

Teil I (Kurzbericht) des Abschlussbericht zu dem ptble-geförderten Projekt

Entwicklung eines innovativen Waschverfahrens für frischen Schnittsalat auf Basis der nicht- thermischen Plasmatechnologie zur Erhöhung der Produktsicherheit, -qualität und Nachhaltigkeit (SPLASH)

Projektdauer: 15.10.2019 – 30.11.2023

Kontaktdaten:

Dr. Clemens Morath
Leitung Qualitätsmanagement und -sicherung
Gartenfrisch Jung GmbH
Hermann-Jung-Str. 2
74249 Jagsthausen

Inhalt

1	Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand	3
1.1	Aufgabenstellung und Anknüpfungspunkt	3
1.2	Stand der Wissenschaft	4
2	Ablauf des Vorhabens	6
3	Wesentliche Ergebnisse sowie die Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
4	Literatur	26

1 I. Kurzdarstellung

1.1 Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand

1.1.1 Aufgabenstellung und Anknüpfungspunkt

Das Projekt wurde eingangs als Projektskizze zur Deutschen Innovationspartnerschaft Agrar (DIP) konzipiert und nach erfolgreicher Begutachtung als Vollantrag ausgearbeitet und bewilligt. Das Projekt mit dem vollständigen Namen „Entwicklung eines innovativen Waschverfahrens für frischen Schnittsalat auf Basis der nicht-thermischen Plasmatechnologie zur Erhöhung der Produktsicherheit, -qualität und Nachhaltigkeit (Splash)“ wurde 2018 letztendlich von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung durch ihren Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (ptble) bewilligt.

Der Einsatz der Plasmatechnologie im Bereich Lebensmittel stellt, bei einer direkten Ausrichtung auf das Produkt, einen neuen und innovativen Ansatz dar, der zunehmend von Forschungsinstituten und inzwischen auch der Industrie wahrgenommen wird. Ein solches in der bisherigen Forschung unberücksichtigtes Gebiet ist die Kombination aus dem Einsatz der Plasmatechnologie, in Form von plasmaprozessiertem Wasser (PPW), und der Optimierung der Nachhaltigkeit der zum Waschen von Salat eingesetzten Ressourcen, wie Wasser, Strom und Bodenfläche. Dies wird ergänzt durch die toxikologische und sensorische Prüfung der plasmabehandelten Lebensmittel, insbesondere bei geschnittenen, frisch hergestellten und verkauften Erzeugnissen unter Berücksichtigung einer effizienten Hygiene.

Dabei ist das Ziel des Verbundes die Entwicklung eines nachhaltigen, ressourcenschonenden Waschprozesses für frischen Schnittsalat unter Einsatz von PPW, sowie die Feststellung von toxikologischen und sensorischen Änderungen am frisch geschnittenen und gewaschenen Salat nach einer nicht-thermischen dekontaminierenden Plasmabehandlung. Darüber hinaus soll die Transport- bzw. Lagerfähigkeit der Produkte erhalten und bestenfalls optimiert sowie die Entkeimungseffizienz im Waschwasser untersucht werden. Kernpunkt ist eine innovative Entkeimungstechnologie mittels PPW, wobei auch hier die Möglichkeiten des optimierten Ressourceneinsatzes, in Form einer bedarfsgerechten Nachdosierung, erforscht wird. Die Prozessführung wird an die jeweiligen Ergebnisse der mikrobiologischen, toxikologischen und sensorischen Prüfung der Produkte nach Plasmabehandlung und an die Bedingungen zur Transport- und Lagerfähigkeit des plasmabehandelten Schnittsalates angepasst.

Plasmaverfahren stellen einen besonders interessanten technischen Lösungsansatz dar, da auf Grund der Vielfalt der generierten Wirkmechanismen einerseits ein breites Wirkungsspektrum erzielt wird und andererseits eine Adaption der Mikroorganismen an das Verfahren erheblich erschwert und bisher nicht bekannt ist.

Eine optimierte Prozessführung im Waschprozess von frischem Schnittsalat mit integrierten hygienisierenden Agenzien, mechanischen, strömungs- und steuerungstechnischen Anpassungen auf Basis von „hygienic-design“ führt zu mehr Nachhaltigkeit und Ressourcenschonung von Wasser, Strom, Bodenfläche und PPW. Die Ergebnisse der toxikologischen, sensorischen und mikrobiologischen Untersuchungen der Produkte stellen ein entscheidendes Qualitätsmerkmal bei der Beurteilung der Sicherheit, Qualität und Frische dar. So stellen toxikologisch und mikrobiologisch belastete Produkte ein hohes Gesundheitsrisiko durch Humanpathogene wie *Escherichia coli* (EHEC), *Listeria monocytogenes*, Salmonella und Campylobacter für den Konsumenten dar. Hingegen ist der erste Eindruck bei Aussehen und Geruch von Salat ausschlaggebend für eine grundlegende Akzeptanz beim Verbraucher bzw. zur Feststellung der Einhaltung von Qualitätsstandards und der Transport- und Lagerfähigkeit geeignet. Dementsprechend ist es das Ziel, mittels angepasster toxikologischer, sensorischer und mikrobiologischer Analyse die Beeinflussung der PPW Behandlung festzustellen und zu beurteilen (Bewertungsmatrix), sowie die Transport- und Lagerfähigkeit zu berücksichtigen.

1.1.2 Stand der Wissenschaft

In den letzten Jahren war die Behandlung von Lebensmitteln mit nicht-thermischem Plasma von zunehmender Bedeutung in der Forschung (Moreau, Feuilloley et al. 2005, Vleugels, Shama et al. 2005, Kayes, Critzer et al. 2007, Akishev, Grushin et al. 2008, Moreau, Orange and Feuilloley 2008, Leipold, Kusano et al. 2010). Hierbei ist die Produktpalette breit gefächert, von Obst und Gemüse (Critzler, Kelly-Wintenberg et al. 2007, Niemira and Sites 2008, Perni, Shama and Kong 2008, Niemira 2012), über Fleisch (Moon, Kim et al. 2009, Frohling, Durek et al. 2012), Eier und Molkereiprodukte (Song, Kim et al. 2009, Moritz, Wiacek et al. 2021) und Saft (Surowsky, Fischer et al. 2013) bis hin zu Saatgut, Nüssen und Gewürzen (Deng, Ruan et al. 2007). Das Plasma wird hierbei sowohl direkt als auch indirekt eingesetzt. Die antimikrobielle Wirkung ist gut belegt (2-120 s führten zu einer Reduzierung der Keimzahl von 2-5 lg Stufen), aber die Untersuchungen zum Einfluss auf organoleptische Eigenschaften, toxikologische Änderungen und die Transport- und Lagerfähigkeit stehen erst am Anfang (Schlüter, Ehlbeck et al. 2013, Schnabel, Niquet et al. 2015, Schnabel, Sydow et al. 2015). Da jede Plasmaquelle eine spezifische Konstruktion ist und die Parameter stark variieren können, ist eine Vergleichbarkeit zur antimikrobiellen Plasmawirkung bisher nur mikrobiologisch möglich (Ehlbeck, Schnabel et al. 2011). Insbesondere bei frisch geschnittenem Salat sind nicht nur die Verluste in der Nacherntephase vergleichsweise hoch, sondern es besteht auch ein höheres Gefährdungspotential des Konsumenten, durch die potenzielle Belastung mit Humanpathogenen und dem möglichen rohen Verzehr, als bei anderen konservierten Produkten.

FrISChe und vorgeschnittene Salate zählen aufgrund der hohen primären Keimbelastung zu den leicht verderblichen Lebensmitteln und stellen höchste Anforderungen an die Rohstoffe sowie die Verarbeitungstechnologien. Die originäre Keimbelastung von frischem Gemüse liegt zwischen 10^5 - 10^7 KbE/g, mit einem Schwerpunkt auf Vertretern der Gattung *Erwinia* und *Pseudomonas*. Relevant für die Sicherheit ist das Vorhandensein von pathogenen Bakterien wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* (Francis, Thomas and O'beirne 1999, Oliveira, Usall et al. 2011). Bei Untersuchungen vom Bundesinstitut für Risikobewertung zur Keimbelastung von Mischsalaten im Jahre 2008 wurden 5 % der Proben positiv auf *Listeria monocytogenes* getestet (BfR 2010).

Die Hersteller von diesen Produkten sind sich ihrer Verantwortung gegenüber dem Verbraucher bewusst, aber wissen auch um die Problematik der Entfernung von Mikroorganismen sobald diese Erzeugnisse kontaminiert wurden. Innerhalb der Europäischen Union existieren verschiedene Prä-ventionsstrategien zur Vermeidung von Kontaminationen/Kreuzkontaminationen entlang der Wertschöpfungskette. Etablierte Praktiken und Konzepte wie gute Agrarpraxis, gute Herstellungs-praxis und die Gefahrenanalyse (HACCP) sollen das Risiko einer Verunreinigung mit pathogenen Bakterien und Lebensmittelverderbern minimieren. Allerdings gibt es im Herstellungsprozess geschnittener Salate zahlreiche Kontaminationsquellen.

Der Herstellungsprozess beinhaltet verschiedene Waschvorgänge (3 bis 8 Liter Wasser pro kg Salat) mittels Tauch- und Spülverfahren, häufig unter Zusatz von chemischen Agenzien. Einfache Wasch-schritte mit Trinkwasser erreichen maximal eine Keimreduktion von einer Zehnerpotenz. Zusätzlich werden seit vielen Jahren Chlor und Chlorverbindungen als Desinfektionsmittel im verwendeten Prozesswasser, für die Entkeimung der Arbeitsflächen und im europäischen Raum auch direkt für die Entkeimung des Lebensmittels eingesetzt. Typische Chlorbehandlungen beinhalten Konzentrationen zwischen 15-200 ppm bei Kontaktzeiten im Bereich von einigen Minuten. Eine Behandlung mit chlorhaltigem Wasser führt lediglich zu einer Keimreduktion von etwa 1 bis 2 weiteren Zehner-potenzen. Die gesamte Reduktion von 2 bis 4 Zehnerpotenzen ist unzureichend, da die Infektionsdosis humanpathogener Mikroorganismen mit 10 bis 100 KbE/g häufig sehr niedrig und die Ausgangsbelastung von Schnittsalat mit bis zu 10^9 KbE/g sehr hoch ist (Klaiber, Baur et al. 2005).

Gründe für die beschränkte Wirksamkeit können eine starke Anhaftung der Zellen auf der Oberfläche, die Ausbildung schützender Biofilme sowie die Einlagerung von Zellen in Poren oder Spalten sein (z.B. pflanzliche Stomata), wo das Agens nicht einzudringen vermag (Ölmez and Temur 2010).

Darüber hinaus haben Mikroorganismen eine größere Affinität zu den Schnittflächen und die wachsartige Kutikula erschwert eine Benetzung vieler pflanzlicher Lebensmittel. Sofern

pathogene Bakterien nicht entfernt oder inaktiviert werden, können sie als Kontaminationsquelle die weitere Prozessumgebung befallen.

Hohe Konzentrationen an Chlor, in Kombination mit langen Einwirkzeiten, können die sensorischen Eigenschaften der pflanzlichen Lebensmittel beeinflussen und zu einer Bildung schädlicher organi-scher Chloridverbindungen wie Trihalomethan oder Haloessigsäuren führen. Aus diesem Grund ist der Einsatz von Chlor für die Behandlung von Lebensmitteln in Deutschland und einigen Ländern der EU nicht zugelassen.

Da konventionelle und neue Desinfektionsverfahren für die Hygienisierung von Schnittsalaten in der Verarbeitung bisher nur eine begrenzte, häufig unzureichende mikrobizide Effizienz aufweisen, sind die Hersteller von Schnittsalaten auf der Suche nach praxistauglichen Verfahren, die eine sichere Inaktivierung im industriellen Prozess ermöglichen.

1.2 Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben begann planmäßig am 15.10.2019 und endete am 30.11.2023. Es ist leicht zu erkennen, dass der beschriebene Zeitraum auch die Zeit der weltweit wütenden Corona-Pandemie umfasst. Natürlich waren die Projektarbeiten, insbesondere diejenigen, die ein gemeinschaftliches Arbeiten der Partner erforderte, nicht planmäßig durchzuführen.

Allgemein gliederten sich die Arbeiten in 6 Arbeitspakete (AP). AP 1 umfasste die Entwicklung eines optimalen Erzeugungs- und Applizierungsprozesses von plasmaprozessiertem Wasser (engl. plasma processed water, PTW). AP 2 umfasste die Untersuchungen an nativen und technisch relevanten Mikroorganismen, um die Entwicklungsprozesse aus iterativ AP1 zu unterstützen. Weiterhin sollte in diesem AP auch die Wiederverwendbarkeit des Waschwassers hinsichtlich der mikrobiologischen Last untersucht werden. In AP 3 stand die innovative Verfahrensgestaltung und der Aufbau der industriellen Salatwaschstrecke für die PTW-Anwendung im Vordergrund. Final wurde die Salatwaschanlage beim Projektpartner Gartenfrisch Jung installiert und in Betrieb genommen. AP 4 fasste die großskaligen Versuche an der Industrieanlage mit PTW und der Evaluierung ihrer physikalischen Prozessgrößen zusammen. AP 5 wurde dazu genutzt die eruierten Daten und deren Bewertung in Vorbereitung einer Zulassungsstrategie aufzuarbeiten, um zeitnah nach Projektende eine Zulassungsanfrage bei den benannten Behörden stellen zu können. Im letzten Arbeitspaket (AP 6) erfolgte die Koordination und Kommunikation der Projektaufgaben und -ergebnisse. Ein Austausch der Projektpartner über die neu gewonnenen Daten und Erkenntnisse fand regelmäßig über den gesamten Projektzeitraum auf den Projekttreffen statt sowie in regelmäßigen Arbeitstreffen.

1.3 Wesentliche Ergebnisse sowie die Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die wesentlichen Ergebnisse im Projekt umfassen die Konzeptionierung und den Aufbau einer Salatwaschstrecke im hygienic design (HEWA 3800) mit integrierter PTW-Applikation. Dem Aufbau der neuen Anlage in der industriellen Produktion von Gartenfrisch Jung und deren Nutzung im regulären Betrieb mit flexibler PTW-Integration. In Abhängigkeit des Szenarios wurde auf dem verzehrfertigen Schnittsalat eine Reduktion der Gesamtkeimzahl > 2 Ig-Stufen und im Waschwasser bis zu 3 Ig-Stufen erreicht. Gleichzeitig erfolgte keine signifikante Änderung der Produktqualität. Die Sensorik wurde im getesteten Parameterbereich nicht beeinflusst und es wurden keine toxikologischen Auffälligkeiten detektiert. Basierend auf den vielfältigen und umfassenden Ergebnissen wurde eine Zulassungsstrategie vorbereitet. Die positiven Projektergebnisse konnten durch zahlreiche Konferenzbeiträge und Messebeteiligungen der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Öffentlichkeit präsentiert werden.

Im Projekt war eine enge Zusammenarbeit mit den Projektpartnern Kronen GmbH und der Gartenfrisch Jung GmbH als Projektpartner im Teilvorhaben 1 essentiell. Hierzu sollten mit den Partnern folgende primären Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

1. In enger Zusammenarbeit mit dem Partner Kronen wurde eine neuartige Salatwaschstrecke konzipiert und aufgebaut (<https://www.kronen.eu/de/news/erfolgreichste-tests-mit-neuer-entkeimungstechnologie>). Anschließend wurde die Anlage an Gartenfrisch Jung übergeben.
2. In enger Kooperation mit den Projektpartnern Gartenfrisch Jung und ATB-Potsdam wurde das Gesamtkonzept der plasmagestützten Dekontamination von frischen Schnittsalat und dessen Waschwasser erarbeitet.

Zur Lösung der obigen Aufgabenstellungen wurde ebenfalls mit den Unterauftragnehmern TU Potsdam, tentamus GmbH und GPKH Rechtsanwälte ein intensiver Austausch gepflegt. Hier sind insbesondere die Zusammenarbeit im Bereich der Lebensmitteltoxikologie, -sensorik und -rechtsgrundlage zu nennen, die in Zusammenarbeit mit den Unterauftragnehmern der Projektpartner Kronen, ATB und INP durchgeführt wurden.

2 II. Eingehende Darstellung

2.1 Ergebnisse des Forschungsvorhabens

2.1.1 AP 1 Innovativer Waschprozess

AP1 „**Innovativer Plasmaprozess**“ fußte auf den Arbeiten des INPs. Die INP-seitigen Versuche zielten darauf ab, im Labormaßstab PTW-Produktions- und Behandlungsprinzipien zu testen und iterativ zu verbessern. Die Ergebnisse bildeten die Grundlage für das Design einer Großanlage, die in den Versuchen im Technikumsmaßstab Anwendung fand. Weiterhin flossen, die in parallellaufenden Arbeitspaketen gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls in die Konstruktion der Anlage ein. Die erzielten Ergebnisse in diesem Arbeitspaket sind den Berichten des INPs zu entnehmen.

2.1.1.1 Erstellung Lastenheft für die PTW-Erzeugung und Dosierung

Gartenfrisch Jung war in diesem Arbeitspaket, gemeinschaftlich mit allen Projektpartnern, an der Formulierung des Lastenheftes beteiligt. Im Rahmen der im Lastenheft definierten Anforderungen sollte eine optimale Lösung für das Projektziel erarbeitet werden. Dazu wurden die zu Projektbeginn bekannten Verfahren und Vorrichtungen erfasst und ein Ist-Zustand formuliert. Aus der gegebenen Problemstellung und den angedachten Lösungsmöglichkeiten wurde dann der Soll-Zustand definiert und die dafür notwendigen Parameter und Schnittstellen eruiert. Das Lastenheft wurde über die gesamte Projektlaufzeit dynamisch erweitert und angepasst, um die jeweils neu gewonnenen Erkenntnisse in die Lösungsfindung mit einfließen lassen zu können.

In Absprache mit den Projektpartnern Kronen und Gartenfrisch Jung wurden die Randbedingungen der zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten zusammengefasst und daraus die notwendigen Maßnahmen für eine Umsetzung vor Ort in der Produktionsumgebung bei Gartenfrisch Jung abgeleitet. Erhöhter Aufwand wurde insbesondere in den Bereichen Platzbedarf, technische Schnittstellen und Arbeitssicherheit ersichtlich.

2.1.2 AP 2 Produktqualität & Sicherheit

2.1.2.1 Design relevanter Prüfkörper

Im AP2 „Design relevanter Prüfkörper“ sollten sowohl Salatvarietäten und deren Schnittgröße als auch der Waschprozess an sich definiert werden, um mit diesen festgelegten Parametern die mikrobiologischen Untersuchungen im Labormaßstab beginnen zu können.

Aus den Ergebnissen und Vorkenntnissen des abgeschlossenen Projektes „SafeFresh“ (FKZ: 13N12427) konnte die Datenlage genutzt werden, um den 5-stufigen Waschprozess (Vorbild,

Vordüse, Vorwäsche, Hauptwäsche, Klarwasserspülung) in Absprache mit den Projektpartnern Gartenfrisch und Kronen auf einen industrienahen 2- oder 3-stufigen Waschprozess (Hauptwäsche, Düse, ggf. Klarwasserspülung) zu reduzieren und möglichst wassersparend zu arbeiten. Gleichzeitig wurde der für die Produkthaltbarkeit sehr wichtige Schleuderprozess mit integriert (Abbildung 1).

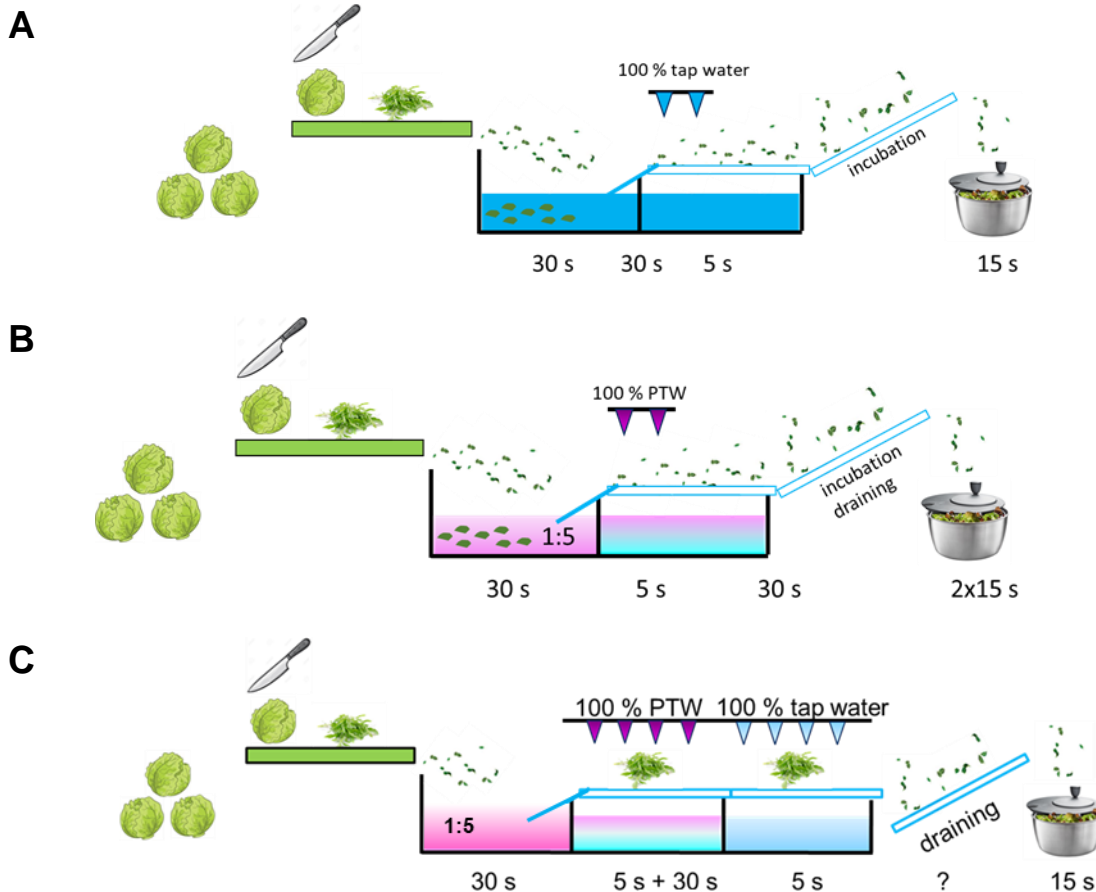


Abbildung 1:

Hinsichtlich der pflanzlichen Prüfkörper (Salat) wurde sich in einem ersten Schritt auf frischen grünen Schnittsalat geeinigt, der je nach Verfügbarkeit Endivie, Kopfsalat oder Batavia beinhaltete. Der Salat wurde auf Grund der geringen Mengen, die im Labormaßstab benötigt werden, vor Ort in Greifswald bei einem Bio-Händler erworben. Für spätere Versuche im Projektverlauf wurden in Vorbereitung der Technikumsversuche auch die Mischsalatvariante „Pariser Mischung“ (Endivie, Frisée, Radicchio) und Baby Leaf Salatmischungen (Spinat, grüner Eichblatt, Rucola, Lollo rosso, Mizuna) eingeplant. Die Schnittgröße wurde spezifiziert, sodass der frische Schnittsalat Schnittkanten von 2 bis 4 cm hatte.

Da das INP im AP2.2 die Waschprozessentwicklung mikrobiologisch begleitete, wurde sich für die mikrobiologischen Analysen mit GFJ auf die Testung der Gesamtkeimzahl geeinigt. Die spezifischeren Analysen fanden im AP2.3 seitens des ATB statt.

2.1.2.2 AP 2.2 Prozessbegleitende Mikrobiologie

Dieses AP unterteilte sich in zwei größere Arbeitsbereiche. Im ersten Projektzeitraum (2019-2021) konzentrierten sich die Arbeiten auf die Prozessentwicklung (AP1.2 und AP1.3) zur PTW-Applikation für die Wäsche von frischem Schnittsalat und die Definition/Optimierung der Prüfkörper (AP2.1) mittels mikrobiologischer Untersuchungen im Labormaßstab. Im zweiten Projektzeitraum (2022-2023) wurden die Erkenntnisse aus dem AP1 und ersten Teil AP2 (Labor) in die Produktionsumgebung von Gartenfrisch Jung im Technikumsmaßstab übertragen und in Kombination mit AP1.4, AP4 und AP5 mikrobiologische Untersuchungen zur Gesamtkeimzahl, Vitalität und Viabilität durchgeführt.

2019 - 2021

Im AP2.2 wurden die zuvor im AP2.1 festgelegten Waschprozessparameter, Prüfkörper und mikrobiologischen Bestimmungen mit Hilfe der am INP konzipierten und aufgebauten Mini-Variante der Waschstrecke (Abbildung 3 aus Zwischenbericht 2020) in insgesamt 6 verschiedenen Waschprozessvariationen (Abbildung 5, Abbildung 6 aus Meilensteinbericht) auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit auf dem Salat untersucht, um möglichst frühzeitig auch die notwendige Reduktion von 2 log₁₀ zu erreichen.

Die mikrobiologischen Analysen zur Gesamtkeimzahl (native Belastung) in den unterschiedlichen Waschprozessen berücksichtigten nicht nur den direkten antimikrobiellen Einfluss während des Waschens (Tag 0) sondern auch den Einfluss auf die Lagerfähigkeit (Tag 1 und 7). Alle Untersuchungen fanden im Vergleich zur Nutzung von Leitungswasser (INP-Qualität) statt. Im PTW-Waschprozess wurden unterschiedliche PTW-Konzentrationen (100%PTW, 50%PTW:50%Brauchwasser, 10%PTW:90%Brauchwasser, 20%PTW:80%Brauchwasser) getestet, um aus Sicht der Industrie Ressourcen-schonend zu arbeiten (Wasser, Energie). Im Weiteren wurden die Prozesszeiten der gesamten Waschstrecke von anfangs 180 s auf 95 s reduziert, um ebenfalls den industriellen Anforderungen gerecht zu werden. Außerdem wurden Szenarien mit und ohne Klarspülschritt untersucht, um ebenfalls Ressourcen und Zeit zu sparen. Darüber hinaus wurde die Anordnung der Wasch- und Spülschritte variiert.

Im Ergebnis dieser Versuchsreihen im Labormaßstab konnte die notwendige Reduktion von mindestens 2 log₁₀ auf dem Salat erzielt werden (Abbildung 5 aus Zwischenbericht 2020, Abbildung 7-9 aus Meilensteinbericht 2021). Die Untersuchungen zur metabolischen Aktivität (XTT-Assay) und zur Membranintegrität (LiveDead-Assay) (Abbildungen 2-4 aus Zwischenbericht 2021) der auf dem Salat verbliebenen Mikroorganismen zeigten, dass die durch PTW-Einsatz ausgelösten Reaktionen zu einem verstärkten Ablösen der Mikroflora als auch Abtöten dieser zurückzuführen war. Zusätzlich konnte ein möglicher Übergang zum

viable-but-nonculturable-status (VBNC) einiger Mikroorganismen in einigen Waschszenarien nicht ausgeschlossen werden. Ob es sich eher um ein Abtöten oder Ablösen handelte, konnte mit Hilfe der Untersuchungen zum Waschwasser untersucht werden.

Im Zusammenhang mit dem Waschen des frischgeschnittenen Salates wurde auch das Waschwasser mikrobiologisch untersucht (CFU-, XTT-, LiveDead-Assay). Dies diente weiteren Erkenntnissen, ob die Mikroflora durch den Einsatz von PTW, wenn vermehrt abgelöst (Detachment), im Waschwasser aktiv überlebt und daher anschließend durch weitere Dekontaminationsmöglichkeiten wie UV-Strahlung abgetötet werden müsste oder ob das PTW im Waschwasser weiterhin auch hier antimikrobiell wirkt und nicht durch aufzehrende Oxidationsprozesse (vergleichbar zu Ozon) an Wirkung verliert.

Auch im Waschwasser war eine Reduktion der Gesamtkeimzahl erkennbar (Ausgangskonzentration des Salates minus Reduktion auf dem Salat minus Zunahme MO im Waschwasser), diese liegt im Bereich von 1 bis 5 log₁₀-Stufen, abhängig vom Lagerungstag und der Entnahmestelle und kann durch Integration von Insekten- und Sandfang, sowie PTW-Frischzufuhr in den Technikumsversuchen ggf. gesteigert werden.

Die Untersuchungen zur Zunahme/Reduktion der Mikroorganismen im Waschwasser, zur metabolischen Aktivität als auch Membranintegrität der verbleibenden Mikroflora im Waschwasser (Abbildung 5 aus Zwischenbericht 2021) zeigten, dass ein Großteil der Salat-Mikroflora im Waschprozess abgewaschen wird (2-4 log₁₀). Eine Inaktivierung im Waschwasser ist auch bei Berücksichtigung der Ergebnisse für die metabolische Aktivität (Reduktion möglich) und die Membranintegrität (deutlich reduziert) gegeben.

Das Waschszenario mit einer 20%PTW:80%Brauchwasser-Konzentration im Waschbecken und einem zusätzlichen Klarspülschritt zeigte in den Laborversuchen die bestmögliche Reduktion für die Kombination aus Salat- und Waschwasserdaten.

Insgesamt scheint im Waschwasser durch das PTW eher ein biozider (Abtöten) als biostatischer (VBNC) Effekt zu beobachten zu sein.

Da allerdings in allen Waschszenarien metabolische Aktivität als auch Membranintegrität sich lediglich Null annähern, ist eine zusätzliche Behandlung des Waschwassers ggf. mit UV-Strahlung weiterhin zu empfehlen.

Der direkte Vergleich zwischen der dekontaminierenden Kapazität im Waschwasser von Chlordioxid und PTW soll erst im Technikumsmaßstab erfolgen, um reale Waschverhältnisse mit berücksichtigen zu können. Dies betrifft insbesondere wirkungsaufzehrende Waschwasserbestandteile wie Insekten, Steine und Sand, die im experimentellen Design des

Labormaßstabes nicht entfernt werden können und die Wirkung der antimikrobiellen Komponenten und damit auch die Vergleichbarkeit negativ beeinflussen können.

Im Rahmen von vorherigen Untersuchungen in einer längeren Waschstrecke (basierend auf dem BMEL/BLE-Projekt SafeFresh FKZ 13N12427) mit 5 Waschschritten und deutlich längeren Waschzeiten konnten im Labormaßstab für PTW im gleichen Waschszenario höhere mikrobielle Inaktivierungen auf dem Salat erzielt werden als für ClO₂ (15 ppm), siehe Schnabel, Balazinski et al. 2021. Dabei sind die eingesetzten 15 ppm ClO₂ schon deutlich höher als im allgemeinen industriellen Einsatz mit Trinkwasser (0,2 ppm). Für das Waschwasser wurde der Effekt vor dem Projekt SPLASH noch nicht untersucht.

Da die Produktsicherheit immer in Kombination mit dem Erhalt der Produktqualität betrachtet werden muss, wurden am INP zusätzlich einfache Farbuntersuchungen zum C-Wert (Chroma) der frisch geschnittenen und gewaschenen Salate innerhalb der jeweiligen Waschprozesse durchgeführt (Abbildung 6 aus Zwischenbericht 2020). Dadurch gab es einen einfach detektierbaren zusätzlichen Parameter zur Überprüfung der Qualitätsbeeinflussung, um einen ersten Eindruck zu erhalten und hierbei auch dem Projektpartner ATB Daten für das AP 2.4 zur Verfügung stellen zu können.

Die Farbanalysen ergaben keinen negativen Einfluss auf den frisch geschnittenen und PTW-gewaschenen Salat im Vergleich zum Einsatz von Leitungswasser im Labormaßstab.

Ein weiterer Aspekt der Produktsicherheit/-qualität sind beim Prüfkörper Salat auch die Konzentrationen an Ionen mit Richt-/und Grenzwerten wie Nitrat und Nitrit, als auch mit wertgebendem Inhalt wie einiger Kationen. Dafür wurden am INP sowohl ionenchromatografische Untersuchungen am Salat als auch am Waschwasser durchgeführt. Die Informationen zum Waschwasser ergaben zusätzlich ein besseres Verständnis der PTW-Wirkmechanismen.

Die Ergebnisse (Tabelle 1 aus Zwischenbericht 2021) für den unbehandelten und behandelten Salat zeigten, dass die verzehrfertige Probe (gewaschener, geschleuderter, verpackter Salat) in allen untersuchten Labor-Szenarien die zulässigen Nitratwerte (Eisbergsalate mit 2000-2500 mg NO₃ kg⁻¹ und andere frische Salate mit 2500-4500 mg NO₃ kg⁻¹ nach (Verordnung (EG) Nr 1881/2006) deutlich unterschritt. Der unbehandelte Salat enthielt 1251,82 ± 200,88 mg NO₃ kg⁻¹, die mit Leitungswasser gewaschenen Salate enthielten 350,57±5,79 mg NO₃ kg⁻¹ bis 1630,90±284,45 mg NO₃ kg⁻¹ und die mit PTW gewaschenen Salate enthielten 1861,21 ± 225,86 mg NO₃ kg⁻¹ bis 1905,95 ± 936,11 mg NO₃ kg⁻¹.

Unabhängig von der eingesetzten PTW-Konzentration und einem Klarspülschritt am Ende der Waschstrecke bleibt die Lebensmittelsicherheit in Bezug auf Nitrat gegeben.

Für Nitrit gibt es keine offiziellen Richtwerte, aber eine Empfehlung der maximal täglichen Aufnahmemenge 0,07 mg/kg Körpergewicht. Dies bedeutet bei 60 kg Körpergewicht 4,2 mg als maximale tägliche Aufnahmemenge. Nur im Waschszenario mit der besten Wirkung im Waschwasser und auf dem Salat enthielt der Salat am Ende der PTW-Waschstrecke noch $7,69 \pm 2,30$ mg NO₂ kg⁻¹, dadurch könnte eine 60 kg schwere Person täglich nicht mehr als 545 g dieses Salates essen. Diese Menge wird üblicherweise nicht täglich verzehrt.

In den anderen Waschszenarien war kein Nitrit mehr nachweisbar.

Auch bezogen auf die Nitritwerte war somit die Lebensmittelsicherheit für den Konsumenten gegeben.

2022 - 2023

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den durchgeführten großskaligen Technikumsversuchen in industrieller Umgebung, die hier zusammengefasst werden. Teilweise wurde zu den Versuchen bereits im Zwischenbericht 2022 berichtet. Bei der Durchführung der Technikumsversuche fließen die Arbeiten aus den APs 2.2, 2.3, 4.3 und 4.4 zusammen.

Die optimalsten Szenarien der Laborversuche - aus mikrobiologischer, technischer und industrieller Sicht - wurden ab 2022 im Industriemaßstab untersucht.

Insgesamt konnten im Jahr 2022 sechs Industrieversuche durchgeführt werden (Übersicht Tabelle 1). Die ersten drei Versuchsreihen dienten der Etablierung der Versuche vor Ort in Jagsthausen bei Gartenfrisch Jung - Versuch 1 – und der praktischen Testung der Versuchsdurchführung mittels der Leitungswasserreferenzen – Versuch 2 und 3. Hierbei wurden bereits Variationen, wie niedrig und stark kontaminiertes Waschwasser im Hauptbecken und die Kombination von Prozesswasser mit UV-C, untersucht. Grundsätzlich enthält das bei Gartenfrisch Jung genutzte Prozesswasser (sauberes Ausgangswasser) zur Salatwäsche geringe Mengen an ClO₂, sodass die Kombination von ClO₂ mit PTW ebenfalls untersucht wurde, da sie automatisch vorlag.

In den 3 weiteren Versuchsreihen wurden PTW-Szenarien getestet. Diese angesetzten Versuchsreihen umfassten zwei Versuchsreihen ohne den Klarspülschritt, jedoch mit einer Variation der hohen und niedrigen Ausgangsbelastung des Waschwassers. Eine niedrige Belastung sollte eine mikrobiologisch saubere Anlage, wie sie in der Produktion bei Gartenfrisch Jung nach der nächtlichen Reinigung (CIP/SIP-Verfahren) zu finden ist, simulieren. Eine mikrobiologisch verschmutzte Anlage dient der Simulation einer, nach längerer Laufzeit, verwendeten Anlage. Diese Versuche dienten der Sammlung von Erfahrungswerten hinsichtlich der Verwendung von PTW in Anlagen mit unterschiedlichen

Grundbelastungen (siehe auch AP1.4). Außerdem wurde in der letzten Versuchsreihe im Jahr 2022 das PTW-Szenario mit einem Klarspülschritt untersucht. Der Klarspülschritt ist eine empfohlene Verfahrensweise, deren Implementierung ggf. nötig wäre.

Tabelle 1: Übersicht über die im Jahr 2022 durchgeführten Versuchsreihen im Industriemaßstab beim Projektpartner Gartenfrisch Jung.

Zeitraum	Tätigkeit
KW 03/2022	Training
KW 13/2022	Leitungswasser, niedrige organische Belastung im Waschwasser
KW 25/2022	Leitungswasser, hohe organische Belastung im Waschwasser, UV-C
KW 34/2022	PTW, hohe organische Belastung im Waschwasser
KW 36/2022	PTW, niedrige organische Belastung im Waschwasser
KW 47/2022	PTW, niedrige organische Belastung im Waschwasser, Klarspülen

Aus den 6 Versuchsreihen von 2022 lagen sehr umfangreiche Datensätze vor, da jede Versuchsreihe mit 3 biologischen und 3 technischen Replikaten sowohl für die Salat- als auch die Waschwasserproben von den Partnern ATB und INP analysiert wurde.

Die Erkenntnisse aus den ersten 6 Versuchsreihen flossen in die weiteren 3 Versuchsreihen im Jahr 2023 mit ein, um zum einen durch Wiederholungen Datensätze zu komplettieren, weitere Szenarien auf diesem sehr Industrie-realen Niveau zu testen/ zu optimieren und um Proben für die zulassungsrelevanten toxikologischen Untersuchungen (AP 5), im Anschluss an deren Etablierung beim UAN tentamus GmbH, bereit zu stellen.

Durchgeführt und untersucht wurden die in Tabelle 2 zusammengefassten Szenarien.

Die 2023-Versuchsreihen untersuchten in Versuchsreihe 7 eine höhere Konzentration von PTW im Waschwasser des Waschbeckens (50% PTW zu 50% Prozesswasser). Hingegen enthielten alle anderen Szenarien mit PTW im Waschbecken ein Verhältnis von 20% PTW und 80% Prozesswasser. In der Versuchsreihe 8 wurde das Szenario aus Versuchsreihe 5 (KW36/2022) mit UV-C kombiniert und die Versuchsreihe 9 diente der Wiederholung der Versuchsreihe 2 (KW13/2022), um eine bessere Datenlage zu erreichen.

Tabelle 2: Übersicht über die im Jahr 2023 durchgeführten Versuchsreihen im Industriemaßstab beim Projektpartner Gartenfrisch Jung.

Zeitraum	Tätigkeit
KW 08/2023	PTW (50:50 Verhältnis), hohe organische Belastung im Waschwasser
KW 11/2023	PTW (20:80 Verhältnis), niedrige organische Belastung im Waschwasser, UV-C
KW 16/2023	Leitungswasser, niedrige organische Belastung im Waschwasser

Untersucht wurden für Salat- und Waschwasserproben 1) die Gesamtkeimzahl (GKZ, total viable count, TVC) zur Bestimmung der Vermehrungsfähigkeit; 2) die metabolische Aktivität (XTT, auf Basis der ATP-Umsetzung durch Dehydrogenasen) zur Unterscheidung zwischen Bau- und Erhaltungsmetabolismus (VBNC); 3) die Zellwand/-membranintegrität (Live/Dead) zur Unterscheidung zwischen intakten (lebenden) und defekten (toten) Mikroorganismen; und 4) die Konzentration an Nitrit und Nitrat in den Proben mittels Ionenchromatographie (IC). Die Ergebnisse zu den Versuchsreihen 1-6 wurden im Zwischenbericht 2022 beschrieben. Die Ergebnisse der Versuchsreihen 7-9 sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Reduktionsfaktor (RF) als Differenz zwischen Kontrolle und Probe, metabolische Aktivität (XXT, Kontrolle 100%) und Membranintegrität (Live/Dead, Kontrolle 100%), Konsumentenprobe nach dem Schleudern. ND = nicht detektierbar

Szenario	RF auf GKZ (KbE/mL) basierend	XTT (%)	Live/Dead (%)	Nitrit/Nitrat (mg/L)
PTW:Prozesswasser (50:50)	2,5	26	64	ND / 905
PTW:Prozesswasser (20:80), UV-C	2,0	60	65	ND / 670
Leitungswasser 100%	0,6	82	78	ND / 1174

Für die Salatproben wurden zusätzlich 1) Farbmessungen auf Basis des L*a*b Systems und 2) Chlorophyllmessungen (Gesamtchlorophyllgehalt) zur Analyse der Qualität untersucht. Die Ergebnisse zu den Versuchsreihen 1-6 wurden im Zwischenbericht 2022 beschrieben. Die Ergebnisse der Versuchsreihen 7-9 sind in Tabelle 4 dargestellt.

Darüber hinaus wurden 3) erste toxikologische Untersuchungen für die spezifische Matrix Salat und spezifische Fragestellung der PTW-Behandlung durch die tentamus GmbH als UAN

in 2022 mittels Laborproben etabliert und validiert. Für die Versuchsreihen 7-9 wurden toxikologische Untersuchungen an Proben aus dem Industriemaßstab durchgeführt. Für das Szenario aus KW8/2023 wurden Zytotoxizität, Mutagenität und Genotoxizität untersucht, da hierbei die höchste Gesamtkonzentration an PTW eingesetzt wird. Für die Versuchsreihen 8 und 9 wurden Zytotoxizität und Mutagenität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen sind auch für das AP5 wichtig.

Tabelle 4: Chroma-Wert (Farbe) und Gesamtchlorophyllgehalt von Kontrolle und Probe, Konsumentenprobe nach dem Schleudern.

Szenario	Farbe (Chroma-Wert basierend auf L*a*b)		Gesamtchlorophyllgehalt (mg/g Frischmasse)	
	unbehandelt	Konsumentenprobe	unbehandelt	Konsumentenprobe
PTW:Prozesswasser (50:50)	44	46	17	13
PTW:Prozesswasser (20:80), UV-C	51	45	7	8
Leitungswasser 100%	43	42	28	32

Tabelle 5: Toxikologische Untersuchungen basierend auf Zytotoxizität mittels Verdau in 3 Zelllinien, Mutagenität mittels Ames-Test mit 5 Salmonella-Stämmen, Genotoxizität mittels Micronucleus-Tests in V79-Zellen und Comet-Tests in Caco-2-Zellen. Genotoxizität wurde nur für das PTW:Prozesswasser-Szenario 50%:50% getestet. NU = nicht untersucht.

Szenario	Zytotoxizität (Verdau-Modell – Caco-2/V79/L929 – bis 10%)	Mutagenität (Ames-Test – TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537)	Genotoxizität (Comet-Test (CaCo-2) und Micronucleus-Test (V79))
PTW:Prozesswasser (50:50)	nicht-zytotoxisch	nicht mutagen (bis 20%)	nicht genotoxisch
PTW:Prozesswasser (20:80), UV-C	nicht-zytotoxisch	nicht mutagen (bis 20%)	NU
Leitungswasser 100%	nicht-zytotoxisch	nicht mutagen (bis 20%)	NU

Für die Wasserproben wurden zusätzlich 1) pH-Werte und 2) Leitfähigkeit bestimmt, um bessere Aussagen zur Wasserqualität treffen zu können. Die Ergebnisse zu den Versuchsreihen 1-6 wurden im Zwischenbericht 2022 beschrieben. Die Ergebnisse der Versuchsreihen 7-9 sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Wachstumsfaktor (GF) als Differenz zwischen Kontrolle und Probe, metabolische Aktivität (XTT, Kontrolle 100%) und Membranintegrität (Live/Dead, Kontrolle 100%), Waschwasser im Kreislauf mit und ohne PTW, mit Salat. ND = nicht detektierbar

Szenario	GF auf GKZ (KbE/mL) basierend	XTT (%)	Live/Dead (%)	Nitrit/Nitrat (mg/L)	pH/ Leitfähigkeit (µS/cm)
PTW:Prozesswasser (50:50)	0,0	153	91	39 / 941	2,2 / 4448
PTW:Prozesswasser (20:80), UV-C	0,0	113	147	28 / 588	2,6 / 2563
Leitungswasser 100%	2,6	128	104	ND / 28	7,8 / 1011

Mit den vielversprechenden Ergebnissen zu den PTW-basierten Waschvarianten für den Salat und das Waschwasser konnte eine umfangreiche Datensammlung (stichpunktartig unten zusammengefasst) für die Entwicklung einer Zulassungsstrategie (AP5) umgesetzt werden und ein Konzeptpapier für die zuständigen Behörden nach Projektende im Dezember 2023 verfasst werden. Zusätzlich wurde ein besseres Verständnis für die antimikrobielle Wirkweise des PTW und essentielle Prozessparameter entwickelt.

Stichpunktartige Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammengefasst ergibt sich für die Salat- und Wasserproben in allen untersuchten Szenarien folgendes Ergebnis:

Salatproben

- 1) Die GKZ wurde durch Leitungswasser mit ClO₂ um 0,0 lg-Stufen bei einer hohen Ausgangsbelastung im Waschwasser und um ca. 1,0 lg-Stufen bei einer niedrigen Ausgangsbelastung im Waschwasser reduziert.

- 2) Die GKZ wurde durch den PTW-Einsatz in der Waschstrecke um 2,5 lg-Stufen bei einer hohen Ausgangsbelastung im Waschwasser und um bis zu 2,2 lg-Stufen bei einer niedrigen Ausgangsbelastung im Waschwasser reduziert.
- 3) Beim Einsatz von PTW nahm die Reduktion der GKZ über die Waschstrecke zu, d.h. die Reduktion war am höchsten in der Entnahmestelle 2 (Konsumentenprobe).
- 4) Beim Einsatz von PTW blieb die Reduktion der GKZ zum Lagerbeginn (Tag 1 & 2) stabil. Am Lagertag 8 konnten noch Unterschiede (bis zu 1,0 lg-Stufen) in der GKZ zwischen Leitungswasser und PTW festgestellt werden, da die überlebenden Mikroorganismen teilweise wieder aufwachsen.
- 5) Die metabolische Aktivität der verbliebenen Mikroorganismen auf dem Salat wird nicht vollständig reduziert (niedrigster Wert 26%), d.h. eine Entstehung von VBNC-Zuständen könnte möglich sein.
- 6) Da die metabolische Aktivität der Mikroorganismen beeinflusst ist, kann die Reduktion der GKZ auf dem Salat auf mechanisches Ablösen (Anstieg im Waschwasser), eine Abtötung durch PTW und in geringem Maß auf VBNC zurückgeführt werden.
- 7) Ein Einfluss auf die Zellwand-/ Zellmembranintegrität der verbliebenen Mikroorganismen auf dem Salat konnte in den Live/Dead-Assays bestätigt werden. Dies gilt in geringem Ausmaß für Leitungswasser und in hohem Ausmaß für PTW. D.h. die Zellen werden durch PTW deutlich abgetötet.
- 8) Hinsichtlich der Lebensmittelqualität konnten beim Salatwaschen mit Leitungswasser oder PTW keine Unterschiede für die Farbe und den Gesamtchlorophyllgehalt des Salates festgestellt werden.
- 9) Geringe Nitrit-Konzentrationen wurden unabhängig von den Waschszenarien im Salat nur gemessen, wenn bereits die ungewaschene Salatprobe Nitrit enthielt. Die Nitrit-Werte blieben dann stabil.
- 10) Nitrat hingegen wurde in allen Salat-Proben (ungewaschen, gewaschen) unabhängig vom Szenario detektiert. Alle Werte lagen unterhalb von 2100 mg/kg und erfüllen die Vorschriften.
- 11) Die toxikologischen Untersuchungen von Leitungswasser- und PTW-gewaschenem Salat zeigten keine zytotoxischen Effekte im Verdau-Modell, keine Mutagenität im Ames-Test und keine Genotoxizität auf Basis von Mikronukleus- und Comet-Assay, auch bei höchster PTW-Konzentration von 50% im Waschwasserbecken.

Wasserproben

- 12) Die TVC-Analyse der Wasserproben ergab sowohl für 100% Leitungswasser als auch 100% PTW kein mikrobiologisches Wachstum. Im Brauchwasser zu Versuchsbeginn

befanden sich bei niedriger Ausgangsbelastung 0,5 lg CFU/ml und bei hoher Ausgangsbelastung > 3 lg CFU/ml.

- 13) Die Entnahmestellen 1 (Hauptwaschbecken und Kreislauf) und 2 (Schleuder) zeigten je nach untersuchtem Szenario einen Anstieg der GKZ im Waschwasser, hierbei häufiger an der Entnahmestelle 2.
- 14) Die direkte Verdünnung von 100%igem PTW mit dem Brauchwasser (20%:80% oder 50%:50%) zeigte bei niedriger Ausgangsbelastung eine Reduktion von 0,7 lg CFU/ml und bei hoher Ausgangsbelastung eine Reduktion von 2,2 lg CFU/ml.
- 15) Der Einsatz von UV-C im Leitungswasserkreislauf hielt die Ausgangskonzentration im Waschwasser während des Waschprozesses stabil.
- 16) Im Waschwasser wurde durch den Einsatz von PTW eine bis zu 2,6 lg-Stufen höhere Reduktion im Vergleich zu purem Leitungswasser gesehen. Dies geschieht zusätzlich zu der vorher beschriebenen Reduktion der Mikroorganismen auf dem Salat selbst.
- 17) Im Waschwasser konnte kein reduzierender Einfluss auf die metabolische Aktivität der verbliebenen Mikroorganismen festgestellt werden. Der VBNC-Zustand scheint hier nicht einzutreten.
- 18) Ebenso, wie schon bei den Salatproben, konnte auch im Waschwasser ein reduzierender Einfluss auf die Membran- / Zellwandintegrität der Mikroorganismen festgestellt werden. Die reduzierte TVC im Waschwasser lässt sich daher auf eine Abtötung durch mechanische Schärkräfte und durch die antimikrobielle Wirkung von PTW zurückführen.
- 19) Im Waschwasser für die Szenarien mit Leitungswasser konnte kein Nitrit festgestellt werden. In den PTW-basierten Szenarien war es durch die Zugabe des PTW nachweisbar.
- 20) Im Waschwasser für die Szenarien mit Leitungswasser konnte Nitrat festgestellt werden. In den PTW-basierten Szenarien war es ebenfalls durch die Zugabe des PTW nachweisbar. Hier deutlich höher konzentriert als im Leitungswasser mit bis zu 1100 mg/l.
- 21) Die IC-Messungen zu den Nitrit- und Nitratwerten im Wasser zeigten auch, dass vermutlich nur eine geringe Aufzehrung beider Komponenten während des Waschens auftritt.
- 22) Die im Waschwasser gemessenen pH-Werte und Leitfähigkeiten spiegeln den Einsatz von PTW und dessen Konzentration wider. Ggf. können diese Parameter als Messindikatoren genutzt werden.

2.1.3 AP 3 Innovativer Waschprozess

2.1.3.1 AP 3.1 Erstellung Lastenheft

Im Rahmen der im Lastenheft definierten Anforderungen ist eine optimale Lösung für das Projektziel erarbeitet worden. Dazu wurden die vorhandenen Gegebenheiten erfasst und die Problemstellung des Waschprozesses unter dem Einsatz von PTW formuliert. Aus dieser Problemstellung und den angedachten Lösungsmöglichkeiten wurde dann der Lösungsansatz und die dafür notwendigen Parameter und Schnittstellen definiert. Dies führte zu einer spezifischen Salatwaschmaschine mit integrierter PTW-Applikation und einer Kreislaufführung des Waschwassers.

2.1.3.2 Entwicklung von Einsatzstrategien von UV-C zum Waschwasserrecycling

Neben der zu entwickelnden Strategie für einen neuartigen Waschprozess wurde auch eine Einsatzstrategie für ein UV-C basiertes Wasserrecycling entwickelt. Dieses Verfahren wurde ausschließlich zur Aufbereitung des Waschwassers konzipiert und sollte nicht den PTW-basierten Prozess unterstützen. Natürlich ist davon auszugehen, dass unbehandeltes Wasser von der Wäsche organische Inhaltsstoffe enthält, die potentiell die Wirkstoffe des PTWs aufzehren könnten. So flankiert eine UV-C basierte Wasseraufarbeitung den Waschprozess in positiver Weise.

Die Anlage wurde von dem Projektpartner Kronen konzipiert und zur Verfügung gestellt. Vor Ort konnte die Anlage anschließend in die für die großskaligen Versuche geplante Produktionslinie integriert werden. Gartenfrisch Jung unterstützte die Integration dieses Schrittes mit seinem Know-How hinsichtlich ähnlicher Methoden.

Abbildung 2 zeigt die UV-C Anlage, die in die Produktionslinie bei Gartenfrisch Jung integriert wurde. Bei der Anwendung von UV-C-Strahlung handelt es sich um ein Verfahren, dessen Wirkprinzipien seit langer Zeit bekannt sind. Hier wird der Bereich des elektromagnetischen Spektrums mit Wellenlängen unterhalb des sichtbaren Lichtes (380-780 nm) zwischen 200-280 nm genutzt. UV-Licht wird in vielen Bereichen zur Oberflächendesinfektion oder zur Aufarbeitung von Flüssigkeiten genutzt. UV-Licht kann als hochenergetische Strahlung Reaktionen anstoßen, die zur Degeneration von Mikroorganismen führen kann. So deckt sich beispielsweise weitgehend die Wellenlänge der UV-C Strahlung mit dem Absorptionsmaximum bakterieller DNA, was hier einen photochemischen Prozess auslöst (z. B. „Dimerbindung“ von Thymin-Nukleotidbasen). In der Folge wird die Replikation der Mikroorganismen-DNA beeinträchtigt oder sogar verhindert, was zur Abtötung der Zelle bzw. der Population führen kann. Die Eindringtiefe von UV-C-Strahlung in trüben, flüssigen Medien wie z. B. Säften ist allerdings sehr begrenzt. Sie ist also

von der Art der Flüssigkeit, ihrem Absorptionsvermögen, gelösten, kolloidalen oder suspendierten Stoffen abhängig, so dass die Strahlung in der Regel schon nach wenigen Millimetern vollständig absorbiert wird.



Abbildung 2: UV-C Anlage zur Aufbereitung des Waschwassers

Von besonderer Bedeutung ist die Ermittlung des Abtötungspotentials von Mikroorganismen durch eine UV-C- sowie alternative Behandlungen. Hierzu werden als Leitkeime *E. coli*, Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Milchsäurebakterien (*Lactobacillus brevis*) und thermophile Sporenbildner (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) in flüssige Lebensmittel (z.B. Apfelsaft) eingebracht. Anhand der Inaktivierungskinetiken dieser fruchtsaftrelevanten Verderbsorganismen kann die Wirksamkeit bzw. Effizienz einzelner sowie kombinierter Behandlungsmethoden ermittelt und mit anderen Verfahren verglichen werden. Mit Hilfe der Dosimetrie werden die verfahrenstechnischen Parameter zur Verfahrens- und Anlagenauslegung (Scale-Up) ermittelt. Außerdem wird der Einfluß einer UV-C-Behandlung auf Inhaltsstoffe, Mikroflora und die Bildung toxikologisch relevanter Substanzen untersucht.

2.1.4 AP 4 Großskalige Versuche

2.1.4.1 Erstellung des Lastenhefts für die Durchführung von großskaligen Versuchen

Das Lastenheft wurde ähnlich wie unter AP1.1 dargelegt, für die großskaligen Versuche zu Projektbeginn 2019 angelegt und im Projektverlauf überprüft sowie im Dezember 2021 mit der Abnahme der Anlage (AP3) abgeschlossen.

2.1.4.2 Test der Einsatzstrategie von UV-C zum Waschwasserrecycling

Die in Abbildung 2 gezeigte Anlage (A) versorgte die ebenfalls in Abbildung 2 gezeigte Produktionslinie (D). Die bodennahe, gräuliche Rohrleitung (C) versorgt dabei die säulenartige Anlage (A) mit verschmutztem Brauchwasser, das in der Säule mittels UV-C behandelt wird. Über Versorgungsleitungen (B) wird die Anlage anschließend mit dem UV-C behandelten Wasser versorgt. Das können wie in Abbildung 2 gezeigt Waschbecken oder Sprinkleranlagen sein. So kann eine bzw. mehrere Anlagen entlang einer Produktionslinie diese ressourcenschonend mit gereinigtem Brauchwasser versorgt werden. Schwebteile und ähnliche Verschmutzungen können durch eine UV-C Behandlung allerdings nicht entfernt werden.

Die UV-C Versuchsanlage wurde in diesem AP wie in Abbildung 2 zu sehen in die geplante Fertigungslinie integriert. Dazu wurden vorab in bilateraler Absprache mit dem Konstrukteur der Anlage (Projektpartner Kronen GmbH) die Planung, grundlegende Funktionen und Zuläufe und Abläufe der Anlage besprochen und umgesetzt.

2.1.4.3 Planung und Umsetzung der baulichen Maßnahmen für großskalige Versuche

In diesem Arbeitspaket wurde die neue Salatwaschmaschine (HEWA 3800) vor Ort bei Gartenfrisch Jung erstmalig in Betrieb genommen und in der herkömmlichen Produktion getestet. Für die Versuchsreihen 1 bis 3 und 9 wurde dieser Aufbau ebenfalls genutzt (siehe AP2). Eine Integration von UV-C war möglich. Die Salatwaschmaschine wurde vom Anlagenbauer Kronen einerseits bezüglich Waschprozess und Hygiene optimiert, andererseits wurde diese auch an die baulichen Bedingungen bei Gartenfrisch Jung angepasst. An die Salatwaschmaschine wurde ein Salatputztisch vorgeschaltet und eine Schleuder sowie Austrageband nachgeschaltet, wobei Salatputztisch und Austrageband seitens Gartenfrisch Jung separat angeschafft wurden und die Schleuder vorhanden war aber überarbeitet wurde. Die Ausrichtung der gesamten Anlage wurde an die räumlichen Bedingungen angepasst (siehe Abbildung 2).

2.1.4.4 Tests der neuen Salatwaschmaschine mit Wasser

Zur Demonstration der Wirksamkeit der entwickelten Ansätze sollten Versuche im großskaligen, industrierelevanten Maßstab (350 kg Salat/ Stunde) im AP4 durchgeführt werden. Dies umfasst, die Darstellung der mikrobiologischen Inaktivierungsleistung, die Quantifizierung produktspezifischer Behandlungsintensitäten und die qualitative Wirkung auf

das Produkt unter besonderer Berücksichtigung der Produktionsumgebung (Temperatur, Feuchtigkeit, high care Bereich). Die besondere Herausforderung bestand darin, die großskaligen Versuche mit den Erfordernissen der täglichen Salatproduktion bei Gartenfrisch Jung zu koordinieren.

Die Funktionsweise der neuen, optimierten Salatwaschstrecke mit hygienic design wurde im Einsatz mit Leitungswasser als auch mit PTW erprobt. Dabei erfolgten Untersuchungen hinsichtlich der antimikrobiellen Effekte auf dem Salat und im Waschwasser zum Verständnis der Wirkmechanismen, Kreuzkontaminationsquellen und Aufzehrungseffekten im Waschwasser mit/ohne PTW. Am Ende der umfangreichen Untersuchungen lagen auch genügend Ergebnisse zur Beurteilung der Waschszenarien, für eine ggf. notwendige Zulassung, vor.

2.1.4.5 Tests der neuen Salatwaschmaschine mit PTW

In diesem AP wurde die neue Waschstrecke (HEWA 3800) bei Gartenfrisch Jung mit der PTW-Applikation kombiniert. Dazu wurde der Düsenaufsatz für Prozesswasser (Leitungswasser) entfernt oder für einen Klarspülschritt entlang der Waschstrecke nach hinten verschoben. An die Stelle des regulären Sprühaufsatzes wurde der PTW-Sprühaufsatz integriert. Das PTW wurde wie in AP 1.4 beschrieben, außerhalb der Produktionshalle hergestellt und zum Produktionsort per IBC-Container verbracht. Der antimikrobielle Einfluss von PTW wurde in 6 verschiedenen Szenarien mit verschiedenen Ausgangsbelastungen, PTW-Konzentrationen und in Kombination mit UV-C intensiv untersucht (AP2). Ebenso erfolgten Untersuchungen zur Produktqualität, -sensorik (ATB) und -toxikologie und Untersuchungen zum Waschwasser (AP2).

2.1.4.6 Untersuchen der Kombination aus Waschwasserrecycling und dem Einsatz von PTW

Der vollständige Prozess aus PTW-Erzeugung, Konditionierung (Anschmutzungsgrad) und anschließender spezifischer Waschvorgang (Versuchsreihe) unterlag chargenbedingt unterschiedlicher mikrobiologischer Last. So wurden auch Szenarien erstellt, bei denen gezielt verschmutztes Wasser (siehe Tabelle 1 und 2 „hohe organische Belastung“) in die Versuchswaschmaschine eingeleitet wurde, um dadurch den Effekt des eingebrachten PTW in Abhängigkeit vom Verschmutzungsgrad zu erfassen. Während aller Versuchsreihen wurden dazu vor und nach dem Waschprozess Wasserproben an unterschiedlichen Stellen entnommen und analysiert.

Aus den daraus gewonnenen Ergebnissen können zukünftig Bewertungen hinsichtlich Reduktionsleistung und Toxizität vorgenommen werden, um das Waschwasser für einen längeren Zeitraum als bisher im Waschprozess zu belassen, ohne die Produktsicherheit und Produktqualität negativ zu beeinflussen (siehe Tabelle 6).

2.1.5 AP 5 Vorbereitung und Zulassung

2.1.5.1 *Auswertung der großskaligen Versuche in Hinblick auf eine Zulassung*

Die Auswertung der großskaligen Versuche (AP4 und AP2) erfolgte aus technischer, biologischer, chemischer und lebensmitteltechnologischer Sicht aller Projektpartner (Forschung und Industrie). Die mikrobiologischen und toxikologischen Ergebnisse für die Versuchsreihen 1-9 sind im AP2 beschrieben. Die Qualitätsuntersuchungen sind ebenfalls im AP2 beschrieben, sowie bei Projektpartner ATB. Das ATB hat auch die sensorischen Untersuchungen beschrieben. Die technische Umsetzbarkeit mit ökonomischer Sichtweise wurde durch den Einsatz der projektspezifischen Hewa3800 bei Gartenfrisch Jung realisiert und als sinnvoll bewertet. Nach Vorlage aller Daten wurde gemeinsam das Versuchsszenario 7 für die Zulassungsstrategie favorisiert. Da hier die Versuchsergebnisse den Rückschluss auf eine mikrobiologische Inaktivierung der nativen Mikroflora auf dem Salat von einem Reduktionsfaktor $> 2 \log_{10}$ KbE/ml und im Waschwasser von 2-3 \log_{10} KbE/ml bei gleichzeitigem Erhalt der Produktqualität, ohne sensorische oder toxikologischer Nebenwirkungen zulassen. Daher wurde im AP5.3 dieses Szenario eingebunden und im Konzeptpapier aufgenommen.

2.1.5.2 *Entwicklung Zulassungsstrategie*

Aufgrund der nicht abzusehenden Verzögerungen im Projektablauf, unter anderem einer längeren Etablierungsphase der toxikologischen Untersuchungen durch den notwendigen Wechsel des UAN, haben sich Teile der Versuchsdurchführungen an der Industrieanlage in das Jahr 2023 verschoben. Damit verschob sich auch die Entwicklung der Zulassungsstrategie, da diese auf den gesamten Versuchsergebnissen aus dem Industriemaßstab fußte. In sehr enger und intensiver Kooperation der Projektpartner und des UAN GPKH durch Beratungen und Besprechungen konnte zum Projektende Oktober/November 2023 eine Strategie festgelegt werden. Hierbei wurde festgelegt, welches Szenario den PTW-Einsatz in der Salatwäsche am besten abbildet und in die Erarbeitung eines Zulassungskonzeptes einfließt. Wie in AP5.2 dargestellt, wurde das Szenario mit der höchsten PTW-Konzentration gewählt. Dieses Szenario wurde im Anschluss an das Projektende im Dezember 2023 in einem Zulassungskonzept für die Landesbehörden in Baden-Württemberg umfänglich beschrieben und mit wissenschaftlichen Daten unterlegt. Anschließend wurden im Januar und Februar 2024 noch Rücksprachen mit allen Partnern und dem UAN durchgeführt und das Konzept finalisiert. Eine erste Vorlage erfolgte bei den Behörden durch die GPKH (Mandatsträger der Projektpartner) im März 2024. Der weitere Verlauf der Zulassung des PTW-Verfahrens zur Salatwäsche wird in der Projektverwertung berücksichtigt.

2.1.6 AP 6 Projektkoordination & Meilensteine

Die Dokumentation der Arbeiten, das Anfertigen von Berichten sowie das Schreiben von Veröffentlichungen haben die gesamte Projektlaufzeit begleitet. Ferner sind die Ergebnisse des Projektes auf Tagungen präsentiert und für Vorlesungen genutzt worden. Ein Wechsel des Projektkoordinators im Projektjahr 2023 aus gesundheitlichen Gründen, bedingte eine kurzfristige Projektverlängerung um 2 Monate für die Einarbeitungsphase des neuen Projektkoordinators.

3 Literatur

- Akischev, Y., M. Grushin, V. Karalnik, N. Trushkin, V. Kholodenko, V. Chugunov, E. Kobzev, N. Zhirkova, I. Irkhina and G. Kireev (2008). "Atmospheric-pressure, nonthermal plasma sterilization of microorganisms in liquids and on surfaces." Pure and Applied Chemistry **80**(9): 1953-1969.
- BfR, B. f. R. (2010). Hohe Keimbelastung in Sprossen and küchenfertigen Salatmischungen. Nr.026/2010. Bonn, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).
- Critzer, F. J., K. Kelly-Wintenberg, S. L. South and D. A. Golden (2007). "Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces." Journal of food protection **70**(10): 2290-2296.
- Deng, S., R. Ruan, C. K. Mok, G. Huang, X. Lin and P. Chen (2007). "Inactivation of Escherichia coli on almonds using nonthermal plasma." Journal of food science **72**(2): M62-M66.
- Ehlbeck, J., U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, T. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen and K. D. Weltmann (2011). "Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination." Journal of Physics D-Applied Physics **44**(1).
- Francis, G. A., C. Thomas and D. O'beirne (1999). "The microbiological safety of minimally processed vegetables." International Journal of Food Science & Technology **34**(1): 1-22.
- Frohling, A., J. Durek, U. Schnabel, J. Ehlbeck, J. Bolling and O. Schluter (2012). "Indirect plasma treatment of fresh pork: Decontamination efficiency and effects on quality attributes." Innovative Food Science & Emerging Technologies **16**: 381-390.
- Kayes, M. M., F. J. Critzer, K. Kelly-Wintenberg, J. R. Roth, T. C. Montie and D. A. Golden (2007). "Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma." Foodborne Pathogens and Disease **4**(1): 50-59.
- Klaiber, R. G., S. Baur, G. Wolf, W. P. Hammes and R. Carle (2005). "Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination." Innovative Food Science & Emerging Technologies **6**(3): 351-362.
- Leipold, F., Y. Kusano, F. Hansen and T. Jacobsen (2010). "Decontamination of a rotating cutting tool during operation by means of atmospheric pressure plasmas." Food control **21**(8): 1194-1198.
- Moon, S. Y., D.-B. Kim, B. Gweon, W. Choe, H. Song and C. Jo (2009). "Feasibility study of the sterilization of pork and human skin surfaces by atmospheric pressure plasmas." Thin Solid Films **517**(14): 4272-4275.
- Moreau, M., M. Feuilloley, N. Orange and J. L. Brisset (2005). "Lethal effect of the gliding arc discharges on *Erwinia* spp." Journal of applied microbiology **98**(5): 1039-1046.
- Moreau, M., N. Orange and M. G. J. Feuilloley (2008). "Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination." Biotechnology Advances **26**(6): 610-617.
- Moritz, M., C. Wiacek, T. Weihe, J. Ehlbeck, K. D. Weltmann and P. G. Braun (2021). "Effect of cold atmospheric pressure plasma treatment of eggshells on the total bacterial count inoculated *Salmonella* Enteritidis and selected quality parameters." Plasma processes and polymers **18**(1): 2000061.
- Niemira, B. A. (2012). "Cold plasma decontamination of foods." Annual review of food science and technology **3**: 125-142.
- Niemira, B. A. and J. Sites (2008). "Cold plasma inactivates *Salmonella* Stanley and *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on golden delicious apples." Journal of Food Protection **71**(7): 1357-1365.
- Oliveira, M., J. Usall, I. Viñas, C. Solsona and M. Abadias (2011). "Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves." Food microbiology **28**(3): 590-596.
- Ölmez, H. and S. Temur (2010). "Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce." LWT-Food Science and Technology **43**(6): 964-970.
- Perni, S., G. Shama and M. G. Kong (2008). "Cold Atmospheric Plasma Disinfection of Cut Fruit Surfaces Contaminated with Migrating Microorganisms." Journal of Food Protection **71**(8): 1619-1625.
- Schlüter, O., J. Ehlbeck, C. Hertel, M. Habermeyer, A. Roth, K. H. Engel, T. Holzhauser, D. Knorr and G. Eisenbrand (2013). "Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods." Molecular nutrition & food research **57**(5): 920-927.

Schnabel, U., R. Niquet, O. Schlüter, H. Gniffke and J. Ehlbeck (2015). "Decontamination and Sensory Properties of Microbiologically Contaminated Fresh Fruits and Vegetables by Microwave Plasma Processed Air (PPA)." Journal of Food Processing and Preservation **39**(6): 653-662.

Schnabel, U., D. Sydow, O. Schlüter, M. Andrasch and J. Ehlbeck (2015). "Decontamination of fresh-cut iceberg lettuce and fresh mung bean sprouts by non-thermal atmospheric pressure plasma processed water (PPW)." Modern Agricultural Science and Technology **1**(1): 23-39.

Song, H. P., B. Kim, J. H. Choe, S. Jung, S. Y. Moon, W. Choe and C. Jo (2009). "Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*." Food Microbiology **26**(4): 432-436.

Surowsky, B., A. Fischer, O. Schlueter and D. Knorr (2013). "Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system." Innovative Food Science & Emerging Technologies **19**: 146-152.

Vleugels, M., G. Shama, X. T. Deng, E. Greenacre, T. Brocklehurst and M. G. Kong (2005). "Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control." IEEE Transactions on Plasma Science **33**(2): 824-828.