hitzeempfindlichsten ist. Dies kann bekämpft werden, indem man während der Verarbeitung den Anteil an gelöstem Sauerstoff in der Milch verringert. Dadurch kann der Vitamin C- Verlust während der Lagerung der Milch auf ein Minimum reduziert werden. Bei Folsäure kann es innerhalb einer Lagerzeit von 14 Tagen zu einem Aktivitätsverlust von 100% kommen, während Vitamin B<sub>3</sub> innerhalb von drei Monaten

50% seiner Aktivität verlieren kann (VARNAM und SUTHERLAND, 2001). Auch die Verpackung hat einen großen Einfluss auf den Vitamingehalt der Milch. Farblose Glasflaschen lassen viel Licht durch, wodurch es zu Photodegradation kommt, was vor allem das lichtempfindliche Vitamin C betrifft. Am besten geschützt ist die Milch in Kartons, die mit Aluminiumfolie ausgekleidet sind (z.B. Tetra Pak™).

In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien festgestellt, dass der Konsum von unerhitzter Milch (Rohmilch) einen protektiven Einfluss gegenüber der Entstehung von Asthma und Allergien bei Kindern hat. LOSS et al. (2011) stellten fest, dass dieser Effekt des Rohmilchkonsums mit der Molkenproteinfraktion assoziiert sein könnte, die während der Erhitzung inaktiviert wird. Die Caseinfraktion hingegen ist hitzestabil und wird weder durch Pasteurisation noch durch UHT-Erhitzung zerstört.

## 1.4 ALTERNATIVE PHYSIKALISCHE HALTBARMACHUNGSVERFAHREN FÜR MILCH

### 1.4.1 BAKTOFUGIERUNG

Die Baktofugierung ist ein besonderes Separierungsverfahren, wobei Mikroorganismen (vor allem Bakterien und Sporen) durch Zentrifugalkraft aus der Milch entfernt werden. Die Baktofuge ist eine Zentrifuge mit hoher Beschleunigung von 10 000 bis 15 000 g. Dadurch werden 98 bis 99% der somatischen Zellen, Bakterien und Bakteriosporen entfernt, weshalb sie auch „Entkeimungszentrifuge“ genannt wird (FRISTER, 2007a). Die gereinigte Milch wird auf 60 bis 75°C vorgewärmt (thermisiert) und gleich darauf in die Baktofuge geleitet. Nach erfolgter Separierung wird das abgetrennte Baktofugat mittels Dampf injektor für drei bis vier Sekunden auf 130 bis 140°C erhitzt, um alle Sporen wirksam abzutöten. Das so sterilisierte Baktofugat wird abgekühlt, bevor es der entkeimten Milch wieder zugesetzt oder einer anderen Verwertung zugeführt wird (STRAHM und EBERHARD, 2009). Die Baktofugierung wird vor allem zur Entfernung der Sporen von *Clostridium* ssp. aus der Milch verwendet, um die Spätblähung bei der Käseherstellung zu verhindern.

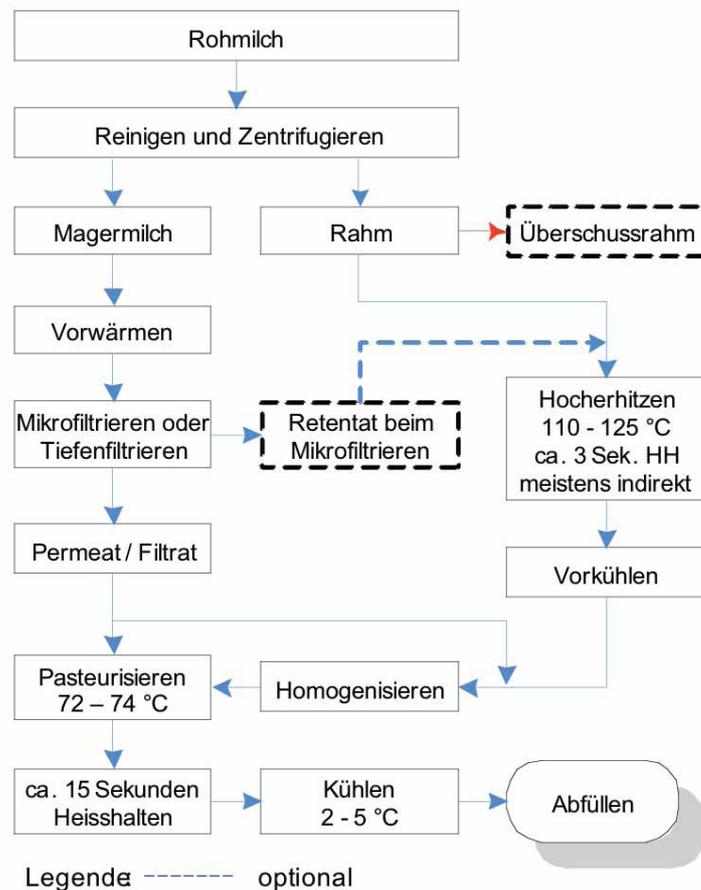
### *1.4.2 MIKROFILTRATION*

Die Mikrofiltration ist ein Membrantrennverfahren, bei dem eine semipermeable Membran mit einer Porenweite von 0,8 bis 1,4  $\mu\text{m}$  die Bakterien zurückhält, während die Milchbestandteile einschließlich der Caseinmicellen die Membran passieren (KRÖMKER, 2007). Dieses Verfahren ist allerdings nur für Magermilch anwendbar, da Fettpartikel die Membranen verstopfen würden. Daher wird der Rahm vor der Mikrofiltration durch Zentrifugation entfernt und nach Erhitzung auf ca. 127°C und darauffolgender Abkühlung der mikrofiltrierten Magermilch wieder zugesetzt, bis der standardisierte Fettgehalt erreicht ist. Dieses Gemisch wird anschließend bei 72 bis 74°C pasteurisiert und danach abgekühlt (STRAHM und EBERHARD, 2009). Für die Mikrofiltration sind verschiedene Membranmodule aus Keramik im Einsatz, insbesondere Wickelmodule und Rohrmodule. Die Mikrofiltration wird seit ca. 1980 in der Milchtechnologie angewandt (STRAHM und EBERHARD, 2009). Das Ziel der Mikrofiltration ist es, eine Konsummilch (ESL-Milch) mit verlängerter Haltbarkeit herzustellen. Die Trenngrenze bei industriell eingesetzten Mikrofiltrationsmembranen beträgt ca. 1,4  $\mu\text{m}$ , die eine Keimrückhaltung von mehr als 99,5% ermöglicht (STRAHM und EBERHARD, 2009).

### *1.4.3 TIEFENFILTRATION*

Das Verfahren der Tiefenfiltration ist der Mikrofiltration ähnlich und wird ebenfalls zur Herstellung von ESL-Milch verwendet. Magermilch wird filtriert, wobei die Mikroorganismen am Filter hängen bleiben und daher kein Retentat (Bakterienkonzentrat) wie bei der Mikrofiltration zurückbleibt. Für die Tiefenfiltration werden eine Vorfilter- und eine Endfiltereinheit verwendet. Jede Filtereinheit besteht aus mehreren Polypropylenfilterkerzen. Die Trenngrenze des Vorfilters beträgt 0,3  $\mu\text{m}$  und die des Endfilters 0,2  $\mu\text{m}$ . Die Keimrückhaltung beträgt mehr als 99% (STRAHM und EBERHARD, 2009). Für die Herstellung von ESL-Milch mittels Tiefenfiltration wird die Rohmilch zuerst zentrifugiert und so in Magermilch und Rahm getrennt. Die Magermilch wird sodann über die Filterkerzen tiefenfiltriert. Der Rahm wird auf 110 bis 125°C erhitzt, abgekühlt und wieder mit der Magermilch vereint. Das

Gemisch aus tiefenfiltrierter Magermilch und erhitztem Rahm wird nun bei 72 bis 74°C pasteurisiert und anschließend abgekühlt (STRAHM und EBERHARD, 2009).



**Abbildung 1. Prozessablauf für die Herstellung von ESL-Milch mittels Mikrofiltration oder Tiefenfiltration (STRAHM und EBERHARD, 2009)**

#### 1.4.4 HOCHDRUCKBEHANDLUNG

Hochdruckbehandlung (auch Pascalisation genannt) ist eine Methode zur Konservierung von Lebensmitteln, die mit hohem hydrostatischem Druck arbeitet. Der eingesetzte Druck kann zwischen 100 und 1000 MPa variieren, die Behandlungsdauer zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten (DOUGLAS, 2003). Der Temperaturbereich liegt normalerweise nahe der Raumtemperatur und kann bis 121°C erhöht werden (CLARK, 2006). Milch war das erste Lebensmittel, an dem 1899 am University of West Virginia Agricultural Center, USA, der Chemiker Bert Hite Versuche zur Hochdruckbehandlung durchführte. Die Anwendung von Hochdruck zur

Reduzierung von Bakterien in Milch erfordert geringere Temperaturen als die herkömmliche Pasteurisation bzw. UHT-Erhitzung. Das bedeutet, dass es zu keinen bzw. deutlich geringeren Geschmacksveränderungen („Kochgeschmack“) der Milch kommt. Milch, die bei 586 MPa und 54,4°C für fünf Minuten behandelt wurde, hält sich gekühlt mehr als 45 Tage, wobei der natürliche Geschmack erhalten bleibt. Allerdings werden bei dieser Methode Bakteriosporen nicht abgetötet (VAZQUEZ-LANDAVERDE et al., 2006). Aktuelle Forschungen haben ergeben, dass eine Hochdruckbehandlung mit 300 MPa bei 25°C für 30 Minuten zu einer Inaktivierung von *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella* und *Staphylococcus aureus* in Rohmilch führt (YANG et al., 2012). Die Bakterien erleiden dabei irreversible Schäden der Zellwände, der Zellmembranen und der chromosomalen DNA (YANG et al., 2012). Um Bakteriosporen, wie z.B. von *Clostridium perfringens*, in Milch wirkungsvoll zu eliminieren, bietet sich die synergistisch wirkende Kombination aus Hochdruckbehandlung und Zusatz von Nisin, einem antibiotisch wirksamen Peptid aus der Gruppe der Lantibiotika, an (GAO et al., 2011). Die Verwendung von Nisin als Konservierungsmittel für Lebensmittel ist in der EU allerdings nur für gereiften Käse und Schmelzkäse, bestimmte Puddings, Clotted Cream und Mascarpone erlaubt (EFSA, 2006). Aufgrund der noch nicht vollständig gelösten Probleme der Sporeninaktivierung und der hohen Kosten wird die Hochdruckhaltbarmachung von Milch kommerziell nicht angewandt.

#### 1.4.5 GEPULSTE ELEKTRISCHE FELDER (PULSED ELECTRIC FIELDS, PEF)

Beim PEF-Verfahren wird ein Lebensmittel einem hohen elektrischen Feld (20 bis 80 kV/cm) ausgesetzt. Sowohl flüssige als auch feste Lebensmittel können damit behandelt werden. Verschiedene Experimente mit Milch als flüssigem Medium wurden bereits unternommen, um den Einfluss einer Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern auf die Abtötung verschiedener Mikroorganismen abzuklären. Dabei wurde von Magermilch, Vollmilch und UHT-Milch ausgegangen, die mit *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Listeria innocua*, *Mycobacterium paratuberculosis*, Salmonellen und *Staphylococcus aureus* inokuliert wurde. Der Abtötungsgrad schwankte in Abhängigkeit von den untersuchten Bakterien, der elektrischen

Feldstärke, der Behandlungszeit, der Pulsdauer und der maximalen Temperatur des Lebensmittels (EBERHARD und SIEBER, 2006). Wenn ein ausreichend starkes Potenzial, im Bereich von etwa 1V, induziert wird, kommt es zum Verlust der Zellmembranstabilität und schließlich zum dielektrischen Bruch der Membran. Der Zellinhalt tritt aus und die Stoffwechselaktivität versiegt (EBERHARD und SIEBER, 2006). Das PEF-Verfahren kann mit milder Hitze oder dem Einsatz von Lysozym und/oder Nisin kombiniert werden.

#### 1.4.6 ULTRASCHALL

Ultraschall wird seit einigen Jahren bei diversen lebensmitteltechnologischen Prozessen wie Homogenisierung, Dispergierung unter hohen Scherraten, Pasteurisation und in der Fest-Flüssig-Separation eingesetzt. Bei der Anwendung dieser Technologie auf eine kontinuierlich fließende Flüssigkeit wird in erster Linie ein akustischer Druck erzeugt, der sich zum hydrostatischen Druck addiert. Für industrielle Anwendungen ist eine Ultraschalleistung von 0,1 bis 1000 W/cm<sup>2</sup> bei einer Frequenz von 20 bis 100 kHz einzusetzen (PERREN und BATES, 2009). In der Molkereiindustrie wird Ultraschall bereits zur Homogenisierung von Milch eingesetzt (SKIBA und KHMELEV, 2007). Für die Anwendung von Ultraschall zur Haltbarmachung von Milch empfiehlt es sich, dieses Verfahren mit einer anderen Strategie zur mikrobiellen Reduktion zu kombinieren, wie z.B. einer milden Erhitzung (D'AMICO et al., 2006). Ein Beispiel dafür ist die Inaktivierung von *Listeria monocytogenes* in inokulierter UHT-Milch und die Reduktion der Gesamtkeimzahl in Rohmilch. Eine kontinuierliche Ultraschallbehandlung (20 kHz, 118 W/cm<sup>2</sup>) kombiniert mit milder Erhitzung (57°C) für 18 Minuten verringerte sowohl die Keimzahl von *L. monocytogenes* als auch die Gesamtkeimzahl um fünf Log-Stufen (D'AMICO et al., 2006).

Bei den alternativen (auch „kalten“) Verfahren wie Hochdruck, gepulsten elektrischen Feldern und Ultraschall gibt es, im Gegensatz zu den Hitzebehandlungen zur Haltbarmachung von Milch, keine klar definierten und allgemein anerkannten Mindestbedingungen für die Gewährleistung der hygienischen Sicherheit des fertigen Produktes. Bei Hitzebehandlungen, wie z.B. der Pasteurisation, genügt die Angabe

einer Zeit- / Temperaturkombination oder der Nachweis der Inaktivierung eines milchoriginären Enzyms (alkalische Phosphatase) zur Anerkennung einer ausreichenden Erhitzung des Produktes. Im Labor- und Pilotmaßstab wurden bereits viele Versuche mit alternativen Verfahren zur Milchkonservierung durchgeführt. Die mit unterschiedlichen Bedingungen erzielten Ergebnisse sind jedoch schwer vergleichbar. Deshalb hat bis heute keines der alternativen Verfahren in der milchtechnologischen Praxis in nennenswertem Umfang Verbreitung gefunden.

## 1.5 DEFINITION ROHMILCH UND ROHMILCHKÄSE

Gemäß österreichischem Lebensmittelbuch (IV. Auflage, Codexkapitel/B32/Milch und Milchprodukte, 2011) handelt es sich bei Rohmilch um rohe Konsummilch, die zum unmittelbaren Verzehr bestimmt ist. Sie wird nicht über 40°C erhitzt und keiner Behandlung mit entsprechender Wirkung unterzogen. Rohmilch darf nur am Tag der Gewinnung und an den zwei darauffolgenden Tagen abgegeben werden. Rohmilch für den menschlichen Verzehr ist mit der Kennzeichnung „Rohmilch, vor dem Verzehr abkochen“ zu versehen. Rohe Konsummilch schmeckt produkttypisch und ihr Fettgehalt wird nicht verändert, das heißt, sie besitzt ihren natürlichen Fettgehalt von 3,5 bis 4% (RIMBACH et al., 2010).

Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 beschreibt im Anhang I unter Ziffer 4 „Rohmilch“ als das Gemelk von Nutztieren, das nicht über 40°C erhitzt und keiner Behandlung mit ähnlicher Wirkung unterzogen wurde. Abgeleitet ist diese Definition von der Temperatur der Milch direkt nach dem Melken, die – beeinflusst durch die Körpertemperatur der Kühe - normalerweise nicht über 40°C liegt (HELBLE, 2008). Rohmilch wird vom jeweiligen Milcherzeugungsbetrieb direkt an den Konsumenten abgegeben (Ab-Hof-Abgabe). Ebenfalls unter Anhang I Ziffer 4 ist die Definition für „Milcherzeugungsbetrieb“ angegeben. Dieser ist ein Betrieb mit einem oder mehreren Nutztieren, die zur Erzeugung von Milch, die als Lebensmittel in Verkehr gebracht werden soll, gehalten werden.

Laut Lebensmittelsicherheitsbericht 2011 der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH) und des österreichischen

Bundesministeriums für Gesundheit gibt es in Österreich derzeit 394 Direktvermarkter von Rohmilch.

Rohmilch enthält von allen Milchsorten den höchsten Anteil an Nährstoffen wie Vitamine und Mineralstoffe. Rohe Kuhmilch enthält alle bekannten Vitamine und ist wichtig zur Bedarfsdeckung für die Vitamine A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> und Pantothenensäure. Ein halber Liter Rohmilch kann einen Großteil des täglichen Vitamin A- (25%), Vitamin B<sub>2</sub>- (50%), Pantothenensäure- (25%) und Vitamin B<sub>12</sub>- Bedarfs (70%) decken (RIMBACH et al., 2010). Der Gehalt an fettlöslichen Vitaminen in Rohmilch hängt von der Fütterung ab, während der Gehalt an den wasserlöslichen B-Vitaminen, die im Pansen synthetisiert werden, ausgenommen Vitamin B<sub>12</sub>, nicht fütterungsabhängig ist (RIMBACH et al., 2010). Durch Wärmebehandlung der Rohmilch werden jedoch viele Vitamine zerstört. Die geringsten Verluste verursacht die Pasteurisation, die höchsten die Sterilisation. Zu den hitzeempfindlichsten Vitaminen zählen B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C und Folsäure (RIMBACH et al., 2010).

Bestimmte Käsesorten, wie Allgäuer Emmentaler, französischer Camembert, Roquefort oder Parmigiano Reggiano, müssen aus Rohmilch hergestellt werden. Andere Käsesorten, wie Brie, Feta, Limburger oder Mozzarella können, müssen aber nicht, mit Rohmilch hergestellt werden. Wenn zur Käseherstellung Rohmilch verwendet wurde, muss dies immer deklariert werden und zwar durch den Hinweis „mit Rohmilch hergestellt“ (Anhang III Abschnitt IX Kap. IV Nr. 2 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004). Auch andere Milcherzeugnisse aus Rohmilch müssen so gekennzeichnet werden.

Laut einem Kommentar der schweizerischen Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) gelten die klassischen Schweizer Rohmilchkäsesorten Appenzeller, Berner Alp- und Hobelkäse, Emmentaler, L'Étivaz, Gruyère, Roh-Tilsiter, Tête de Moine und Sbrinz als hygienisch sicher. Hohe Milchqualität, rasche Milchverarbeitung innerhalb von 18 Stunden, relativ hohe Temperaturen bei der Käseherstellung verbunden mit einer guten Säuerung des Käseteiges sowie lange Reifungsdauern von drei bis 18 Monaten verhindern, dass sich Krankheitserreger in gefährlicher Weise vermehren können. Auch empfindliche Konsumentengruppen, wie z.B. schwangere Frauen, können diese Käse bedenkenlos zu sich nehmen (ALP, 2008). Dagegen sind Weichkäse aus Rohmilch, wie z.B. Camembert de Normandie

AOP (Appellation d'Origine Protégée, geschützte Ursprungsbezeichnung) oder Roquefort AOP, hygienisch wesentlich riskanter, da die Käsemasse hier kaum erhitzt wird, der Wassergehalt hoch ist und die Reifungszeiten nur wenige Wochen betragen. Dadurch ist eine Inaktivierung bzw. Reduzierung von Krankheitserregern aus der Rohmilch nicht sichergestellt. Die hygienische Sicherheit dieser Käsesorten muss daher durch strenge Überwachung der Milchqualität schon bei der Gewinnung und lückenlose mikrobiologische Kontrollen der Produktchargen garantiert werden (ALP, 2008).

## 1.6 DEFINITION VORZUGSMILCH

Weder im österreichischen noch im deutschen Lebensmittelbuch ist eine Definition für „Vorzugsmilch“ angegeben.

Vorzugsmilch ist als einzige Rohmilch für den Rohverzehr bestimmt und muss deshalb besonders strengen Anforderungen an Gewinnung, Beschaffenheit, Behandlung, Verpackung und Beförderung genügen. Sie wird unter besonderen hygienischen Bedingungen produziert, die in Deutschland in der Tier-LMHV (Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung) geregelt sind.

In Österreich gibt es keine Erzeugerbetriebe für Vorzugsmilch, in Deutschland etwa 80 (VSB, 2010). Viele davon sind im Verband Deutscher Vorzugsmilcherzeuger vertreten. Vorzugsmilch hat in Deutschland einen sehr geringen Anteil am Milchkonsum und wird meist in Bioläden und Reformhäusern oder mittels Direktvermarktung angeboten. Die Erzeugerbetriebe benötigen von der zuständigen Behörde, in Deutschland sind das die kommunalen Veterinärämter, eine entsprechende Genehmigung. Gefordert werden außerdem u.a. monatliche tierärztliche Untersuchungen der Milchkühe, eine getrennte Haltung dieser vom restlichen Tierbestand, besondere Hygienestandards und eine konsequente Eigenkontrolle der Vorzugsmilch in monatlichen Stichproben. Vorzugsmilch muss gefiltert und innerhalb von zwei Stunden auf 4°C abgekühlt werden. Vorzugsmilch enthält wie Rohmilch den natürlichen Fettgehalt der Milch sowie alle Vitamine und Mineralstoffe in unveränderter Form.

**Tabelle 2. Unterschiede zwischen Rohmilch und Vorzugsmilch (THIELKE, 2009)**

<b>Merkmal</b>	<b>Rohmilch</b>	<b>Vorzugsmilch</b>
Voraussetzung für die Abgabe	Anzeige beim jeweils zuständigen Veterinäramt	Genehmigung durch die zuständige Behörde (Veterinäramt)
Abgabeform	direkt aus dem Milchtank in die mitgebrachte Milchkanne; auch „Eiserne Kuh“ in Form von Selbstzapfsystemen	Fertigpackung, verschlossene Kannen und ähnliche Behältnisse
Abgabeort	nur in der Betriebsstätte (Ab-Hof)	in und außerhalb der Betriebsstätte (mittel- und unmittelbar), auch an Einzelhandel
Verkehrsbezeichnung	Rohmilch, Ab-Hof-Milch	Vorzugsmilch
Kennzeichnung	Hinweisschild an der Abgabestelle: „Rohmilch, vor dem Verzehr abkochen“	Hinweis auf der Verpackung: „Rohmilch – verbrauchen bis ... – aufbewahren bei höchstens +8°C“
Verbrauchsfrist	tagesfrisch, maximal vom Vortag	maximal 96 Stunden ab Gewinnung
Anforderungen an den Betrieb	<p>Erfüllung der gesetzlichen Anforderungen an die Abgabe kleiner Mengen von Primärerzeugnissen:</p> <p>Vermeidung nachteiliger Beeinflussung (Wände, Böden, Flächen instand halten, reinigen, ggf. desinfizieren; hygienische Herstellungs- und Lagerungsbedingungen; Verwendung von Trinkwasser; Abfälle getrennt lagern)</p> <p>Sicherstellung einer guten Lebensmittelhygiene (bei der Lagerung Verunreinigungen vermeiden; Trinkwasserversorgung), GMP</p> <p>Personalschulungen</p> <p>Persönliche Hygiene, ggf. Schutzkleidung</p>	<p>Erfüllung der „gesetzlichen Anforderungen an Vorzugsmilch“ (Anlage 9 Tier-LMHV):</p> <p>Anforderungen an den Tierbestand (getrennte Haltung der Vorzugsmilch-Kühe; monatliche tierärztliche Kontrolle der Kühe; monatliche Kontrolle der Eutergesundheit über die Bestimmung der somatischen Zellen in der Milch)</p> <p>Milchkühlung auf 4°C innerhalb von 2 h nach dem Melken; Temperatur zwischen Abfüllung und Abgabe ≤ 8°C</p> <p>Einhaltung von Grenzwerten bezüglich bestimmter Bakterien</p> <p>Anforderungen an die Vorzugsmilcherzeugungsbetriebe (Räume, Fußböden, Wände, Decken, Türen, Beleuchtung, Waschplätze, Umkleieräume etc.)</p>

## 1.7 MIKROBIOLOGISCHE BESCHAFFENHEIT VON ROHMILCH

Eine der „zehn goldenen Regeln“ der World Health Organisation (WHO, Weltgesundheitsorganisation) zur Vermeidung von lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten heißt: „Kaufe pasteurisierte Milch anstelle von Rohmilch.“

Die Milch einer gesunden Kuh verlässt praktisch keimfrei das Euter und wird erst während der Passage des Strichkanals mit Mikroorganismen kontaminiert. Die in die Rohmilch gelangenden Keime stammen von der Euteroberfläche, den Melkgerätschaften, dem Einstreu im Stall, dem Futter, dem Melker, der Stallluft und dem Wasser, mit dem das Euter gewaschen wird. Bei guter Melk- und Euterhygiene sowie einer entsprechenden Reinigung des Melkgeschirrs ist eine Keimzahl von unter 5000 KbE/mL zu erwarten (ZANGERL, 2007). Die Keime, die sich in der Rohmilch befinden, vermehren sich während der Lagerung, des Transports sowie im milchverarbeitenden Betrieb. Die Vermehrungsgeschwindigkeit hängt von der Ausgangskeimzahl, von der Temperatur und Dauer der Lagerung bzw. des Transports ab. Durch die Kühlung der Rohmilch kommt es zu einer Verschiebung der Keimflora in Richtung psychrotrophe, gramnegative Keime. In kühl gelagerter Rohmilch besteht die Keimflora hauptsächlich aus Pseudomonaden. Diese können sich selbst bei Temperaturen von 5°C innerhalb von drei bis vier Tagen zu hohen Zahlen vermehren (ZANGERL, 2007).

**Tabelle 3. Kontaminationsquellen in frisch ermolkenen Rohmilch (ZANGERL, 2007)**

<b>Herkunft</b>	<b>Keimzahl pro mL</b>	<b>Keimgruppen</b>
Luft im Stall	ca. 100	vor allem aerobe Sporen
Euter (innen)	praktisch keimfrei (bei gesunden Kühen)	-
Strichkanal	ca. 100-1000	Mikrokokken, Staphylokokken, Streptokokken, Milchsäurebakterien, Coryneforme, Bacillen, Gramnegative
Euteroberfläche	1 000-100 000 (abhängig von der Euterhygiene)	Mikrokokken, Staphylokokken, Streptokokken, Milchsäurebakterien, Clostridien, Bacillen, Coliforme u.a. Gramnegative, Pathogene
Gerätschaften (Melkanlage)	ca. 1 000-500 000	vor allem Gramnegative Keime (Pseudomonaden, Enterobakterien)

**Tabelle 4. Zusammensetzung der Keimflora von frischer Rohmilch (FRANK und HASSAN, 2002)**

<b>Keimflora</b>	<b>Prozentanteil</b>
Mikrokokken, Staphylokokken	30-99
<i>Bacillus, Clostridium</i>	< 10
<i>Streptococcus, Lactococcus</i>	0-50
<i>Mikrobacterium, Coryneforme, Lactobacillus</i>	< 10
<i>Pseudomonas, E. coli, Alcaligenes, Acinetobacter</i>	< 10
Hefen und Schimmelpilze	< 10

## 1.8 EUTERGESUNDHEIT UND MASTITIS

Gemäß International Dairy Federation wird die Mastitis des Rindes als eine entzündliche Reaktion der Milchdrüse mit infektiöser, traumatischer oder toxischer Ursache definiert. Diese Erkrankung, bei deren Zustandekommen neben dem ursächlichen Agens eine Vielzahl von Faktoren (Melkhygiene, Melktechnik, Melkarbeit, Stallhygiene, Tierhygiene, Fütterungsregime, Management etc.) zusammenwirken, stellt bei in Herden gehaltenen Milchkühen ein Bestandsproblem dar. Das einzelne Tier unterliegt in der Herde einem Erkrankungsdruck, der durch die Infektionslage in der Herde (im Sinne eines Erregerreservoirs) einerseits und durch das Ausmaß von haltungstechnischen und hygienischen Mängeln andererseits bestimmt wird (KRÖMKER, 2007). Zur sicheren Diagnose erkrankter Milchdrüsen sollten immer mindestens zwei Kriterien (Erreger- und Entzündungsnachweis) herangezogen werden, wobei die grundsätzliche diagnostische Einordnung dabei auf der Ebene des Euterviertels erfolgt (KRÖMKER, 2007). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft empfiehlt, den Gehalt somatischer Zellen im Viertelanfangsgemelk mit dem Nachweis mikrobiologischer Erreger zu kombinieren. Die Anzahl der somatischen Zellen in der Milch (Zellgehalt) ist ein Ausdruck für die Eutergesundheit von Milchkühen, wobei gesunde Milchdrüsenkomplexe in der Regel nicht mehr als 100 000 Zellen pro mL Milch ausweisen (DVG, 1994). Oft ist der Effekt von Mastitiden als Veränderungen der Rohmilch zu erkennen und zwar als Entwicklung eines ranzigen Geschmackes sowie geringerer Hitzestabilität des Molkenproteins (KRÖMKER, 2007). Gerade bei Hochleistungskühen kommt es aufgrund der enormen Milchproduktion und der damit verbundenen Belastung des Eutergewebes und des gesamten Organismus der Kuh häufig zu Mastitiden (STOLZ et al., 2008). Es können auch subklinische Mastitiden auftreten, also solche, die nicht an der veränderten Milch erkennbar sind und nur durch eine erhöhte Anzahl somatischer Zellen in der Milch nachweisbar sind. Eine gezielte Therapie von Mastitiden setzt die genaue Kenntnis der verursachenden Erreger voraus. Deshalb werden im Rahmen der veterinärmedizinischen Kontrollen Gemelkproben von jedem Euterviertel einer Kuh getrennt voneinander untersucht. Häufige Mastitis-Erreger sind bestimmte Streptokokken (z.B. *Streptococcus agalactiae*, *Sc. dysgalactiae*, *Sc. uberis*), Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative

Staphylokokken), *Bacillus cereus*, Mycoplasmen, der Eitererreger *Arcanobacterium pyogenes*, Enterobakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella ssp.*) aber auch Hefen und sogar Algen (z.B. *Prototheca zopfii*) (STOLZ et al., 2008).

**Tabelle 5. Befunde von Viertelgemelksuntersuchungen in Österreich 2009 (KRÖMKER, 2010)**

<b>Erreger</b>	<b>Häufigkeit</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	31%
sonstige	24%
Koagulase-negative Staphylokokken	17%
<i>Streptococcus uberis</i>	13%
<i>Str. dysgalactiae</i>	9%
<i>E. coli</i> / coliforme Keime	5%
<i>Str. agalactiae</i>	1%

## 1.9 GESUNDHEITSGEFÄHRDENDE MIKROBIOLOGISCHE POTENTIALE IN ROHMILCH

Im Besonderen sind es vier pathogene Mikroorganismen, die heutzutage in Europa für schwere Krankheitsausbrüche beim Menschen nach dem Konsum von Rohmilch verantwortlich sind: *Salmonella*, Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC), *Campylobacter* und *Listeria*. Es kommen aber auch Infektionen durch sekundäre Kontamination bzw. Rekontamination von hitzebehandelten Milchprodukten vor.

Zwischen 1992 und 2000 waren 52% der Lebensmittelinfektionen in England und Wales auf den Konsum von Rohmilch zurückzuführen (YILMAZ et al., 2009). In den USA waren 34% der Lebensmittelinfektionen zwischen 1998 und 2007, die mit Milch und Milchprodukten in Verbindung gebracht werden konnten, auf nicht-pasteurisierte Erzeugnisse zurückzuführen (SMITH DE WAAL et al., 2009).

### 1.9.1 SALMONELLEN

Salmonellen gehören zu den obligat pathogenen Enterobakterien. Es handelt sich dabei um gramnegative Stäbchen, die peritrich begeißelt sind. Sie wachsen generell in einem Temperaturbereich von zehn bis 47°C und werden durch Tiefkühlung nicht abgetötet. Als gesicherte Keimabtötung gilt ein Erhitzen auf über 70°C für mindestens 15 Sekunden (MUCH et al., 2011). Es sind mehr als 2000 Serotypen (Serovare) bekannt. Die häufigste Spezies ist *Salmonella enterica*. Aus historischen Gründen werden die Serotypen von *Salmonella* inkorrekterweise meist nur mit den Gattungs- und Serovarnamen bezeichnet, z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Enteritidis (Kurzbezeichnung *Salmonella* Enteritidis). Zu den Erregern der typhösen Salmonellose gehören *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B und C. Zu den Erregern der enteritischen Salmonellose mit dem Leitsymptom Durchfall gehören *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium und ca. 1600 weitere Serovare von enterischen Salmonellen. *S. Typhi* und *S. Paratyphi* sind nur für den Menschen pathogen. Keimreservoir für die typhösen Salmonellen ist daher nur der Mensch, von dem die Erreger direkt durch Schmierinfektion oder indirekt durch Lebensmittel und Wasser übertragen werden. Die letzten großen Typhusepidemien in Österreich traten kurz nach dem Zweiten Weltkrieg auf.

Nutztiere können sich mit salmonellenbelasteten Futtermitteln anstecken (MUCH et al., 2011). Enteritische Salmonellen werden durch kontaminierte Tiere auf Lebensmittel, wie z.B. Rohmilch, übertragen. Die Inkubationszeit beträgt zwölf bis 36 Stunden. Als Komplikation einer Durchfallerkrankung, aber auch ohne begleitende Diarrhoe, kann es zu septischen Streuungen mit Absiedelungen in verschiedenen Organen kommen (ALLERBERGER, 2008a). Die notwendige Infektionsdosis für Salmonellen beträgt mindestens 1000 Keime (MUCH, et al., 2011). Die Kontamination der Rohmilch mit Salmonellen kann nach dem Melken über salmonellenhaltigen Kot von Kälbern und Kühen erfolgen. Weiters durch den Menschen, Melkgerätschaften und –anlagen, Brauchwasser und auch durch Fliegen und Ratten. Eine direkte Kontamination über das Euterinnere kommt sehr selten vor, so z.B. über klinisch und subklinisch verlaufende Salmonellenmastitiden.

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf die Salmonellose und ihre Erreger als überwachungspflichtige Zoonose und Zoonoseerreger verwiesen.

In Österreich konnte im Jahre 2011 in keiner von insgesamt 936 untersuchten Proben der Lebensmittelgruppen Milch, Milchprodukte und Käse *Salmonella* nachgewiesen werden (MUCH et al., 2012).

In Deutschland ist Rohmilch sehr selten mit Salmonellen kontaminiert. Dort werden seit vielen Jahren Salmonellen in Rinderbeständen auf Grundlage der Rinder-Salmonellose-Verordnung (Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. November 1991 (BGBl. I S. 2118), zuletzt geändert durch Artikel 2 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3939)) bekämpft.

In anderen Ländern scheinen Salmonellen häufiger in Rohmilch vorzukommen. So wurden in den USA im Jahre 2001 131 Proben von Herdensammelmilch untersucht. Der Erreger konnte in acht Fällen (6,1%) nachgewiesen werden (HERBERTZ, 2002).

**Tabelle 6. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Salmonelosen**

<b>Stamm</b>	<b>Ort</b>	<b>Zeit</b>	<b>betroffene Personen</b>	<b>Bemerkungen</b>	<b>Referenzen</b>
<i>Salmonella</i> Newport	Utah (USA)	April 2010	6	Rohmilch; die Betroffenen waren zwischen zwei und 56 Jahren alt	COLLINS, 2010
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Pennsylvania (USA)	Feb. - Juli 2007	29	Rohmilch von Ab-Hof-Verkauf	LIND et al., 2007
<i>Salmonella</i> Enteritidis Phagentyp 8	Österreich	2005	1	Rohmilch	ALLERBERGER, 2008a
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Schweiz	Dez. 2002	23 (davon 17 Patienten)	Rohmilch aus der Küche eines Pflegeheims	BAG, 2004
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Illinois und benachbarte US-Bundesstaaten	März/April 1985	16 284	In einer Molkerei wurde unbeabsichtigt pasteurisierte Milch mit kontaminierter Rohmilch vermischt; der Stamm war gegen viele Antibiotika resistent	LECOS, 1986
<i>Salmonella</i> Typhimurium	New Mexico (USA)	1983	19	Der Erreger war gegen die meisten Antibiotika resistent.	LEEDOM, 2006
<i>Salmonella</i> ssp.	Großbritannien	1982-1986	728	Rohmilch	DE BUYSER, 2001
<i>Salmonella</i> Dublin	Kalifornien (USA)	1980-1983	303	Vorzugsmilch; 69 Personen starben, die meisten von ihnen waren davor schon schwer krank	LEEDOM, 2006

Die Typisierungen aller Salmonellen erfolgen in Österreich in der Nationalen Referenzzentrale für Salmonellen am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der AGES in Graz mittels Serotypisierung nach dem Kauffmann-White-Schema; eine weitere Differenzierung wird durch Lysotypisierung in Phagentypen bei *Salmonella* Enteritidis und in definitive Typen bei *Salmonella* Typhimurium durchgeführt (MUCH et al., 2011).

### 1.9.2 VEROTOXIN-BILDENDE *ESCHERICHIA COLI* (VTEC)

*Escherichia coli* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, das peritrich begeißelt ist. Es gehört zur Normalflora des Darmes und ist dort nicht pathogen. Von den darmpathogenen *E. coli* verursachen vor allem die enterohämorrhagischen *E. coli* (VTEC) die Kontamination von Rohmilch. VTEC bilden die Exotoxine Shigatoxin Stx1 oder Stx2. Wegen des zelltoxischen Effekts auf Verozellen wurden diese Toxine auch als Verotoxine oder Verocytotoxine bezeichnet. Daher lauten die Synonyme für VTEC auch STEC (Shigatoxin-bildende *E.coli*) und VTEC (Verotoxin-bildende *E.coli*). VTEC gelangen über den Kot von Wiederkäuern, wie z.B. Rindern, in Lebensmittel wie Rohmilch und Milchprodukte. Die Infektionsdosis ist sehr gering, es genügen schon zehn bis 100 VTEC-Bakterien. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis zehn Tage. Die Symptomatik ist vielfältig: bei etwa einem Drittel der Patienten manifestiert sich die Erkrankung als leichter Durchfall. Bei zehn bis 20% entwickelt sich eine hämorrhagische Colitis mit Bauchkrämpfen, blutiger Diarrhoe und Fieber (ALLERBERGER, 2008a). Bei circa fünf bis 15% können sich nach der Diarrhoe ein kurzes, symptomloses Intervall und dann ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) einstellen (ALLERBERGER, 2008a). HUS manifestiert sich klinisch als akutes Nierenversagen mit Anämie und Thrombozytopenie. Bei bis zu 30% der HUS-Patienten kann es zu einer dauerhaften Nierenschädigung mit Dialyse- oder Transplantationspflicht kommen (ALLERBERGER, 2008a).

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf Verotoxinbildende *E. coli* als überwachungspflichtigen Zoonoseerreger verwiesen.

Infektionen mit VTEC nach dem Konsum nicht-pasteurisierter Kuhmilch, inklusive HUS bei Kindern, wurden in Österreich wiederholt beschrieben (ALLERBERGER, 2008a). Im Jahr 2010 konnten in allen 27 untersuchten österreichischen Rohmilchproben keine VTEC nachgewiesen werden (MUCH et al., 2011). Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS) hat in den Jahren 2006 bis 2010 insgesamt 2105 Lebensmittelproben aus Baden-Württemberg auf das Vorhandensein von VTEC untersucht, wobei 23 Kuhrohmilchproben VTEC-positiv waren (CONTZEN et al., 2011).

**Tabelle 7. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von VTEC**

<b>Stamm</b>	<b>Ort</b>	<b>Zeit</b>	<b>betroffene Personen</b>	<b>Bemerkungen</b>	<b>Referenzen</b>
<i>E. coli</i> O157:H7	Kalifornien (USA)	August-Okt. 2011	5 Kinder	Rohmilch, Butter und Rahm sowie Rohkolostrum	CDFA, 2011
<i>E. coli</i> O157:H7	BRD	Mai 2008	23 Kinder	2 HUS-Fälle; Rohmilch von einem Bauernhof	KNEIFEL und APPRICH, 2011
<i>E. coli</i> O157:H7	Kalifornien (USA)	Sept. 2006	4 Kinder	2 HUS-Fälle; Rohmilch und Rohkolostrum	SCHNEIDER et al., 2008
<i>E. coli</i> O157:H7	Washington und Oregon (USA)	Dez. 2005	18 (davon 15 Kinder)	Rohmilch von einer unlizenzierten Farm	BHAT et al., 2007
<i>E. coli</i> O26:H	Steiermark und Wien	Juli 2001	2 Kinder	1 HUS-Fall; Rohmilch	ALLERBERGER et al., 2003
<i>E. coli</i> O26:H	Tirol	Juli 1998	1 Kind	1 HUS-Fall; Rohmilch	TGAM, 2011

Die Nationale Referenzzentrale und das Nationale Referenzlabor für *E. coli* einschließlich Verotoxin bildender *E. coli* befinden sich am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der AGES in Graz.

### 1.9.3 CAMPYLOBACTER

Die Gattung *Campylobacter* ist neben *Salmonella* der häufigste bakterielle Durchfallerreger beim Menschen. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis fünf Tage. *Campylobacter* ist ein spiralig gewundenes, gramnegatives Stäbchenbakterium, das an einem oder beiden Polen eine Geißel aufweisen kann. Man kultiviert *Campylobacter* unter mikroaerophilen Bedingungen. Die Bakterien reagieren empfindlich auf saure pH-Werte und werden durch Pasteurisieren sicher abgetötet (MUCH et al., 2011). Viele *Campylobacter*-Arten sind bei Haus-, Nutz- und Wildtieren weit verbreitet und gelten dort als physiologische Darmbewohner (ALLERBERGER, 2008a). Für den Menschen sind *Campylobacter jejuni*, *C. fetus* und *C. coli* pathogen. *C. jejuni* und *C. coli* verursachen im Gastrointestinaltrakt eine entzündliche Enteritis mit Fieber und Durchfällen. Der Krankheitsverlauf ist selbstlimitierend. In seltenen Fällen kann als Folge einer *Campylobacter*-Infektion das Guillain-Barré-Syndrom, eine Erkrankung des Nervensystems, auftreten. *C. fetus* löst vor allem bei Kleinkindern Gastroenteritis aus, bei Rindern und Schafen Fehlgeburten sowie Unfruchtbarkeit. In verschiedenen Studien wurden Nachweisraten beim Rind von 22 bis 89% erhoben (ALLERBERGER, 2008a). Im Jahr 2005 wurden in Österreich amtlich Kotproben von 605 Rindern auf *Campylobacter* spp. untersucht: 15% der Tiere waren mit *Campylobacter jejuni* besiedelt (ALLERBERGER, 2008a). Der am häufigsten nachgewiesene Erreger bei Lebensmittelinfektionen ist *C. jejuni*. Die Ansteckung erfolgt im Wesentlichen über infiziertes Wasser und fäkal kontaminierte Lebensmittel. Nichtpasteurisierte Milchprodukte sind als mögliche Vehikel der Keime gut belegt (ALLERBERGER, 2008a). Auch Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch sowie durch den Kontakt mit infizierten Tieren (Haustieren, Nutztieren) sind beobachtet worden.

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf die Campylobacteriose und ihre Erreger als überwachungspflichtige Zoonose und Zoonoseerreger verwiesen.

In den im Jahre 2010 in Österreich untersuchten 55 Rohmilchproben konnte *Campylobacter* nicht nachgewiesen werden (MUCH et al., 2011). In den USA ist

*Campylobacter jejuni* in ein bis zwei Prozent der untersuchten Rohmilchproben zu finden (YILMAZ et al., 2009).

**Tabelle 8. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Campylobacteriosen**

Stamm	Ort	Zeit	betroffene Personen	Bemerkungen	Referenzen
<i>C. jejuni</i>	Pennsylvania (USA)	Jan. 2012	80 (davon 25 Kinder)	Rohmilch	ANDREWS, 2012
<i>Campylobacter</i> spp.	Österreich	2005	5	Rohmilch	ALLERBERGER, 2008a
<i>C. jejuni</i>	Wisconsin (USA)	Dez. 2001	75	Rohmilch; die Betroffenen waren zwischen zwei und 63 Jahren alt	HARRINGTON et al., 2002
<i>C. jejuni</i>	Österreich	Sept. 1998	38 Kinder	Rohmilch aus der Kantine eines Jugendheims	LEHNER et al., 2000
<i>C. jejuni</i>	Kalifornien (USA)	Mai 1984	12 (davon 9 Kinder)	Vorzugsmilch, Kefir und Eiscreme; Besuch einer Farm	CDC, 1984
<i>C. jejuni</i>	Pennsylvania (USA)	Mai 1983	57 Kinder	Rohmilch; Besuch zweier Farmen	BLESSING et al., 1983
<i>C. jejuni</i>	Georgia (USA)	1981	50	Vorzugsmilch	POTTER et al., 1983

Die Nationale Referenzzentrale sowie das Nationale Referenzlabor für *Campylobacter* in Lebensmittel und Futtermittel befinden sich am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der AGES in Graz.

#### 1.9.4 LISTERIEN

Listerien sind ubiquitär vorkommende, grampositive Stäbchenbakterien. Die Spezies *Listeria monocytogenes* verursacht eine Erkrankung, die als Listeriose bezeichnet wird. Die Inkubationszeit beträgt etwa drei Wochen. Listerien bilden bei 20°C Geißeln und sind somit beweglich, ab 37°C dagegen sind sie unbeweglich (NEUMEISTER und WINKLHOFER, 1997). *L. monocytogenes* lässt sich aerob und fakultativ anaerob anzüchten. Die orale Aufnahme des Erregers, meist mittels kontaminierter Lebensmittel, wie z.B. Weichkäse, führt bei immunkompetenten Personen zu grippeähnlichen Symptomen. Bei Immungeschwächten kommt es dagegen zu einer Invasion der Erreger. Die Bakterien sind fakultativ intrazellulär und können sich innerhalb der Zellen des Immunsystems vermehren. Es kommt zu Infektionen des Zentralen Nervensystems, der Augen, der inneren Organe, zu Sepsis sowie bei Schwangerschaftslisteriose zu einer Fehlgeburt oder schweren Schädigungen des Ungeborenen. Während der Schwangerschaft ist die Anfälligkeit gegenüber Listerien deutlich erhöht (ALLERBERGER, 2008a). Infizierte Neugeborene erkranken häufig an einer Hirnhautentzündung. Trotz gezielter Antibiotikatherapie verlaufen bis zu 30% aller invasiven Listeriosen tödlich (MUCH et al., 2011).

Das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) hat im Jahr 2009 mehrere Lebensmittelgruppen auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* untersucht. In der Warengruppe Milch (inkl. Rohmilch, Vor- und Zwischenprodukten) wurden 160 Proben untersucht, wobei in einer Probe *L. monocytogenes* qualitativ nachgewiesen werden konnte (LAVES, 2009).

In Österreich sind Erkrankungen, Todesfälle und Verdachtsfälle an Listeriose erst seit 2004 meldepflichtig.

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf die Listeriose und ihre Erreger als überwachungspflichtige Zoonose und Zoonoseerreger verwiesen.

Mindestens 10% der sporadischen Listeriosen in Österreich können mit dem Verzehr von Rohmilch und rohen Milchprodukten in Zusammenhang gebracht werden (ALLERBERGER, 2008a). In einer von insgesamt 30 Kuhrohmilch-Proben (3,3%), die 2010 von der AGES in Österreich untersucht wurden, konnte *L. monocytogenes* nachgewiesen werden (MUCH et al., 2011).

**Tabelle 9. Durch Rohmilch hervorgerufene, bestätigte Fälle von Listeriosen**

Erreger	Ort	Zeit	betroffene Personen	Bemerkungen	Referenzen
<i>L. monocytogenes</i>	Washington (USA)	März 2009	4 Schwangere	Rohmilch und daraus hausgemachter Weichkäse; 2 Totgeburten	SHYNG und MCINTYRE, 2012
<i>L. monocytogenes</i>	Österreich	2002	1 Schwangere	Die Mutter hatte 2 Wochen vor der Entbindung Rohmilch getrunken; das Neugeborene verstarb	ALLERBERGER, 2008b
<i>L. monocytogenes</i>	North Carolina (USA)	Okt. 2000- Jan. 2001	12 (davon 10 Schwangere)	Rohmilch und hausgemachter Weichkäse; 5 Totgeburten, 3 Frühgeburten, 2 infizierte Neugeborene	BOGGS et al., 2001

*Listeria monocytogenes* wird meist nicht über das Tier, sondern über die unbelebte Umwelt in die Lebensmittelproduktion eingeschleppt; daher gilt eine Überwachung des Tierbestandes auf Listerien als nicht zweckmäßig (MUCH et al., 2011).

Das Nationale Referenzlabor für Listerien befindet sich am Institut für Lebensmitteluntersuchungen der AGES in Wien.

### 1.9.5 BRUCELLEN

Bakterien der Gattung *Brucella* sind kurze, unbewegliche, nicht sporenbildende Stäbchen, die als Auslöser der Brucellose gelten. Sie sind gramnegativ und wachsen unter aeroben Bedingungen. Brucellen sind gegenüber Hitze und allen geläufigen Desinfektionsmitteln empfindlich (MUCH et al., 2011). *Brucella abortus* verursacht Fehlgeburten bei Rindern und die Bang'sche Krankheit (Morbus Bang) beim Menschen. Diese ist durch ein undulierendes (wellenförmiges) Fieber, das wochen- bis monatelang andauert, sowie Leber- und Milzschwellung charakterisiert (ZETKIN und SCHALDACH, 1999). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch Brucellen-haltige Lebensmittel wie Rohmilch und daraus hergestellte Produkte oder über direkten Kontakt mit infizierten Tieren und deren Ausscheidungen. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist sehr selten. Die Inkubationszeit beträgt zwischen fünf und 60 Tagen (MUCH et al., 2011).

Die Rinderpopulation in Österreich ist seit 1999 amtlich anerkannt frei von *Brucella abortus*, damit trägt Österreich den offiziellen Status *Officially Brucellosis Free* (OBF). Aus diesem Grund besteht keine Notwendigkeit, österreichische Lebensmittel auf *Brucella* zu untersuchen (MUCH et al., 2011). Um den amtlichen Status OBF nicht zu verlieren, muss die Seuchenfreiheit jedes Jahr durch Surveillance-Programme bei den Rinderbeständen bestätigt werden.

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf die Brucellose und ihre Erreger als überwachungspflichtige Zoonose und Zoonoseerreger verwiesen.

2008 trat die neue Bangseuchen-Untersuchungsverordnung (Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit, Familie und Jugend über die Untersuchung von Milch- und Blutproben zur Feststellung der Brucellose (Abortus Bang), BGBl. II Nr. 305/2007, zuletzt geändert durch BGBl. II Nr. 479/2010) in Kraft. Seitdem erfolgt eine flächendeckende Überwachung aller milchliefernden Rinderbetriebe. In keinem der

im Jahre 2010 von der AGES untersuchten 35 374 Betriebe in Österreich wurde *B. abortus* gefunden (MUCH et al., 2011).

Die Nationale Referenzzentrale und das Nationale Referenzlabor für Brucellose befinden sich am Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen der AGES in Mödling.

### 1.9.6 TUBERKULOSE UND MYCOBACTERIUM BOVIS

#### 1.9.6.1 Geschichte der Tuberkuloseübertragung durch Milch

1882 gelang es dem deutschen Mediziner und Mikrobiologen Robert Koch, den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis*, auch „Tuberkelbazillus“ genannt, anzufärben und in Reinkultur zu züchten. Die Tuberkulose war damals eine gefürchtete Krankheit und in allen Gesellschaftsschichten verbreitet. Sie war auch unter den Namen „Schwindsucht“, „Wiener Krankheit“ oder „weiße Pest“ bekannt. Für diese Entdeckung erhielt Koch 1905 den Nobelpreis für Medizin. 1901 entdeckte Koch zwei verschiedene Erreger, nämlich *Mycobacterium tuberculosis* als Verursacher der Tuberkulose des Menschen und *Mycobacterium bovis* als Verursacher der Rindertuberkulose. *M. tuberculosis* ist nicht auf Rinder übertragbar, *M.bovis* dagegen auf den Menschen. Koch glaubte allerdings nicht, dass sich die bovine und menschliche Tuberkulose ähnlich waren, was die Erkennung infizierter Milch als Quelle der Erkrankung verzögerte. Veterinärmediziner machten Robert Koch darauf aufmerksam, dass verbesserte Rinderstallhygiene gegen die Verbreitung von Krankheiten wie Cholera und Typhus über die Milch von Bedeutung war, aber in Bezug auf Tuberkulose vollkommen wirkungslos sei. Die Tuberkuloseerreger mussten also bereits von der Kuh über das Euter in die Milch gelangen. Die in den meisten Rinderställen herrschende Enge war ein unlösbares Problem, die intensive Nutzung der Tiere in der Milchwirtschaft erhöhte die Gefahr der Ansteckung mit Tuberkulose sogar erheblich (ORLAND, 2001).

Der deutsche Bakteriologe und Serologe Emil von Behring wurde Anfang des 20. Jahrhunderts zu einem der größten Verfechter der hygienisch einwandfreien

Kindermilch. Er behauptete, dass die meisten Tuberkulosekranken die Erreger bereits im Kindesalter mit der Milch aufgenommen hätten und somit latent infektiös wären (ORLAND, 2001). Am 5. Februar 1904 trat in Dänemark das erste Pasteurisierungsgesetz Europas in Kraft, das zum Vorbild für das deutsche Viehseuchengesetz von 1912 wurde (ORLAND, 2001).

Im Deutschland der unmittelbaren Nachkriegszeit stellte Rohmilch die häufigste Infektionsquelle der ernährungsbedingten Tuberkulose bei Kindern dar. Jedes Jahr starben etwa 1000 Menschen in Deutschland an boviner Tuberkulose. Nicht zu vergessen sind auch die Infektionen von Nutztieren durch die Aufzucht mit infizierter Kuhmilch bzw. Kolostrum (KRÜGER, 2007). Anfang der 1950er Jahre führten die Bundesrepublik Deutschland und die Schweiz schließlich das Bang'sche Verfahren zur Tuberkulosekontrolle der Rinderbestände ein. Bernhard Bang, ein dänischer Veterinärmediziner, forderte darin die regelmäßige Tuberkulinisierung des gesamten Bestandes, eine getrennte Haltung der positiv reagierenden Rinder und die Tötung von tuberkulösen Tieren. Schließlich müsse auf die absolut tuberkulosefreie Aufzucht der Kälber und regelmäßige Kontrolluntersuchungen der gesamten Rinderherde geachtet werden.

#### **1.9.6.2 Mycobakterien**

Mycobakterien sind aerobe, grampositive Stäbchenbakterien. Die dicke Mureinschicht ihrer Zellwand lässt sich aber durch Gramfärbung nicht darstellen. Der Grund dafür ist der hohe Lipidgehalt der Zellwand, der ein Eindringen der basischen Farbstoffe verhindert. Durch die Ziehl-Neelsen-Färbung lassen sich die Bakterien färben („säurefeste Stäbchen“) (NEUMEISTER und WINKLHOFER, 1997).

Der häufigste Erreger von Tuberkulose beim Menschen ist *Mycobacterium tuberculosis*. *M. bovis* und *M. caprae* sind Erreger der Rindertuberkulose und in Österreich nur bei circa 1% aller Tuberkulose-Erkrankungen des Menschen nachweisbar (MUCH et al., 2011). Die Rindertuberkulose manifestiert sich bei erkrankten Tieren als Abmagerung, Fieber, Husten mit beschleunigter Atmung (Lungentuberkulose) und Lymphknotenschwellung. Eine besondere Form ist die

Eutertuberkulose, bei der das Eutergewebe knotenartig verdichtet bzw. angeschwollen ist (FUCHS, 2009). Menschen können sich oral, wie z.B. über den Konsum von Rohmilch, oder über Inhalation des Erregers infizieren, da der Erreger durch das Rind vor allem über die Milch und den Bronchialschleim ausgeschieden wird.

Die Tuberkulose ist heute besonders in Afrika, Asien, Lateinamerika und den Nachfolgestaaten der Sowjetunion verbreitet. In den letzten Jahren kam es zu einer starken Zunahme von multiresistenten Mycobakterien-Stämmen. Für *M. tuberculosis* sind Menschen das einzige Reservoir, für die zoonotischen Erreger *M. bovis* und *M. caprae* gelten Menschen und Rinder, gelegentlich auch Ziegen, als Infektionsreservoir. Die Tuberkulose manifestiert sich bei 80% der Patienten als Lungentuberkulose, sie kann jedoch auch andere Organe befallen (MUCH et al., 2011). Die Inkubationszeit beträgt Monate bis Jahre. Das höchste Infektionsrisiko für Mensch und Tier besteht bei der offenen Lungentuberkulose, wenn tuberkulöse Herde Anschluss an das Bronchialsystem gewinnen und die Erreger massenhaft im Sputum ausgeschieden werden (NEUMEISTER und WINKLHOFER, 1997).

In den 1940er Jahren wurde die Milchpasteurisierung in Europa flächendeckend eingeführt, um die Tuberkuloseerreger aus dem Lebensmittel Milch zu eliminieren. Bis zu dieser Zeit stellte die Rohmilch eine wesentliche Ursache für die Übertragung der Tuberkulose dar.

Österreich erhielt 1999 von der Europäischen Union den Status „*amtlich anerkannt frei von Tuberkulose* bzw. *Officially Tuberculosis Free*“ (OTF) für Rinderbestände verliehen. Das bedeutet, dass nicht mehr jedes Jahr neu überprüft werden muss, ob der Handel mit österreichischen Rindern ohne vorherige veterinärmedizinische Kontrolle im europäischen Binnenmarkt erfolgen darf.

In Anlage I Absatz A des Zoonosengesetzes (Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonosenerregern vom 18.11.2005) wird auf Tuberkulose durch *Mycobacterium bovis* als überwachungspflichtige Zoonose und Zoonoseerreger verwiesen.

In den Jahren 2002 bis 2007 wurde in Österreich bei geschlachteten Rindern kein Fall von *M. bovis* festgestellt (FUCHS, 2009). Im Frühjahr 2008 wurde bei einem

geschlachteten Rind aus Tirol im Zuge der Schlachttieruntersuchung Tuberkulose festgestellt, verursacht durch *M. caprae*. In der Folge wurden weitere infizierte Rinder in Kontaktbetrieben gefunden. Der gemeinsame Erreger war ident mit jenem Stamm, der in den vergangenen Jahren vereinzelt bei Fällen von Tuberkulose bei Rindern und freilebendem Rotwild in Tirol festgestellt wurde. Daher erfolgte im Herbst 2008 auf Anordnung des Bundesministeriums für Gesundheit die Durchführung von Tuberkulose-Tests bei allen untersuchungspflichtigen Rindern in den betroffenen Tiroler Bezirken. Es wurden *M. caprae*-Infektionen bei acht Rindern aus acht Beständen mikrobiologisch bestätigt (MUCH et al., 2011). Im September 2008 trat die neue Rindertuberkuloseverordnung (Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit, Familie und Jugend zur Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung der Tuberkulose der Rinder, BGBl. II Nr. 322/2008, zuletzt geändert durch BGBl. II Nr. 381/2009) in Kraft.

Im Jahre 2010 wurde bei Schlachttieruntersuchungen in Österreich kein Fall von *M. bovis* festgestellt (MUCH et al., 2011). Erstinfektionen mit *M. bovis* lassen sich in Österreich durchwegs auf den Konsum roher Kuhmilch im Ausland zurückführen (ALLERBERGER, 2008a).

Das Nationale Referenzlabor für Rindertuberkulose befindet sich am Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen der AGES in Mödling.

#### 1.9.7 METHICILLIN-RESISTENTE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA)

Die Pathogene, die am häufigsten mit Mastitis bei Milchkühen assoziiert werden, sind *Staphylococcus aureus*, Streptokokken, besonders *Streptococcus agalacticae*, und *Mycoplasma* spp. Staphylokokken sind grampositive, kugelförmige Bakterien, die zu traubenähnlichen Haufen angeordnet sind. *Staphylococcus aureus* ist der einzige menschenpathogene Vertreter, der koagulasepositiv ist. Er besiedelt die Haut und die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raumes bei Menschen und Tieren. *S.aureus* ist verantwortlich für schwere Wundinfektionen mit Eiterbildung sowie durch seine toxinbildenden Eigenschaften für Lebensmittelvergiftungen. Staphylokokken-Enterotoxine sind fast ausschließlich präformiert in verdorbenen Lebensmitteln

vorhanden und fallen durch eine kurze Inkubationszeit von zwei bis sechs Stunden auf (ALLERBERGER, 2008a). Die Enterotoxine sind relativ hitzestabil und werden durch nur kurzfristiges Erhitzen auf 100°C nicht inaktiviert (NEUMEISTER und WINKLHOFER, 1997). Das heißt, sie überstehen Prozesse wie Pasteurisation oder UHT-Erhitzung der Milch, ohne ihre Wirkung einzubüßen. Die Symptome einer Staphylokokken-Intoxikation sind plötzliche Übelkeit mit Erbrechen und Bauchschmerzen, gefolgt von Durchfällen. Die Erkrankung ist selbstlimitierend und klingt ohne Spätfolgen ab.

Im Juni 2007 konnte in Österreich ein Ausbruch von Erbrechen, Durchfall und Kreislaufproblemen bei 166 Kindern von acht Schulen und einem Kindergarten auf den Konsum von Staphylokokken-Enterotoxin-positiven Milchprodukten (Vollmilch, Vanillemilch, Kakaomilch) zurückgeführt werden. *S. aureus* wurde in den Euterviertel-Gemelkproben von sieben der 19 Milchkühe des Rinderbestandes, der der betroffenen Molkerei zulieferte, nachgewiesen (ALLERBERGER, 2008a).

Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) sind durch eine Resistenz gegen sämtliche  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (z.B. Penicilline, Cephalosporine) charakterisiert. Sie sind weltweit gefürchtet, vor allen als Krankenhauskeime, und für ernsthafte Infektionen verantwortlich. Gesunde Menschen können ständige oder vorübergehende Träger von MRSA sein (DOMBROWSKI und WISCHHUSEN, 2012). MRSA wurde auch bei Heim- und Nutztieren nachgewiesen. Bei Nutztieren hat sich ein spezifischer Typ von MRSA ausgebreitet, der als „Multilocus Sequenztyp ST398“ beschrieben wird. Diese sogenannten „Livestock-associated“ MRSA (LA-MRSA) treten u.a. auch bei Rindern auf (DOMBROWSKI und WISCHHUSEN, 2012). In Milchviehbeständen ist *S. aureus* als Erreger schwerer Euterentzündungen (Mastitiden) bekannt, die sich schnell innerhalb einer Herde von Kuh zu Kuh ausbreiten können. Ist der Erreger der Mastitis ein MRSA, ist er gegenüber den meisten gängigen Antibiotika unempfindlich und daher kaum zu bekämpfen. Dies führt zu großen wirtschaftlichen Schäden bei den Milcherzeugerbetrieben, da mit MRSA infizierte Milchkühe meist getötet werden müssen.

Menschen mit erhöhtem Kontakt zu infizierten Tieren, wie Landwirte und Veterinärmediziner, haben ein erhöhtes Risiko, sich zu infizieren und den Keim weiter zu verbreiten. Eine Infektion des Menschen mit LA-MRSA-Stämmen scheint

nur in seltenen Fällen zu schweren Krankheitsausbrüchen zu führen (DOMBROWSKI und WISCHHUSEN, 2012). Im Jahr 2010 wurden 30 Vorzugsmilchproben aus Deutschland in Bezug auf MRSA untersucht und drei davon wurden als MRSA-verdächtig beurteilt, was einem Prozentsatz von 10% entspricht (DOMBROWSKI und WISCHHUSEN, 2012). Die endgültige Bestätigung von MRSA erfolgt durch den Nachweis eines spezifischen Gens. Da eine Verknüpfung der Daten mit den Bestätigungsuntersuchungen nicht vollständig gelang, konnte die Bestätigung der Isolate den Proben nicht abschließend zugeordnet werden, sodass ausschließlich die Untersuchungen auf MRSA-verdächtige *S. aureus* ausgewertet wurden.

Eine sorgfältige Melkhygiene, z.B. durch Zitzendesinfektion, sowie antimikrobielle Behandlung sind der wichtigste Schutz des Milchviehs vor einer Mastitis. Allerdings scheint das Aussondern und Töten von Kühen mit einer MRSA-assoziierten Mastitis derzeit die einzige Möglichkeit zur effektiven Bekämpfung zu sein. Daneben sollte auch die Einschleppung der MRSA in Milchviehbetriebe durch geeignete Vorbeugemaßnahmen verhindert werden. Der Verbraucher kann durch den Konsum von MRSA-haltiger Rohmilch diese resistenten Keime aufnehmen. Das Risiko, dadurch zu erkranken, wird nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens jedoch als unwahrscheinlich eingestuft (FRIEDRICH et al., 2010).

Das nationale Referenzlabor für koagulasepositive Staphylokokken, einschließlich *Staphylococcus aureus*, befindet sich am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der AGES in Graz.

## 1.10 UNTERSUCHUNGSVERFAHREN DER MIKROBIELLEN BELASTUNG VON MILCH

Neben den klassischen kulturellen und biochemischen Untersuchungsverfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von Mikroorganismen kommt heute eine Vielzahl neuer, z.T. automatisierbarer, Verfahren zum Einsatz. Dazu gehören neben vielen Schnellmethoden, molekularbiologischen und serologischen Verfahren, auch in-situ Monitoringsysteme, die eine sofortige bzw. schnelle Untersuchung auf das Vorhandensein von Mikroorganismen während des industriellen Herstellungsprozesses („just in time“ monitoring) ermöglichen.

Ein bereits serienmäßig in der Rohmilchanalytik angewandtes in-situ Monitoringsystem ist BactoScan™, das auf dem Prinzip der Durchfluscytometrie beruht. Die Durchfluscytometrie ist ein Messverfahren, bei dem eine Bakteriensuspension mit einem DNA-spezifischen Farbreagenz angefärbt und durch eine Kapillare gepumpt wird, die vor dem Objektiv eines Mikroskops angeordnet ist und beleuchtet wird. Jedes detektierbare Bakterium wird über Photoelektronik am Mikroskop registriert und gezählt. Mit dieser Methode können bis zu 200 Rohmilchproben pro Stunde analysiert werden (FOSS, 2012).

Zur Real-Time Detektion spezifischer Bakterien, wie z.B. *Salmonella* ssp., werden in der Molkereiindustrie das BactiFlow® oder das D-Count® -System eingesetzt, die ebenfalls auf der Durchfluscytometrie basieren (AES Chemunex, 2005).

## 1.11 KOLOSTRUM

### 1.11.1 DEFINITION

Kolostrum (auch Colostrum, Kolostralmilch, Biestmilch, Erstmilch oder Vormilch genannt) ist nach Anhang III Abschnitt IX der Verordnung (EG) Nr. 853/2004, das bis zu drei bis fünf Tage nach der Geburt eines Kalbes aus den Milchdrüsen der Kuh abgesonderte Sekret, das reich an Immunglobulinen und Mineralstoffen ist und der Gewinnung von Rohmilch vorausgeht.

Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1662/2006 Absatz 5 wird Kolostrum als Erzeugnis tierischen Ursprungs eingestuft, fällt jedoch nicht unter die Definition von Rohmilch in Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 853/2004. Kolostrum wird auf ähnliche Weise hergestellt und ist mit einem ähnlichen Risiko für die menschliche Gesundheit wie Rohmilch behaftet. Aus diesem Grund bedarf es spezifischer Hygienevorschriften für die Kolostrumerzeugung.

„Erzeugnisse auf Kolostrumbasis“ sind Verarbeitungserzeugnisse, die aus der Verarbeitung von Kolostrum oder aus der Weiterbearbeitung solcher Verarbeitungserzeugnisse resultieren (EG-VO 1662/2006, Anhang II).

Bovines Kolostrum ist eine Mischung aus Eutersekreten und Blutbestandteilen der Kuh und enthält besonders hohe Anteile an Immunglobulinen (Antikörper) und anderen Serumproteinen, die während der Trockenstehphase (Phase zwischen der vorangegangenen Laktation und der Geburt des folgenden Kalbes) in der Milchdrüse akkumuliert werden. Das Kolostrum ist eine hervorragende Quelle an Nährstoffen für das neugeborene Kalb. Obwohl sich die genauen Werte zwischen den einzelnen Kuhrassen unterscheiden, hat Kolostrum einen deutlich höheren Gehalt an Feststoffen und Immunglobulinen als Milch (CROWLEY et al., 1983). Der Anteil an Immunglobulinen in Kuhkolostrum ist deshalb besonders hoch, da beim Rind im Gegensatz zum Menschen keine vorgeburtliche Übertragung der Antikörper über die Plazenta zum Ungeborenen stattfindet. Die Aufgabe der Immunglobuline ist es, dem Kalb sofort nach der Geburt einen immunologischen Schutz gegenüber unterschiedlichen Antigenen, vor allem Bakterien und Viren, zu gewährleisten („passive Immunisierung“ bzw. „Leihimmunität“).

Das Aussehen des Kolostrums lässt Rückschlüsse auf seine Qualität zu. Kolostrum hoher Qualität hat einen hohen Feststoffanteil (ca. 24%) und somit auch einen hohen Anteil an Immunglobulinen, was dem Kolostrum eine dicke, cremige Konsistenz verleiht (CROWLEY et al., 1983). Ein hoher Gehalt an  $\beta$ -Carotin färbt das Kolostrum gelblich (PENCHEV GEORGIEV, 2008). Die Qualität des Kolostrums kann sowohl mit einem Brix-Refraktometer (HEINRICHS und JONES, 2011) als auch mit einem Colostrometer™ (FLEENOR und STOTT, 1980) gemessen werden. Dieses Gerät, ähnlich einem Aräometer, misst die Dichte des Kolostrums und schätzt daraus den IgG-Gehalt. Kolostrum hoher Qualität hat eine relative Dichte von über 1,05 (FLEENOR und STOTT, 1980) sowie einen IgG-Gehalt ab 50 mg/mL (HEINRICHS und JONES, 2011).

Kolostrum war schon im 18. Jahrhundert als Heilmittel für Menschen bekannt, wie die Aufzeichnungen des deutschen Mediziners Dr. Christoph Wilhelm Hufeland belegen (Bibliothek der practischen Heilkunde, 1838). Er beschrieb darin den Unterschied von Kolostrum im Gegensatz zu normaler Milch bei Tieren und Menschen. Er erkannte den wichtigen Einfluss des Kolostrums auf Wachstum und Gesundheit von Kälbern und setzte Kolostrum auch als Heilmittel bei seinen Patienten ein. Während des Amerikanischen Bürgerkrieges (1861-1865) wurde Kolostrum als natürliches

Antibiotikum für die Behandlung der Verwundeten eingesetzt (PRÜMMER, 2008). 1955 veröffentlichten die US-amerikanischen Forscher CAMPBELL und PETERSON eine Publikation über den Einsatz von Kolostrum („Immunmilch“) bei Patienten mit rheumatischer Arthritis. 1963 berichteten dieselben Forscher über die passive Immunisierung des Menschen durch orale Gaben von Kuhkolostrum (EL-LOLY, 2007).

### 1.11.2 INHALTSSTOFFE

Da bovines Kolostrum ein Naturprodukt ist, schwankt seine Zusammensetzung in Abhängigkeit von Kuhrasse, Gesundheitszustand des Tieres, Fütterung und dem Zeitpunkt, zu dem das Kolostrum gewonnen wird (KELLY, 2003). Der Übergang von Kolostrum zu Rohmilch ist fließend, besonders der Anteil an Immunglobulinen verringert sich schnell. Bereits zwölf Stunden nach Geburt des Kalbes sind nur noch 50 Prozent der anfänglichen Immunglobulin G (IgG) Konzentration erhalten. Nach weiteren zwölf Stunden hat sich deren Anteil erneut halbiert (STEPHAN et al., 1990).

**Tabelle 10. Veränderung von Rinderkolostrum in den ersten 60 Stunden nach Geburt des Kalbes (STEPHAN et al., 1990)**

<b>Zeit nach der Geburt des Kalbes [Stunden]</b>	<b>IgG-Gehalt [g/L]</b>
0	103
12	59
24	24
36	14
48	8
60	5

Bovines Kolostrum unterscheidet sich von Kuhmilch vor allem durch seinen hohen Gehalt an Protein und Trockenmasse. Dagegen sind sowohl der Kohlenhydrat- als auch der Mineralstoffanteil im Kolostrum niedriger als in Kuhmilch.

**Tabelle 11. Vergleich der durchschnittlichen Zusammensetzung von bovinem Kolostrum und Kuhmilch**

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>bovines Kolostrum</b>	<b>Referenzen</b>	<b>Kuhmilch</b>	<b>Referenzen</b>
Trockenmasse	26,9%	MORRILL et al., 2012	13%	FRISTER, 2007b
Kohlenhydrate (Lactose)	2,9%	MORRILL et al., 2012	5%	FRISTER, 2007b
Protein	12,7%	MORRILL et al., 2012	3,4%	FRISTER, 2007b
Fett	5,6%	MORRILL et al., 2012	3,8%	FRISTER, 2007b
Mineralstoffe	0,05%	HEINRICHS und JONES, 2011	0,7%	RIMBACH et al., 2010

Besonders wertvoll ist Kolostrum durch den hohen Anteil an den vielen bioaktiven Komponenten der Molkeproteinfraktion, wie Wachstumsfaktoren (vor allem IGF1), Immunglobuline (vor allem IgG, IgA und IgM), Lactoperoxidase, Lysozym, Lactoferrin, Cytokinen, Aminosäuren und Vitaminen (INDYK et al, 2008).

**Tabelle 12. Vergleich der bioaktiven Komponenten von bovinem Kolostrum und Kuhmilch**

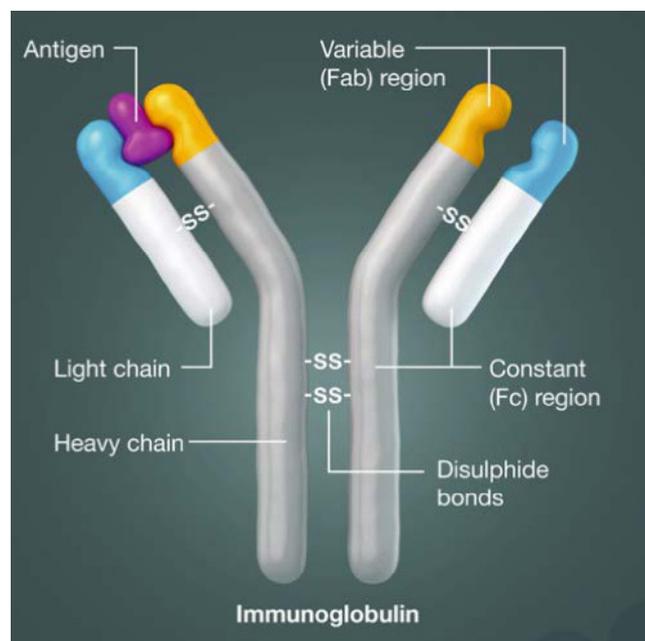
<b>bioaktive Komponenten</b>	<b>bovines Kolostrum</b>	<b>Referenzen</b>	<b>Kuhmilch</b>	<b>Referenzen</b>
IgG	18 - 92 mg/mL	PENCHEV GEORGIEV, 2008	0,25 - 0,5 mg/mL	PENCHEV GEORGIEV, 2008
Wachstumsfaktoren (IGF1)	50 - 2000 µg/mL	ELFSTRAND et al., 2002	0,004 – 0,01 µg/mL	PENCHEV GEORGIEV, 2008
Lactoferrin	1,2 – 2,6 mg/mL	PENCHEV GEORGIEV, 2008	0,1 mg/mL	FRISTER, 2007b
α-Lactalbumin	2,04 – 2,64 mg/mL	LEVIEUX und OLLIER, 1999	0,6 – 1,7 mg/mL	PERMYAKOV, 2004
β-Lactoglobulin	14,3 – 18,9 mg/mL	LEVIEUX und OLLIER, 1999	3 – 3,5 mg/mL	HAMBLING et al., 1992
Serumalbumin	1,2 – 2,66 mg/mL	PENCHEV GEORGIEV, 2008	0,1 – 0,4 mg/mL	FRISTER, 2007b

In der Milch gehören die Immunglobuline (Antikörper) neben α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin, Serumalbumin und Lactoferrin zur Molkenproteinfraktion. Sie kommen als Antikörper in allen Säugermilcharten vor. Die Immunglobuline werden in fünf Klassen unterteilt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Die Immunglobuline werden ausschließlich von Plasmazellen synthetisiert.

In dieser Masterarbeit wird nur auf das im bovinen Kolostrum vorhandene Immunglobulin G (IgG) eingegangen. Über 90% der Gesamt-Immunglobuline im bovinen Kolostrum gehören zur Klasse der IgG (ALEXIEVA et al., 2004). IgG unterteilt sich in die Unterklassen IgG1 und IgG2. Bei Wiederkäuern stammt das vorherrschende IgG1 hauptsächlich aus dem Blut und wird über die Alveolarzellen in das Euter transportiert (GAPPER et al., 2007). Etwa 80% (GAPPER et al., 2007) des

Gesamt-IgG-Gehaltes im Kolostrum ist IgG1. IgG-Antikörper bestehen aus vier Polypeptidketten, davon zwei identen H-Ketten (heavy chains) und zwei L-Ketten (light chains), die von Disulfidbrücken zusammengehalten werden. IgG besitzt zwei Antigenbindungsstellen mit denen es ein Antigen erkennt, bindet und einhüllt, bevor dieses von einem Makrophagen abgebaut wird (ZETKIN und SCHALDACH, 1999).

Im menschlichen Verdauungstrakt wird bovines IgG durch die Proteasen Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase und Elastase in die Antikörperfragmente  $F(ab)_2$ , Fab und Fc zerlegt. Die Fragmente  $F(ab)_2$  und Fc behalten dabei die neutralisierende Wirkung eines intakten IgG-Moleküls. Im Verdauungstrakt des Menschen bleibt ungefähr die Hälfte der aufgenommenen IgG-Moleküle immunologisch aktiv (ALEXIEVA et al., 2004).



**Abbildung 2. Schema eines Immunglobulin G (IgG)-Moleküls (GAPPER et al., 2007)**

IgG besitzen Abwehrfunktionen vorrangig gegen Bakterien und deren Antigene, gegen Viren und Toxine (ZETKIN und SCHALDACH, 1999). Sie sind zu vielfältigen Funktionen fähig wie Aktivierung des Komplementsystems, bakterielle Opsonierung, Agglutination und Bindung an spezifische Stellen an der Oberfläche von Antigenen mit anschließender Inaktivierung derselben (GAPPER et al., 2007).

### 1.11.3 WIRTSCHAFTLICHE BEDEUTUNG VON KOLOSTRUM

Die zwei großen Anwendungsgebiete von bovinem Kolostrum sind zum einen der Futtermittelbereich und zum anderen der Bereich der menschlichen Ernährung mit gleichzeitiger positiver Wirkung auf die Gesundheit.

Während der letzten 30 Jahre ist das Interesse an den positiven physiologischen Effekten und den Möglichkeiten zur Nutzung der verschiedenen Komponenten des Kolostrums stark gestiegen (ELFSTRAND et al. 2002). Durch den weltweiten Verkauf von bovinen Immunglobulinen zur Anreicherung von Säuglingsnahrung und anderen Lebensmitteln wurden im Jahre 2004 ungefähr 100 Millionen US-Dollar erwirtschaftet (GAPPER et al., 2007). Der potentielle Markt von Kolostrum ist sehr groß. Zu den Anwendungspotentialen gehören:

- Vorbeugung und Linderung von gastrointestinalen Beschwerden
- Anreicherung von Säuglingsnahrung
- hyperimmunes Kolostrum
- unterstützende Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis
- Leistungssport
- Mundpflege
- Kosmetika

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die orale Einnahme von bovinen Kolostrumprodukten eine positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit hat, obwohl manche Forscher der Meinung sind, dass bestimmte bovine Immunglobulin-Subklassen einen nachteiligen Effekt hervorrufen könnten (GAPPER et al., 2007).

Da bovine Immunglobuline einer fremden Spezies angehören, kann Kolostrum beim Menschen nur oral oder äußerlich (z.B. als Creme) angewendet werden (ALEXIEVA et al., 2004).

Grundsätzlich gibt es bei der Entwicklung von auf bovinen Immunglobulinen basierenden Produkten zwei Vorgehensweisen:

1. Isolation und/oder Konzentrierung von Immunglobulinen, die natürlicherweise im Kolostrum vorkommen

## 2. Hyperimmunisierung von trächtigen Kühen während der Trockenstehzeit mit Antigenen, um spezifische Antikörper im Kolostrum zu erhalten

Bei der Herstellung von hyperimmunem Kolostrum wird der Kuh ein bestimmtes Antigen injiziert, worauf sie mit der Produktion von spezifischen Immunglobulinen reagiert, die in das Kolostrum abgegeben werden. Diese Methode wird bereits in den USA und in Australien kommerziell eingesetzt, um Produkte auf der Basis von mit IgG angereichertem hyperimmunem Kolostrum zu erzeugen (UBIC, 2012).

Die orale Anwendung von Hyperimmunkolostrum-Produkten mit hohen Konzentrationen an spezifischen Antikörpern kann verschiedene Infektionskrankheiten beim Menschen vorbeugen oder sogar heilen. Gute Ergebnisse wurden bei Präparaten gegen Rotaviren, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Cryptosporidium parvum* und *Helicobacter pylori* erzielt (ALEXIEVA et al., 2004). Vielversprechend sind auch Anwendungen bei AIDS-Patienten (KORHONEN et al., 2000) sowie bei Säuglingen und Kleinkindern mit Darminfektionen (URUAKPA et al., 2002).

Als erwiesen gilt auch die positive Wirkung von bovinem Kolostrum in der Behandlung von durch NSAID (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; Nichtsteroidale Antirheumatika) induzierte Magenschleimhautschädigungen (URUAKPA et al., 2002). NSAID gelten als sehr wirksame Medikamente gegen rheumatoide Arthritis, haben jedoch Nebenwirkungen in Form von leichten bis schwersten Schädigungen des Magens bzw. des Duodenums (ZETKIN und SCHALDACH, 1999).

Einige Produkte, die auf bovinem Kolostrum basieren und deren Wirkung medizinisch belegt ist, sind bereits kommerziell erhältlich. Beispiele dafür sind:

- *IMM272-Rotavirus* (Immuron Ltd., North Melbourne, Australien), ein hyperimmunes bovines Kolostrum, gefriergetrocknet, zur Vorbeugung und Behandlung von durch Rotaviren hervorgerufenen Durchfällen bei Kleinkindern; rezeptfreies Arzneimittel
- *Travelan*<sup>®</sup> (Immuron Ltd., North Melbourne, Australien), ein hyperimmunes bovines Kolostrum, gefriergetrocknet, zur Vorbeugung von Reisediarrhoe hervorgerufen durch Enterotoxische *E.coli* (ETEC) sowie zur Linderung von leichten Magen-Darm-Störungen; rezeptfreies Arzneimittel

- *Tegrice1*<sup>®</sup> (Sterling Technology, Brookings, South Dakota, USA), ein Ultrafiltrationskonzentrat an Molkenproteinen aus bovinem Kolostrum, pasteurisiert und sprühgetrocknet, zur Heilung und Linderung von NSAID-bedingten Schleimhautschädigungen des Verdauungstraktes und anderen entzündlichen Magen-Darm-Erkrankungen; Nutraceutical

Bei Sportlern soll Kolostrum den Muskelaufbau fördern sowie während intensivem Training das Immunsystem stärken (URUAKPA et al., 2002).

In Orientierung an positive klinische Versuche zur Wirksamkeit von bovinem Kolostrum gibt es folgende Empfehlungen zur Dosierung:

**Tabelle 13. Empfohlene Dosierung von bovinem Kolostrum bei bestimmten körperlichen Bedingungen (KELLY, 2003)**

<b>Anwendung</b>	<b>tägliche Dosis</b>	<b>Standardisierung des Kolostrums</b>
Leistungssteigerung von Sportlern	60 g/Tag	75% Protein mit 15% IgG
AIDS-bedingte Diarrhoe	10 g/Tag	ca. 43% Immunglobulin mit einer aktiven Dosis von Immunglobulin von 4,3 g/Tag
Vorbeugung und Behandlung von Infektionskrankheiten	10 g/Tag	ca. 43% Immunglobulin mit einer aktiven Dosis von Immunglobulin von 4,3 g/Tag
NSAID-bedingte Schleimhautschädigungen des Verdauungstraktes	15 g/Tag	ca. 43% Protein

In der EU wird bovines Kolostrum hauptsächlich als Nahrungsergänzungsmittel oder diätetisches Lebensmittel in Form von Pulver, Kapseln und Tabletten oder als Flüssigextrakt verkauft. Daneben gibt es auch Anbieter von Mundspülungen mit

Kolostrumzusätzen (HURLEY und THEIL, 2011). In der Kosmetik wird Kolostrum als Zutat in Anti-Aging Präparaten eingesetzt (ALEXIEVA et al., 2004).

#### 1.11.4 MIKROBIOLOGISCHE RISIKEN VON KOLOSTRUM

Laut einer US-amerikanischen Studie, in der über 200 Proben von bovinem Kolostrum aus zwölf Milchviehbetrieben in den Bundesstaaten Minnesota und Wisconsin mikrobiologisch untersucht wurden, betrug das geometrische Mittel der Gesamtkeimzahl  $1,6 \cdot 10^7$  KbE/mL und das der Coliformenkeimzahl  $2,7 \cdot 10^6$  KbE/mL (GODDEN, 2009).

Bei einer anderen US-amerikanischen Studie aus dem Jahre 2011, in der 55 Proben aus 55 Milchviehbetrieben in Pennsylvania mikrobiologisch untersucht wurden, betrug der Mittelwert der Gesamtkeimzahl fast  $1 \cdot 10^6$  KbE/mL und der Mittelwert der Coliformenkeimzahl lag etwas über  $3 \cdot 10^5$  KbE/mL (HEINRICHS und JONES, 2011). Bei einer Probe konnten  $1 \cdot 10^3$  KbE *Streptococcus agalactiae* pro mL nachgewiesen werden. Außerdem befanden sich in acht Proben *Salmonella* ssp., was einem Prozentsatz von 15% entspricht (HEINRICHS und JONES, 2011).

REBELEIN (2010) führte mikrobiologische Untersuchungen von Kolostrumproben von 39 verschiedenen Milchkühen eines US-amerikanischen Milchviehbetriebes durch, wobei in 21,1% der Proben *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden konnten.

Nach SCHWEIKERT (2012) waren 72% der untersuchten Kolostrumproben aus bayerischen Milchviehbetrieben mikrobiologisch zu sehr kontaminiert, um für den menschlichen Verzehr verwendet zu werden. In 22,7% der Proben konnte *Listeria* ssp. (SCHWEIKERT, 2012) nachgewiesen werden und in 4,5% der Proben *Salmonella* ssp. (SCHWEIKERT, 2012).

Kolostrum ist oft Träger einer großen Vielfalt pathogener Mikroorganismen wie *Mycoplasma* ssp., *Mycobacterium paratuberculosis*, Fäkalcoliforme und *Salmonella* ssp. (GODDEN, 2009). Die mikrobielle Kontamination von bovinem Kolostrum stellt nicht nur ein hygienisches Problem bei der Verarbeitung von Kolostrum für den

Menschen dar, sondern es gilt auch als erwiesen, dass Bakterien im Kolostrum eine negative Auswirkung auf die passive Absorption des kolostralen IgG durch den Darm in den Blutkreislauf des Kalbes und somit auf seine Immunisierung haben (GODDEN, 2009).

Die Gewinnung und die Lagerung von bovinem Kolostrum sind kritische Lenkungspunkte (Critical Control Points) bei der mikrobiologischen Qualitätssicherung (REBELEIN, 2010). Hierbei treten drei Hauptgebiete bzw. –quellen von mikrobiologischer Kontamination des Kolostrums auf (GODDEN, 2009):

1. infizierte Milchdrüsen (Mastitis) oder fäkale Verunreinigung des Kolostrums während der Gewinnung
2. Kontaminationen während Sammlung oder Lagerung des Kolostrums durch kontaminierte Gerätschaften
3. Vermehrung von Mikroorganismen im gelagerten Kolostrum

Methoden zur Vermeidung der mikrobiellen Kontamination durch infizierte Milchdrüsen oder durch fäkale Verunreinigung sind (GODDEN, 2009; REBELEIN, 2010):

- a. kein Säugen des Kalbes durch die Mutterkuh
- b. die Kühe sollten in einer sauberen, trockenen und kühlen Umgebung gehalten werden
- c. sorgfältige Zitendesinfektion und –inspektion vor der Gewinnung des Kolostrums durch das Melkpersonal
- d. kein Vereinigen von Rohkolostrum verschiedener Kühe
- e. regelmäßige veterinärmedizinische Untersuchungen der Kühe

Methoden zur Vermeidung von Kontaminationen während Sammlung oder Lagerung des Kolostrums (GODDEN, 2009):

- a. sorgfältige Reinigung und Instandhaltung der Gerätschaften und Lagerbehälter
- b. regelmäßige Hygieneschulungen des Personals

Methoden zur Vermeidung der Vermehrung von Mikroorganismen im gelagerten Kolostrum (GODDEN, 2009; REBELEIN, 2009):

- a. Kolostrum, das nicht innerhalb von ein bis zwei Stunden nach der Gewinnung verfüttert bzw. verarbeitet wird, sollte schnell gekühlt (höchstens 48 Stunden bei ca. 4°C) oder eingefroren werden
- b. eventuell Zugabe einer 0,5%igen Lösung des Konservierungsmittels Kaliumsorbat zum gekühlten Kolostrum
- c. chargenweise Pasteurisation des Kolostrums bei 60°C für 60 Minuten und anschließendes Kühlen oder Einfrieren
- d. gründliche Reinigung und Desinfektion der Pasteurisierungsanlagen
- e. Transport und Lagerung des Kolostrums in sauberen und verschließbaren Behältern
- f. regelmäßige mikrobiologische Kontrollen des Kolostrums durch akkreditierte Laboratorien

Die Verwendung von Kaliumsorbat als Konservierungsmittel für Kolostrum ist umstritten und bedarf weiterer Erforschung, da manche Konservierungsmittel die kolostralen Immungobuline schädigen können (GODDEN, 2009).

Die Pasteurisierungstemperatur von 60°C muss genau eingehalten werden, da bereits ab 60,5°C eine Denaturierung des IgG einsetzt und das Kolostrum eindickt (GODDEN, 2009). Eine Hitzebehandlung des Kolostrums bei 60°C für 60 Minuten gewährleistet ein Aufrechterhalten der natürlichen IgG-Konzentrationen und der Fließeigenschaften während pathogene Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Mycoplasma bovis* und *Mycobacterium paratuberculosis* sicher abgetötet werden (GODDEN, 2009). Höhere Temperaturen und Behandlungszeiten führen zu Hitzedenaturierung der kolostralen Immunglobuline und anderer essentieller Inhaltsstoffe (REBELEIN, 2010).

## 1.12 KONTROLLMECHANISMEN UND -METHODEN

### 1.12.1 MILCHHYGIENISCHE RECHTSVORSCHRIFTEN

#### 1.12.1.1 Allgemeines

Die EU-Kommission veröffentlichte 1997 das sogenannte „Grünbuch über allgemeine Grundsätze des Lebensmittelrechts in der Europäischen Union“, worin die Grundlagen eines gemeinsamen Lebensmittelrechtes präsentiert wurden. Die BSE-Krise Mitte der 1990er Jahre hatte eindrucksvoll gezeigt, welche negativen Auswirkungen ein nicht einheitliches Lebensmittel- und insbesondere auch ein unterschiedliches Futtermittelrecht haben.

2000 erschien das „Weißbuch zur Lebensmittelsicherheit“, worin erstmals einheitliche Maßstäbe für Lebens- und Futtermittel festgeschrieben waren.

2002 erschien die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 „zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA)“. Mit dieser „Basis-Verordnung“ wurden die Vorgaben des „Weißbuches zur Lebensmittelsicherheit“ umgesetzt und damit EU-rechtlich eingeführt.

Dieses neue Lebensmittelrecht hat folgende Ziele:

- Die Lebensmittelsicherheit muss auf allen Stufen der Lebensmittelkette, einschließlich der Primärproduktion, gewährleistet werden (Rückverfolgbarkeit, „from farm to fork“). Lebensmittelbetriebe müssen registriert bzw. zugelassen werden.
- Die Lebensmittelsicherheit soll auf EU-Ebene überwacht werden.
- Der Lebensmittelunternehmer hat die primäre rechtliche Verantwortung für die Lebensmittelsicherheit seiner Produkte. So muss jeder Lebensmittelproduzent ein Hygienemanagementsystem (gemäß HACCP) einrichten und die Dokumentation der Lebensmittelhygiene in seinem Betrieb verpflichtend durchführen.

- Anstelle von Inhaltsvorgaben sollen Zielvorgaben festgelegt werden.
- Die engere Zusammenarbeit von Überwachung und Lebensmittelbetrieben soll gefördert werden.

2004 wurde auf Basis dieser Grundprinzipien das „Hygienepaket“ geschaffen, das folgende Regelungen enthält:

- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 „über Lebensmittelhygiene“
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004 „über Hygieneregelungen für Lebensmittel tierischen Ursprungs“
- Verordnung (EG) Nr. 854/2004 „zur Lebensmittelüberwachung von Erzeugnissen tierischen Ursprungs“
- Verordnung (EG) Nr. 882/2004 „über amtliche Kontrolle zur Einhaltung des Lebens- und Futtermittelrechts sowie Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz“

Die neuen EU-Verordnungen zur Lebensmittelhygiene gelten seit dem 1. Januar 2006. Das bis dahin geltende EU-Richtlinien-Recht, auf dem z.B. die Milchverordnung beruhte, und das nationale Besonderheiten enthielt, ist damit ungültig.

### **1.12.1.2 Struktur des EU-Lebensmittelhygiene-Rechts**

Mit dieser Neuordnung des EU-Rechts muss die Europäische Gemeinschaft nun konkrete Durchführungs- und Auslegungsregelungen erlassen, um eine einheitliche Rechtsanwendung in den EU-Mitgliedsstaaten zu ermöglichen. Deshalb hat die Kommission noch die Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften zu den Verordnungen des Hygienepakets aus 2004 und die Verordnung (EG) 2076/2005 zur Festlegung von Übergangsregelungen für die Durchführungen der Verordnungen 853, 854 und 882 aus 2004 sowie zu Änderungen der Verordnungen 853 und 854 erlassen. Gleichzeitig wurde die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel veröffentlicht. Alle diese Verordnungen sind seit dem 11. Januar 2006 in Kraft und sind unmittelbar anzuwendendes Recht. Nationale Regelungen sind nur noch

erlaubt, wenn in den oben angeführten EU-Verordnungen solche Regelungsbereiche explizit aufgeführt sind.

**Tabelle 14. Übersicht über das EU-Lebensmittelhygienerecht**

<b>Verordnungen (EG)</b>	<b>ergänzende Rechtsunterlagen</b>
	<b>Verordnungen (EG)</b>
852/2004 Lebensmittelhygiene	2074/2005 Durchführungsvorschriften zu den VO (EG) 852, 853 und 854/2004 → Wärmebehandlungsverfahren
853/2004 Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs	
854/2004 amtliche Überwachung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs	2076/2005 Durchführungsvorschriften zu den VO (EG) 853 und 854/2004 → Aufbrauchfristen, Umhüllung/Verpackung
882/2004 amtliche Kontrollen	Leitlinien der EG-Kommission zu mikrobiologischen Kriterien → Bewertung von mikrobiologischen Ergebnissen
2073/2005 mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel	

#### 1.12.1.2.1 *Verordnung (EG) Nr. 852/2004*

Diese Verordnung regelt keine produktspezifischen oder milchhygienischen Belange. Mit ihr erfolgt eine weitere Klarstellung des Umfangs der Verantwortlichkeiten eines Lebensmittelunternehmers für den Bereich der Lebensmittelhygiene. So werden z.B. die genaueren Regelungen der Primärproduktion und allgemeine Hygienevorschriften beschrieben. Genaue Parameter und Grenzwerte sind nicht vorgeschrieben.

Die Verordnung (EG) Nr. 852/2004 sieht die Anwendung von HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points; Gefahrenanalyse und kritische Lenkungspunkte) verpflichtend für alle Lebensmittelunternehmer vor. Das HACCP-Konzept ist ein

präventiv ausgerichtetes Überwachungssystem, das die Sicherheit von Lebensmitteln und Verbrauchern gewährleisten soll. Nur solche Lebensmittel, die die HACCP-Richtlinien erfüllen, dürfen in der EU gehandelt und in die EU eingeführt werden. Das HACCP-Konzept muss in einer dokumentierten Version vorliegen. Bei der Umsetzung der gesetzlichen Forderungen muss mit der Einführung der „Guten Hygienepraxis“ (GHP) begonnen werden. Diese Vorbeugemaßnahmen werden in sogenannten Leitlinien von vielen Berufsgruppenverbänden herausgegeben. Auf dieser Basis steht das Unternehmen und aus dem erzielten Erfolg ergibt sich das betriebsspezifische Restrisiko. Hieraus ergeben sich möglicherweise kritische Lenkungspunkte, die verwaltet werden müssen.

#### *1.12.1.2.2 Verordnung (EG) Nr. 853/2004*

Diese Verordnung über Hygieneregeln für Lebensmittel tierischen Ursprungs greift eine Stufe tiefer. In Artikel 4 Abs. 1 ist die grundsätzliche Registrierungs- bzw. Zulassungspflicht für lebensmittelverarbeitende Betriebe geregelt. Der Milcherzeugerbetrieb ist hier privilegiert, da er nach der Regelung des Artikels 4 Abs. 2 als Betrieb der Primärproduktion keiner behördlichen Zulassung bedarf. Der Milchverarbeitungsbetrieb aber ist zulassungspflichtig und gemäß Artikel 5 dürfen hier behandelte Milchprodukte nur mit einem Identitätskennzeichen gemäß Anhang II, Abschnitt I (ovale Form, Angabe des Mitgliedstaates, in dem der zugelassene Betrieb niedergelassen ist, Angabe der Zulassungsnummer und Angabe der Abkürzung „EG“ (Europäische Gemeinschaft)) in den Verkehr gebracht werden. Im Anhang I finden sich unter Ziffer 4 die Begriffsbestimmungen für „Rohmilch“ und „Milcherzeugungsbetrieb“ sowie unter Ziffer 7 eine Begriffsbestimmung für „Milcherzeugnisse“.

#### *1.12.1.2.3 Verordnung (EG) Nr. 854/2004*

Diese Verordnung zur Lebensmittelüberwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs legt nach Artikel 1 besondere Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung fest und gilt nur für Tätigkeiten

und Personen, auf die die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 Anwendung findet. Nach Artikel 8 hat die amtliche Überwachung von Rohmilch, Kolostrum, Milcherzeugnissen und Erzeugnissen auf Kolostrumbasis gemäß Anhang IV zu erfolgen.

Hier sind in Kapitel I die Kontrollen von Milch- und Kolostrumerzeugungsbetrieben geregelt und in Kapitel II die Kontrolle der Rohmilch und des Kolostrums bei der Abholung. Hinsichtlich der Kriterien für Rohmilch und Kolostrum wird auf die Regelungen der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 Anhang III Abschnitt IX Kapitel I Teil III verwiesen.

#### *1.12.1.2.4 Verordnung (EG) Nr. 882/2004*

Diese Verordnung über die amtlichen Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz folgt dem Ansatz der Basis-Verordnung (EG) Nr. 178/2002 und behandelt Lebens- und Futtermittelrecht/-sicherheit gleich. Gemäß Artikel 1 dieser Verordnung werden allgemeine Regeln für die Durchführung amtlicher Kontrollen festgelegt, mit denen überprüft werden soll, ob Bestimmungen eingehalten werden, die insbesondere darauf abzielen, unmittelbar oder über die Umwelt auftretende Risiken für Mensch und Tier zu vermeiden, zu beseitigen oder auf ein annehmbares Maß zu senken und lautere Gepflogenheiten im Futtermittel- und Lebensmittelhandel zu gewährleisten und den Verbraucherschutz, einschließlich der Kennzeichnung von Futtermitteln und Lebensmitteln und sonstiger Formen der Verbraucherinformation, sicherzustellen. In dieser Verordnung werden den jeweils zuständigen Behörden keine Regelungen hinsichtlich fester Überprüfungsintervalle oder des Prüfungsumfanges vorgegeben, sondern es soll vielmehr ein gemeinschaftlicher Rahmen geschaffen werden, der überall in der EU gültig ist.

Bezüglich der Registrierung/Zulassung von Futtermittel- und Lebensmittelbetrieben sieht Artikel 31 dieser Verordnung vor, dass die zuständigen Behörden die Verfahren festlegen, welche die Futtermittel- und Lebensmittelunternehmer bei der Beantragung der Registrierung ihrer Betriebe gemäß der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 und der Richtlinie 95/69/EG zu befolgen haben.

#### 1.12.1.2.5 *Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel*

Diese Verordnung legt Kriterien zum mikrobiologischen Status der Lebensmittel sowie Durchführungsbestimmungen fest, die von Lebensmittelunternehmen bei der Durchführung allgemeiner und spezifischer Hygienemaßnahmen einzuhalten sind. Dabei trägt diese Verordnung ganz den Anforderungen der unmittelbaren Eigenverantwortlichkeit des Lebensmittelunternehmers im Sinn der Verordnung (EG) 178/2002 Rechnung.

Gemäß Artikel 4 Absatz 2 der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 haben Lebensmittelunternehmer grundsätzlich über die angemessene Beprobungshäufigkeit zu entscheiden, es sei denn, dass im Anhang I zu dieser Verordnung spezielle Probenahmeintervalle vorgesehen sind. In diesem Anhang I sind folgende Kapitel enthalten, die für Milch und Milchprodukte relevant sind:

Kapitel 1: Lebensmittelsicherheitskriterien

Kapitel 2: Prozesshygienekriterien mit Punkt 2.2: Milch und Milcherzeugnisse (hier ist die jeweilige Lebensmittelkategorie, die zu untersuchenden Mikroorganismen, der Probenahmeplan, die Grenzwerte, die analytische Referenzmethode, die Stufe, für die das Kriterium gilt sowie die Maßnahmen im Falle unbefriedigender Ergebnisse aufgeführt)

Kapitel 3: Bestimmungen über die Entnahme und Aufbereitung von Untersuchungsproben mit Punkt 3.1: Allgemeine Bestimmungen über die Entnahme und Aufbereitung der Untersuchungsproben

Bei dieser Verordnung zeigt sich die immer wieder fortschreitende Verknüpfung von Gesetz und internationalen Normen. So sind die entsprechenden ISO-Normen und die Richtlinien des Codex Alimentarius als Referenzverfahren immer dann heranzuziehen, wenn keine spezifischen Vorschriften für die Probenahme und Probenaufbereitung vorliegen.

### 1.12.1.3 Gesetzliche Grundlagen in Österreich

In Österreich als EU-Mitgliedstaat gilt das gesamte EU-Hygienepaket. Darüber hinaus gilt in Österreich auch das Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG). Das LMSVG hat sich mit der Umsetzung der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 die Grundsätze „Schutz des Verbrauchers vor Täuschung“ und „Gesundheitsschutz des Verbrauchers“ zum Ziel gesetzt (BMG, 2010b). Mit dem LMSVG werden die Grundsätze und Anforderungen an Lebensmittel, Wasser für den menschlichen Gebrauch, Gebrauchsgegenstände und kosmetische Mittel geregelt. Der 3. Abschnitt im LMSVG regelt die Hygiene im Lebensmittelbereich. Dies umfasst die Eintragung und Zulassung von Betrieben (§ 10), die Direktvermarktung (§ 11), die Anpassung der Anforderung für bestimmte Lebensmittelunternehmer (§ 13) sowie Bestimmungen über Rohmilch (§ 14). Ergänzend zu § 10 LMSVG werden mit der „Eintragungs- und Zulassungsverordnung“ weitere Voraussetzungen und Bedingungen für die Eintragung und Zulassung von Betrieben und Lebensmittelunternehmer getroffen. Ergänzend zu § 11 des LMSVG wird in der „Lebensmittel-Direktvermarktungsverordnung“ die direkte Abgabe kleiner Mengen bestimmter Lebensmittel an den Endverbraucher oder an örtliche Einzelhandelsunternehmen, die diese direkt an den Endverbraucher abgeben, geregelt.

Zur näheren Ausführung des § 14 LMSVG enthält die „Rohmilchverordnung“ (Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über Rohmilch und Rohrahm, BGBl. II Nr. 106/2006) Vorschriften für das In-Verkehr-Bringen von Rohmilch, die für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmt ist, sowie damit in Zusammenhang stehende Behandlungs- und Kennzeichnungsvorschriften.

Das Epidemiegesetz, das bereits seit 1950 in Kraft ist, wurde zuletzt am 16. Mai 2012 novelliert (BGBl. I Nr. 43/2012). Es legt die möglichen Maßnahmen der zuständigen Behörden sowie die anzeigepflichtigen Krankheiten des Menschen fest. Anzeigepflichtig sind u.a. Verdachts-, Erkrankungs- und Todesfälle an bakteriellen und viralen Lebensmittelvergiftungen, Paratyphus, Typhus (Abdominaltyphus), Bang'scher Krankheit und Tuberkulose hervorgerufen durch *Mycobacterium bovis*.

Unter dem Sammelbegriff „bakterielle und virale Lebensmittelvergiftungen“ sind u.a. folgende Erreger zusammengefasst, wobei nochmals darauf hingewiesen wird, dass ein Zusammenhang mit einem Lebensmittel gegeben sein muss:

- Campylobacteriose und ihre Erreger
- Listeriose und ihre Erreger
- *Escherichia coli*
- Salmonellose und ihre Erreger

Diese aufgezählten Erreger überschneiden sich mit dem im Zoonosegesetz aufgezählten Erregern.

Die Überwachung der Tierbestände ist in mehreren Veterinärsgesetzen (vor allem dem Tierseuchengesetz, das in Grundzügen noch aus dem Jahre 1909 stammt, und zuletzt 2008 novelliert wurde (BGBl. I Nr. 36/2008), sowie dem Tiergesundheitsgesetz aus dem Jahre 1999) geregelt. Ziel des Tierseuchengesetzes ist auch die Verhinderung der Einschleppung oder Weiterverbreitung von Krankheiten, die durch Tiere auf den Menschen übertragen werden können. Darunter fällt auch die unmittelbare Übertragung durch Lebensmittel tierischer Herkunft (BMG, 2010b). Als anzeigepflichtige Tierseuchen ist im Tierseuchengesetz u.a. die Tuberkulose der Rinder und die Maul- und Klauenseuche und aufgeführt.

Gemäß Bangseuchengesetz, BGBl. I Nr. 67/2005 und Rinderleukosegesetz, BGBl. I Nr. 67/2005, sind die Brucellose der Rinder (Abortus bang) bzw. die enzootische Rinderleukose ebenfalls eine anzeigepflichtige Tierseuche.

Das Futtermittelgesetz aus dem Jahre 1999 regelt die Herstellung, das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln sowie die erforderlichen Kontrollen.

Zoonosen sind Infektionskrankheiten, deren Erreger vom Tier auf den Menschen übertragen werden können, was sehr häufig über kontaminierte Lebensmittel geschieht. In Österreich wurde die EU-Zoonose-Richtlinie 2003/99/EG aus dem Jahre 2003 durch das Bundesgesetz zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern, BGBl. I Nr. 128/2005 (Zoonosengesetz, ZoonG), umgesetzt.

Dieses Gesetz stellt eine klare rechtliche Grundlage für die effektive Überwachung und Bekämpfung der Zoonosen dar und gibt darüber hinaus auch die organisatorischen Strukturen für die erfolgreiche nationale Zoonosenbekämpfung vor (BMG, 2010b). Mit dem ZoonG wurden die rechtlichen Grundlagen für die Zusammenarbeit zwischen den Bereichen Humanmedizin, Veterinärmedizin, Lebensmittel und Futtermittel im Rahmen der Bundeskommission für Zoonosen geschaffen. Zu den Aufgaben dieser Kommission zählt auch die Unterstützung des Bundesministers für Gesundheit bei der Festlegung der erforderlichen Maßnahmen bei bundesländerübergreifenden lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen. Die epidemiologische Abklärung von derartigen Krankheitsausbrüchen wird dann im Auftrag des Bundesministers für Gesundheit von der Bundeskommission für Zoonosen in Zusammenarbeit mit den Landeskommissionen der Bundesländer sowie der AGES durchgeführt (BMG, 2010a).

Das ZoonG regelt

- die Organisation der Überwachung von Zoonosen und deren Erregern,
- die Überwachung diesbezüglicher Antibiotikaresistenzen,
- die epidemiologische Untersuchung lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche und
- den Austausch über Informationen über Zoonosen und Zoonoseerreger.

Im Anhang I A sind u.a. folgende überwachungspflichtigen Zoonosen und deren Erreger aufgelistet:

- Brucellose und ihre Erreger
- Campylobacteriose und ihre Erreger
- Listeriose und ihre Erreger
- Salmonellose und ihre Erreger
- Tuberkulose durch *Mycobacterium bovis*
- Verotoxin-bildende *Escherichia coli*

Laut Zoonosengesetz ist ein lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch als das unter gegebenen Umständen festgestellte Auftreten einer mit demselben Lebensmittel oder mit demselben Lebensmittelunternehmer in Zusammenhang stehende oder

wahrscheinlich in Zusammenhang stehende Krankheit und/oder Infektion in mindestens zwei Fällen beim Menschen oder eine Situation, in der sich die festgestellten Fälle stärker häufen als erwartet, definiert.

#### 1.12.1.4 Gesetzliche Anforderungen an die Erzeugung von Rohmilch

In Anhang III Abschnitt IX Kapitel I der EG-Verordnung Nr. 853/2004 sind die Bestimmungen für die Rohmilcherzeugung festgelegt. Danach definiert Kapitel I.I. die Hygienevorschriften, die an die Tiere gestellt werden, von denen die Rohmilch gewonnen wird. Auch die Anforderungen an deren Gesundheitszustand sind darin definiert. Kapitel I.II. definiert die Hygienevorschriften für Erzeugerbetriebe und enthält Vorschriften für Betriebstätte und Ausrüstungen, Hygiene beim Melken, Abholung/Sammlung und Beförderung sowie Personalhygiene. In Kapitel I.III. werden die Vorschriften in Bezug auf die Keim- und Zellzahlen sowie Antibiotikarückstände in Rohmilch beschrieben. Absatz 2 schreibt vor, dass eine repräsentative Anzahl an Proben von Rohmilch aus Milcherzeugungsbetrieben, die nach dem Zufallsprinzip gezogen werden, auf Übereinstimmung mit den Werten der nachfolgenden Tabelle kontrolliert werden müssen.

Lebensmittelunternehmer müssen mit geeigneten Verfahren sicherstellen, dass rohe Kuhmilch folgende Kriterien erfüllt:

**Tabelle 15. Gesetzliche Anforderungen für Rohmilch gemäß EG-VO 853/2004**

Keimzahl bei 30°C (pro mL)	≤ 100 000 KbE/mL (*)
Somatische Zellen (pro mL)	≤ 400 000 Zellen/mL (**)
(*) Über zwei Monate ermittelter geometrischer Mittelwert bei mindestens zwei Probenahmen je Monate.	
(**) Über drei Monate ermittelter geometrischer Mittelwert bei mindestens einer Probenahme je Monat, es sei denn, die zuständige Behörde schreibt eine andere Methode vor, die saisonalen Schwankungen der Produktionsmenge Rechnung trägt.	

Lebensmittelunternehmer müssen außerdem mit geeigneten Verfahren sicherstellen, dass Rohmilch nicht in Verkehr gebracht wird, wenn

- ihr Gehalt an Rückständen von Antibiotika über den zugelassenen Mengen für einen der Stoffe der Anhänger I und II der Verordnung (EG) Nr. 2337/90 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1231/2006, liegt oder
- die Gesamtrückstandsmenge aller antibiotischen Stoffe den höchstzulässigen Wert überschreitet.

Sollte Rohmilch nicht den Anforderungen über Hygiene und Rückstandsmengen genügen, so muss der Lebensmittelunternehmer dies der zuständigen Behörde melden und durch geeignete Maßnahmen Abhilfe schaffen.

Kapitel II.I. und II.II. beschreiben die Vorschriften für Milcherzeugnisse bezüglich Temperatur und Wärmebehandlung.

Kapitel IV schreibt vor, dass im Falle der für den unmittelbaren menschlichen Verzehr bestimmten Rohmilch das Wort „Rohmilch“ auf der Etikettierung zu erkennen sein muss. Im Falle von mit Rohmilch hergestellten Erzeugnissen, bei denen der Herstellungsprozess keinerlei Wärmebehandlung oder physikalische oder chemische Behandlung umfasst, müssen die Worte „mit Rohmilch hergestellt“ auf der Etikettierung zu erkennen sein.

Diese Vorschriften finden Anwendung auf Erzeugnisse, die für den Einzelhandel bestimmt sind. Der Ausdruck „Etikettierung“ umfasst alle Verpackungen, Dokumente, Hinweise, Etiketts, Ringe oder Verschlüsse, mit denen solche Erzeugnisse versehen sind oder die auf sie Bezug nehmen.

In Österreich muss Rohmilch den Anforderungen der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, der Rohmilchverordnung BGBl. II 106/2006 und der Direktvermarktungsverordnung BGBl. II 108/2006 entsprechen. Laut § 14 LMSVG gilt, dass rohe Kuhmilch folgendes Kriterium erfüllen muss:

Keimzahl bei 30°C (pro mL):  $\leq 50\ 000$  KbE/mL

Die Rohmilchverordnung regelt in § 6, dass rohe Kuhmilch folgende Kriterien erfüllen muss:

Keimzahl bei 30°C (pro mL):  $\leq 50\ 000$  KbE/mL

Somatische Zellen (pro mL):  $\leq 400\ 000$  Zellen/mL

Die Lebensmittel-Direktvermarktungsverordnung schreibt ebenfalls vor, dass rohe Kuhmilch als Keimzahl bei 30°C  $\leq 50\ 000$  Keime pro mL enthalten darf.

Neben den nationalen Gesetzen und Verordnungen gibt es in Österreich auch nationale Leitlinien, wie die Leitlinie über mikrobiologische Kriterien für Milch und Milchprodukte, die Leitlinie für eine gute Hygienepraxis für bäuerliche Milchverarbeitungsbetriebe oder die Leitlinie für eine gute Hygienepraxis bei der Milchverarbeitung auf Almen. Diese Leitlinien dienen zur leichteren Handhabung für die Umsetzung der Anforderungen der EU-Hygiene-Verordnungen und werden vom Bundesministerium für Gesundheit veröffentlicht.

#### **1.12.1.5 Anforderungen an den Milcherzeuger**

Die Basis-Verordnung (EG) 178/2002 legt in Artikel 3 Nr. 2 fest, dass auch der Milcherzeugerbetrieb ein Lebensmittelunternehmen ist. Damit ist der Milcherzeuger ein Lebensmittelerzeuger im Sinne des Artikels 3 Nr. 3 und fällt als Urproduzent unter den Anwendungsbereich des Kapitels II der Basis-Verordnung. Gemäß den Regelungen der Artikel 14 bis 21 ist er für das von ihm produzierte Lebensmittel Milch im Sinne dieser Verordnung allumfassend verantwortlich. Weiteres regelt die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 über Hygieneregeln für Lebensmittel tierischen Ursprungs im Anhang III:

- Abschnitt IX: Rohmilch und verarbeitete Milcherzeugnisse  
Hier werden die Hygienevorschriften für die Rohmilch-Primärproduktion definiert. So muss die Rohmilch von gesunden Kühen stammen, die amtlich anerkannten brucellose- und tuberkulosefreien Betrieben angehören und

denen keine nicht zugelassenen Stoffe oder Erzeugnisse verabreicht worden sind bzw. bei denen nach Verabreichung zugelassener Stoffe oder Erzeugnisse die vorgeschriebene Wartezeit eingehalten worden ist.

Weiters definiert dieser Abschnitt die Hygienevorschriften für Milcherzeugerbetriebe und geht auf Melkgeschirr, Behälter, Räume, Ausrüstung, sowie Melken, Abholen/Sammeln, Beförderung und Personalhygiene ein.

Auch die Kriterien für Rohmilch werden in diesem Abschnitt definiert, wie Probenahme, mikrobiologische Kriterien und Antibiotikarückstände.

Weitere Regelungen können noch im nationalen Recht der EU-Mitgliedstaaten erfolgen, wenn sie in der Verordnung vorgesehen sind, z.B. Rohmilch Ab-Hof-Abgabe und Vorzugsmilch Artikel 10 Abs. 8 Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (Sicherheit, Rückverfolgbarkeit, bauliche Anforderungen, personelle Anforderungen, Anforderungen an Tiere).

#### **1.12.1.6 Gesetzliche Anforderungen an die Erzeugung von Vorzugsmilch**

Die neuen EU-Verordnungen (Lebensmittelhygienepaket) berücksichtigen die Verkaufsform „Vorzugsmilch“ nicht. Die EU-Mitgliedsstaaten können allerdings gemäß Artikel 10 Absatz 8 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 aus eigener Initiative und unter Einhaltung der allgemeinen Bestimmungen des Vertrages einzelstaatliche Vorschriften beibehalten oder einführen, mit denen das Inverkehrbringen von Rohmilch, die für den unmittelbaren menschlichen Verbrauch bestimmt sind, in seinem Hoheitsgebiet untersagt oder eingeschränkt wird.

Die Anforderungen für Vorzugsmilch sind in Deutschland in der Tier-LMHV (Tierische Lebensmittelhygieneverordnung) vom 15. August 2007 geregelt. Gemäß Anlage 9 Kapitel 1 Nr. 3 Tier-LMHV muss Vorzugsmilch bei monatlich durchzuführenden Stichprobenuntersuchungen im Erzeugerbetrieb folgende Voraussetzungen erfüllen:

**Tabelle 16. Voraussetzungen für Vorzugsmilch gemäß Tier-LMHV**

	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>n</b>	<b>c</b>
1. Keimzahl/mL bei +30°C	20 000	50 000	5	2
2. <i>Enterobacteriaceae</i> /mL bei +30°C	10	100	5	2
3. Koagulase-positive Staphylokokken/mL ( <i>S. aureus</i> )	10	100	5	2
4. Anzahl somatischer Zellen/mL	200 000	300 000	5	2
5. Salmonellen in 25mL	0	0	5	0
6. Pathogene Mikroorganismen oder deren Toxine dürfen in der Milch von Rindern nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen können.				
7. Bei der sensorischen Kontrolle der Milch von Rindern dürfen keine Abweichungen erkennbar sein.				
8. Der Phosphatetest muss bei Milch von Rindern positiv reagieren.				

m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die einzelne Proben diesen Wert nicht überschreiten

M = Höchstwert; das Ergebnis gilt nicht als ausreichend, wenn die Werte einer oder mehrere Proben diesen Wert überschreiten

n = Anzahl der Proben

c = Anzahl der Proben mit Wert zwischen „m“ und „M“; das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn die Werte der übrigen Proben höchstens den Wert „m“ erreichen

Ergibt sich bei Stichprobenuntersuchungen von Einzelproben ein Wert „≤m“ so sind im Regelfall weitere Untersuchungen nicht erforderlich. Liegt der Wert dagegen zwischen „m“ und „M“, so sind die dann zu ziehenden Proben (n) jeweils auf einen Produktionstag zu beziehen.

Richtwertüberschreitungen haben zur Folge, dass die zuständige Lebensmittelüberwachungsbehörde mit dem betroffenen Milcherzeuger nach erzeuger- und stallspezifischen Schwachstellen sucht und Nachproben (n = 5; c = 2) zur Untersuchung entnimmt. Warnwertüberschreitungen haben zur Folge, dass dem Milcherzeugungsbetrieb die Vorzugsmilchabgabe sofort verboten wird. Erst nach

Durchführung von Sanierungsmaßnahmen und Nachuntersuchungen mit unauffälligem Befund wird die Abgabesperre aufgehoben.

Für das Herstellen, Behandeln und in Verkehr bringen von Vorzugsmilch ist laut § 18 Abs. 1 Tier-LMHV eine Genehmigung der zuständigen Behörde erforderlich. In der Zeit von der Abfüllung bis zur Abgabe der Vorzugsmilch darf laut § 17 Absatz 2 Punkt 3 Tier-LMHV eine Temperatur von +8°C nicht überschritten werden. Weiters muss die Fertigpackung mit dem dem Verbrauchsdatum vorangestellten Wort „Rohmilch“ sowie dem nachgestellten Hinweis „Aufbewahren bei höchstens +8°C“ gekennzeichnet sein, wobei das Verbrauchsdatum eine Frist von 96 Stunden nach der Gewinnung nicht überschreiten darf.

Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (CVUAS) führt monatlich für die in Baden-Württemberg zugelassenen Vorzugsmilcherzeuger (vor 2008: acht, 2008: sieben, 2009: sechs) die Überprüfung der Vorzugsmilch auf die Einhaltung der Güteanforderungen Gesamtkeimzahl, *Enterobacteriaceae*, koagulase positive Staphylokokken, somatische Zellen, Salmonellen, pathogene Mikroorganismen und deren Toxine sowie sensorische Eigenschaften durch (FRIEDRICH und HORLACHER, 2010). Seit dem Inkrafttreten der Tier-LMHV liegt die Häufigkeit von Warnwertüberschreitungen bei Vorzugsmilch in der Regel unter 2%, im Falle der somatischen Zellzahl bei 3,7% (FRIEDRICH und HORLACHER, 2010).

#### **1.12.1.7 Gesetzliche Anforderungen an Erzeugung und Einfuhr von Kolostrum**

Kolostrum muss den Anforderungen der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs entsprechen.

In Anhang III Abschnitt IX Kapitel I der EG-Verordnung Nr. 853/2004 sind die Bestimmungen für die Gewinnung von Kolostrum und Erzeugnissen auf Kolostrumbasis festgelegt. Danach definiert Kapitel I.I. die Hygienevorschriften, die an die Tiere, von denen das Kolostrum gewonnen wird, sowie an deren Gesundheitszustand gestellt werden. Kapitel I.II. definiert die Hygienevorschriften für Kolostrumerzeugerbetriebe und enthält Vorschriften für Betriebstätte und

Ausrüstungen, Hygiene beim Melken, Abholung/Sammlung und Beförderung sowie Personalhygiene. In Kapitel I.III. werden die Kriterien in Bezug auf die Keim- und Zellzahlen sowie Antibiotikarückstände in Kolostrum beschrieben. Dort heißt es, dass für Kolostrum die einzelstaatlichen Kriterien hinsichtlich der Keimzahl, des Gehalts an somatische Zellen und Rückständen von Antibiotika gelten, bis spezifische Gemeinschaftsvorschriften festgelegt werden. Absatz 2 schreibt vor, dass eine repräsentative Anzahl an Proben von Kolostrum aus Milcherzeugungsbetrieben, die nach dem Zufallsprinzip gezogen werden, kontrolliert werden müssen.

Kapitel II beschreibt die Vorschriften für Erzeugnisse auf Kolostrumbasis wie Temperaturvorschriften und Vorschriften für die Wärmebehandlung.

Kapitel IV, das die Etikettierung behandelt, schreibt vor, dass diese im Falle von Kolostrum das Wort „Kolostrum“ deutlich erkennen lassen muss. Im Falle der auf Kolostrumbasis hergestellten Erzeugnisse muss das Wort „kolostrumhaltig“ zu erkennen sein.

Laut Verordnung (EU) Nr. 790/2010 ist die Einfuhr von Kolostrum und kolostrumhaltigen Erzeugnissen in die Europäische Union untersagt, da die Kommission keine Liste von Drittländern und Drittlandgebieten festgelegt hat, aus denen die Einfuhr von Kolostrum gestattet ist.

### *1.12.2 NÄHRUNGSERGÄNZUNGSMITTEL*

Der Begriff „Nahrungsergänzungsmittel“ (NEM) wird in § 3 Ziffer 4 des LMSVG, BGBl. I Nr. 95/2010 idgF. definiert. Demnach sind NEM Lebensmittel, die zur Ergänzung der normalen (allgemeinen) Ernährung dienen und eine ernährungsspezifische oder physiologische Wirkung zeigen. Sie werden dosiert als Konzentrate abgegeben und sind zur Aufnahme in kleinen, abgemessenen Mengen bestimmt. Bei NEM ist die Angabe einer eindeutigen Verzehrsempfehlung verpflichtend. Waren, die in großen Mengen verzehrt werden sollen (z.B. ein Liter/Tag) sind daher keine NEM.

NEM dienen nicht zur Heilung, Linderung oder Verhütung von menschlichen Krankheiten.

Mit Ausnahme der Begriffsdefinitionen setzt die Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung BGBl. II Nr. 88/2004 idgF. die europäische Richtlinie 2002/46/EG in österreichisches Recht um.

### 1.12.3 *DIÄTETISCHE LEBENSMITTEL*

Der Begriff „diätetische Lebensmittel“ wird in § 3 Ziffer 3 des LMSVG, BGBl. I Nr. 95/2010 idgF. definiert. Diätetische Lebensmittel sind entsprechend gekennzeichnete Lebensmittel, die für eine definierte Personengruppe und eine besondere Ernährung bestimmt sind und die sich auf Grund ihrer besonderen Zusammensetzung oder des besonderen Verfahrens ihrer Herstellung deutlich von den Lebensmitteln des allgemeinen Verzehrs unterscheiden, die sich für den angegebenen Ernährungszweck eignen und mit dem Hinweis darauf in Verkehr gebracht werden, dass sie für diesen Zweck geeignet sind.

Eine besondere Ernährung muss den besonderen Ernährungserfordernissen folgender Verbrauchergruppen entsprechen:

- bestimmte Gruppen von Personen, deren Verdauungs- bzw. Resorptionsprozess oder Stoffwechsel gestört ist,
- bestimmte Gruppen von Personen, die sich in besonderen physiologischen Umständen befinden und deshalb einen besonderen Nutzen aus der kontrollierten Aufnahme bestimmter, in der Nahrung enthaltener Stoffe ziehen können, oder
- gesunde Säuglinge oder Kleinkinder

Zu den diätetischen Lebensmitteln gehören Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung, Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder, Lebensmittel für kalorienarme Ernährung zur Gewichtsverringerung, Lebensmittel, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit (Zöliakie) geeignet sind sowie diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke.

Nach § 3 der Verordnung über diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, BGBl. II 2000/416 idgF., müssen sich diese Lebensmittel gemäß den Anweisungen des Herstellers sicher und nutzbringend verwenden lassen und wirksam sein in dem Sinne, dass sie den besonderen Ernährungserfordernissen der Personen, für die sie bestimmt sind, entsprechen, was durch allgemein anerkannte wissenschaftliche Daten zu belegen ist.

Die Zusammensetzung von Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke muss den im Anhang der Verordnung BGBl. II 2000/416 idgF. angeführten Kriterien entsprechen.

#### *1.12.4 FUNKTIONELLE LEBENSMITTEL (FUNCTIONAL FOODS, NUTRACEUTICALS)*

Funktionelle Lebensmittel sind Lebensmittel, die mit zusätzlichen Inhaltsstoffen angereichert sind und mit einem positiven Effekt auf die Gesundheit beworben werden. Zugesetzt werden z.B. Ballaststoffe, Vitamine, Mineralstoffe, Bakterienkulturen und ungesättigte Fettsäuren. Eine gesetzliche Definition innerhalb der EU gibt es noch nicht.

Funktionelle Lebensmittel gelangen in den typischen Lebensmittelformen in den Handel. Sie müssen den Bestimmungen des LMSVG und der Lebensmittelkennzeichnungsverordnung entsprechen. Produktspezifische Vorschriften gibt es nicht. Bei der rechtlichen Beurteilung von funktionellen Lebensmitteln geht es im Wesentlichen um vier Punkte:

1. Das Erzeugnis muss gesundheitlich unbedenklich sein (GRAS-Status; Generally Recognized as Safe).
2. Die eingesetzten Inhaltsstoffe müssen frei verwendbar bzw. zugelassen sein.
3. Die Wirkungen über einen positiven gesundheitlichen Zusatznutzen eines funktionellen Lebensmittels müssen wissenschaftlich nachgewiesen sein und dürfen nicht irreführend sein. Der Nachweis muss den allgemein anerkannten wissenschaftlichen Standards entsprechen und muss sich aus mehreren Studien, die sich auf Untersuchungen am Menschen beziehen, ableiten

sein. Gesundheitsbezogene Angaben dürfen nur verwendet werden, wenn ihr Nachweis im Rahmen des Zulassungsverfahrens auch bestätigt wurde. Welche Gesundheitsangaben wissenschaftlich bewiesen sind, wird im Rahmen eines Zulassungsverfahrens nach der Health-Claims-Verordnung, VO (EG) Nr. 1924/2006, geprüft.

4. Die Werbeaussagen über das funktionelle Lebensmittel dürfen nicht mit dem Verbot der krankheitsbezogenen Angaben kollidieren. Solche sind ausschließlich Arzneimitteln vorbehalten.

#### 1.12.5 *NEUARTIGE LEBENSMITTEL (NOVEL FOODS)*

Neuartige Lebensmittel ("Novel Foods") sind Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die vor dem 15. Mai 1997 in der EU noch nicht in nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr verwendet wurden. Neuartige Lebensmittel sind Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die folgenden Kategorien zuzuordnen sind:

- Lebensmittel mit neuer oder gezielt modifizierter primärer Molekularstruktur
- Lebensmittel, die aus Mikroorganismen, Pilzen oder Algen bestehen oder aus diesen isoliert worden sind
- Lebensmittel, die in Europa unbekannte und exotische Pflanzen und Pflanzenteile enthalten oder Lebensmittelzutaten, die aus Tieren isoliert wurden
- Lebensmittel, die mit einem neuen, nicht üblichen Verfahren hergestellt wurden, das eine Veränderung der Zusammensetzung oder Struktur bewirkt (z.B. Hochdruckbehandlung)

Das Zulassungsverfahren für neuartige Lebensmittel verläuft gemäß Verordnung (EG) 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten. Es gibt ein Genehmigungsverfahren und ein Anmeldeverfahren (Notifizierung).

### 1.12.6 *HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINTS (HACCP)- KONZEPT*

HACCP, deutsch: „Gefahrenanalyse und kritische Lenkungspunkte“, ist ein vorbeugendes Instrument der Vermeidung von Gesundheitsrisiken für den Konsumenten. Die gesetzliche Basis dafür sind die europäische Lebensmittel-Hygienerichtlinie 93/94/EWG vom 14. Juni 1993 und die Basis-Verordnung (EG) Nr. 178/2002. Durch die am 1. Januar 2006 in Kraft getretene Verordnung (EG) Nr. 852/2004 ist für jeden Lebensmittelunternehmer die Einrichtung eines HACCP-Konzeptes Pflicht.

HACCP beinhaltet unter anderem eine produkt- und betriebsspezifische Gefahrenanalyse, gezielte Überwachung sicherheitsrelevanter Verfahrensschritte (CCPs) und festgelegte Maßnahmen für den Fall von Sollwertabweichungen. HACCP ist die zweite von vier Stufen auf dem Weg zur Lebensmittelsicherheit (JAKOB et al., 2004):

#### *1. Grundanforderungen*

Die Grundlage einer sicheren Lebensmittelproduktion ist die Beachtung der allgemein anerkannten Grundsätze und Verfahrensweisen, ohne die die Herstellung einwandfreier Produkte von konstanter hoher Qualität kaum möglich ist. Auf der Stufe der Primärproduktion werden diese Anforderungen mit der Guten landwirtschaftlichen Praxis (GAP; Good Agricultural Practice) umschrieben. In der Verarbeitung gilt die Gute Herstellungspraxis (GMP; Good Manufacturing Practice) und die Gute Hygienepraxis (GHP).

GAP beinhaltet Richtlinien für eine umweltgerechte, ökonomische und nachhaltige Produktion in der Landwirtschaft und Maßnahmen für die hygienische Sicherheit landwirtschaftlicher Produkte. GAP umfasst die Boden- und Substratbehandlung, Düngung, Bewässerung, Pflanzenschutz, Ernte, Nacherntebehandlung, Lagerung, Tierhaltung, Arbeitssicherheit usw. Unter dem Titel „Guide to Good Dairy Farming Practice“ haben die FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations; Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen) und der IDF

(International Dairy Federation; Internationaler Milchwirtschaftsverband) GAP-Richtlinien für die Milcherzeugung publiziert.

GMP umfasst die Grundanforderungen an die Lebensmittelverarbeitung und umfasst Vorschriften im Bereich der Reinigung, Personalhygiene, Infrastruktur und Rückverfolgbarkeit. Dazu gehören dokumentierte und dem Stand der Technologie entsprechende Rezepturen, Verfahren, Apparate und Einrichtungen.

## 2. HACCP

Das zentrale Instrument im Dienste der Lebensmittelsicherheit ist das HACCP-Konzept, mit dem der Herstellungsprozess jedes Lebensmittels auf mögliche Gefahren hin untersucht und gesteuert wird und vorbeugende Maßnahmen zu deren Verminderung oder Eliminierung festgelegt werden. HACCP-Konzepte können nur auf der Grundlage der Guten Herstellungspraxis sowie einschlägiger Fachkenntnisse erstellt werden.

## 3. Selbstkontrolle

Jeder Lebensmittelbetrieb muss über ein System zur Selbstkontrolle verfügen und damit regelmäßig überprüfen, ob sein Qualitätssicherungssystem (GMP und HACCP) auf dem letzten Stand ist und funktioniert. Mittel der Selbstkontrolle sind z.B. betriebsinterne Audits und stichprobenweise Endproduktkontrollen. GMP, HACCP und Selbstkontrolle sind EU-rechtlich verankert und verpflichtend. Die Einhaltung wird von den behördlichen Vollzugsorganen kontrolliert.

## 4. Zertifizierungssysteme

Die Food Safety Standards des Handels wie BRC (British Retail Consortium) oder IFS (International Food Standard) sind privatrechtliche Zertifizierungssysteme. Bezüglich der Rückverfolgbarkeit gehen sie aber weiter als der Gesetzgeber, indem der Verarbeiter die gesamte vorgelagerte

Verarbeitungskette einzubeziehen hat und nicht nur den direkten Lieferanten und den direkten Abnehmer („one step up, one step down“).

FSSC 22000 (Food Safety System Certification 22000) umfasst ein vollständiges Zertifizierungsverfahren für Lebensmittelsicherheitssysteme auf der Grundlage bestehender Zertifizierungsnormen und wird als gleichwertig mit anderen genehmigten Systemen (wie z.B. IFS) anerkannt. FSSC richtet sich an Unternehmen, die tierische Produkte, verderbliche Gemüseprodukte, Produkte mit langer Haltbarkeit, (sonstige) Lebensmittelzutaten wie Zusatzstoffe, Vitamine und Biokulturen sowie Lebensmittelverpackungsmaterialien herstellen oder verarbeiten.

## 2 PROBLEMSTELLUNG

Das Ziel des praktischen Teils dieser Masterarbeit war es, die Wirkung von physikalischen Haltbarmachungsmethoden wie Hitzebehandlung, Mikrofiltration, Hochdruckbehandlung und Kombinationen daraus auf den mikrobiologischen Zustand und den Gehalt an Immunglobulin G (IgG) von bovinem Kolostrum zu untersuchen.

Der theoretische Teil beschäftigt sich mit den aktuellen und historischen Aspekten des Lebensmittelrechtes, der Milchhygiene und den damit verbundenen Krankheitserregern.

Die Kernfrage war, ob ein natives und möglichst unbehandeltes Produkt wie bovines Kolostrum, bei dem ein hoher natürlicher Gehalt an IgG aus gesundheitsfördernden Gründen erhalten bleiben soll, mikrobiologisch sicher genug sein kann, um an verschiedene, auch hochempfindliche Konsumentengruppen abgegeben werden zu können. Reicht es aus, dafür die Vorschriften für die Vorzugsmilchproduktion anzuwenden? Können in-situ Monitoringsysteme („just in time“ monitoring) eingesetzt werden, um die mikrobiologische Sicherheit des Produktes zu gewährleisten?

Es sollte ebenfalls ermittelt werden, wo die kritischen Lenkungspunkte bei der Kolostrumgewinnung und –verarbeitung liegen können, welches Restrisiko bestehen bleibt und wie die Risikopotenziale in den Griff zu bekommen sind.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 PROBE

Das für diese Untersuchungen verwendete bovine Rohkolostrum wurde von der Firma OCS Colostrum Vitaplus GmbH, A-6300 Wörgl, der Arbeitsgruppe Prozesstechnik der BOKU zur Verfügung gestellt und war in 2 kg-Blöcken tiefgefroren. Kolostrumblöcke, die augenscheinlich verunreinigt waren, z.B. mit Stroh und Schmutz, wurden nicht für die Untersuchungen herangezogen.

Da vorhergehende Experimente zeigten, dass Auftauen mit anschließendem Vereinigen und Wiedereinfrieren des Kolostrums zu einer Ansäuerung mit Ausfällung des Caseins führt, wurde das Kolostrum in gefrorenem Zustand zerkleinert und vereinigt. Danach wurden Chargen zu je zwölf kg bei 30 bis 35°C aufgetaut und mittels Separator entfettet, wobei Magerkolostrum entstand.

Dieses Magerkolostrum wurde zur Durchführung von Inokulation, Hitzebehandlung, Mikrofiltration und Hochdruckbehandlung verwendet.

## 3.2 MIKROFILTRATION

Als Membranelemente wurden keramische ISOFLUX™ Rohrmembranen der Firma TAMI Deutschland GmbH verwendet. Diese Membran hat einen Gradienten in der Membranschichtdicke, der einen gleichmäßigen Permeatfluss erlaubt. Die grobporösen Trägerrohre bestehen aus Titanoxid und sind mit der aktiven keramischen Membran beschichtet. Die Membran besteht in Abhängigkeit von der Trenngrenze aus Titan- oder Zirkonoxid. Die Porendurchmesser dieser Mikrofiltrationselemente betragen 0,8 µm bzw. 1,4 µm. Die Rohrmembranen sind 1178 mm lang und haben acht Röhrenkanäle mit einem hydraulischen Durchmesser von je 6 mm. Die Membranoberfläche eines Elements beträgt 0,2 m<sup>2</sup>.

## 3.3 HOCHDRUCKBEHANDLUNG

Sowohl inokuliertes Kolostrum als auch solches, das mikrofiltriert wurde, wurde Hochdruckbehandlungen von 400 MPa und 500 MPa unterzogen. Für jeden Durchgang wurden 200 g des gefrorenen Kolostrums in Polyethylen-Polyamid-Beuteln vakuumverpackt. Nach dem Auftauen wurde jeder Beutel in einen weiteren Beutel vakuumverpackt. Die Hochdruckanlage (FF725, Nova Swiss Sarl, Cesson, Frankreich) wurde auf 20°C temperiert, bevor die verpackte Probe in die mit dem Kälteschutzmittel Friogel® (Climalife Groupe Dehon, Frankreich) gefüllte Druckkammer eingebracht wurde. Der Druck wurde auf 400 MPa bzw. 500 MPa aufgebaut, wobei die Temperatur 22°C nicht überstieg. Nach einer Haltezeit von zehn Minuten wurde die Druckkammer entspannt und die Proben entnommen.

## 3.4 HITZEBEHANDLUNG

Zur Hitzebehandlung des Kolostrums wurden vier verschiedene Methoden ausgewählt:

- 1) 10 Minuten bei 60°C
- 2) 20 Minuten bei 75°C
- 3) 30 Minuten bei 100°C (strömender Dampf)
- 4) 15 Minuten bei 121°C (Autoklavieren)

### 3.5 MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON UNBEHANDELTEM UND BEHANDELTEM KOLOSTRUM

#### 3.5.1 HERSTELLUNG DER ÜBERNACHTKULTUREN FÜR DAS INOKULATION

##### 3.5.1.1 Geräte und Hilfsmittel

- Heizplatte mit Magnetrührer: IKA RCT basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
- Autoklav: CertoClav Tischautoklav CV-EL 10 L O; CertoClav GmbH, Österreich
- Brutschrank 30°C: Binder BD 53; Binder GmbH, Deutschland
- Brutschrank 37°C: Binder BD 53; Binder GmbH, Deutschland
- sterile Röhrchen: 15 mL,; Polypropylen, konischer Boden, mit Schraubverschluss, Art.-Nr.: 188271; Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
- Glasflaschen mit Schraubverschluss: 250 mL
- Pipettierhilfe
- sterile Einweg-Messpipetten: 10 mL, Kunststoff
- sterile Einweg-Transferpipetten, Kunststoff
- Bunsenbrenner
- Laborwaage: Precisa 4000 C; Precisa Gravimetrics AG, Schweiz
- sterile Einweg-Impfösen, Kunststoff
- Sterilwerkbank: Thermo Scientific MSC 12 EN-NF G2xELALL, Thermo Fisher Scientific, USA
- Einweg-Küvetten: Plastibrand Halbmikro-Standardküvetten für den Einmalgebrauch

- Photometer: Thermo Electron Sci Inst UV-VIS Spectrophotometer 335908P-000

### 3.5.1.2 Nährmedien

#### Nährbouillon: Roth X929.1

- Pepton aus Gelatine (5,0 g/L)
- Rindfleischextrakt (3,0 g/L)
- pH  $6,8 \pm 0,2$  bei  $25^{\circ}\text{C}$
- 8 g/L

#### Hirn-Herz-Glucose-Bouillon: Roth X916.1

- Kalbshirn-Infusion (7,5 g/L)
- Pepton (10,0 g/L)
- NaCl (5,0 g/L)
- Rinderherz-Infusion (10,0 g/L)
- Dinatriumphosphat (2,5 g/L)
- Glucose (2,0 g/L)
- pH  $7,4 \pm 0,2$  bei  $25^{\circ}\text{C}$
- 37 g/L

#### Tryptic Soy Broth: Merck 1.05459.0500

- Caseinpepton (17,0 g/L)
- Sojapepton (3,0 g/L)
- D-Glucose (2,5 g/L)
- NaCl (5,0 g/L)
- Dikaliumhydrogenphosphat (2,5 g/L)
- pH  $7,3 \pm 0,2$  bei  $25^{\circ}\text{C}$
- 30g/L

**Tabelle 17. Für die Inokulation des Magerkolostrums eingesetzte Stämme**

Code	Genus	Spezies	Sub-spezies	Synonym	Ursprung	Kommentar
Ec 2	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	-	DSM 30083 NCTC 9001	Urin	Biohazard Gruppe 2
G Li 1	<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	-	LMG 11387 ATCC 33090	Rinderhirn (Deutschland)	-
G Bc 7	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	<i>subtilis</i>	LMG 7135 DSM 10 ATCC 6051	unbekannt	-

*Escherichia coli*, 25 mL bzw. 250 mL

Die benötigte Menge an Nährbouillon wurde in Glasflaschen hergestellt, autoklaviert, abgekühlt und in der Sterilwerkbank aseptisch in die sterilen Röhrchen pipettiert. Dann wurde das Nährmedium aseptisch mit *E.coli* beimpft und mit leicht aufgeschraubtem Deckel aerob über Nacht bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte (OD 600) dieser Übernachtskultur betrug ca. 0,4, was einer Keimzahl von ca.  $3 \cdot 10^8$  KbE/mL entspricht.

*Listeria innocua*, 25 mL bzw. 250 mL

Die benötigte Menge an Hirn-Herz-Bouillon wurde in Glasflaschen hergestellt, autoklaviert, abgekühlt und in der Sterilwerkbank aseptisch in die sterilen Röhrchen pipettiert. Dann wurde das Nährmedium aseptisch mit *L. innocua* Übernachtskultur beimpft und mit leicht aufgeschraubtem Deckel aerob über Nacht bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte (OD 600) dieser Übernachtskultur betrug ca. 0,65, was einer Keimzahl von ca.  $1 \cdot 10^9$  KbE/mL entspricht.

### Bacillus subtilis, 25 mL bzw. 250 mL

Die benötigte Menge an Trypton-Soja-Bouillon wurde in Glasflaschen hergestellt, autoklaviert, abgekühlt und in der Sterilwerkbank aseptisch in die sterilen Röhren pipettiert. Dann wurde das Nährmedium aseptisch mit *B. subtilis* beimpft und mit leicht aufgeschraubtem Deckel aerob über Nacht bei 30°C inkubiert. Die optische Dichte (OD 600) dieser Übernachtskultur betrug ca. 0,5, was einer Keimzahl von ca.  $2 \cdot 10^7$  KbE/mL entspricht.

## 3.5.2 HITZEBEHANDLUNG

### 3.5.2.1 Geräte und Hilfsmittel

- Autoklav: CertoClav Tischautoklav CV-EL 10 L O; CertoClav GmbH, Österreich
- Wasserbad: Medingen W22; Labortechnik Medingen GmbH, Deutschland
- Röhren: Polypropylen Röhren, 50 mL, konischer Boden mit Stehrand und Schraubverschluss, Art.-Nr.: 227270; Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
- Metallgestell für 50 mL-Röhren: Stahl, mit Epoxidpulver-Beschichtung, autoklavierbar
- Kurzzeitmesser: Oregon Scientific Timer SKT 338 N mit Std./Min./Sek., digital; Oregon Scientific, USA

### 3.5.2.2 Durchführung der Hitzebehandlung

Von Rohkolostrum, Magerkolostrum und allen kontaminierten Kolostrumproben wurden jeweils ca. 50 mL zur Hitzebehandlung herangezogen. Dazu wurde das Wasserbad auf 60°C bzw. 75°C aufgeheizt, dann das Röhren mit der Probe in einem Metallgestell hineingestellt und die jeweilige Zeit mit dem Timer gemessen. Die Hitzebehandlung mit strömendem Dampf wurde im Autoklaven ohne Überdruck durchgeführt, die Autoklavier-Behandlung bei 1 bar Überdruck. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und weiterverarbeitet.

### 3.5.3 NACHWEIS DER AEROBEN MESOPHILEN GESAMTKEIMZAHL NACH DIN EN ISO 4833-1:2003 UND GRAM-FÄRBUNG

#### 3.5.3.1 Geräte und Hilfsmittel

wie in 3.5.1.1

- entfettete Objektträger, Glas
- sterile Einmal-Impfösen, Kunststoff
- Färbewanne und Färbebrücke
- Pinzette
- Lichtmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv zur 1000-fachen Vergrößerung
- Immersionsöl
- Lösungen und Chemikalien für die GRAM-Färbung (ammoniakalische Kristallviolettlösung, Lugol'sche Lösung, Ethanol 96% und alkoholische Safraninlösung)

#### 3.5.3.2 Nährmedien

##### Gepuffertes Peptonwasser nach ISO 6579: Oxoid CM0509

- Pepton (10 g/L)
- NaCl (5 g/L)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_5 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (9 g/L)
- pH 7,0  $\pm$  0,2 bei 25°C

##### Plate-Count Agar (Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar): Art.-Nr.: X930.1;

##### Roth Germany

- Pepton aus Casein (5,0 g/L)
- Glucose (1,0 g/L)
- Hefeextrakt (2,5 g/L)
- Agar (15,0 g/L)
- pH 7,0  $\pm$  0,2

### **3.5.3.3 Herstellung des Plate-Count Agars**

23,5 g des Mediums wurden in 1 L RO-Wasser in einer Glasflasche suspendiert, fünf bis zehn Minuten unter ständigem Rühren gemischt und für ca. eine Minute aufgekocht. Das Medium sollte danach vollständig gelöst sein. Dann wurde es 15 Minuten lang im Autoklaven bei 121°C sterilisiert. Vor dem Gussverfahren wurde das Medium im Wasserbad bei 50°C temperiert.

### **3.5.3.4 Herstellung der Verdünnungslösung**

25,5 g/L des Mediums wurden in 1 L RO-Wasser suspendiert, je 9 mL in Glaseprouvetten überführt und im Autoklaven bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Die Verdünnungslösung wurde vor der Verwendung auf Raumtemperatur abgekühlt.

### **3.5.3.5 Probenvorbereitung und Beimpfung**

Das gefrorene Kolostrum wurde in einem Wasserbad bei 10°C (kaltes Leitungswasser) aufgetaut. Es ist wichtig, dass die Proben sofort nach dem Auftauen mikrobiologisch untersucht werden, da mehrmaliges Auftauen und Einfrieren die Mikroorganismen schädigt und sich somit die Ergebnisse der Untersuchungen nicht mehr gleichen. Vom aufgetauten Kolostrum wurde je 1 mL aseptisch entnommen und zu jeweils 9 mL der Verdünnungslösung pipettiert. Nach Schütteln mittels Vortex-Gerät wurden weitere Dezimalverdünnungen angelegt. Die Anzahl der Verdünnungsstufen richtet sich nach der zu erwartenden Keimzahl. Bei allen mikrobiologischen Bestimmungen wurden Doppelansätze durchgeführt. Mittels aseptischer Arbeitsweise wurde mit den Verdünnungsstufen das Medium nach dem Koch'schen Plattengussverfahren beimpft. Die Petrischalen wurden 72 h bei 30°C aerob bebrütet.

### 3.5.3.6 Auswertung

Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle sichtbaren koloniebildenden Einheiten auf den zur Berechnung heranzuziehenden Platten (zehn bis 300 kbE) ausgezählt und das gewogene arithmetische Mittel mittels folgender Gleichung errechnet:

$$\bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d$$

- $\bar{c}$  gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahl
- $\Sigma c$  Summe der Kolonien der Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- $n_1$  Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- $n_2$  Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe
- $d$  Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

### 3.5.3.7 GRAM-Färbung

Die GRAM-Färbung ist eine Methode zur mikroskopischen Grobbestimmung von Bakterien. Die Zellwand von gramnegativen Bakterien ist einschichtig, die von grampositiven Bakterien mehrschichtig aufgebaut. Dieser Unterschied lässt sich durch Färben mit einem Triphenylmethan-Farbstoff, Beizen mit Jod und anschließender Ethanolbehandlung mit Gegenfärbung deutlich machen. Bei grampositiven Bakterien wird der Farbstoff-Jod-Komplex festgehalten (blau-violette Färbung), bei gramnegativen Bakterien erfolgt dagegen eine Auswaschung dieses Farbstoffs mit Ethanol. Die nunmehr farblosen Zellen werden durch eine Gegenfärbung (Kontrastrfärbung) mit Safraninlösung hellrot eingefärbt. Von jeder PCA-Platte wurden drei Einzelkolonien ausgesucht und hitzefixierte Ausstriche der Bakterien auf Objektträgern hergestellt. Die GRAM-Färbung wurde mit Kristallviolett-Safranin nach HUCKER durchgeführt (ELLNER, 2002).

### 3.5.4 NACHWEIS VON ESCHERICHIA COLI MIT CHROMOCULT COLIFORMEN AGAR

#### 3.5.4.1 Geräte und Hilfsmittel

wie in 3.5.1.1

#### 3.5.4.2 Nährmedien

Gepuffertes Peptonwasser nach ISO 6579: Oxoid CM0509

wie in 3.5.3.2

ChromoCult® Coliformen Agar ES: Merck 1008500500

- Pepton (5,0 g/L)
- KCl (7,5 g/L)
- 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (10,0 g/L)
- Gallensalze (1,15 g/L)
- Propionat (0,5 g/L)
- Agar-Agar (10,0 g/L)
- 6-Chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid (0,15 g/L)
- Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (0,1 g/L)
- 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronsäure (0,1 g/L)
- pH 7,0 ± 0,2 bei 25°C

#### 3.5.4.3 Herstellung des ChromoCult® Coliformen Agars

34,5 g des Mediums wurden in 1 L RO-Wasser im siedenden Wasserbad oder im strömenden Dampf unter regelmäßigem Umschwenken solange gekocht, bis der Nährboden vollständig gelöst war. Das Nährmedium wurde anschließend bei 50°C im Wasserbad temperiert und in sterile Petrischalen gegossen.

#### **3.5.4.4 Herstellung der Verdünnungslösung**

wie in 3.5.3.4

#### **3.5.4.5 Probenvorbereitung und Beimpfung**

wie in 3.5.3.5

Mittels aseptischer Arbeitsweise wurde mit den Verdünnungsstufen das Medium nach dem Oberflächenausstrichverfahren beimpft. Die Petrischalen wurden 24 h bei 37°C aerob bebrütet.

#### **3.5.4.6 Auswertung**

Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle dunkelblau-violetten koloniebildenden Einheiten auf den zur Berechnung heranzuziehenden Platten (zehn bis 300 kbE) ausgezählt und nach 3.5.3.6 berechnet.

### ***3.5.5 NACHWEIS VON LISTERIA SSP. NACH DIN EN ISO 11290-2: 2005 UND IDENTIFIZIERUNG MITTELS API® LISTERIA TESTSYSTEM***

#### **3.5.5.1 Geräte und Hilfsmittel**

wie in 3.5.1.1

### 3.5.5.2 Nährmedien und Chemikalien

#### Gepuffertes Peptonwasser nach ISO 6579: Oxoid CM0509

wie in 3.5.3.2

#### Brilliance™ Listeria Agar Base (früher: Oxoid Chromogenic Listeria Agar (OCLA)): Oxoid CM1080

- Pepton (18,5 g/L)
- Hefeextrakt (4,0 g/L)
- NaCl (9,5 g/L)
- Natriumpyruvat (2,0 g/L)
- Lithiumchlorid (15,0 g/L)
- Maltose (4,0 g/L)
- X-Glucosid Chromogenic Mix (0,2 g/L)
- Agar (14,0 g/L)
- pH 7,0 ± 0,2 bei 25°C

#### Brilliance™ Listeria Selective Supplement: Oxoid SR0227

- Nalidixinsäure (26,0 mg/L)
- Polymyxin B (10,0 mg/L)
- Ceftazidim (6,0 mg/L)
- Amphotericin (10,0 mg/L)

#### Brilliance™ Listeria Differential Supplement: Oxoid SR0228

- Lecithinlösung (40,0 mL/L)

#### Trypton-Soja-Hefe-Extrakt Agar (TSYEA): Merck 1004540500

- Enzymatisch verdautes Casein (17,0 g/L)
- Enzymatisch verdautes Sojamehl (3,0 g/L)
- NaCl (5,0 g/L)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,5 g/L)
- D-Glucose (2,5 g/L)
- Hefeextrakt (6 g/L)

- Agar (13,0 g/L)
- pH 7,3 ± 0,2 bei 25°C
  
- Wasserstoffperoxid-Lösung (3%)
- API® Listeria Testsystem zur biochemischen Bestimmung aller Listerien-Spezies, bioMérieux SA, REF 10 300

### **3.5.5.3 Herstellung des Brilliance™ Listeria Agars**

33,6 g des Mediums wurden in 480 mL RO-Wasser suspendiert und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nach Temperieren des Mediums auf 50°C wurde ein Fläschchen Brilliance™ Listeria Selective Supplement sowie ein Fläschchen Brilliance™ Listeria Differential Supplement zugegeben. Nach gutem Mischen wurden sterile Petrischalen gegossen.

### **3.5.5.4 Herstellung des TSYEA**

24,5 g des Mediums wurden in 500 mL RO-Wasser aufgelöst und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Nach Temperieren des Mediums auf 50°C wurden sterile Petrischalen gegossen.

### **3.5.5.5 Herstellung der Verdünnungslösung**

wie in 3.5.3.4

### **3.5.5.6 Probenvorbereitung und Beimpfung**

wie in 3.5.3.5

Vom aufgetauten Kolostrum wurden je 25 g aseptisch entnommen und zur Wiederbelebung der Listerien in einem sterilen Homogenisationsbeutel mit je 225 g gepuffertem Peptonwasser versetzt und eine Stunde bei 20°C inkubiert. Mittels aseptischer Arbeitsweise wurde mit den Verdünnungsstufen das Medium nach dem Oberflächenausstrichverfahren beimpft. Die Petrischalen wurden 48 h bei 37°C aerob bebrütet.

### **3.5.5.7 Auswertung und Bestätigung**

Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle blaugrünen Kolonien, mit und ohne Hof, auf den zur Berechnung heranzuziehenden Platten (zehn bis 300 kbE) ausgezählt und nach 3.5.3.6 berechnet. Von jeder Platte wurden fünf verdächtige Kolonien ausgewählt und für die Bestätigungstests (Beimpfen von TSYEA und Bebrüten bei 37°C, Katalasereaktion, API<sup>®</sup> *Listeria* Testsystem) herangezogen.

### **3.5.5.8 Beimpfen des TSYEA**

Die ausgewählten Kolonien wurden auf der Oberfläche des Mediums so ausgestrichen, dass sich gut voneinander getrennte Kolonien entwickeln konnten. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C für 24 Stunden. Die folgenden Untersuchungen wurden mit von dem TSYEA entnommenen Reinkulturen durchgeführt.

### **3.5.5.9 Katalase-Reaktion**

Eine mit einer sterilen Impföse vom TSYEA entnommene Reinkultur wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung suspendiert. Die sofortige Bildung von Gasblasen zeigte eine positive Reaktion an.

### 3.5.5.10 API® *Listeria*

Gemäß Anleitung des API® *Listeria* Testsystems der Firma bioMérieux SA wurden die Reinkulturen identifiziert. API® *Listeria* ist ein standardisiertes Testsystem zur Identifizierung von *Listeria* ssp. anhand miniaturisierter biochemischer Reaktionen und einer Datenbasis. Ein Test besteht aus einem Streifen mit zehn Mikroröhrchen, die dehydrierte Substrate zum Nachweis von Enzymaktivität oder Kohlenhydratfermentation enthalten. Die Stoffwechselprodukte, die während der Inkubation entstehen, bewirken Farbumschläge, entweder direkt oder nach Zugabe von Reagenzien. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgt anhand der Ablesetabelle, die Identifizierung mit der Profilliste der Arbeitsanleitung oder einer Identifizierungssoftware.

Eine vom TSYEA entnommene Reinkultur wurde in 2 mL API® Suspension Medium suspendiert. Diese Keimsuspension sollte dem Trübungsstandard McFarland 1 entsprechen und wurde sofort in die Mikroröhrchen des Teststreifens pipettiert. Danach wurde der Streifen in eine mit ca. 3 mL RO-Wasser gefüllte Inkubationswanne gelegt, diese abgedeckt und unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden zwei Tropfen des ZYM B-Reagens dem [DIM] - Mikroröhrchen zugegeben und innerhalb von drei Minuten alle Farbreaktionen abgelesen. Anhand des dabei entstehenden numerischen Profils konnte dann die Identifizierung der Listerien erfolgen.

Tabelle 18. Ablesetabelle für das API® *Listeria* Testsystem (BIOMÉRIEUX, 2010)

			Ergebnisse	
Tests	aktive Bestandteile	Reaktionen	negativ	positiv
DIM	Enzymsubstrat	Differenzierung <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	hellorange beige-rosa grau-beige	orange
ESC	Esculin Eisencitrat	Hydrolyse	hellgelb	schwarz
αMAN	4-Nitrophenyl-αD-mannopyranosid	α-Mannosidase	farblos	gelb
DARL	D-Arabit	Säurebildung	rot / rot orange	gelb / gelb orange
XYL	D-Xylose	Säurebildung		
RHA	L-Rhamnose	Säurebildung		
MDG	Methyl-αD-glucopyranosid	Säurebildung		
RIB	D-Ribose	Säurebildung		
G1P	Glucose-1-Phosphat	Säurebildung		
TAG	D-Tagatose	Säurebildung		

Dem Hersteller nach können mit dem API® *Listeria* Testsystem *Listeria ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. grayi* identifiziert werden.

### 3.5.6 NACHWEIS VON *BACILLUS SSP.* MIT *HiCROME™ BACILLUS AGAR*

#### 3.5.6.1 Geräte und Hilfsmittel

wie in 3.5.1.1

#### 3.5.6.2 Nährmedien

Gepuffertes Peptonwasser nach ISO 6579: Oxoid CM0509

wie in 3.5.3.2

HiCrome™ Bacillus Agar: Fluka 92325

- Pepton aus tierischem Gewebe (10,0 g/L)
- Fleischextrakt (1,0 g/L)
- D-Mannitol (10,0 g/L)
- NaCl (10,0 g/L)
- Chromogene Mischung (3,2 g/L)
- Phenolrot (0,025 g/L)
- Agar (15,0 g/L)
- pH 7,1 ± 0,2 bei 25°C

#### 3.5.6.3 Herstellung des *HiCrome™ Bacillus Agars*

49,2 g des Mediums wurden in 1 L RO-Wasser suspendiert und unter regelmäßigem Umschwenken solange gekocht, bis der Nährboden vollständig gelöst war. Das Nährmedium wurde anschließend bei 50°C im Wasserbad temperiert und in sterile Petrischalen gegossen.

#### 3.5.6.4 Herstellung der Verdünnungslösung

wie in 3.5.3.4

### **3.5.6.5 Probenvorbereitung und Beimpfung**

wie in 3.5.3.5

Mittels aseptischer Arbeitsweise wurde mit den Verdünnungsstufen das Medium nach dem Oberflächenausstrichverfahren beimpft. Die Petrischalen wurden 48 h bei 30°C aerob bebrütet.

### **3.5.6.6 Auswertung**

Nach Ende der Bebrütungszeit wurden alle grünen koloniebildenden Einheiten auf den zur Berechnung heranzuziehenden Platten (zehn bis 300 kbE) ausgezählt und nach 3.5.3.6 berechnet.

### **3.5.7 IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MITTELS ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)**

Der Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA) ist eine Methode zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch Markierung eines der beiden Reaktionspartner mit einem Enzym und der enzymatischen Umsetzung des später zugesetzten Substrates sichtbar gemacht. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im Nanogramm-Bereich. Bei dem in diesem Fall angewendeten ELISA handelt es sich um eine „Double-Sandwich-Technik“.

#### **3.5.7.1 Geräte und Material**

- Bovine IgG ELISA Quantitation Set, Cat. No. E10-118, Bethyl Laboratories Inc., USA, Nachweisbereich: 7,8 – 500 ng/mL

**Tabelle 19. Bestandteile des Bovine IgG ELISA Quantitation Sets (BETHYL, 2009)**

Coating Buffer	SIGMA C3041-50CAP 0,05 M Carbonat-Bicarbonat, pH 9,6 Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Waschlösung Blockierungslösung Verdünnungslösung	SIGMA T9039-10PAK 0,05 M Tris Buffer Saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 8,0; 0,05% Tween 20 Sigma Aldrich Co., USA
Stopplösung	0,2 M Schwefelsäure (verdünnen einer 2 M Schwefelsäure-Maßlösung, A2845, AppliChem GmbH, Deutschland)
Coating Antikörper	Sheep anti-bovine IgG-affinity purified antibody (1 mg/mL); Cat. No. A10-118A
HRP (Horse Radish Peroxidase)- Detektions-Antikörper	Sheep anti-bovine IgG-HRP Konjugat (1 mg/mL); Cat.No. A10-118P
Enzym-Substrat	TMB One Component HRP Microwell Substrate; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin in schwach saurem Puffer; Cat. Nr. E102
Bovine Reference Serum (Standardlösung)	Bovine Reference Serum, 24 mg/mL; Cat. No. RS10-103

- Photometer: Tecan Magellan, Artikelnr.: I217618; Tecan Group Ltd., Schweiz
- Plattenwaschautomat: Tecan-Columbus Washer, Artikelnr.: I209004; Tecan Group Ltd., Schweiz
- Mikrotiterplatten: 96 Well ELISA Microplatte transparent, Polystyrol, Microlon 600, High Binding, F-Boden, Art. Nr.: 655061, Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
- Zu den Mikrotiterplatten passende Deckel, einer davon mit Aluminiumfolie beschichtet (für die Dunkelreaktion)
- Mehrkanalpipette: 8-Kanal-Pipette, 30-300 µL, 146908005; eppendorf Research, Eppendorf AG, Deutschland

- Einkanalpipetten: 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL; eppendorf Research, Eppendorf AG, Deutschland
- Pipettenspitzen: 10 µL, 200 µL, 1000 µL; epTIPS Standard, Eppendorf AG, Deutschland
- Mikrolitergefäße: 1,5 mL, 2 mL; Eppendorf Safe-Lock Gefäße; Eppendorf AG, Deutschland
- Röhrchen: 15 mL,; Polypropylen, konischer Boden, mit Schraubverschluss, Art.-Nr.: 188271; Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
- Pipettier-Reservoirs für Mehrkanalpipetten: Polystyrol, 50 mL, mit gewölbtem Boden
- 

### **3.5.7.2 Durchführung**

#### Probenaufbereitung

Die tiefgefrorenen Proben wurden in kaltem Wasser (10°C) aufgetaut und sofort weiterverarbeitet. Nach Herstellung aller benötigten Reagenzien, wurde die Probe mit Verdünnungslösung verdünnt, damit ihr IgG-Gehalt im Nachweisbereich (7,8 – 500 ng/mL) lag.

#### Durchführung ELISA

- Alle Standards, Proben und Blindwerte wurden doppelt aufgetragen (Doppelbestimmung).
- Jedes Well der Mikrotiterplatte wurde mit 100 µL Coating Antikörper (1 µL Coating Antikörper mit Coating Buffer auf 100 µL verdünnt) befüllt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubiert.
- Dann wurde die Platte fünf Mal mit Waschlösung im Plattenwaschautomaten gewaschen.
- Danach wurde jedes Well der Mikrotiterplatte mit 200 µl Blockierungslösung befüllt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.
- Dann wurde wieder fünf Mal gewaschen.

- Jedes Well der Mikrotiterplatte wurde mit 100  $\mu$ L Standardverdünnungen (7,8 bis 500 ng/mL) und den Probenverdünnungen (1:50 000, 1:200 000 und 1:400 000) befüllt.
- Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- Danach wurde fünf Mal gewaschen.
- In jedes Well wurden 100  $\mu$ L HRP-Detektions-Antikörper zugegeben.
- Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- Danach wurde fünf Mal gewaschen.
- Dann wurden 100  $\mu$ L TMB-Substrat-Lösung zugegeben.
- Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Aluminium-beschichteten Deckel abgedeckt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratreaktion ergab danach eine blaue Färbung.
- Zum Schluss wurden 100  $\mu$ L Stopplösung zugegeben. Die Färbung änderte sich von blau zu gelb.

### **3.5.7.3 Auswertung ELISA**

- Sofort nach Zugabe der Stopplösung wurde die Extinktion bei 450 nm Wellenlänge im Photometer gemessen.
- Mithilfe der Softwareprogramme Magellan und Excel wurde eine Kalibrationskurve erstellt. Bei dieser wurde die Standardkonzentration in ng/mL logarithmisch auf die Abszissenachse und die Standardextinktion linear auf die Ordinatenachse aufgetragen. Anhand dieser Kalibrationskurve erfolgte schließlich die Ermittlung der jeweiligen IgG-Konzentrationen über die jeweiligen Extinktionswerte. Zur automatischen Datenreduktion wurde eine 4-parameter curve fit-Methode verwendet.

## **3.6 DAS HACCP-KONZEPT**

Bei der Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln müssen alle Einflüsse, die die Gesundheit der Konsumenten negativ beeinflussen könnten, vorbeugend ausgeschaltet werden. Endproduktkontrollen sind zwangsläufig nur

Stichproben und reichen nicht aus, um die Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten. HACCP ist ein präventives Konzept, um die Lebensmittelsicherheit zu garantieren. Dabei werden spezifische Gefahren, die zu einer Gesundheitsbeeinträchtigung der Konsumenten führen könnten, frühzeitig erkannt und ausgeschaltet. Dazu gehören biologische/mikrobiologische, chemische und physikalische Gefahren.

**Tabelle 20. Beispiele für mögliche Gefahren in der Lebensmittelindustrie**

<b>biologische/ mikrobiologische Gefahren</b>	<b>chemische Gefahren</b>	<b>physikalische Gefahren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schädlinge, Ungeziefer, Nagetiere, Vögel und deren Ausscheidungen</li> <li>• pathogene Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Viren)</li> <li>• Toxine (z.B. Mycotoxine)</li> </ul>	<p>Rückstände und Kontaminanten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pestizide, Herbizide, Fungizide, Düngemittel, (Tier-) Arzneimittel</li> <li>• prozessbedingte Schadstoffe (z.B. Nitrosamine)</li> <li>• Schwermetalle, Rußpartikel</li> <li>• Schmierstoffe, Reinigungs- und Desinfektionsmittel</li> </ul>	<p>Fremdkörper:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glassplitter, Kunststoff, Steine, Haare, Metallteile</li> <li>• Farben, Lacke, Anstriche</li> <li>• Staub, Papier, Schmutz, Holz</li> </ul>

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde ausschließlich auf die mikrobiologischen Gefahren während der Herstellung von Kolostrumprodukten eingegangen.

Während des Herstellungsprozesses wird jedes Produkt auf mögliche Gefahren hin untersucht und Maßnahmen zu deren Verminderung oder Eliminierung festgelegt. Das HACCP-Konzept baut auf der Einhaltung der GMP-Normen auf. Die vom Codex Alimentarius vorgeschlagene Vorgangsweise zur Einführung eines HACCP-Konzeptes beruht auf fünf vorbereitenden Schritten sowie aus den eigentlichen sieben HACCP-Grundsätzen (REICHE und MAYER, 2007).

### 3.6.1 DIE FÜNF VORBEREITENDEN SCHRITTE

#### 1. Bildung eines HACCP-Teams

Das Team sollte aus allen relevanten Bereichen des Lebensmittelunternehmens zusammengestellt werden, die mit dem Produkt zu tun haben, wobei auch externe Personen dazugehören können.

#### 2. Beschreibung des Produktes

Das Produkt soll vollständig, einschließlich relevanter Sicherheitsinformationen wie Bezeichnung, Produkteigenschaften, Art des Konsums, beschrieben werden.

#### 3. Feststellung des Verwendungszweckes

Der Verwendungszweck des Produktes für den Verbraucher und für die Zielgruppen soll ermittelt werden. Der Verwendungszweck ist ein wichtiger Punkt für die Risikoabschätzung, da ein Lebensmittel für den Normalverbraucher als sicher, für empfindliche Personen (YOPI: Young, Old, Pregnant, Immuno-compromised; Säuglinge/Kleinkinder, ältere Menschen, Schwangere, immungeschwächte Personen) allerdings als unsicher eingestuft werden muss.

#### 4. Flussdiagramm des Herstellungsprozesses erstellen

Alle Schritte des Prozesses müssen aufgenommen werden und schematisch dargestellt werden. Damit können auch die Schwachstellen eines Prozesses dargestellt werden.

#### 5. Überprüfung des Herstellungsprozesses vor Ort

Hierbei müssen Abweichungen korrigiert und Veränderungen in das Flussdiagramm aufgenommen werden.

Die eigentlichen HACCP-Prinzipien werden nach diesen vorbereitenden Arbeiten angewendet.

### 3.6.2 DIE SIEBEN HACCP-GRUNDSÄTZE

#### HACCP-Grundsatz 1

Identifizierung und Bewertung von Gefahren, die ein mögliches Gesundheitsrisiko darstellen.

#### HACCP-Grundsatz 2

Identifizierung der CCPs, der kritischen Lenkungspunkte, d.h. von Prozessen oder Arbeitsschritten, mit denen eine mögliche Gefahr vermindert oder ausgeschaltet werden kann. Ein CCP ist ein Prozess- oder Arbeitsschritt, der für die Beherrschung einer möglichen Gefahr eine entscheidende Rolle spielt.

#### HACCP-Grundsatz 3

Festlegung von Bedingungen (Grenzwerten), deren Einhaltung sicherstellt, dass jeder CCP unter Kontrolle ist.

#### HACCP-Grundsatz 4

Einrichtung eines Überwachungssystems (Monitoring), mit dem die Einhaltung aller vorgegebenen Bedingungen überprüft wird.

#### HACCP-Grundsatz 5

Festlegung von Korrekturmaßnahmen, die ergriffen werden müssen, sobald durch das Monitoring eine Abweichung von den festgelegten Bedingungen angezeigt wird.

#### HACCP-Grundsatz 6

Festlegung von Verfahren zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des HACCP-Konzeptes (Verifizierung).

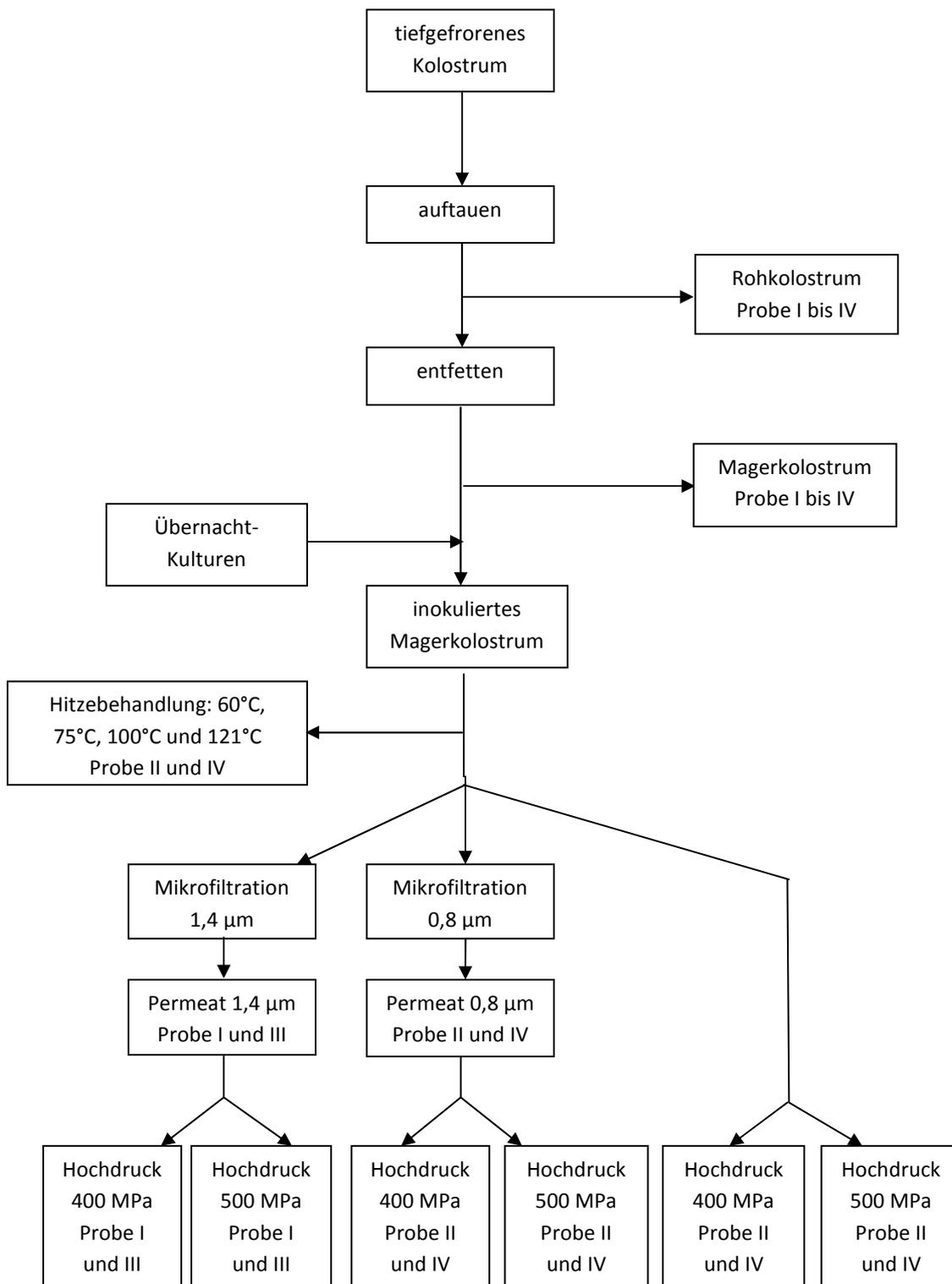
#### HACCP-Grundsatz 7

Einrichtung einer Dokumentation, die alle Berichte zu diesen Grundsätzen und ihrer Anwendung erfasst.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ANALYSE DES KEIMSPEKTRUMS

Insgesamt wurden 36 Kolostrumproben mikrobiologisch untersucht und darin die mesophile Gesamtkeimzahl mit anschließender GRAM-Färbung, die *Listeria* ssp. – Keimzahl mit anschließender Bestätigung und Identifizierung, die *E. coli* - Keimzahl und die *Bacillus* ssp. – Keimzahl bestimmt. Es wurden vier Rohkolostrumproben (I, II, III und IV) entfettet. Das dabei entstandene Magerkolostrum wurde ebenfalls mit I, II, III und IV nummeriert. Sowohl von allen Rohkolostrum- als auch allen Magerkolostrumproben wurde das gesamte Keimspektrum untersucht. Den Magerkolostrumproben wurden dann Übernachtkulturen von *E.coli*, *Listeria innocua* und *Bacillus subtilis* zugegeben und zwar dem Magerkolostrum I und II jeweils 25 mL jeder Übernachtkultur und dem Magerkolostrum III und IV jeweils 250 mL jeder Übernachtkultur. Mit diesen inokulierten Magerkolostrumproben wurde dann, wie in Abbildung 3 dargestellt, verfahren:



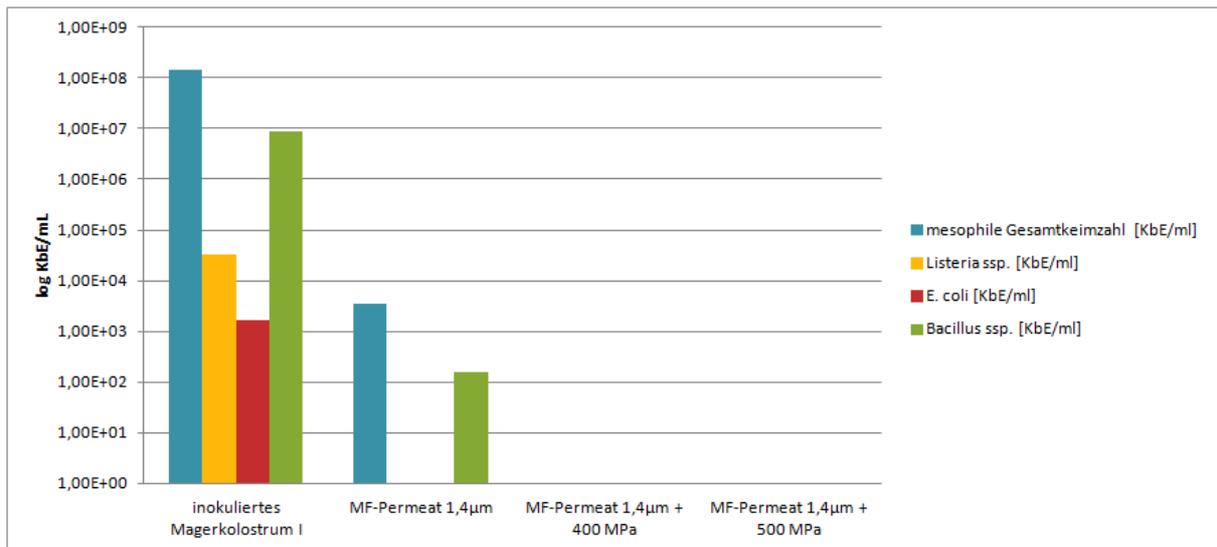
**Abbildung 3. Probenschema unbehandeltes und behandeltes Kolostrum**

Alle *Listeria*-Kolonien, die für die Bestätigungs- und Identifizierungstests herangezogen wurden, waren Katalase-positiv und konnten als *Listeria innocua* und *L. grayi* identifiziert werden. Der hochpathogene *L. monocytogenes* konnte nicht nachgewiesen werden.

Die GRAM-Färbungen von Isolaten der mesophilen Gesamtkeimzahlbestimmungen ergaben ausschließlich grampositive Stäbchen und Kokken.

#### 4.1.1 ANALYSE DES KEIMSPEKTRUMS DER KOLOSTRUMPROBE I

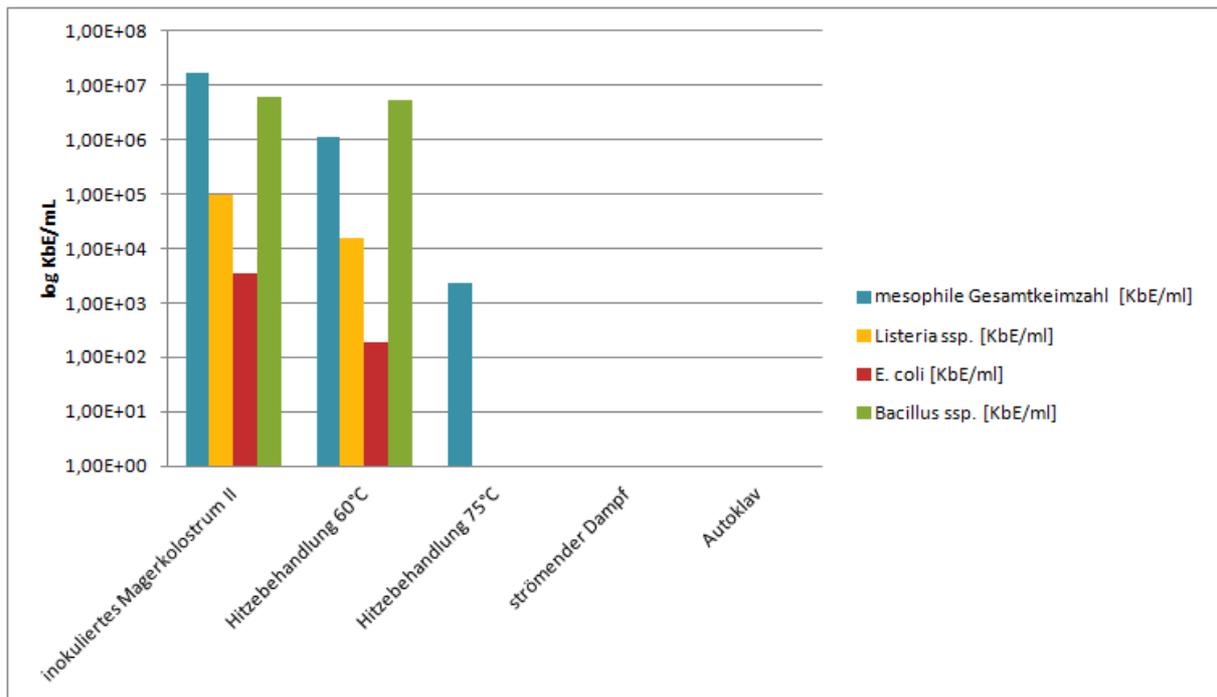
Die Abbildung 4 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen von Mikrofiltration und Kombinationen daraus mit Hochdruckbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe I. Vor den Behandlungen lag die mesophile Gesamtkeimzahl bei  $14,5 \cdot 10^9$  KbE/mL, die *Listeria*-Keimzahl bei  $3,2 \cdot 10^4$  KbE/mL, die *Bacillus*-Keimzahl bei  $8,6 \cdot 10^6$  KbE/mL und die *E. coli* Keimzahl bei  $1,65 \cdot 10^3$  KbE/mL. Nach Mikrofiltration durch eine Membran mit  $1,4 \mu\text{m}$  Porendurchmesser konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $3,5 \cdot 10^3$  KbE/mL reduziert werden und die *Bacillus*-Keimzahl auf  $1,6 \cdot 10^2$  KbE/mL. *Listeria* und *E.coli* waren nicht mehr nachweisbar. Nach den Kombinationsbehandlungen aus Mikrofiltration bei  $1,4 \mu\text{m}$  Porendurchmesser und Hochdruck, sowohl bei 400 MPa als auch bei 500 MPa, waren keine Bakterien mehr nachweisbar.



**Abbildung 4. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung von Mikrofiltration und Hochdruckbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe I**

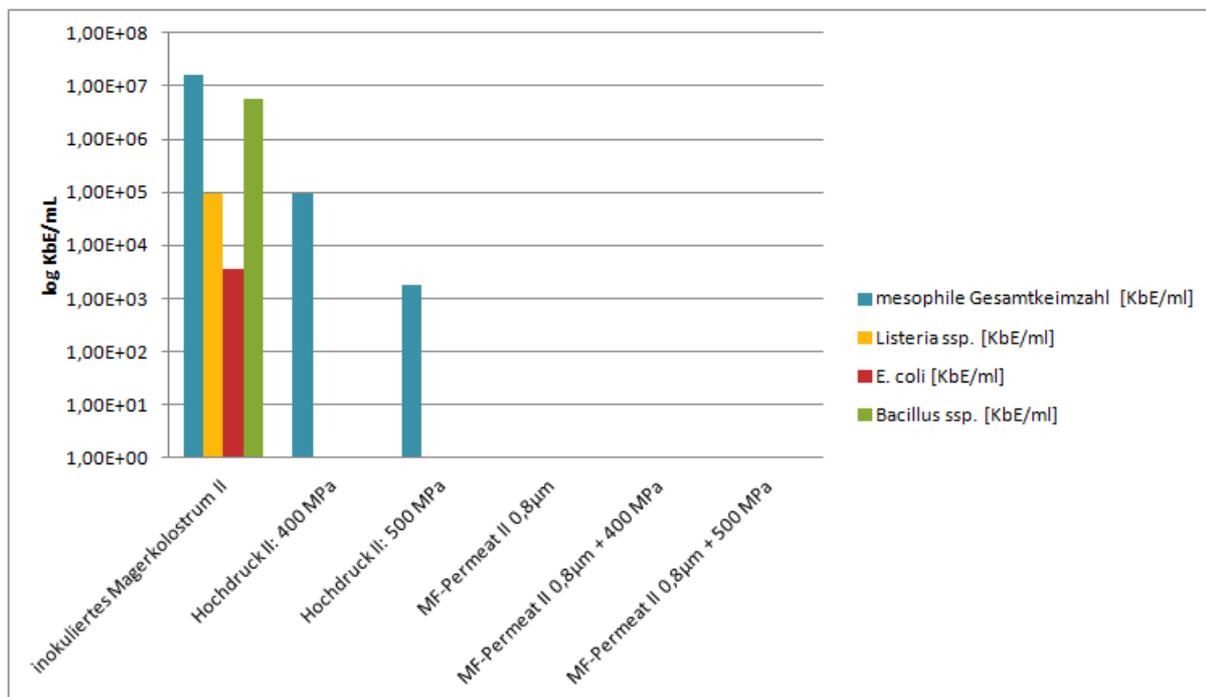
#### 4.1.2 ANALYSE DES KEIMSPEKTRUMS DER KOLOSTRUMPROBE II

Die Abbildung 5 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen der Hitzebehandlungen (60°C für zehn Minuten, 75°C für 20 Minuten, strömender Dampf (100°C) für 30 Minuten und Autoklavierung (121°C) für 15 Minuten) auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II. Vor den Hitzebehandlungen lag die mesophile Gesamtkeimzahl bei  $1,7 \cdot 10^7$  KbE/mL, die *Listeria*-Keimzahl bei  $9,7 \cdot 10^4$  KbE/mL, die *E.coli*-Keimzahl bei  $3,5 \cdot 10^3$  KbE/mL und die *Bacillus*-Keimzahl bei  $5,9 \cdot 10^6$  KbE/mL. Nach der Hitzebehandlung bei 60°C waren noch  $1,1 \cdot 10^6$  KbE/mL der mesophilen Gesamtkeimzahl nachweisbar,  $1,6 \cdot 10^4$  KbE/mL *Listeria*,  $1,9 \cdot 10^2$  KbE/mL *E.coli* und  $5,5 \cdot 10^6$  KbE/mL *Bacillus*. Nach der Hitzebehandlung bei 75°C waren nur noch  $2,3 \cdot 10^3$  KbE/mL der mesophilen Gesamtkeimzahl nachweisbar. Nach den Hitzebehandlungen mit strömendem Dampf und Autoklavierung konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.



**Abbildung 5. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hitzebehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II**

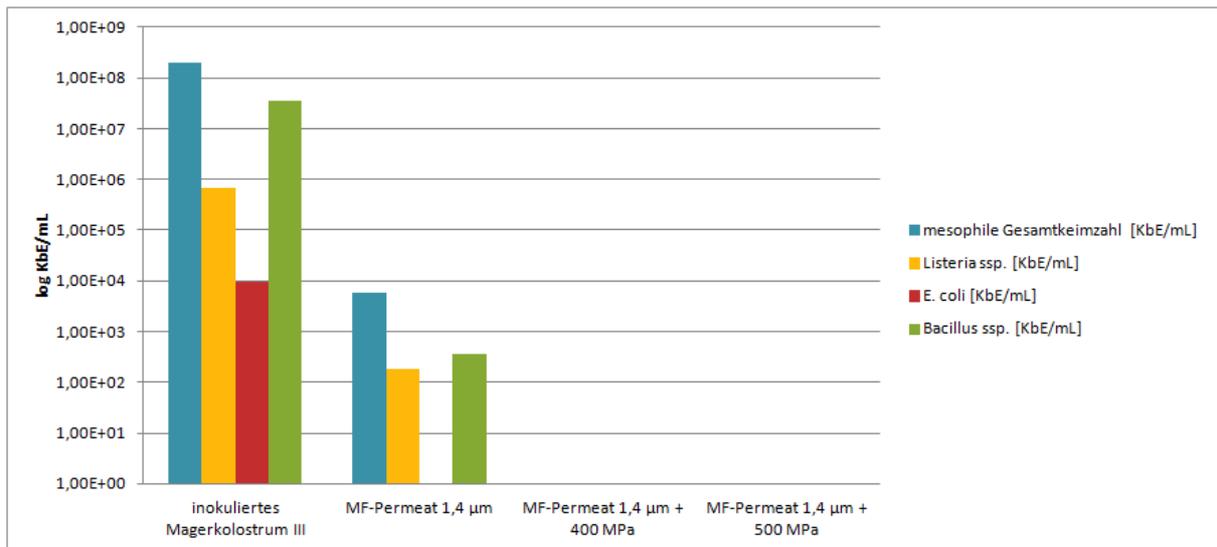
Die Abbildung 6 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen von Mikrofiltration und Hochdruckbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II. Mit der Hochdruckbehandlung bei 400 MPa konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $9,5 \cdot 10^4$  KbE/mL verringert werden. Alle anderen Bakterien waren nicht mehr nachweisbar. Mit der Hochdruckbehandlung bei 500 MPa konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $1,8 \cdot 10^3$  KbE/mL verringert werden. Alle anderen Bakterien waren ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Nach Mikrofiltration durch eine Membran mit 0,8  $\mu$ m Porendurchmesser konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Dasselbe gilt auch für die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung aus Mikrofiltration bei 0,8  $\mu$ m Porendurchmesser und Hochdruckbehandlung bei sowohl 400 MPa als auch 500 MPa.



**Abbildung 6. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hochdruck- und der Mikrofiltrationsbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe II**

#### 4.1.3 ANALYSE DES KEIMSPEKTRUMS DER KOLOSTRUMPROBE III

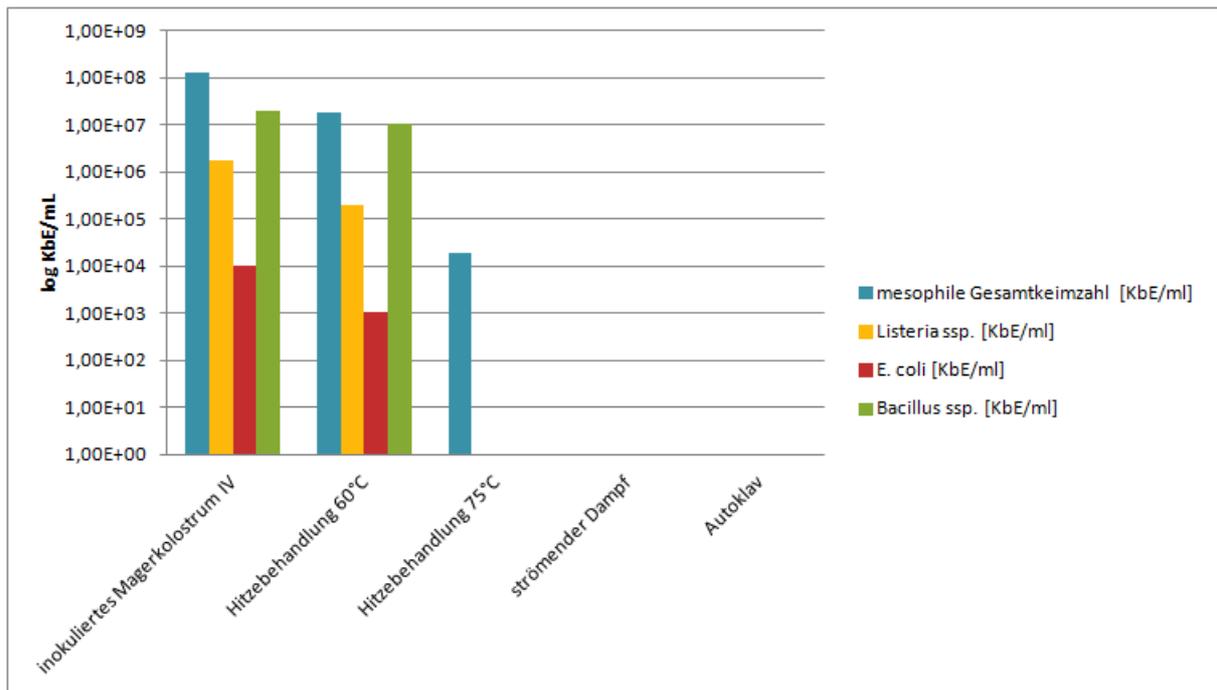
Die Abbildung 7 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen der verschiedenen Keimreduktionswirkungen von Mikrofiltration und Kombinationen daraus mit Hochdruckbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe III. Vor den Behandlungen lag die mesophile Gesamtkeimzahl bei  $19,5 \cdot 10^9$  KbE/mL, die *Listeria*-Keimzahl bei  $6,8 \cdot 10^5$  KbE/mL, die *Bacillus*-Keimzahl bei  $3,6 \cdot 10^7$  KbE/mL und die *E. coli* Keimzahl bei  $9,3 \cdot 10^3$  KbE/mL. Nach Mikrofiltration durch eine Membran mit 1,4 µm Porendurchmesser konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $5,7 \cdot 10^3$  KbE/mL reduziert werden, die *Bacillus*-Keimzahl auf  $3,5 \cdot 10^2$  KbE/mL und die *Listeria*-Keimzahl auf  $1,8 \cdot 10^2$  KbE/mL. *E.coli* waren nicht mehr nachweisbar. Nach den Kombinationsbehandlungen aus Mikrofiltration bei 1,4 µm Porendurchmesser und Hochdruck, sowohl bei 400 MPa als auch bei 500 MPa, waren keine Bakterien mehr nachweisbar.



**Abbildung 7. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Mikrofiltration und der Hochdruckbehandlung auf die inokulierte Magerkolostrumprobe III**

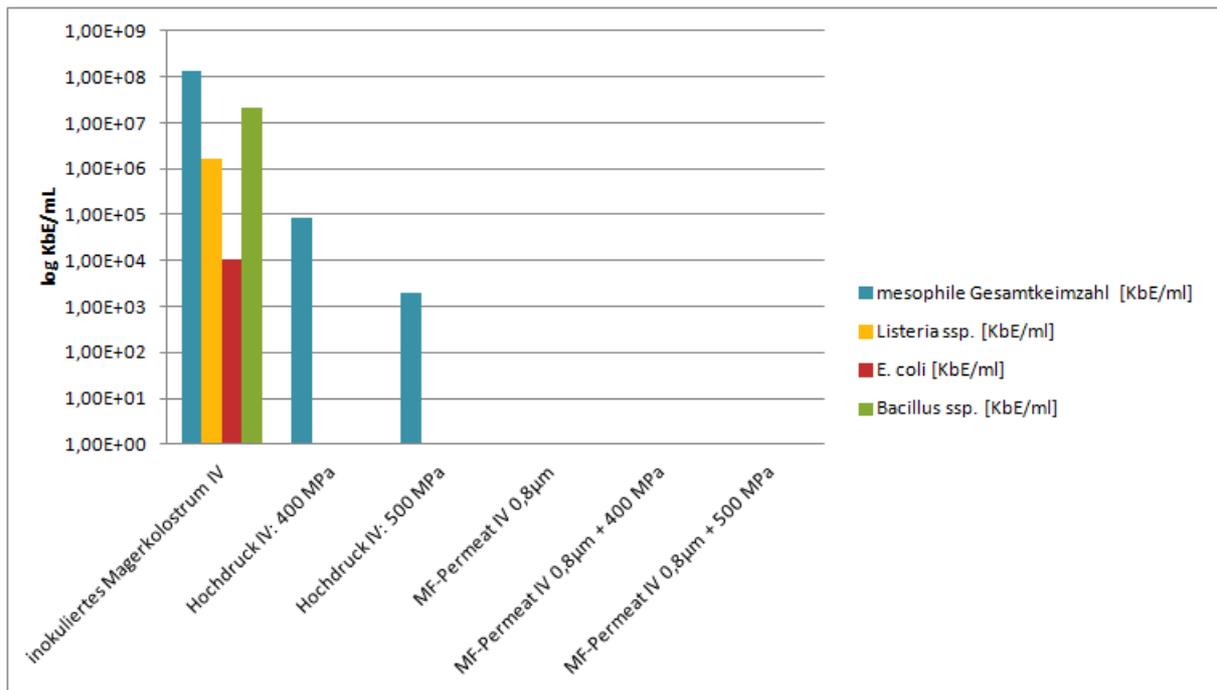
#### 4.1.4 ANALYSE DES KEIMSPEKTRUMS DER KOLOSTRUMPROBE IV

Die Abbildung 8 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen der Hitzebehandlungen (60°C für zehn Minuten, 75°C für 20 Minuten, strömender Dampf (100°C) für 30 Minuten und Autoklavierung (121°C) für 15 Minuten) auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV. Vor den Hitzebehandlungen lag die mesophile Gesamtkeimzahl bei  $1,3 \cdot 10^8$  KbE/mL, die *Listeria*-Keimzahl bei  $1,7 \cdot 10^6$  KbE/mL, die *E.coli*-Keimzahl bei  $1,1 \cdot 10^3$  KbE/mL und die *Bacillus*-Keimzahl bei  $1,1 \cdot 10^7$  KbE/mL. Nach der Hitzebehandlung bei 60°C waren noch  $1,9 \cdot 10^7$  KbE/mL der mesophilen Gesamtkeimzahl nachweisbar,  $2,1 \cdot 10^5$  KbE/mL *Listeria*,  $1,9 \cdot 10^2$  KbE/mL *E.coli* und  $5,5 \cdot 10^6$  KbE/mL *Bacillus*. Nach der Hitzebehandlung bei 75°C waren nur noch  $2,0 \cdot 10^4$  KbE/mL der mesophilen Gesamtkeimzahl nachweisbar. Nach den Hitzebehandlungen mit strömendem Dampf und Autoklavierung konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.



**Abbildung 8. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hitzebehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV**

Die Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der Keimreduktionswirkungen von Mikrofiltration und Hochdruckbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV. Mit der Hochdruckbehandlung bei 400 MPa konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $8,8 \cdot 10^4$  KbE/mL verringert werden. Alle anderen Bakterien waren nicht mehr nachweisbar. Mit der Hochdruckbehandlung bei 500 MPa konnte die mesophile Gesamtkeimzahl auf  $2,0 \cdot 10^3$  KbE/mL verringert werden. Alle anderen Bakterien waren ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Nach Mikrofiltration durch eine Membran mit  $0,8 \mu\text{m}$  Porendurchmesser konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Dasselbe gilt auch für die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung aus Mikrofiltration bei  $0,8 \mu\text{m}$  Porendurchmesser und Hochdruckbehandlung bei sowohl 400 MPa als auch 500 MPa.



**Abbildung 9. Graphische Darstellung der Keimreduktionswirkung der Hochdruck- und Mikrofiltrationsbehandlungen auf die inokulierte Magerkolostrumprobe IV**

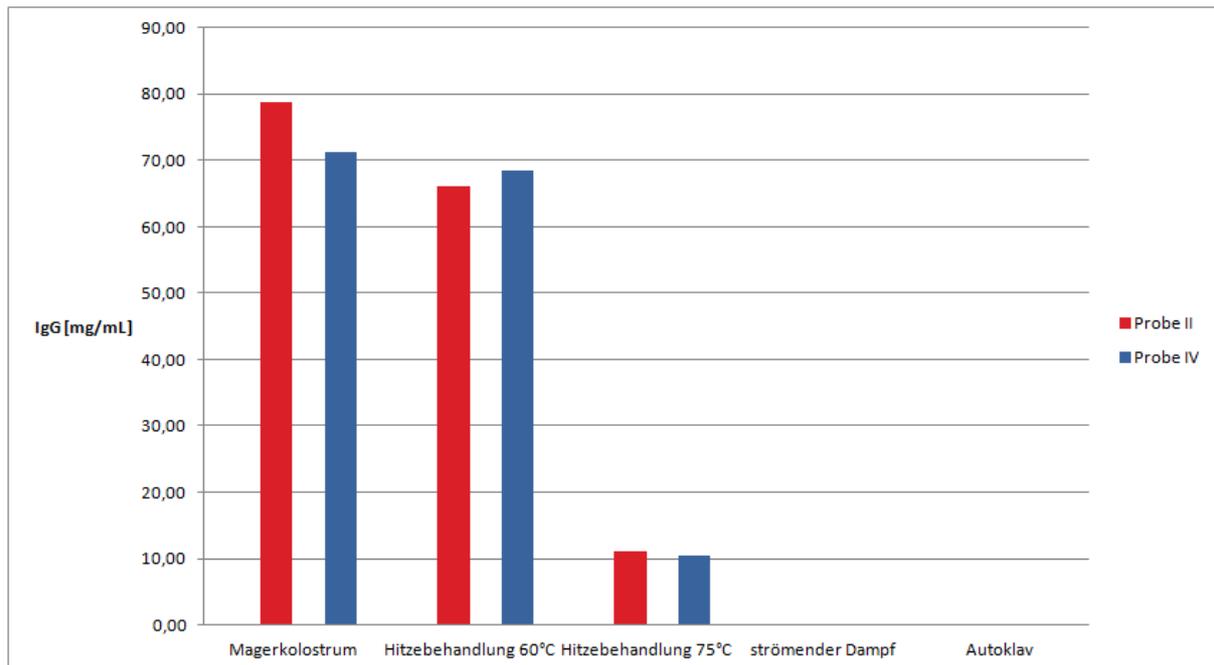
## 4.2 ANALYSE DES IGG-GEHALTES

Insgesamt wurden 32 Kolostrumproben immunologisch analysiert und der IgG-Gehalt mittels ELISA bestimmt.

Die Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung des IgG-Gehaltes der Magerkolostrumproben II und IV vor und nach Hitzebehandlungen bei 60°C für zehn Minuten, 75°C für 20 Minuten, strömendem Dampf (100°C) für 30 Minuten und Autoklavierbedingungen (121°C) für 15 Minuten. Die Kolostrumprobe II hatte einen nativen IgG-Gehalt von 78,85 mg/mL. Nach der Hitzebehandlung bei 60°C war dieser Gehalt auf 66,00 mg/mL gesunken und nach der Behandlung bei 75°C auf 11,19 mg/mL. Nach den Hitzebehandlungen mit strömendem Dampf und Autoklavierung war kein IgG mehr in der Kolostrumprobe II nachweisbar.

Die Kolostrumprobe IV zeigte ein sehr ähnliches Verhalten. Der IgG-Gehalt sank von 71,18 mg/mL im Magerkolostrum auf 68,46 mg/mL nach der Hitzebehandlung mit 60°C. Nach der Behandlung mit 75°C waren nur noch 10,36 mg IgG/mL nachweisbar

und nach strömendem Dampf und Autoklavierung war kein IgG mehr in der Kolostrumprobe IV nachweisbar.



**Abbildung 10. Graphische Darstellung des IgG-Gehaltes von Magerkolostrum vor und nach den Hitzebehandlungen**

Die Abbildung 11 zeigt die graphische Darstellung des IgG-Gehaltes der Magerkolostrumproben vor und nach den Behandlungen mit Hochdruck bei 400 MPa und 500 MPa, Mikrofiltrationen durch Membranen mit 0,8 µm und 1,4 µm Porendurchmesser und Kombinationen aus diesen Behandlungen. Die Kolostrumprobe I hatte einen nativen IgG-Gehalt von 68,53 mg/mL. Nach Mikrofiltration durch eine 1,4 µm-Membran waren 49,04 mg IgG/mL nachweisbar. Nachdem dieses Permeat einer Hochdruckbehandlung bei 400 MPa unterzogen worden war, konnten noch 33,25 mg IgG/mL nachgewiesen werden. Nach einer Hochdruckbehandlung des Permeates bei 500 MPa waren nur noch 13,98 mg IgG/mL nachweisbar.

Die Kolostrumprobe II hatte einen nativen IgG-Gehalt von 78,85 mg/mL. Nach Hochdruckbehandlungen bei 400 MPa und nach 500 MPa waren noch 43,40 mg IgG/mL bzw. 16,51 mg IgG/mL nachweisbar. Das Mikrofiltrationspermeat der Kolostrumprobe II durch eine Membran mit 0,8 µm Porendurchmesser hatte einen

IgG-Gehalt von 37,76 mg/mL. Hochdruckbehandlungen dieses Permeates mit 400 MPa bzw. 500 MPa ergab IgG-Werte von 18,20 mg/mL bzw. 9,95 mg/mL.

Der native IgG-Gehalt der Kolostrumprobe III betrug 61,39 mg/mL. Das Mikrofiltrationspermeat dieser Kolostrumprobe durch eine Membran mit 1,4 µm Porendurchmesser hatte einen IgG-Gehalt von 41,94 mg/mL. Nach Hochdruckbehandlung des Permeates mit 400 MPa bzw. 500 MPa konnten IgG-Gehalte von 33,00 mg/mL bzw. 14,76 mg/mL nachgewiesen werden.

Die Kolostrumprobe IV hatte einen nativen IgG-Gehalt von 71,18 mg/mL. Nach Hochdruckbehandlungen mit 400 MPa bzw. 500 MPa konnten noch 54,93 mg IgG/mL bzw. 18,53 mg/mL nachgewiesen werden. Das Mikrofiltrationspermeat der Kolostrumprobe IV durch eine Membran mit 0,8 µm Porendurchmesser hatte einen IgG-Gehalt von 46,49 mg/mL. Hochdruckbehandlungen dieses Permeates mit 400 MPa bzw. 500 MPa ergab IgG-Werte von 39,15 mg/mL bzw. 13,51 mg/mL.

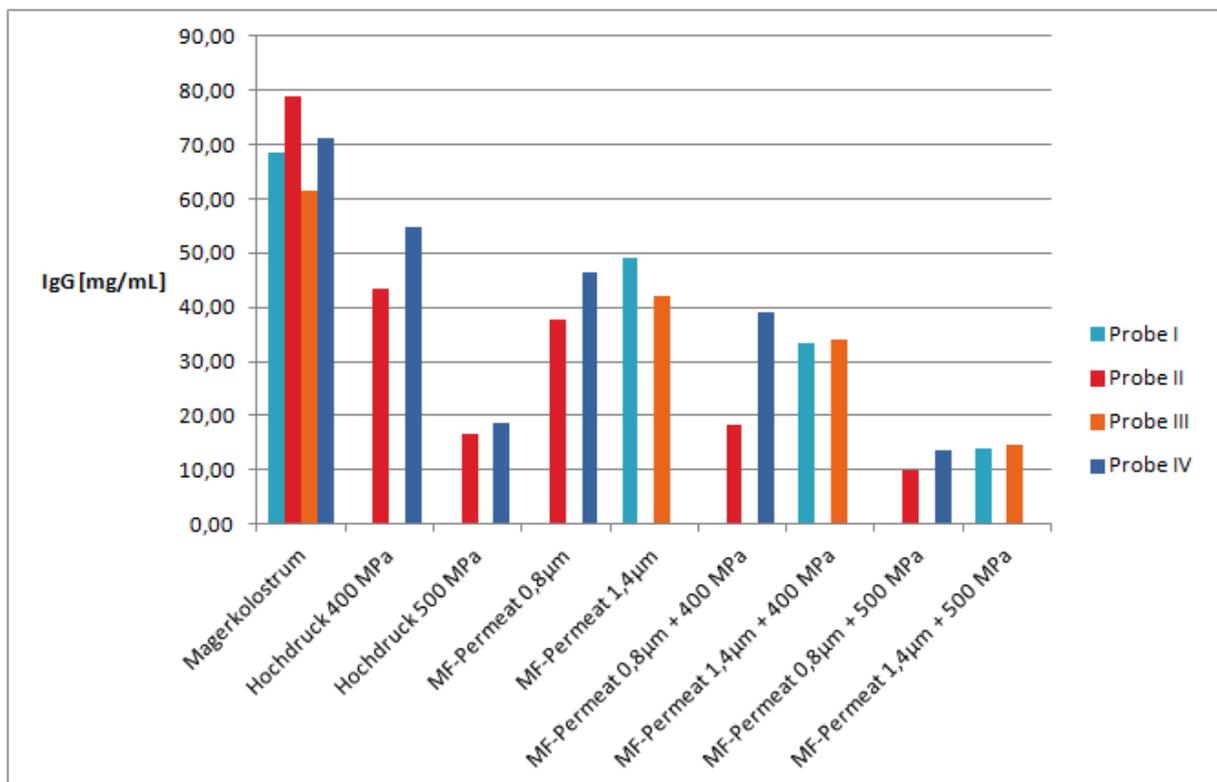
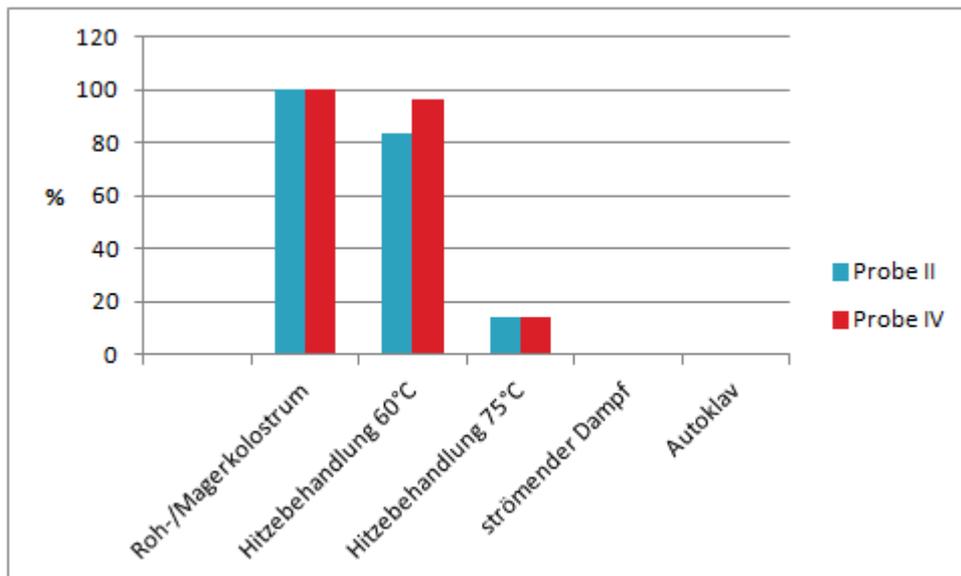


Abbildung 11. Graphische Darstellung des IgG-Gehaltes von Magerkolostrum vor und nach den Behandlungen mit Hochdruck, Mikrofiltration und Kombinationen daraus

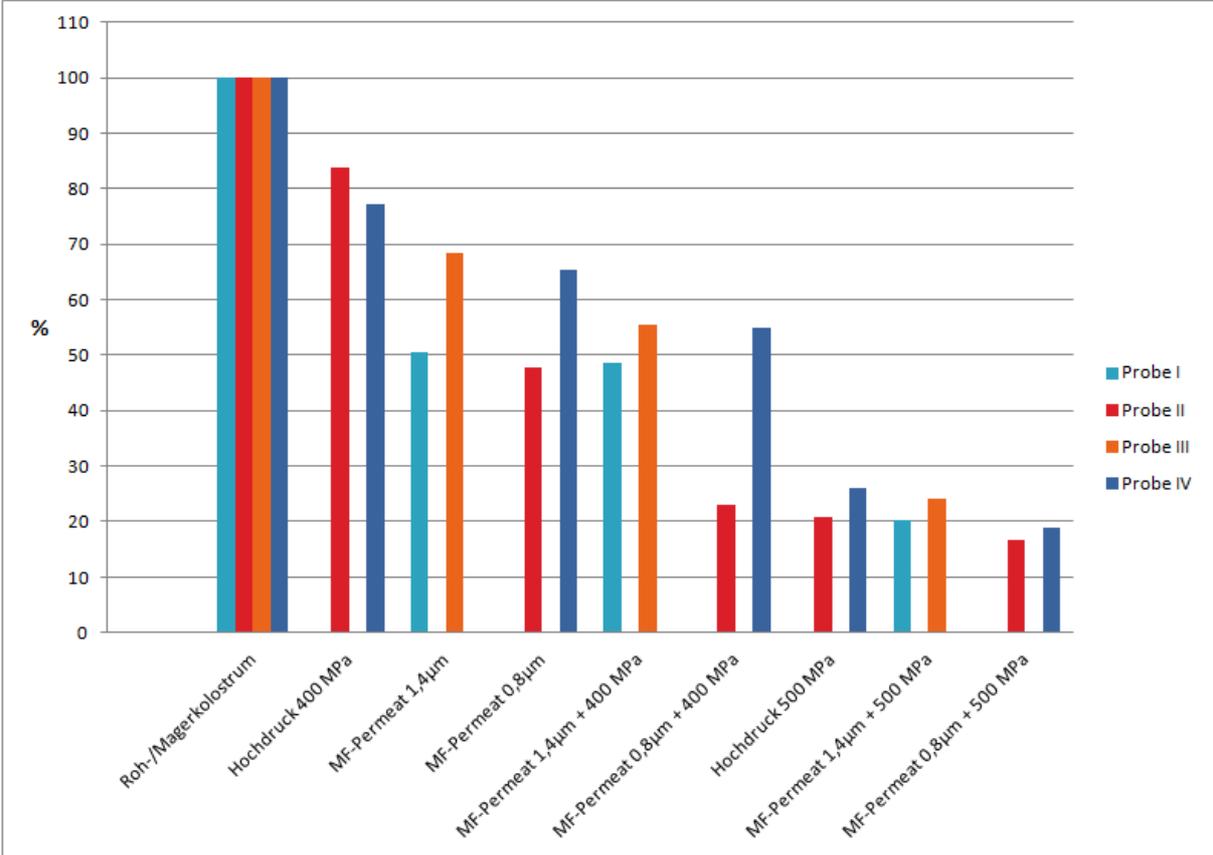
Die Abbildung 12 zeigt die graphische Darstellung des prozentuellen Restanteils von IgG nach den Hitzebehandlungen. Nach der Hitzebehandlung bei 60°C für zehn Minuten waren noch etwa 80 bis 95% des Ausgangs-IgG-Gehaltes des Kolostrums vorhanden. Nach der Behandlung bei 75°C für 20 Minuten waren nur noch etwa 10% des IgG nachweisbar. Die Hitzebehandlungen bei strömendem Dampf (100°C) für 30 Minuten und Autoklavierbedingungen (121°C) für 15 Minuten führten dazu, dass kein IgG mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 12. Prozentuelle Restanteile von IgG im Kolostrum nach den Hitzebehandlungen**

Die Abbildung 13 zeigt die graphische Darstellung der prozentuellen Restanteile von IgG im Kolostrum nach Hochdruckbehandlungen bei 400 MPa und 500 MPa, Mikrofiltrationen durch Membranen mit 0,8 µm und 1,4 µm Porendurchmesser und Kombinationen aus Mikrofiltrationen und Hochdruckbehandlungen. Nach der Hochdruckbehandlung bei 400 MPa waren noch etwa 70 bis 85% des Ausgangs-IgG-Gehalts im Kolostrum nachweisbar. Das 1,4 µm-Mikrofiltrationspermeat enthielt noch etwa 50 bis 70% IgG im Vergleich zum 0,8 µm-Mikrofiltrationspermeat, das etwa 45 bis 65 % IgG enthielt. Nach Hochdruckbehandlung des 1,4 µm-Mikrofiltrationspermeates bei 400 MPa konnten noch etwa 50 bis 55 % IgG nachgewiesen werden. Nach Hochdruckbehandlung des 0,8 µm-Mikrofiltrationspermeates bei 400 MPa waren noch etwa 20 bis 50 % des IgG vorhanden. Sowohl beim mit 500 MPa hochdruckbehandelten Kolostrum als auch bei

dem mit 500 MPa behandelten Mikrofiltrationspermeat beider Porendurchmesser (0,8 µm und 1,4 µm) konnten IgG-Werte von 25% und weniger nachgewiesen werden.



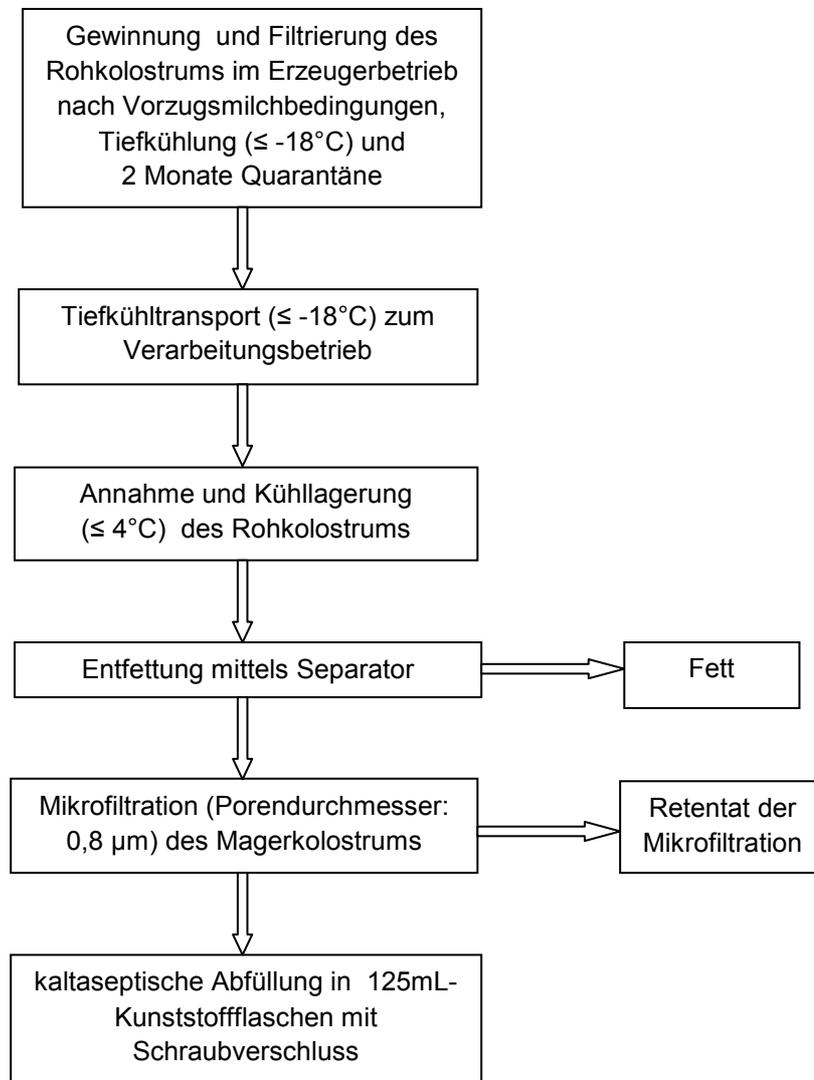
**Abbildung 13. Prozentuelle Restanteile von IgG im Kolostrum nach Mikrofiltrationen, Hochdruckbehandlungen und Kombinationen daraus**

## 4.3 UMSETZUNG DES HACCP-KONZEPTES

### 4.3.1 BESCHREIBUNG DES PRODUKTES

<b>Produkt</b>	Flüssigextrakt aus bovinem Kolostrum
<b>Herstellung</b>	mittels Separator entfettetes, entcaseiniertes und durch Membranfiltration entkeimtes Produkt
<b>Charakteristik</b>	< 0,1% Fett, ca. 95% Wasser, $a_w$ -Wert=0,99, pH=6,4
<b>Haltbarkeit</b>	zwei Jahre im ungekühlten Zustand
<b>Zubereitung</b>	keine
<b>Vorgesehener Gebrauch</b>	zum Verzehr für alle Konsumenten geeignet
<b>Spezifische Deklaration</b>	Flüssigextrakt aus 100% bovinem Kolostrum, entfettet, membranfiltriert

#### 4.3.2 FLIESSDIAGRAMM DES HERSTELLUNGSPROZESSES EINES FLÜSSIGEN KOLOSTRUMPRODUKTES MIT BIOAKTIVEN KOMPONENTEN



Das Rohkolostrum wird in einem Vorzugsmilchbetrieb gewonnen und durch sterile Reinigungsfilter, die Partikel von mehr als 100 µm Durchmesser zurückhalten, filtriert. Danach wird das Kolostrum sofort eingefroren und unter Quarantäne eingelagert, bis veterinärmedizinisch bestätigt ist, dass das Kolostrum von absolut gesunden Tierbeständen stammt.

Nach dem Transport zum Verarbeitungsbetrieb wird das Kolostrum bei  $\leq 4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und im Wareneingang inspiziert. Es muss abgelehnt werden, wenn eine oder mehrere der folgenden Beobachtungen gemacht werden:

- sichtbare Verschmutzungen des Kolostrums oder des Transportbehälters
- Schimmelbewuchs des Transportbehälters
- Blut im Kolostrum
- saurer Geruch des Kolostrums
- Stroh oder andere Fremdkörper im Kolostrum
- nicht korrekt beschriftete bzw. codierte Transportbehälter

Danach wird ein Hemmstofftest durchgeführt (z.B. Brillantschwarz-Reduktionstest, Penzymtest oder Charm-Test). Bei Nachweisbarkeit von Hemmstoffen muss das Kolostrum abgelehnt werden. Das angenommene Kolostrum wird laufend mittels eines in-situ Monitoringsystems, das auf dem Prinzip der Durchflusscytometrie beruht, mikrobiologisch untersucht. Bis zur Weiterverarbeitung wird das Kolostrum bei maximal  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Insgesamt darf das Kolostrum nur höchstens 48 Stunden gekühlt gelagert werden. Nach Entfettung mittels Separator wird das Kolostrum mikrofiltriert, wobei laufend die Leitfähigkeit und der Gesamtgehalt des organischen Kohlenstoffes (Total Organic Carbon, TOC) des finalen Spülwassers des CIP (Cleaning in Place)-Prozesses mittels Sensoren überprüft werden. Danach wird das Produkt kaltaseptisch in Flaschen mit Schraubverschluss abgefüllt.

### 4.3.3 ANALYSE DER MIKROBIOLOGISCHEN GEFAHREN WÄHREND DES HERSTELLUNGSPROZESSES

Prozessschritt	Art der Gefährdung und Einflussfaktore	Kontroll- und Überwachungsmaßnahmen	Häufigkeit der Prüfung	Grenzwerte	Maßnahmen bei Abweichungen	Verantwortlicher	Verifizierung
1 Gewinnung und Filtrierung des Kolostrums  <b>CCP</b>	pathogene Mikroorganismen Euterkrankheiten (Mastitis) erkranktes Personal  mangelhafte Hygiene beim Melken und im Stall  unsterile Reinigungsfilter  ungeschultes Melkpersonal	Erzeugerbetrieb muss den Anforderungen eines Vorzugsmilchbetriebes entsprechen  Zitzenkontrolle und -desinfektion durch das Melkpersonal  medizinische Untersuchungen des Personals; amtliches Gesundheitszeugnis  Sterilitätszertifikate des Filterherstellers  regelmäßige Hygieneschulungen	veterinärmedizinische Kontrollen mindestens ein Mal im Monat  2 Monate Quarantäne für das Kolostrum  wöchentliche Gesundenuntersuchung des Personals  tägliche mikrobiologische Untersuchung des Kolostrums  Zitzenkontrolle und -desinfektion vor und nach jedem Melken  optische Prüfung der Filter  halbjährliche Hygieneschulungen mit anschließender Prüfung	Werte für somatische Zellzahlen und Keimzahlen gemäß Anlage 9 der Tier-LMHV  Ausschluss übertragbarer Krankheiten des Personals  Befund der Zitzenkontrolle muss unauffällig sein  keine Abweichung des Filters  Bestätigung des Schulungsbesuches und der bestandenen Prüfungen	kranke Tiere von der Kolostrumgewinnung ausschließen  Abgabesperre für Kolostrum  Tätigkeits- und Beschäftigungsverbot für erkranktes Personal  Beseitigung der Mängel  Hygienestandards verbessern  Filter nicht verwenden	Veterinärbehörde  Gesundheitsamt  Erzeugerbetrieb	veterinärmedizinische Kontrollen  amtsärztliche Untersuchungen  Überprüfung der Sterilitätszertifikate  Schulungsprotokolle und Prüfungsbestätigungen

2 Tiefkühl- transport zum Verarbeitungs- betrieb  <b><u>CCP</u></b>	Vermehrung pathogener Mikroorganismen  <b>Temperatur</b>	Temperatur- messung  Temperaturauf- zeichnung im Lieferwagen mittels Logger	alle 5 Minuten	$\leq -18^{\circ}\text{C}$	Kolostrum darf nicht mehr abgegeben werden  Beseitigung der Mängel	Transport- unternehmen	Auswertung der Temperatur- aufzeichnungen Überprüfung der Thermometer
3 Annahme des Rohkolostrums  <b><u>CCP</u></b>	pathogene Mikroorganismen  Verunreinigungen, Verderb  <b>Temperatur</b>	Inspektion des Kolostrums, Hemmstofftests  in-situ Monitoring für die mikrobiologische Kontrolle  Einsichtnahme und Protokollierung der Temperatur- aufzeichnungen	bei jeder Anlieferung	sensorisch einwandfreies und hemstofffreies Kolostrum  Werte für somatische Zellzahlen und Keimzahlen gemäß Anlage 9 der Tier-LMHV  $\leq 4^{\circ}\text{C}$	Zurückweisen des Kolostrums  Rückstellproben	Wareneingang	Überprüfung der Wareneingangs- protokolle  Überprüfung der Thermometer  regelmäßige Wartung der in-situ Monitoringsysteme
4 Kühlagerung des Rohkolostrums  <b><u>CCP</u></b>	Vermehrung pathogener Mikroorganismen  <b>Temperatur</b>  ungenügende Reinigung der Tanks	Temperatur- messung und -aufzeichnung, korrekte Reinigung (CIP/SIP, Cleaning and Sterilizing in Place)	mehrmals täglich  vor und nach jedem Gebrauch	$\leq 4^{\circ}\text{C}$  sichtbare Verun- reinigungen	Kolostrum darf nicht weiterverarbeitet werden  Beseitigung der Mängel	Schichtleiter	Überprüfung der Thermometer  interne Reinigungsprotokolle regelmäßige Wartung des Kühlraumes internes Hygienemonitoring

5	pathogene Mikroorganismen  ungenügende Reinigung der Separatoren	korrekte Reinigung (CIP/SIP)	vor und nach jeder Entfettung	sichtbare Verunreinigungen der Separatoren	Kolostrum darf nicht weiterverarbeitet werden  Beseitigung der Mängel	Schichtleiter	interne Reinigungsprotokolle  internes Hygienemonitoring
6	pathogene Mikroorganismen  ungenügende Reinigung der Mikrofiltrationsanlage  Biofilmbildung	korrekte Reinigung (CIP/SIP)  optische Kontrolle der Anlage  Messung von Leitfähigkeit und TOC (Gesamtgehalt des organischen Kohlenstoffes) des finalen CIP-Spülwassers mittels in-line-Sensoren	bei jedem Mikrofiltrationsdurchgang	sichtbare Verunreinigungen  keimfreies Permeat  Grenzwerte für die Leitfähigkeitsmessung von unter 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei 25°C bzw. 500ppb für den TOC	Kolostrum nicht weiterverwenden  Mikrofiltrationsanlage sperren  Permeat nicht weiterverwenden  Beseitigung der Mängel  CIP/SIP optimieren und wiederholen	Schichtleiter	interne Reinigungsprotokolle  internes Hygienemonitoring  Wartungsprotokolle
7	pathogene Mikroorganismen  Rekontamination	korrektes CIP/SIP-System  Reinraumbedingungen	bei jedem Chargenwechsel	sichtbare Verunreinigen	Abfüllvorgang stoppen  Beseitigung der Mängel	Wareneingang  Schichtleiter	interne Reinigungsprotokolle  internes Hygienemonitoring

#### 4.3.4 BEWERTUNG DER KRITISCHEN LENKUNGSPUNKTE

##### 1. CCP: Gewinnung des Rohkolostrums

Das Rohkolostrum muss aus einem Betrieb stammen, der eine behördliche Genehmigung zur Vorzugsmilchgewinnung hat. Kolostrum, das aus einem gesunden Euter gewonnen wurde, ist praktisch keimfrei. Bei einer an Mastitis erkrankten Kuh steigt die Keimzahl im Gemelk stark an, in 95% der Fälle lassen sich dabei *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. und *Micrococcus* sp. nachweisen (ALI und FISCHER, 2002). Diese Mikroorganismen sind auch für den Menschen pathogen, und besonders *S. aureus* bildet Enterotoxine. Vorbeugende Maßnahmen sind in den gesetzlichen Vorschriften für die Vorzugsmilch geregelt und beinhalten monatliche veterinärmedizinische und mikrobiologische Untersuchungen sowie eine sorgfältige Zitzenkontrolle und -desinfektion vor jedem Melken.

Da es sich bei dem zu gewinnenden Produkt um ein hochsensibles Lebensmittel handelt, ist es angebracht, auch das Melkpersonal wöchentlich auf übertragbare Krankheiten zu untersuchen und regelmäßig in Fragen der Personalhygiene zu schulen. Erkrankte Kühe müssen von den anderen Kühen abgeschottet werden und dürfen nicht für die Kolostrumgewinnung verwendet werden. Das Kolostrum wird nach dem Melken durch sterile Reinigungsfilter gefiltert und sofort auf  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt und zwei Monate lang unter Quarantäne gestellt, bis veterinärmedizinisch sichergestellt ist, dass das Kolostrum von gesunden Tierbeständen stammt.

Der Zustand der Zitzen der Kühe, von denen das Kolostrum gewonnen werden soll, ist ein kritischer Lenkungspunkt, da eine sichtbare Veränderung des Euters ein Hinweis auf Mastitis sein kann und diese wiederum signifikante Auswirkungen auf die mikrobiologische Sicherheit des Kolostrums hat.

##### 2. CCP: Tiefkühltransport des Rohkolostrums zum Verarbeitungsbetrieb

Das Kolostrum muss bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  in einwandfrei sauberen Tanks zum Verarbeitungsbetrieb transportiert werden. Während des Transportes wird die Temperatur laufend mit einem Logger aufgezeichnet. Der Transportweg ist möglichst kurz zu halten.

Die Temperatur des Rohkolostrums während des Transportes ist ein kritischer Lenkungspunkt, weil eine erhöhte Temperatur signifikante Auswirkungen auf die mikrobiologische Sicherheit des Kolostrums hat.

### *3. CCP: Annahme des Rohkolostrums*

Sofort nach der Ankunft im Verarbeitungsbetrieb werden die Temperaturaufzeichnungen des Loggers überprüft. Das Kolostrum wird bei  $\leq 4\text{ °C}$  aufgetaut und auf sensorische Abweichungen des Aussehens und des Geruchs sowie auf das Vorhandensein von Hemmstoffen untersucht. Hier kann ein in-situ Monitoringsystem zur schnellen mikrobiologischen Untersuchung, wie z.B. Durchflussscytometrie (BactiFlow<sup>®</sup>, BactoScan<sup>™</sup> oder D-Count<sup>®</sup>), eingesetzt werden, das, im Vergleich zu den klassischen mikrobiologischen Methoden, viel Zeit einspart. Die Parameter müssen mindestens den Anforderungen an Vorzugsmilch entsprechen. Kolostrum, das den Annahmebedingungen bezüglich Sensorik, Temperatur, Hemmstoffen, Mikrobiologie oder somatischer Zellzahl nicht entspricht, ist ausnahmslos abzulehnen.

Die Qualität des Rohkolostrums ist ein kritischer Kontrollpunkt, weil die Überprüfung bei der Annahme entscheidet, ob das gelieferte Kolostrum überhaupt verarbeitet wird.

### *4. CCP: Kühllagerung des Rohkolostrums bis zur Weiterverarbeitung*

Das Rohkolostrum muss auf mindestens  $4\text{ °C}$  gekühlt werden und sollte innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet werden. Die Lagerung hat in einwandfrei sauberen Tanks zu erfolgen. Die Temperatur wird regelmäßig mittels Thermometer überprüft und aufgezeichnet. Bei Überschreitung des Grenzwertes darf das Kolostrum nicht weiterverarbeitet werden.

Die Lagerungstemperatur des Rohkolostrums ist ein kritischer Lenkungspunkt, weil eine erhöhte Temperatur signifikante Auswirkungen auf die mikrobiologische Sicherheit des Kolostrums hat.

## 5. CCP: Mikrofiltration des Magerkolostrums

Das Magerkolostrum wird bei einem Porendurchmesser von 0,8 µm mikrofiltriert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Mikrofiltrationsanlage bei jedem Schichtwechsel mittels CIP/SIP (Cleaning in Place/Sterilization in Place)-System gereinigt bzw. sterilisiert wird. Zweck des CIP-Verfahrens ist es, ein finales Spülwasser in der Qualität von gereinigtem Wasser mit entsprechender Leitfähigkeit und Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) zu erhalten. Das finale Spülwasser wird nur dann akzeptiert, wenn es Grenzwerte für die Leitfähigkeitsmessung von unter 1,3 µS/cm bei 25 °C bzw. 500 ppb für den TOC erreicht (METTLER TOLEDO, 2013). Diese Werte entsprechen den Anforderungen der US-amerikanischen und der europäischen Arzneibücher. Die Messungen erfolgen mittels Leitfähigkeits- und TOC-Sensoren und dauern etwa eine Minute (METTLER TOLEDO, 2013). Weiters ist die Mikrofiltrationsanlage regelmäßig zu warten, auf Biofilmbildung zu kontrollieren und die Filtermodule ggf. auszutauschen. Bei Abweichungen darf das Kolostrum nicht weiterverwendet werden.

Die Keimfreiheit des Mikrofiltrationspermeat ist ein kritischer Lenkungspunkt, da keimhaltiges Permeat nicht weiterverarbeitet werden darf. Die Messung erfolgt ebenfalls nach dem Prinzip der Durchflussscytometrie.

## 5 DISKUSSION

### *Mikrobiologische und immunologische Untersuchungen des Kolostrums*

Das im Rahmen dieser Masterarbeit untersuchte Rohkolostrum war von sehr guter Qualität, was den Gehalt an IgG betrifft (64,64 bis 78,97 mg IgG/mL). Nach HEINRICHS und JONES (2011) hat bovines Kolostrum hoher Qualität einen IgG-Anteil von über 50 mg/mL.

Die mikrobiologische Qualität des Rohkolostrums war mit einer Gesamtkeimzahl von  $10^7$  bis  $10^8$  KbE/mL allerdings sehr schlecht. Vom lebensmittelrechtlichen Standpunkt aus wäre dieses Produkt nicht verkehrsfähig gewesen, da die Verordnung (EG)

853/2004 für Rohmilch eine Gesamtkeimzahl von  $\leq 10^5$  KbE/mL vorschreibt. Außerdem konnten Listerien und Bacillen nachgewiesen werden. Die Gramfärbung nach der mesophilen Gesamtkeimzahlbestimmung ergab ausschließlich grampositive Stäbchen und Kokken. Es wird vermutet, dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um Milchsäurebakterien und Bacillen handelt.

Das Rohkolostrum wurde entfettet und das Magerkolostrum Behandlungen mit Hitze, Mikrofiltration, Hochdruck und Kombinationen daraus ausgesetzt. Da das dabei entstehende Kolostrumprodukt für alle Konsumentengruppen, also auch empfindliche Personen wie Kleinkinder, Immungeschwächte und ältere Menschen, geeignet sein sollte, wurden die Lebensmittelsicherheitskriterien der EG-Hygiene-Verordnung (Tabelle 21) herangezogen, um das Produkt mikrobiologisch sicher zu machen.

**Tabelle 21. Grenzwerte für Mikroorganismen in Lebensmitteln für Säuglinge und für besondere medizinische Zwecke gemäß EG-Hygiene-Verordnung**

Mikroorganismen	Probenahmeplan		Grenzwerte		Stufe, für die das Kriterium gilt
	n	c	m	M	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	in 25 g nicht nachweisbar		in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	in 10 g nicht nachweisbar		Ende des Herstellungsprozesses
präsumtiver <i>Bacillus cereus</i>	5	1	50 KbE/g	100 KbE/g	Ende des Herstellungsprozesses

Bezüglich der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl wurden die Richt- und Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM, 2010) für Säuglingsnahrung angenommen, die in Tabelle 22 zusammengefasst sind.

**Tabelle 22. Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl für Säuglingsnahrung (DGHM, 2010)**

	<b>Richtwert (KbE/g)</b>	<b>Warnwert (KbE/g)</b>
aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (30°C)	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$

Daraus ergibt sich, dass nur jene Behandlungsmethoden in Frage kommen, mit denen diese Kriterien erfüllt werden. Das trifft auf die Hitzebehandlungen bei strömendem Dampf (30 Minuten) und Autoklavenbedingungen (15 Minuten), auf die Mikrofiltration mit 0,8 µm Porendurchmesser und die Kombinationsbehandlungen aus Mikrofiltration mit 0,8 µm bzw. 1,4 µm Porendurchmesser und Hochdruck mit 400 MPa bzw. 500 MPa zu. Bei den beiden Hitzebehandlungen und den Kombinationsbehandlungen kommt es zur Denaturierung der Proteine des Kolostrums mit Gelierung bzw. Klumpenbildung. Außerdem ist nach den Hitzebehandlungen IgG nicht mehr nachweisbar, bei den Kombinationsmethoden jeweils weniger als 40 mg IgG/mL. Nach KELLY (2003) gelten 40 mg IgG/mL als Mindestkonzentration in bovinem Kolostrum, um positive gesundheitliche Effekte beim Menschen zu erzielen.

In den Abbildungen 11 und 13 sind die sich stark voneinander unterscheidenden IgG-Werte der Kolostrumproben II und IV nach Kombinationsbehandlung mit Mikrofiltration bei 0,8 µm Porendurchmesser und 400 MPa Hochdruck zu erkennen. Eine mögliche Erklärung für diesen Zustand, der auch nach mehrmaligem Wiederholen der Analysen auftrat, wäre ein Schutzeffekt von Casein, Lactose und Salzen auf das IgG (ELFSTRAND et al., 2002) in Probe IV. INDYK et al. (2008) berichten hingegen von einer großen Stabilität des IgG gegenüber Hochdruckbehandlungen bis 400 MPa. Es wäre möglich, dass sich in der Kolostrumprobe IV ein außergewöhnlich gutes Schutzmilieu befunden hatte, das dazu führte, dass das IgG gegenüber der Hochdruckanwendung von 400 MPa besonders widerstandsfähig war.

Nach der Mikrofiltration mit 0,8 µm Porendurchmesser waren im Permeat keine Mikroorganismen mehr nachweisbar und der IgG-Gehalt lag bei 37,76 mg/mL bis 46,49 mg/mL. Nach KELLY (2003) sollten z.B. Sportler zur Leistungssteigerung pro

Tag etwa 6,75 g IgG in Form von bovinem Kolostrum zu sich nehmen und immungeschwächte Personen bzw. solche mit Infektionskrankheiten des Verdauungstraktes etwa 4,3 g Immunglobuline pro Tag. Das bedeutet, dass Sportler von dem in dieser Weise haltbargemachten Kolostrum täglich ca. 150 mL trinken sollten und Kranke ca. 100 mL.

Die Tabelle 23 zeigt eine Zusammenfassung der Behandlungsmethoden des Kolostrums mit Auswertung und Konsequenzen.

**Tabelle 23. Zusammenfassung Behandlungsmethoden Kolostrum**

<b>Behandlungsmethode</b>	<b>Auswertung und Konsequenzen</b>
Hitzebehandlung 60°C, 10 Minuten	mikrobiologische Werte: zu hoch IgG: OK
Mikrofiltrationspermeat 1,4 µm	
Hochdruck 400 MPa	
Hitzebehandlung 75°C, 20 Minuten	mikrobiologische Werte: OK IgG: zu niedrig
Hitzebehandlung 100°C, 30 Minuten	
Hitzebehandlung 121°C, 15 Minuten	
Hochdruck 500 MPa	
Mikrofiltrationspermeat 0,8 µm + 400 MPa	
Mikrofiltrationspermeat 0,8 µm + 500 MPa	
Mikrofiltrationspermeat 1,4 µm + 400 MPa	
Mikrofiltrationspermeat 1,4 µm + 500 MPa	
Mikrofiltrationspermeat 0,8 µm	mikrobiologische Werte: OK IgG: OK

### *Rechtliche Definitionen von Kolostrumprodukten*

Gemäß EU-Lebensmittelrecht ist Kolostrum keine Milch, obwohl es auch aus dem Euter von Milchkühen gewonnen wird.

Im EU-Raum werden Kolostrumprodukte in Form von Kapseln, Pulvern, Tabletten und Flüssigextrakten verkauft. Die Frage, ob Kolostrum ein Nahrungsergänzungsmittel (NEM) ist, ist innerhalb der EU bis heute umstritten. Für eine Auslobung eines Kolostrumproduktes als NEM spricht, dass Kolostrum eine ernährungsspezifische oder physiologische Wirkung zeigt und in dosierter Form in den Verkehr gebracht wird. Gegen eine Auslobung als NEM spricht, dass Kolostrum ein Naturprodukt ist und daher keine definierte Zusammensetzung besitzt und dass es gemäß Nahrungsergänzungsmittelverordnung (NEMV) verboten ist, andere als die in den Anlagen 1 und 2 der NEMV angeführten Substanzen (Vitamine und Mineralstoffe in definierter Form) für die Herstellung von NEMs zu verwenden. Es ist aber möglich, bestimmte bioaktive Fraktionen durch Ultrafiltration und Nanofiltration (WU et al., 2011) aus Kolostrum abzutrennen und zur Herstellung von genau standardisierten Produkten zu verwenden.

Kolostrumprodukte dürfen als NEMs und als diätetische Lebensmittel für Personen, die sich "in besonderen physiologischen Umständen befinden und deshalb einen besonderen Nutzen aus der kontrollierten Aufnahme bestimmter in der Nahrung enthaltener Stoffe ziehen können", ausgelobt werden. Zu diesen Personen gehören z.B. Leistungssportler, Schwangere oder ältere Menschen.

Um ein Kolostrumprodukt allerdings als funktionelles Lebensmittel ausloben zu dürfen, bedarf es eines fundierten wissenschaftlichen Nachweises des positiven gesundheitlichen Zusatznutzens in Form von Studien am Menschen. Ein entsprechendes Dossier muss von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority; EFSA) geprüft und bestätigt werden. Da es für Kolostrum schon viele Studien über die positive Wirkung auf die menschliche Gesundheit gibt, wäre es eventuell möglich, dieses in Form eines funktionellen Lebensmittels auf den EU-Markt zu bringen.

Problematisch ist allerdings, dass Kolostrum in die Kategorie „neuartiges Lebensmittel“ fällt, da es bzw. seine Fraktionen aus Tieren isoliert werden und vor dem 15. Mai 1997 noch nicht in nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr innerhalb der EU verwendet wurde. Als neuartiges Lebensmittel muss es von der Europäischen Kommission gemäß einer speziellen Zulassungsprozedur genehmigt werden.

### *Kommerziell erhältliche Kolostrumprodukte*

Die Anreicherung oder Isolierung von aktivem IgG aus Kolostrum in großem Maßstab ist durch moderne Membrantrennverfahren und Prozesstechnologien möglich und führt zu einem weltweiten starken Anstieg der Marktbereiche von funktionellen Lebensmitteln (Nutraceuticals) und Nahrungsergänzungsmitteln (GAPPER et al., 2007). Die US-amerikanische Lebensmittelbehörde (Food and Drug Administration; FDA) hat Kolostrumprodukten, basierend auf klinischen Studien, den GRAS-Status verliehen (GAPPER et al., 2007).

STRUFF und SPROTTE (2008) berichten von synergistischen Effekten von bovinem Kolostrum mit konventionellen Arzneimitteltherapien wie z.B. einer Reduktion der Lipopolysaccharid- (LPS-) Konzentration im Plasma von Patienten mit Infektionen hervorgerufen durch Gramnegative Bakterien, die mit bakteriziden Antibiotika behandelt wurden.

Nebenwirkungen bei der Einnahme von Kolostrumprodukten treten selten auf und wurden als leichte gastrointestinale Beschwerden mit Blähungen und Übelkeit beschrieben (KELLY, 2003). Limitierende Faktoren von Kolostrumprodukten sind allerdings das allergieauslösende Potenzial der Kuhmilchproteine, inklusive IgG (KORHONEN et al., 2000), sowie der Lactosegehalt (ca. 3%), der bei lactoseintoleranten Personen zu Beschwerden führen kann. Für diese Konsumentengruppe wäre es möglich, das Disaccharid Lactose des Kolostrums in einem zusätzlichen Verarbeitungsschritt mit dem Enzym  $\beta$ -Galactosidase in die Monosaccharide Glucose und Galactose aufzuspalten. Einige Konsumenten berichteten auch von einem „unattraktiven“ (KELLY, 2003) bzw. bitteren (SOLOMONS, 2002) Geschmack des Kolostrums. Dieses Problem wäre durch (künstliche oder natürliche) Aromatisierung lösbar, die dem Produkt einen angenehmen Geschmack verleiht. Es sind überdies bereits Kolostrumprodukte auf dem Markt, die Koscher- und Halal-zertifiziert sind.

Obwohl keine Prionen im Kolostrum von an BSE erkrankten Kühen nachgewiesen werden konnten (BUSCHMANN und GROSCHUP, 2005), ist davon auszugehen, dass Kolostrum für den menschlichen Gebrauch von BSE-freien Kühen stammen muss. In klinischen Studien mit bovinem Kolostrum aus Deutschland in den 1990er

Jahren konnte kein einziger Fall von BSE oder der Creutzfeldt-Jakob Krankheit festgestellt werden (STRUFF und SPROTTE, 2008).

### *Alternative Haltbarmachungsmethoden für Kolostrumprodukte*

Eine weitere Möglichkeit, Kolostrum hygienisch sicher zu machen und dabei gleichzeitig die bioaktiven Inhaltsstoffe beizubehalten, ist eine milde Erhitzung bei 60°C für 45 bis 60 Minuten. ELFSTRAND et al. (2002) berichten, dass dies noch nicht zu einer verstärkten Denaturierung der Immunglobuline führt. HURLEY und THEIL (2011) sind der Meinung, dass diese Bedingungen nicht zu einer merklichen Veränderung der Viskosität des Kolostrums beitragen.

Nach der Mikrofiltration oder Pasteurisation kann eventuell eine Vakuumgefriertrocknung (Lyophilisation) erfolgen. Die Vakuumgefriertrocknung ist die effektivste Trocknungsmethode, um die Immunglobulinfunktionen in bovinem Kolostrum zu erhalten (CHELACK et al., 1993). Dabei wird das Kolostrum bei niedrigen Temperaturen schnell dehydriert, wobei nur wenig Protein denaturiert wird. Nach ELFSTRAND et al. (2002) reduziert eine Vakuumgefriertrocknung die Menge an nativem IgG1, IgG2 und IgA in bovinem Kolostrumkonzentrat um 25% im Vergleich zu Kolostrummolke. In vakuumgefriergetrockneter Kolostrummolke war der Gehalt an IgG2 und IgA um 35 bis 40% reduziert, während der IgG1-Gehalt nur um 17% verringert wurde (ELFSTRAND et al., 2002).

INDYK et al. (2008) berichten, dass IgG aus bovinem Kolostrum weniger empfindlich auf Hochdruckbehandlung mit 400 MPa reagiert als auf Hitzebehandlungen über 65°C, was die Hochdruckbehandlung als zukünftige Behandlungsmethode für Kolostrum interessant machen könnte. Versuche im Umfeld zu dieser Masterarbeit haben dies teilweise bestätigt. Einerseits waren nach einer Hochdruckbehandlung mit 400 MPa noch 40 bis 50 mg IgG/mL nachweisbar, andererseits kam es zu einer Gelierung bzw. Verklumpung des Kolostrums, und die mesophile Gesamtkeimzahl konnte nur um etwa zwei bis drei Log-Stufen verringert werden.

HURLEY und THEIL (2011) sind der Meinung, dass der Einsatz von gepulsten elektrischen Feldern eine geeignete alternative Methode zur Inaktivierung von

Mikroorganismen bei gleichzeitiger Beibehaltung der IgG-Aktivität in Kolostrum ist. Bei diesem Verfahren erwärmt sich das Kolostrum für einige Millisekunden auf weniger als 50°C, was mit einer Pasteurisation bei 72°C für zwei Minuten vergleichbar ist (HURLEY und THEIL, 2011). Dabei werden weder die Sekundärstruktur des IgG noch seine Antigen-bindende Aktivität verändert (HURLEY und THEIL, 2011).

### *Abschließendes Urteil und Risikoeinschätzung für Rohmilch, Rohkolostrum und Vorzugsmilch*

Will ein Produzent von nativen/rohen Kolostrumprodukten bzw. Fraktionen daraus seine Produkte auch hochsensiblen Konsumentengruppen wie Kleinkindern, älteren Menschen, Schwangeren und Immungeschwächten anbieten, reichen die gesetzlichen Anforderungen an die Hygiene von Rohmilch nicht aus, da ein unverantwortlich hohes Restrisiko bleibt. Obwohl der Gesetzgeber den Rohverzehr von Rohmilch bzw. Rohkolostrum nicht vorgesehen hat, werden dennoch innerhalb der EU laufend Krankheitsausbrüche gemeldet, die auf diese Quellen zurückzuführen sind. Die derzeit geltenden gesetzlichen Vorschriften reichen nicht aus, um ein hygienisch einwandfreies Produkt zu erhalten, das unbehandelt konsumiert werden kann. Es kommen immer wieder pathogene Mikroorganismen in Rohmilch vor und eine Vermehrung derselben bis zu Größenordnungen, die als Infektionsdosis oder zur Toxinbildung ausreichen, ist möglich. Bei einigen Bakterien ist die Infektionsdosis sehr gering, wie z.B. zehn bis 100 Keime bei VTEC-Keimen.

Aufgrund des erwarteten positiven Gesundheitsnutzens von in Rohmilch und Rohkolostrum vorkommenden, hitzelabilen bioaktiven Substanzen verzichten viele Konsumenten auf das vorgeschriebene Abkochen. Es liegt aber ein hohes gesundheitliches Risiko, besonders für sensible Personengruppen, vor, wenn Rohmilch und Rohkolostrum nach den Vorschriften für die Rohmilchgewinnung gewonnen und danach roh verzehrt werden. Vor allem *Listeria monocytogenes* stellt eine ernste Gefahr dar. Nach ALLERBERGER (2008a) sind mindestens 10% der in Österreich auftretenden sporadischen Listeriosen auf den Konsum von Rohmilch und rohen Milchprodukten zurückzuführen.

Verschiedene Studien und Untersuchungen haben gezeigt, dass Rohkolostrum von konventionellen Milchviehbetrieben oft sehr stark mikrobiell belastet ist und auch Träger von pathogenen Mikroorganismen wie Salmonellen und auch Coliformen sein kann.

Ein sehr geringes Risiko besteht heutzutage allerdings darin, im EU-Raum nach dem Konsum von Rohmilch bzw. von nach Rohmilchkriterien gewonnenem Rohkolostrum an Tuberkulose oder Morbus Bang zu erkranken, da im EU-Recht strenge Regelungen zur Bekämpfung dieser Infektionskrankheiten in Rinderherden verankert sind und die meisten EU-Staaten, inklusive Österreich, den Status *Officially Tuberculosis Free* bzw. *Officially Brucellosis Free* innehaben.

Vorzugsmilch ist, im Gegensatz zu Rohmilch bzw. Rohkolostrum, für den Rohverzehr bestimmt und unterliegt strengeren Kontrollen und Vorschriften, die in der Tier-LMHV von 2007 festgelegt sind. Dennoch kann auch hier das Risiko einer Erkrankung nicht völlig ausgeschlossen werden. Laut FRIEDRICH und HORLACHER (2010) liegt seit Einführung der Vorschriften der Tier-LMHV zur Vorzugsmilcherzeugung die Häufigkeit von mikrobiologischen Warnwertüberschreitungen bei Vorzugsmilch in Deutschland in Regel unter 2%, im Falle der somatischen Zellzahl bei 3,7%. Außerdem zeigen die in der Tier-LMHV vorgeschriebenen monatlichen Stichprobenuntersuchungen immer nur eine Momentaufnahme des mikrobiologischen Status der Vorzugsmilch. Ein Restrisiko bleibt immer bestehen, wie der positive Nachweis von VTEC-Keimen in 1,3% (FRIEDRICH und HORLACHER, 2010) aller untersuchten Vorzugsmilchproben deutlich macht. FRIEDRICH und HORLACHER (2010) empfehlen sogar, dass Personen mit geschwächtem Immunsystem (alte und kranke Personen sowie Kleinkinder) und Schwangere auf den Verzehr von roher, nicht abgekochter Vorzugsmilch verzichten sollten.

In Anbetracht dieser, auch nach Einführung von Bestimmungen zur Erzeugung von Vorzugsmilch, bestehenden Risiken, ist es notwendig, den Gewinnungs- und Verarbeitungsprozess von Produkten, die auf Rohkolostrum basieren, strengstens zu überwachen und möglichst viele Hürden für pathogene Mikroorganismen einzubauen. Dies beginnt schon im Erzeugerbetrieb, für den „verschärfte“ Vorzugsmilchbedingungen gelten sollten wie z.B. regelmäßige medizinische

Untersuchungen des Personals, was der Gesetzgeber seit 2001 nicht mehr vorschreibt. Weiters sollte die veterinärmedizinische Kontrolle der Milchkühe und die mikrobiologische Kontrolle des Kolostrums öfter als ein Mal pro Monat erfolgen.

Im Verarbeitungsbetrieb sollten in-situ Systeme zum mikrobiologischen Monitoring des angelieferten Rohkolostrums vorhanden sein. Eine durchgängige Kühlkette mit höchstens 4°C ist ebenfalls notwendig. Nach GODDEN (2009) sollten zwischen Gewinnung und Verarbeitung des Kolostrums weniger als 48 Stunden vergehen, um die Vermehrung von Mikroorganismen zu verhindern. Sämtliche Behälter, Gerätschaften und Apparate sowie Leitungen und Schläuche, die mit dem Kolostrum in Berührung kommen, müssen regelmäßig gereinigt und sterilisiert werden (CIP/SIP-System), was durch interne Reinigungs- und Monitoringprogramme zu überprüfen ist. Die Haltbarmachung des Kolostrums sollte durch Mikrofiltration bei 0,8 µm Porendurchmesser durchgeführt werden. Die im Zuge dieser Masterarbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass diese Art der Haltbarmachung am effektivsten ist, sowohl im Hinblick auf die Keimreduktion als auch auf den Beibehalt der bioaktiven Inhaltsstoffe des Kolostrums. Der mikrobiologische Zustand des Produktes kann auch hier durch in-situ Monitoringsysteme überprüft werden, bevor das Kolostrum unter Reinraumbedingungen kaltseptisch abgefüllt und luftdicht verschlossen wird. Werden alle diese Arbeitsschritte und -bedingungen korrekt eingehalten, sollte es möglich sein, ein hygienisch nahezu völlig sicheres Produkt herzustellen.

Ob dieses Produktionssystem wirklich umsetzbar ist, ist letztendlich eine Frage der Kosten und der Wirtschaftlichkeit. Ein US-amerikanischer Produzent von funktionellen Kolostrumprodukten gibt Herstellungskosten von 400 bis 1000 US-Dollar pro kg Produkt (STERLING TECHNOLOGY, 2012) an. Dieses Unternehmen wendet allerdings Pasteurisation und Sprühtrocknung zur Haltbarmachung seiner Produkte an, was eine negative Wirkung auf den Gehalt an bioaktiven Wirkstoffen nicht ausschließt. Es ist damit zu rechnen, dass ein, wie in dieser Masterarbeit beschriebenes, mikrofiltriertes und laufend mikrobiologisch kontrolliertes Produkt, das aus besonders streng kontrollierten Vorzugsmilchbetrieben stammt, um einiges höhere Herstellungskosten erfordern würde, was die Wirtschaftlichkeit eines solchen Produktes in Frage stellt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist seit langem bekannt, dass die Einnahme von bovinem Kolostrum beim Menschen therapeutische Effekte haben kann, wie z.B. bei gastrointestinalen Infektionen, allerdings ist es erst seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts möglich, stabile und standardisierte Kolostrumprodukte herzustellen. Die hauptsächliche Wirkung von Kolostrum beruht auf antibakteriellen Effekten und einer Modulation der Immunantwort beim Menschen.

Ziel dieser Masterarbeit war es, verschiedene physikalische Haltbarmachungsverfahren wie Erhitzung, Mikrofiltration und Hochdruckbehandlung für Kolostrum anzuwenden, um ein hygienisch sicheres Produkt zu erhalten, das gleichzeitig noch so viel IgG enthält, dass seine positive gesundheitliche Wirkung im Konsumenten entfaltet wird. Zur mikrobiologischen und immunologischen Analyse des Kolostrums wurden klassische mikrobielle Methoden und ein Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay angewandt. Weiters wurde ein HACCP-Konzept ausgearbeitet, die gesetzlichen mikrobiologischen Vorschriften für Rohmilch und Vorzugsmilch miteinander verglichen und eine Risikoeinschätzung für ein mikrofiltriertes Kolostrumprodukt erstellt. Außerdem wurde erarbeitet, in welche lebensmittelrechtliche Kategorie Kolostrumprodukte fallen und was bei deren Vermarktung beachtet werden muss.

Das zur Verfügung gestellte Kolostrum wies mesophile Gesamtkeimgehalte von  $10^7$  bis  $10^8$  KbE/mL, sowie eine hohe Belastung mit *Bacillus* ssp. ( $10^6$  bis  $10^7$  KbE/mL) und wenig *Listeria* ssp. ( $10^2$  bis  $10^3$  KbE/mL) auf. *E.coli* konnte nicht nachgewiesen werden. Vom lebensmittelrechtlichen Standpunkt aus wäre dieses Kolostrum als Milch nicht verkehrsfähig gewesen. Der IgG-Gehalt des Kolostrums lag über 60 mg/mL, was einem guten immunologisch relevanten Level entspricht.

Bei den physikalischen Haltbarmachungsverfahren hat sich die Mikrofiltration mit 0,8 µm Porendurchmesser als das effektivste herausgestellt, sowohl vom hygienischen Standpunkt aus, als auch in der Beibehaltung des IgG-Gehaltes des Kolostrums. Das HACCP-Konzept brachte folgende kritische Lenkungspunkte zum Vorschein: Gewinnung des Kolostrums, Transport zum Verarbeitungsbetrieb, Annahme des

Kolostrums, Kühlagerung, Mikrofiltration und Abfüllung. Die Risikoeinschätzung ergab, dass die Einhaltung von Vorzugsmilchbedingungen bei der Kolostrumgewinnung alleine noch kein hygienisch sicheres Produkt bedeutet, obwohl der Konsum von Vorzugsmilch eindeutig weniger Risiko in sich birgt als der Konsum von unerhitzter Rohmilch. Um das hygienische Restrisiko bei der Gewinnung von Kolostrum möglichst niedrig zu halten, ist es daher notwendig, „verschärfte“ Vorzugsmilchbedingungen zu schaffen. Im Verarbeitungsbetrieb müssen strikte Hygienemaßnahmen eingehalten werden und der mikrobiologische Zustand des Kolostrums laufend durch in-situ Monitoringsysteme überwacht werden. Der finanzielle Aufwand solch eines rigoros überwachten Produktes ist allerdings sehr groß und wahrscheinlich nicht wirtschaftlich.

Kolostrumprodukte sind nicht für Kuhmilchallergiker geeignet und können für lactoseintolerante Konsumenten in einem zusätzlichen Prozessschritt mit dem Enzym  $\beta$ -Galactosidase vorbehandelt werden, das die Lactose aufspaltet. Kolostrumprodukte dürfen derzeit als Nahrungsergänzungsmittel und diätetische Lebensmittel verkauft werden. Für die Auslobung als funktionelle oder neuartige Lebensmittel sind allerdings behördliche Genehmigungsverfahren notwendig.

## 7 SUMMARY

Bovine colostrum is the first secretion from a cow's udder shortly after giving birth. Colostrum is rich in amino acids, nucleotides, growth factors, minerals and immunoglobulins, especially IgG. This antibody is known to have a positive physiological influence on the human health, particularly in the gastrointestinal tract, by enhancing the immunological response.

Colostrum products may be sold as dietary supplements or dietetic food within the EU. They should not be consumed by cow milk allergic persons. By adding  $\beta$ -galactosidase, a lactose-cleaving enzyme, colostrum becomes suitable for lactose intolerant persons.

The aim of this master thesis was to develop a production process for a colostrum product that is completely microbiologically safe and therefore suitable for all consumer groups including young, old, pregnant and immuno-compromised persons. Furthermore, this colostrum product has to contain enough IgG to be therapeutically efficient.

Physical preservation methods like heating, microfiltration and high pressure treatment were applied to skimmed colostrum which had been spiked with overnight cultures of *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The microbiological results were compared to the requirements of the European food law. Immunological analyses were performed by using an Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

The original colostrum was of very poor microbiological quality. It had a total mesophilic viable count between  $10^7$  and  $10^8$  colony forming units (cfu)/mL, a *Bacillus* count between  $10^6$  and  $10^7$  cfu/mL and a *Listeria* count between  $10^2$  and  $10^3$  cfu/mL. *E.coli* could not be detected. The IgG-content of the original colostrum was > 60 mg/mL which indicated a high immunological quality.

Microfiltration through a membrane filter with 0,8 µm pore diameter turned out to be the most effective preservation method for a therapeutical colostrum product because it completely removed bacterial cells whilst a high content of IgG remained in the permeate.

The risk assessment revealed that the requirements of the European laws regarding certified raw milk are not rigorous enough to guarantee a completely microbiologically safe product. It is therefore mandatory to create "aggravated certified raw milk-conditions" at the dairy farm along with continuous in-situ monitoring of the colostrum during processing. It is a questionable point whether a complex process like this can be economically profitable.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- AES Chemunex (2005): *BactiFlow® Real-time Microbial Analysis with Digital Flow Cytometry*. Rapid Microbiology Newsletter - A newsletter for the Rapid Micro User's Group™, Nov-Dec 2005, AES Chemunex, Bruz, Frankreich
- Alexieva B, Markova T und Nikolova E (2004): Bovine Colostrum – The Promising Nutraceutical. *Czech J Food Sci* 22 (1): 73-79
- Allerberger F, Friedrich AW, Grif K, Dierich MP, Dornbusch HR, Mache CJ, Nachbaur E, Freilinger M, Rieck P, Wagner M, Caprioli A, Karch H und Zimmerhackl LB (2003): Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis* 7 (1): 43-44
- Allerberger F (2008a): Gefahr aus dem Milchkännchen. In: *Ärzte Woche* 5/2008, Springer-Verlag GmbH, Wien
- Allerberger F (2008b): Macht Milch krank? In: *Ärzte Woche* 4/2008, Springer-Verlag GmbH, Wien
- Ali AA und Fischer RM (2002): Implementation of HACCP to Bulk Condensed Milk Production Line. *Food Rev Int* 18 (2-3): 177-190
- ALP (2008): *Sind Rohmilchkäse für den Konsumenten sicher?* Kommentar der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld - Posieux ALP-Haras, Schweiz: [http://www.db-alp.admin.ch/de/ueberuns/faq\\_detail.php?id=186](http://www.db-alp.admin.ch/de/ueberuns/faq_detail.php?id=186) (abgerufen am 02.11.2012)
- Andrews J (2012): *Campylobacter Cases from Raw Milk Outbreak Reach 80*. Food Safety News, Mar 01 2012: <http://www.foodsafetynews.com/2012/03/campylobacter-cases-from-pa-raw-milk-outbreak-reach-80/> (abgerufen am 02.03.2012)
- BAG (2004): *Campylobacter und Salmonella – Stand Ende 2003*. Bulletin 40, Bundesamt für Gesundheit BAG, Schweiz: 737 (2004)

Bethyl (2009): *Bovine IgG ELISA Quantitation Set, Cat. No. E10-118*. Datenblatt von Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA

Bhat M, Denny J, MacDonald K, Hofmann J, Jain S und Lynch M (2007): *Escherichia coli O157:H7 Infection Associated with Drinking Raw Milk - Washington and Oregon, November – December 2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 56 (08): 165-167*

bioMérieux (2010): *API<sup>®</sup> Listeria – System zur Identifizierung von Listeria*. Produktinformation der bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich

Blessing DJ, Thompson M, Fisher B, Schooley D, Kramer MJ, DeMelfi TM, McCarthy MA, Witte EJ, Hays CW und Smucker J (1983): *Campylobacteriosis Associated with Raw Milk Consumption – Pennsylvania. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 32 (26): 337-344*

BMG (2010a): *Hintergrundinformation „Listerien in steirischem Käse“*. Information des Bundesministeriums für Gesundheit BMG, Österreich: [http://www.verbrauchergesundheit.gv.at/Portal.Node/kvg/public?genetics.rm=Content&genetics.pm=gti\\_full&p.contentid=10008.76148&100224\\_listerien\\_hintergrundinfo\\_bmg-1-.pdf](http://www.verbrauchergesundheit.gv.at/Portal.Node/kvg/public?genetics.rm=Content&genetics.pm=gti_full&p.contentid=10008.76148&100224_listerien_hintergrundinfo_bmg-1-.pdf) (abgerufen am 03.11. 2012)

BMG (2010b): *Lebensmittelbedingter Krankheitsausbruch*. Handbuch, 1. Auflage, 2010, Bundesministerium für Gesundheit BMG, Österreich

BMG (2012): *Lebensmittelsicherheitsbericht 2011 – Zahlen, Daten, Fakten aus Österreich*. Bundesministerium für Gesundheit BMG, Österreich

Boggs JD, Whitwam RE, Hale LM, Briscoe RP, Kahn SE, MacCormack JN, Maillard JM, Grayson SC, Sigmon KS, Reardon JW und Saah JR (2001): *Outbreak of Listeriosis Associated With Homemade Mexican-Style Cheese --- North Carolina, October 2000--January 2001. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 50 (26): 560-2*

Buschmann A und Groschup MH (2005): *Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. J Infect Dis 192 (5): 934-42*

- Campbell B und Petersen WE (1955): Use of protective principles in milk and colostrum in prevention of disease in man and animals. *J Lancet* 75 (11): 494–496
- Campbell B und Petersen WE (1963): Immune Milk - a historical survey. *Dairy Sci Abstr* 25: 345-358
- Carl Roth (2008a): *Hirn-Herz-Glucose Bouillon für die Kultivierung anspruchsvoller Keime*. Produkt-Datenblatt der Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
- Carl Roth (2008b): *Nährbouillon für die allgemeine Kultivierung anspruchsloser Mikroorganismen*. Produkt-Datenblatt der Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
- Carl Roth (2008c): *Plate-Count Agar - Für die Bestimmung der Anzahl von aeroben mikrobiellen Flora in Milch, Nahrungsmitteln und anderen Substanzen*. Produkt-Datenblatt der Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
- CDC (1984): *Epidemiologic Notes and Reports Campylobacter Outbreak Associated with Certified Raw Milk Products – California*. Public Health Letter 1984 (6), Los Angeles County Dept of Human Services, Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention – CDC, USA
- CDFa (2011): *Organic Pastures Raw Milk Recall Announced by CDFa*. News Release by California Department of Food and Agriculture, November 15 2011, Sacramento, California, USA (2011): [http://www.cdfa.ca.gov/egov/Press\\_Releases/Press\\_Release.asp?PRnum=11-064](http://www.cdfa.ca.gov/egov/Press_Releases/Press_Release.asp?PRnum=11-064), (abgerufen am 02.03.2012)
- Chelack BJ, Morley PS und Haines DM (1993): Evaluations of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. *Can Vet J* 34 (7): 407-412
- Clark JP (2006): High-Pressure Processing Research Continues. *Food Technology Magazine* 60 (2): 63-65

- Coenen C (1999): *Untersuchungen zum Vorkommen und zur Risikoeinschätzung pathogener Keime in Rohmilch und Rohmilchprodukten aus der Direktvermarktung*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
- Collins LM (2010): *Salmonella Outbreak Linked to Raw Milk Sold in Orem and Heber*. In: Deseret News. Stand: May 15 2010. Salt Lake City, Utah, USA: <http://www.deseretnews.com/article/700032391/Salmonella-outbreak-linked-to-raw-milk-sold-in-Orem-and-Heber.html> (abgerufen am 02.03.2012)
- Contzen M, Friedrich A und Renz V (2011): *EHEC in Lebensmitteln*. Bericht des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Stuttgart (CVUAS), Stuttgart: [http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema\\_ID=2&ID=1434&Pdf=N](http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=1434&Pdf=N) (abgerufen am 27.02.2012)
- Crowley JW, Jorgensen NA und Howard TW (1983): *Raising dairy replacements*. University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension Programs, Madison, Wisconsin, USA
- D'Amico DJ, Silk TM, Wu J und Guo M (2006): Inactivation of Microorganisms in Milk and Apple Cider Treated with Ultrasound. *Journal of Food Production* 69 (3): 556-563
- De Buyser ML, Dufour B, Maire M und Lafarge V (2001): Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol* 67: 1-17
- DGHM (2010): *Veröffentliche mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: 2010)*. Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Münster
- DIN 11290 (2), DIN EN ISO 11290-2:2005-01 *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes - Teil 2: Zählverfahren*. Deutsche Fassung EN ISO 11290-2:1998 + A1:2004 (2005)

- DIN 4833, DIN EN ISO 4833:2003-06 *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen - Koloniezählverfahren bei 30 °C*. Deutsche Fassung EN ISO 4833:2003 (2003)
- Dombrowski S und Wischhusen J (2012): *Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2010, Zoonosen-Monitoring*. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin: 25-26
- Doralt W (Hrsg.) (2011): *Lebensmittelrecht 2011/12*. Kodex des österreichischen Rechts, LexisNexis Verlag ARD ORAC GmbH & CoKG, Wien
- Douglas L (2003): *High Pressure Processing Basics Fact Sheet*. Virginia Tech and Virginia Sea Grant College Program, Blacksburg, Virginia, USA
- DVG (1994): *Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Bestandsproblem*. Sachverständigenausschuss „Subklinische Mastitis“, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG), Gießen
- Eberhard P und Sieber R (2006): Behandlung der Milch mit gepulsten elektrischen Feldern – eine Alternative zur Wärmebehandlung. *Mitt Lebensm Hyg* 97: 407-432
- EFSA (2006): Gutachten des wissenschaftlichen Gremiums für Lebensmittelzusatzstoffe, Aromastoffe, Verarbeitungshilfsstoffe und Materialien, die mit Lebensmitteln in Berührung kommen auf Ersuchen der Kommission über die Verwendung von Nisin (E234) als Lebensmittelzusatzstoff, Frage Nr. EFSA-Q-2005-031. *The EFSA Journal* (2006) 314
- Elfstrand L, Lindmark-Månsson H, Paulsson M, Nyberg L und Åkesson B (2002): Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. *Int Dairy J* 12: 879-887
- Ellner, R (2002): *Fragen und Antworten zur milchwirtschaftlichen Mikrobiologie*. Behr's Verlag, Hamburg: 122-125

- EI-Loly MM (2007): Bovine Milk Immunglobulins in Relation to Human Health. *Int J Dairy Sci* 2 (3): 184
- European Commission (2011): *Bovine and swine diseases - 2011 Annual report*. The European Commission, Brussels, Belgium
- Fleenor WA und Stott GH (1980): Hydrometer Test for Estimation of Immunoglobulin Concentration in Bovine Colostrum. *J Dairy Sci* 63 (6): 973-977
- Fluka (2008): *HiCrome™ Bacillus Agar*. Datenblatt von Fluka® Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, St. Gallen, Schweiz
- FOSS (2012): *BactoScan™ FC - P/N 1026630, Issue 1 GB, July 2012*. Datenblatt von FOSS A/S, Hilleroed, Dänemark
- Frank JF und Hassan AN (2002): *Microorganisms associated with milk*. In: Roginski H, Fuquay JW and Fox PF (Eds.): *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London: 1786-1796
- Friedrich A und Horlacher S (2010): *Untersuchungen zur Qualität von Vorzugsmilch in Baden-Württemberg*. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart CVUAS, Fellbach: <http://www.cvuas.de/uploaddoc/cvuas/Poster-Qualitaet-VM.pdf> (abgerufen am 06.03.2012)
- Friedrich A, Rau J und Spohr M (2010): *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) beim Milchvieh - eine neue Herausforderung für die Eutergesundheit*. Bericht des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Stuttgart (CVUAS), Fellbach: [http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema\\_ID=2&ID=1319&Pdf=No](http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=2&ID=1319&Pdf=No) (abgerufen am 27.02.2012)
- Frister H (2007a): *Technologische Aspekt der Milchverarbeitung*. In: Krömker V (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Parey Verlag, Stuttgart: 103-109
- Frister H (2007b): *Zusammensetzung der Milch*. In: Krömker V (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Parey Verlag, Stuttgart: 80-101

- Fuchs K (2009): *Wissenschaftliche Stellungnahme zur Risikobewertung von Milcherzeugnissen bei Verdacht auf TBC*. AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Wien
- Gao Y, Qiu W, Wu D und Fu Q (2011): Assessment of clostridium perfringens spore response to high hydrostatic pressure and heat with nisin. *Appl Biochem Biotechnol* 164 (7): 1083-1095
- Gapper LW, Copestake DEJ, Otter DE und Indyk HE (2007): Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrums and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem* 839 (1): 93-109
- Godden SM (2009): *Microbial Hazards Associated with Feeding Colostrum*. Proceedings of the 24<sup>th</sup> Annual Southwest Nutrition and Management Conference, February 26-27, 2009, Tempe, Arizona, USA: 44-52
- Hambling SG, McAlpine AS und Sawyer L (1992): *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins*. Elsevier Applied Science, London: 141-190
- Harrington P, Archer J, Davis JP, Croft DR und Varma JK (2002): Outbreak of Campylobacter jejuni Infections Associated with Drinking Unpasteurized Milk Procured through a Cow-Leasing Program --- Wisconsin, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51 (25): 548-549
- Headrick ML, Korangy S, Bean NH, Angulo FJ, Altekrose SF, Potter ME und Klontz KC (1998): The Epidemiology of Raw Milk-Associated Foodborne Disease Outbreaks Reported in the United States, 1973 Through 1992. *Am J Public Health* 88 (8): 1220
- Heinrichs J und Jones C (2011): *Composition and Hygiene of Colostrum on Modern Pennsylvania Dairy Farms*. Cooperative Extension, DAS 11-171, College of Agricultural Sciences, Department of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA
- Helble S (2008): Milch, Milchprodukte, Milchersatzprodukte und –imitate. Bericht der Untersuchungsämter Baden-Württemberg: [http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema\\_ID=2&ID=887&Pdf=No](http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema_ID=2&ID=887&Pdf=No) (abgerufen am 03.03.2012)

- Herbertz G (2002): *Handbuch Milch – 3.6.8. Salmonellen in Milch und Milcherzeugnissen*. 19. Akt.-Lfg. 12/02, Behr's Verlag, Hamburg: 1-2
- Holt J, Propes D, Patterson C, Clark, Bannerman T, Nicholson L, Bundesen M, Salehi E, DiOrio M, Kirchner C, Tedrick R, Duffy R und Mazurek J (2003): Multistate outbreak of Salmonella serotype Typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk --- Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002—2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 52 (26): 613-615
- Hurley WL und Theil PK (2011): Perspectives on Immunoglobins in Colostrum and Milk. *Nutrients* 3: 442-474
- Huster S (2012): *Studie zu Keimen in Rohmilch auf Tierärztekongress vorgestellt*. Pressemitteilung des 6. Leipziger Tierärztekongresses, 19. bis 21. Januar 2012
- Indyk HE, Williams JW und Patel HA (2008): Analysis of denaturation of bovine IgG by heat and high pressure using an optical biosensor. *Int Dairy J* 18: 359-366
- Jakob E, Mühlemann M, Aebischer-Reic S, Rentsch F und Sieber R (2004): *Sicherheit von Käse*. ALP forum 2004, Nr. 7 d, Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP), Bern: 4-14
- Kelly GS (2003): Bovine Colostrums: A Review of Clinical Uses. *Alternat Med Rev* 8 (4): 378-394
- Kneifel W und Apprich S (2011): *Raw milk quality vs. raw milk safety – Walking a tightrope*. Conference Publication of the International Raw Milk Conference: Raw Milk – Health or Hazard? in Prague, Czech Republic, 20 May 2011: 6-8
- Korhonen H, Marnila P und Gill HS (2000): Bovine milk antibodies for health. *Br J Nutr* 84 (1): 135-146
- Krömker V (2007): *Euterkrankheiten*. In: Krömker V (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey Verlag, Stuttgart: 47-74

- Krömker V (2010): *Mastitis als Faktorenerkrankung*. Präsentation eines Vortrags an der Fachhochschule Dortmund, Fak. II – Bioverfahrenstechnik, Mikrobiologie
- Krüger C (2007): *Die Geschichte des lebensmittelhygienischen Instituts der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med.vet.) durch die Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
- Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ und Mahon BE (2006): Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws – United States, 1993-2006. *CDC Emerging Infectious Diseases* 18 (3): 385-390
- LAVES (2010): *LAVES untersucht Lebensmittel auf das Vorkommen von Listerien*. Bericht des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), Oldenburg: [http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation\\_id=20039&article\\_id=73945&psmand=23](http://www.laves.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=20039&article_id=73945&psmand=23) (abgerufen am 27.02.2012)
- Lecos C (1986): Of Microbes and Milk: Probing America's Worst Salmonella Outbreak. *Dairy Food San* 6: 136-140
- Leedom JM (2006): Milk of Nonhuman Origin and Infectious Diseases in Humans. *Clin Infect Dis* 43 (5): 611-612
- Lehner A, Schneck C, Feierl G, Pless P, Deutz A, Brandl E und Wagner M (2000): Epidemiologic Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to an Outbreak of *Campylobacter jejuni* in an Austrian Youth Centre. *Epidemiol Infect* 125 (1): 13-16
- Levieux D und Ollier A (1999): Bovine immunoglobulin G,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res* 66 (3): 421-430
- Lind L, Reeser J, Stayman K, Deasy M, Moll M, Weltman A, Urdaneta V, Ostroff S, Chiridon W, Campagnolo E und Chen T (2007): *Salmonella Typhimurium*

- Infection Associated with Raw Milk and Cheese Consumption --- Pennsylvania, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56(44): 1161-1164
- Loss G, Apprich S, Waser G, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, Weber J, Sozanska B, Danielewicz H, Horak E, Joost van Neerven RJ, Heederick D, Lorenzen PC, von Mutius E, Braun-Fahrländer C und GABRIELA study group (2011): The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol* 128(4): 766-773
- Merck (2004): *ChromoCult® Coliformen Agar ES – Zum Nachweis von Coliformen in Abwasser und Frischprodukten*. Produktinformation der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Merck (2008): *Tryptic Soy Broth (TSB)*. Merck Microbiology Manual 12<sup>th</sup> Edition
- Mettler Toledo (2013): *Finales Spülwasser CIP validieren mit weniger Wasser und Wartungsaufwand*. Produktinformation der Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland:  
[http://de.mt.com/de/de/home/supportive\\_content/specials/eNews\\_TOC.html](http://de.mt.com/de/de/home/supportive_content/specials/eNews_TOC.html)  
(abgerufen am 17.01.2013)
- Moosbrugger J (2011): *Milchlieferverträge und Marktregelungen in Österreich*. Referat der Landwirtschaftskammer Österreich: [http://www.sgar-ssda.ch/pdfs/weiterbild\\_11\\_09/Referat\\_Moosbrugger\\_16\\_09\\_2011.pdf](http://www.sgar-ssda.ch/pdfs/weiterbild_11_09/Referat_Moosbrugger_16_09_2011.pdf) (abgerufen am 03.11.2012)
- Morrill K, Conrad E und Tyler H (2012): *Nation-Wide Evaluation of Colostrum Quality*. A.S. Leaflet R2711, Iowa State University Animal Industry Report – 2012, Ames, Iowa, USA
- Much P, Salgado-Voss AS, Pichler J, Rendi-Wagner P und Herzog U (2011): *Bericht über Zoonosen und ihre Erreger in Österreich im Jahr 2010*. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH AGES, Bundesministerium für Gesundheit BMG, Wien: 11-32

- Much P, Rendi-Wagner P und Herzog U (2012): *Bericht über Zoonosen und ihre Erreger in Österreich im Jahr 2011*. Bundesministerium für Gesundheit (BMG), Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES), Wien: 14
- Neumeister B und Winklhofer K (1997): *Medizinische Mikrobiologie*. Mediscript-Verlag, Bad Wörishofen: 27-73
- Orland B (2011): *Handeln in Zeiten der Ungewißheit – Tuberkulose, Milch und Tierseuchenbekämpfung im 19. und 20. Jahrhundert*. Internationaler Arbeitskreis für Kulturforschung des Essens, Mitteilungen, Heft 8: 1-18
- Österreichisches Lebensmittelbuch (2011): *Österreichisches Lebensmittelbuch IV. Auflage*. Codexkommission (2006 - 2011): Kapitel B32 (Milch und Milchprodukte)
- Penchev Georgiev I (2008): Differences in Chemical Composition between Cow Colostrum and Milk. *Bulg J Vet Med* 11 (1): 3-12
- Permyakov EA (2004): *Molecular Anatomy and Physiology of Proteins*. Nova Science Pub Inc., Hauppauge, New York, USA: 3
- Perren R und Bates D (2009): Innovation in Lebensmitteln mit Hochleistungsschall. *Lebensmittel-Industrie* Nr. 5/6: 6-7
- Pfunds (2012): *Historie*. Website der Dresdner Molkerei Gebrüder Pfund: <http://www.pfunds.de/historie.htm>. (abgerufen am 02.11.2012)
- Potter ME, Blaser MJ, Sikes RK, Kaufmann AF und Wells JG (1983): Human *Campylobacter* infection associated with certified raw milk. *Am J Epidemiol* 117 (4): 475-483
- Prümmer M (2008): Colostrum , die Urkraft der Natur. *Network-Karriere* Februar 2008: 33
- Rebelein TW (2010): *The Effect of Heat Treatment on Microbiological Qualities of Bovine Colostrum, Passive Immune Transfer of Neonatal Calves, and Future*

*Animal Performance*. Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Reiche T und Mayer J (2007): *HACCP und betriebliche Eigenkontrollen*. Behr's Verlag, Hamburg: 23-53

Rimbach G, Möhring J und Erbersdobler HF (2010): *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1-21

Schneider J, Mohle-Boetani J und Vugia D (2008): Escherichia coli 0157:H7 Infections in Children Associated with Raw Milk and Raw Colostrum from Cows --- California, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57 (23): 625-628

Schweikert L (2012): *Microbiological monitoring of colostrum and colostrum serum during processing*. Master thesis, Universität für Bodenkultur Wien

Shyng S und McIntyre L (2012): *Summary of Food Borne Illnesses & Outbreaks in North America Associated with the Consumption of Raw Milk and Raw Milk Dairy Products (2000-2011)*. British Columbia Centre for Disease Control, Vancouver, Canada: 6

Skiba EA und Khmelev VN (2007): *Sterilization of Milk by Ultrasonics*. Conference Publication of the 8<sup>th</sup> Siberian Russian Workshop and Tutorial on Electron Devices and Materials in Erlagol, Altai, Russia – July 1-5, 2007: 308-310

Smith DeWaal C, Tian XA und Plunkett D (2009): *Outbreak Alert! Analyzing Foodborne Outbreaks 1998 to 2007*. Center for Science in the Public Interest, Washington, District of Columbia, USA: 7

Solomons NW (2002): Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrums concentrates. *Euro J Clin Nutri* 56 (3): 24-28

Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A und Wheeler TT (2009): Immune components of bovine colostrums and milk. *J Anim Sci* 87 (1): 3-9

- St. James J (2011): *Raw Milk under Scrutiny after North Texas Illnesses*. In: WFAA.com. Stand: 20. 04. 2011: <http://www.wfaa.com/news/local/Raw-milk-under-scrutiny-after-North-Texas-illnesses-120321579.html> (abgerufen am 02.03.2012)
- Statistik Austria (2012): *Kuhmilcherzeugung und -verwendung 2011*. Statistik Austria, letzte Änderung: 15.10.2012: [http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/land\\_und\\_forstwirtschaft/viehbestand\\_tierische\\_erzeugung/milch/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/land_und_forstwirtschaft/viehbestand_tierische_erzeugung/milch/index.html) (abgerufen am 02.11.2012)
- Stephan W, Dichtelmüller H und Lissner R (1990): Antibodies from Colostrums in Oral Immunotherapy. *J Clin Chem Clin Biochem* (28): 19-23
- Sterling Technology (2012): *Bovine Colostral Whey Protein/Peptide Concentrates - GRAS Expert Panel Opinion Statement*. Submitted to the Food and Drug Administration by Sterling Technology, Brookings, South Dakota, USA, May 2 2012: 15
- Stolz M, Hackmann W und Stauff D (2008): *Jahresbericht 2007 des CVUA-OWL*. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe (CVUA-OWL), Detmold: 9-15
- Strahm W und Eberhard H (2009): *Trinkmilchtechnologien - Eine Übersicht*. Eidgenössisches Volkswirtschaftsdepartement EVD, Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, ALP-forum 2009, Nr 72d
- Struff WG und Sprötte G (2008): Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: a review--Part II: clinical studies. *Int J Clin Pharmacol Ther* 46 (5): 211-25
- TGAM (2011): *Enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC)*. Tiroler Gesellschaft für Allgemeinmedizin, TGAM - News Juni 2011: [http://www.tgam.at/userupload/editorupload/files/files/Forschung/Leitlinien/tgam\\_leitl\\_ehec\\_juni2011.pdf](http://www.tgam.at/userupload/editorupload/files/files/Forschung/Leitlinien/tgam_leitl_ehec_juni2011.pdf). (abgerufen am 03.03.2012)
- Thermo Fisher Scientific (2010): *Oxoid Brilliance™ Listeria Agar Data Sheet*. Datenblatt der Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

- Thielke S (2009): *Milch ab Hof und Vorzugsmilch – Eine Gegenüberstellung*. Informationsblatt des LAVES-Veterinärinstituts Hannover, Fachbereich 33, Hygieneuntersuchungen von Milch und Milcherzeugnissen, Eiern und Eiprodukten
- UBIC (2012): *The Dry Colostrum Ingredient Market*. Multiclient study brochure by UBC Consulting, USA: <http://www.ubic-consulting.com/template/fs/The%20World%20Colostrum%20Market.pdf> (abgerufen am 05.11.2012)
- Uruakpa FO, Ismond MAH und Akobundu ENT (2002): Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res* 22: 755-767
- Varnam AH und Sutherland JP (2001): *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology*. Food Products Series, Springer US: 76-78
- Vazquez-Landaverde PA, Torres JA und Qian MC (2006): Effect of high-pressure-moderate-temperature processing on the volatile profile of milk. *J Agric Food Chem* 54 (24): 9184-9192
- VSB (2010): *Vorzugsmilch*. In: Verbraucherinformationssystem des Verbraucher Service Bayern VSB, Bayerisches Staatsministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, Stand: 11.11.2010: <http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/lebensmittel/gruppen/vorzugsmilch.htm> (abgerufen am 03.11.2012)
- Waser M, Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrländer C und PARSIFAL Study Team (2006): Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37 (5): 661-670
- Wu M, Wang X, Zhang Z und Wang R (2011): *Isolation and Purification of Bioactive Proteins from Bovine Colostrum*. In: Carpi A (Ed.): *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech Europe, Rijeka, Croatia: 347-366

- Yang B, Shi Y, Xia X, Xi M, Wang X, Ji B und Meng J (2012): Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control* 28 (2): 273-278
- Yilmaz T, Moyer B, MacDonell RE, Cordero-Coma M und Gallagher MJ (2009): *Unpasteurized Milk and Soft Cheese Outbreaks: An Overview of Consumer Safety*. Student Research Essay, Fordham University, New York, USA
- Zangerl P (2007): *Mikrobiologie der Produkte*. In: Krömker V (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey Verlag, Stuttgart: 156-160
- Zetkin M und Schaldach H (1999), *Lexikon der Medizin*. Ullstein Medical, Wiesbaden: 295; 940-941

## 9 ANHANG

**Tabelle 21. Mesophile Gesamtkeimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum**

Probe	mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Rohkolostrum I	$1,20 \cdot 10^8$	$1,10 \cdot 10^8$	$1,15 \cdot 10^8$
Rohkolostrum II	$9,50 \cdot 10^6$	$1,30 \cdot 10^7$	$1,13 \cdot 10^7$
Rohkolostrum III	$1,20 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^8$	$1,25 \cdot 10^8$
Rohkolostrum IV	$6,50 \cdot 10^7$	$7,30 \cdot 10^7$	$6,90 \cdot 10^7$
Magerkolostrum I	$1,10 \cdot 10^7$	$9,40 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^7$
Magerkolostrum II	$8,50 \cdot 10^6$	$7,60 \cdot 10^6$	$8,05 \cdot 10^6$
Magerkolostrum III	$1,10 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^7$	$1,15 \cdot 10^7$
Magerkolostrum IV	$5,00 \cdot 10^6$	$4,90 \cdot 10^6$	$4,95 \cdot 10^6$
inokuliertes Magerkolostrum I	$1,40 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^8$	$1,45 \cdot 10^8$
inokuliertes Magerkolostrum II	$1,60 \cdot 10^7$	$1,70 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^7$
inokuliertes Magerkolostrum III	$1,90 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$1,95 \cdot 10^8$
inokuliertes Magerkolostrum IV	$1,40 \cdot 10^8$	$1,20 \cdot 10^8$	$1,30 \cdot 10^8$

**Tabelle 22. Mesophile Gesamtkeimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums**

Probe	mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
inokuliertes Magerkolostrum II, 60°C, 10 Minuten	$1,30 \cdot 10^6$	$9,70 \cdot 10^5$	$1,14 \cdot 10^6$
inokuliertes Magerkolostrum IV, 60°C, 10 Minuten	$1,40 \cdot 10^7$	$2,30 \cdot 10^7$	$1,85 \cdot 10^7$
inokuliertes Magerkolostrum II, 75°C, 20 Minuten	$3,30 \cdot 10^3$	$1,20 \cdot 10^3$	$2,25 \cdot 10^3$
inokuliertes Magerkolostrum II, strömender Dampf, 30 Minuten	$9,00 \cdot 10^3$	$3,00 \cdot 10^4$	$1,95 \cdot 10^4$
inokuliertes Magerkolostrum IV, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 23. Mesophile Gesamtkeimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums**

<b>Probe</b>	<b>mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm	$3,50 \cdot 10^3$	$3,40 \cdot 10^3$	$3,45 \cdot 10^3$
Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm	$5,80 \cdot 10^3$	$5,50 \cdot 10^3$	$5,65 \cdot 10^3$
Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 400 MPa	$8,90 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^5$	$9,45 \cdot 10^4$
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 500 MPa	$1,70 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^3$	$1,80 \cdot 10^3$
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 400 MPa	$8,50 \cdot 10^4$	$9,10 \cdot 10^4$	$8,80 \cdot 10^4$
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 500 MPa	$1,80 \cdot 10^3$	$2,20 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^3$

**Tabelle 24. Mesophile Gesamtkeimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate**

Probe	mesophile Gesamtkeimzahl [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 25. *Listeria* ssp.-Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum**

Probe	<i>Listeria</i> ssp. [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Rohkolostrum I	$1,70 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^3$	$1,86 \cdot 10^3$
Rohkolostrum II	$7,50 \cdot 10^3$	$1,10 \cdot 10^3$	$4,30 \cdot 10^3$
Rohkolostrum III	$1,10 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^3$	$1,30 \cdot 10^3$
Rohkolostrum IV	$1,70 \cdot 10^2$	$1,03 \cdot 10^2$	$1,37 \cdot 10^2$
Magerkolostrum I	$1,50 \cdot 10^2$	$9,00 \cdot 10^1$	$1,20 \cdot 10^2$
Magerkolostrum II	$2,20 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$	$1,85 \cdot 10^2$
Magerkolostrum III	$1,10 \cdot 10^2$	$1,30 \cdot 10^2$	$1,20 \cdot 10^2$
Magerkolostrum IV	$2,00 \cdot 10^2$	$9,00 \cdot 10^1$	$1,45 \cdot 10^2$
inokuliertes Magerkolostrum I	$5,50 \cdot 10^4$	$9,00 \cdot 10^3$	$3,20 \cdot 10^4$
inokuliertes Magerkolostrum II	$7,30 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^5$	$9,65 \cdot 10^4$
inokuliertes Magerkolostrum III	$4,70 \cdot 10^5$	$8,90 \cdot 10^5$	$6,80 \cdot 10^5$
inokuliertes Magerkolostrum IV	$1,40 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^6$

**Tabelle 26. *Listeria ssp.*-Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums**

<b>Probe</b>	<b><i>Listeria ssp.</i> [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
inokuliertes Magerkolostrum II, 60°C, 10 Minuten	1,70·10 <sup>4</sup>	1,40·10 <sup>4</sup>	1,55·10 <sup>4</sup>
inokuliertes Magerkolostrum IV, 60°C, 10 Minuten	3,00·10 <sup>5</sup>	1,10·10 <sup>5</sup>	2,05·10 <sup>5</sup>
inokuliertes Magerkolostrum II, 75°C, 20 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 27. *Listeria* ssp.-Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums**

Probe	<i>Listeria</i> ssp. [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm	$1,50 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$
Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 28. *Listeria* ssp.-Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate**

<b>Probe</b>	<b><i>Listeria</i> ssp. [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 29. *E.coli*-Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum**

Probe	<i>E. coli</i> [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Rohkolostrum I	< 10	< 10	< 10
Rohkolostrum II	< 10	< 10	< 10
Rohkolostrum III	< 10	< 10	< 10
Rohkolostrum IV	< 10	< 10	< 10
Magerkolostrum I	< 10	< 10	< 10
Magerkolostrum II	< 10	< 10	< 10
Magerkolostrum III	< 10	< 10	< 10
Magerkolostrum IV	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum I	$1,60 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^3$	$1,65 \cdot 10^3$
inokuliertes Magerkolostrum II	$3,50 \cdot 10^3$	$3,50 \cdot 10^3$	$3,50 \cdot 10^3$
inokuliertes Magerkolostrum III	$8,70 \cdot 10^3$	$9,80 \cdot 10^3$	$9,25 \cdot 10^3$
inokuliertes Magerkolostrum IV	$9,50 \cdot 10^3$	$1,10 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^4$

**Tabelle 30. *E.coli*-Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums**

Probe	<i>E.coli</i> [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
inokuliertes Magerkolostrum II, 60°C, 10 Minuten	$1,50 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$1,85 \cdot 10^2$
inokuliertes Magerkolostrum IV, 60°C, 10 Minuten	$1,30 \cdot 10^3$	$8,50 \cdot 10^2$	$1,08 \cdot 10^3$
inokuliertes Magerkolostrum II, 75°C, 20 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 31. *E.coli*-Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums**

<b>Probe</b>	<b><i>E. coli</i> [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 32. *E.coli*-Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate**

<b>Probe</b>	<b><i>E. coli</i> [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 33. *Bacillus* ssp.-Keimzahlen von Rohkolostrum, Magerkolostrum und inokuliertem Magerkolostrum**

Probe	<i>Bacillus</i> ssp. [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Rohkolostrum I	$1,90 \cdot 10^6$	$2,50 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^6$
Rohkolostrum II	$8,70 \cdot 10^5$	$1,20 \cdot 10^6$	$1,04 \cdot 10^6$
Rohkolostrum III	$9,80 \cdot 10^6$	$8,20 \cdot 10^6$	$9,00 \cdot 10^6$
Rohkolostrum IV	$7,50 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^7$	$1,23 \cdot 10^7$
Magerkolostrum I	$9,80 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^6$	$9,90 \cdot 10^5$
Magerkolostrum II	$6,20 \cdot 10^5$	$2,60 \cdot 10^5$	$4,40 \cdot 10^5$
Magerkolostrum III	$1,30 \cdot 10^6$	$2,60 \cdot 10^6$	$1,95 \cdot 10^6$
Magerkolostrum IV	$8,40 \cdot 10^5$	$7,00 \cdot 10^5$	$7,70 \cdot 10^5$
inokuliertes Magerkolostrum I	$7,20 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^7$	$8,60 \cdot 10^6$
inokuliertes Magerkolostrum II	$5,70 \cdot 10^6$	$6,10 \cdot 10^6$	$5,90 \cdot 10^6$
inokuliertes Magerkolostrum III	$2,90 \cdot 10^7$	$4,30 \cdot 10^7$	$3,60 \cdot 10^7$
inokuliertes Magerkolostrum IV	$2,30 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^7$	$2,05 \cdot 10^7$

**Tabelle 34. *Bacillus* ssp.-Keimzahlen des hitzebehandelten inokulierten Magerkolostrums**

Probe	<i>Bacillus</i> ssp. [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
inokuliertes Magerkolostrum II, 60°C, 10 Minuten	$6,80 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^6$	$5,45 \cdot 10^6$
inokuliertes Magerkolostrum IV, 60°C, 10 Minuten	$9,10 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^7$
inokuliertes Magerkolostrum II, 75°C, 20 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, strömender Dampf, 30 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum II, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10
inokuliertes Magerkolostrum IV, Autoklav, 15 Minuten	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 35. *Bacillus* ssp.-Keimzahlen der Mikrofiltrationspermeate und des hochdruckbehandelten Magerkolostrums**

Probe	<i>Bacillus</i> ssp. [KbE/mL]		
	Wert 1	Wert 2	Mittelwert
Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm	$1,10 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$1,60 \cdot 10^2$
Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm	$2,90 \cdot 10^2$	$4,10 \cdot 10^2$	$3,50 \cdot 10^2$
Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum II 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Magerkolostrum IV 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 36. *Bacillus* ssp.-Keimzahlen der hochdruckbehandelten Mikrofiltrationspermeate**

<b>Probe</b>	<b><i>Bacillus</i> ssp. [KbE/mL]</b>		
	<i>Wert 1</i>	<i>Wert 2</i>	<i>Mittelwert</i>
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat I 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat II 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat III 1,4 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 400 MPa	< 10	< 10	< 10
hochdruckbehandeltes Mikrofiltrationspermeat IV 0,8 µm, 500 MPa	< 10	< 10	< 10

**Tabelle 37. IgG-Gehalte von Rohkolostrum, Magerkolostrum und hitzebehandeltem inkuliertem Magerkolostrum**

Probe	Verdünnung	Wert 1 [ng/mL]	Wert 2 [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	[µg/mL]	[mg/mL]	relative Standardabweichung
Rohkolostrum I	400 000	66746000	70004000	68366000	68366,00	68,366	3,37
Rohkolostrum II	400 000	79718000	78221000	78968000	78968,00	78,968	1,34
Rohkolostrum III	400 000	65857000	63440000	64644000	64644,00	64,644	2,64
Rohkolostrum IV	400 000	69849000	66230000	68028000	68028,00	68,028	3,76
Magerkolostrum I	400 000	63320000	73746000	68533000	68533,00	68,533	10,76
Magerkolostrum II	400 000	81900000	75800000	78850000	78850,00	78,850	5,47
Magerkolostrum III	400 000	60840000	61952000	61394000	61394,00	61,394	1,28
Magerkolostrum IV	400 000	76460000	65900000	71180000	71180,00	71,180	10,49
Hitzebehandlung II, 60°C, 10 Min	200 000	70077000	62110000	66001000	66001,00	66,001	8,52
Hitzebehandlung IV, 60°C, 10 Min	200 000	66420711	70508865	68464788	68464,79	68,465	4,74
Hitzebehandlung II, 75°C, 20 Min	50 000	11346000	11034000	11189000	11189,00	11,189	1,97
Hitzebehandlung IV, 75°C, 20 Min	50 000	10132100	10577900	10355000	10355,00	10,355	7,42
Hitzebehandlung strömender Dampf, 30 Min	1	nicht nachweisbar	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Hitzebehandlung Autoklav, 15 Min	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

**Tabelle 38. IgG-Gehalte von hochdruckbehandeltem inokuliertem Magerkolostrum, membranfiltriertem inokuliertem Magerkolostrum und hochdruckbehandeltem Mikrofiltrationspermeat**

Probe	Verdünnung	Wert 1 [ng/mL]	Wert 2 [ng/mL]	Mittelwert [ng/mL]	[µg/mL]	[mg/mL]	relative Standardabweichung
Hochdruck 400 MPa, II	200 000	45039000	41965000	43502000	43502,00	43,502	5,00
Hochdruck 400 MPa, IV	400 000	56689000	53197000	54925000	54925,00	54,925	4,49
Hochdruck 500 MPa, II	200 000	15763000	17257000	16510000	16510,00	16,510	6,40
Hochdruck 500 MPa, IV	400 000	17718000	19354000	18534000	18534,00	18,534	6,24
Permeat 1,4 µm, I	200 000	51022000	47067000	49044500	49044,50	49,045	5,70
Permeat 0,8 µm, II	200 000	36636000	38883000	37759500	37759,50	37,760	4,21
Permeat 1,4 µm, III	200 000	44109000	39772000	41940500	41940,50	41,941	7,31
Permeat 0,8 µm, IV	200 000	47466000	45513000	46489500	46489,50	46,490	2,97
Permeat 1,4 µm, 400 MPa, I	200 000	54201000	51795000	52998000	52998,00	52,998	3,21
Permeat 1,4 µm, 500 MPa, I	200 000	13929000	13966000	13947500	13947,50	13,948	0,19
Permeat 0,8 µm, 400 MPa, II	200 000	42402000	39854000	41128000	41128,00	41,128	4,38
Permeat 0,8 µm, 500 MPa, II	200 000	10196000	9706100	9951050	9951,05	9,951	3,48
Permeat 1,4 µm, 400 MPa, III	200 000	56131000	48893000	52512000	52512,00	52,512	9,75
Permeat 1,4 µm, 500 MPa, III	200 000	14566000	14947000	14756500	14756,50	14,757	1,83
Permeat 0,8 µm, 400 MPa, IV	200 000	35969000	42321000	39145000	39145,00	39,145	11,47
Permeat 0,8 µm, 500 MPa, IV	200 000	13559000	13461000	13510000	13510,00	13,510	0,51