

Online-Monitoring der Sterilisationsgüte in aseptischen Lebensmittelverpackungen mittels Sensortechnologie

Farnoosh Vahidpour¹, Torsten Wagner¹ und Michael J. Schöning^{1,2}

¹Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), FH Aachen, Jülich, Deutschland

²Institut für Biologische Informationsprozesse (IBI-3), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland
Kontakt: vahidpour@fh-aachen.de

Einleitung

Die Verpackungssterilisation in der Lebensmittelindustrie ist einer der wichtigsten Schritte der aseptischen Abfüllung, deren Ziel es ist, kundensichere und langzeitstabile Lebensmittel zu liefern. Dafür wurden mehrere Methoden entwickelt, um die Qualität der Lebensmittel, wie z.B. Milch, zu kontrollieren [1]. Als ein Sterilisationsmittel für Verpackungen in aseptischen Abfüllmaschinen ist Wasserstoffperoxid eines der am häufigsten verwendeten Mittel [2], da es sich zu Wasser und Sauerstoff zersetzt, welche absolut umweltfreundliche Endprodukte darstellen [3]. H_2O_2 wird bei niedrigen Temperaturen flüssig und bei hohen Temperaturen gasförmig aufgebracht. Die Anwendung von H_2O_2 wird kombiniert mit der Anwendung von Heißluft oder Strahlung, um H_2O_2 -Rückstände zu entfernen [2,4,5]. Beim Einsatz von H_2O_2 in Gasform zur Sterilisation von Verpackungen spielen physikalische und chemische Faktoren eine Rolle, da sie einen direkten Einfluss auf die Qualität der Sterilisation haben. Daher werden Kontroll-Setups konzipiert, mit denen die Bedingungen in der Sterilisationskammer vordefiniert und überprüft werden können.

Um die Zuverlässigkeit der aseptischen Bedingungen nachzuweisen, werden bisher traditionelle mikrobiologische Tests eingesetzt. *Bacillus atrophaeus*-Sporen (resistente Mikroorganismen gegenüber dem Sterilisationsmittel) werden dem Sterilisationsmedium ausgesetzt, deren Abtötungsrate bestimmt und die Sterilisation abgeschlossen. Dabei werden typischerweise mikrobiologische Tests, wie z.B. Endpunkttest und Zählreduktionstest [6], genutzt. Ein solches Verfahren hat jedoch den Nachteil aufwendiger Laboranalytik und langsamer Antwortzeit, da die Ergebnisse frühestens nach 48 Stunden erhalten werden können. Um dies zu umgehen, sind neue Methoden zur Online-Überwachung von großem Interesse. In den letzten Jahren wurden spezifischere Verfahren entwickelt, um die Sterilisationsbedingungen durch gasförmiges H_2O_2 zu bestimmen, wie z.B. elektrochemische, konduktometrische oder kolorimetrische Verfahren [7-9]. Die meisten dieser Methoden können jedoch aufgrund von Problemen mit der Transportfähigkeit, Probenvorbereitung oder Reaktionszeit nicht in die Online-Überwachung mit einbezogen werden.

Das Ziel der jüngsten Forschungsarbeiten ist es deshalb, die Sterilisationsbewertungen kostengünstiger durchzuführen und sie auf ein höheres Niveau der Online-Überwachung zu bringen. Parallel sollen die mikrobiologischen Prozesse beschleunigt werden, so dass die Sterilisationsqualität immer noch konsistent bleibt [10-12].

Um dieses Problem zu lösen, wurde kürzlich eine neuartige Sensorplattform auf Basis eines sporenbasierten Biosensors vorgestellt [13]. In der vorliegenden Arbeit wird dieser mit einem kalorimetrischen H_2O_2 -Gassensor auf einem einzigen Chip kombiniert, um die Lebensfähigkeit von Sporen zu bewerten und die gasförmige H_2O_2 -Konzentration und die H_2O_2 -Temperatur zu bestimmen.

Methoden und Materialien

Kalorimetrischer Gassensor

Zur Bestimmung der H_2O_2 -Temperatur und der H_2O_2 -Konzentration während des aseptischen Prozesses mit gasförmigem H_2O_2 wurden flexible kalorimetrische Gassensoren auf Basis von Polyimidfolien untersucht [14]. Dabei wurde der kalorimetrische Gassensor als differentieller Aufbau zweier identischer metallischer Mäanderstrukturen konzipiert [12]. Diese Strukturen wurden mittels Dünnschichttechnik hergestellt. Es wurden Mäanderstrukturen mittels Photolithographie definiert und anschließend 20 nm Ti und 200 nm Pt auf den Sensor aufgedampft. Mittels Lift-off-Technik wurden die Metallrückstände von der Sensoroberfläche entfernt und damit die Sensorherstellung abgeschlossen. Die beiden Mäanderstrukturen wurden mittels einer Passivierungsschicht passiviert [15] (in diesem Fall SU-8), um zu vermeiden, dass die Metallstruktur direkt dem gasförmigen H_2O_2 ausgesetzt wird. Im Anschluss wurde eines der beiden Sensor-Elemente durch einen Katalysator (in diesem Fall MnO_2) aktiviert, wie in Abb. 1 gezeigt ist. Bei Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von gasförmigem H_2O_2 (0; 2,2; 4,1; 5,7; 7,1 und 7,7% v/v), mit einer Gasströmungsgeschwindigkeit von 10 m^3/h und einer Gastemperatur von 240 °C, reagiert der Katalysator auf H_2O_2 und zersetzt es in die

umweltfreundlichen Endprodukte Wasser und Sauerstoff. Die bei dieser Reaktion entstehende Wärme wird vom aktiven Temperaturwiderstand am Sensor-Aufbau gemessen, wie in Gleichung 1 beschrieben ist:

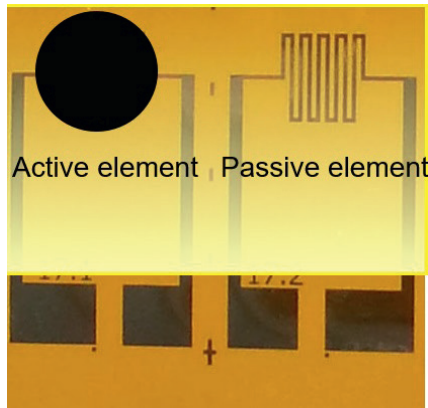


Abbildung 1: Photographische Darstellung zweier identischer Mäanderstrukturen mit Passivierungs- und Aktivierungsschichten auf der kalorimetrischen Gassensoroberfläche.

Die Differenz zwischen denen vom aktiven und passiven Element gemessenen Temperaturen stellt das Messsignal dar, das als Sensorgröße dient. Dieses Signal entspricht der H_2O_2 -Konzentration. Auf der Plattform wurde ein kalorimetrischer Gassensor in Kombination mit dem sporenbasierten Biosensor zur gleichzeitigen Erfassung von Temperatur und H_2O_2 -Konzentration integriert, um so die Qualität der Sterilisation zu erfassen.

Sporenbasierter Biosensor

Als Referenz zum Sterilisationsprozess wurde der sporenbasierte Biosensor auf der Plattform des kombinierten Chemo- und Biosensors für mikrobiologische Experimente eingesetzt. Der Sensor wurde entwickelt, um die Sterilisationsbedingungen von *B. atrophaeus* DSM 675 mit einer Ausgangskeimzahl von 10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml unter verschiedenen Faktoren zu bestimmen. Dieser Aufbau bestand aus zwei identischen interdigitalen Elektrodenstrukturen (IDEs). Die Elektroden wurden, ähnlich wie der kalorimetrische Gassensor, mittels Dünnschichttechnik hergestellt.

Die Sporen wurden auf einer der IDEs immobilisiert. Die Details der Oberflächenvorbereitung und Sporenimmobilisierung wurden bereits zuvor beschrieben [10,16]. Der sporenbasierte Biosensor (kombiniert mit dem kalorimetrischen Gassensor) wurde in der Sterilisationskammer platziert und verschiedenen, oben genannten Konzentrationen von

gasförmigem H_2O_2 ausgesetzt (bei einer Gasströmungsgeschwindigkeit von $10 \text{ m}^3/\text{h}$ und einer Gas Temperatur von 240°C). Die Impedanzsignale der IDEs wurden vor und nach der Sterilisation bewertet und der Unterschied zwischen den Signalen als eine durch die Sterilisation verursachte Veränderung der Sporen bewertet. Die Signalantworten (Impedanz) der sporenbasierten Biosensoren wurden bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen untersucht.

Parallel dazu wurden die Sporen bei der Sterilisation mit gasförmigem H_2O_2 mittels REM-Analyse auf jegliche Morphologieänderung hin charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2 skizziert schematisch das kombinierte Sensorarray, bestehend aus dem sporenbasierten Biosensor (oben) und dem kalorimetrischen Gassensor (unten). Die auf diesem Array entwickelten differentiellen Setups ermöglichen es, die Parameter des Sterilisationsprozesses gleichzeitig chemisch und mikrobiologisch zu charakterisieren.

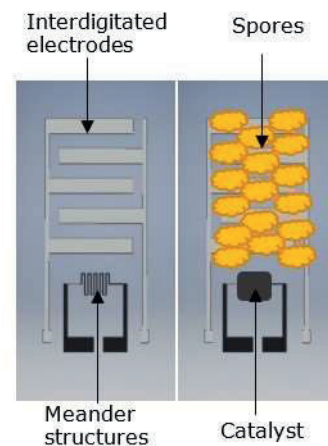


Abbildung 2: Schematische Darstellung des kalorimetrischen Gassensors und des sporenbasierten Biosensors kombiniert auf einer einzigen Sensorplattform.

Abbildung 3 stellt typische Messkurven des kalorimetrischen Gassensors dar. Die schwarze Kurve zeigt die Temperaturmessung des aktiven Elements, bei der der Katalysator mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen reagiert. Hier steigt die Temperatur mit Zunahme der H_2O_2 -Konzentration. Die rote Kurve zeigt die vom passiven Element gemessene Temperatur, die sich in Bezug auf die H_2O_2 -Anwendung weniger ändert. Im unteren Teil der Grafik ist die Temperaturdifferenz der beiden Elemente grün eingezeichnet. Diese Temperaturdifferenz dient als Sensorsignal und entspricht den unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen, die während des Sterilisationsprozesses appliziert werden (s. auch rechte x-Achse und

in blau gestrichelte H_2O_2 -Konzentration). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die vom kalorimetrischen Gassensor erfasste Temperaturdifferenz mit steigender H_2O_2 -Konzentration zunimmt und daher eine Korrelation zwischen diesen kritischen Faktoren im Sterilisationsprozess gezogen werden kann.

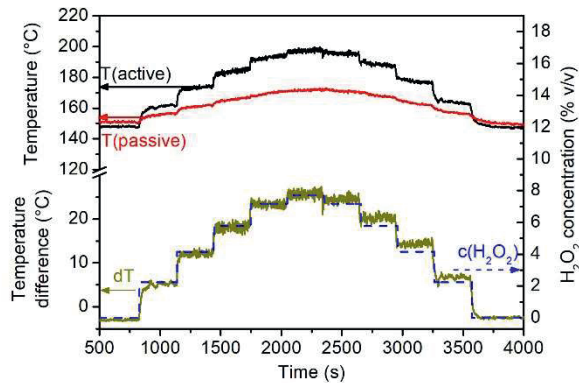


Abbildung 3: Messkurven der Temperatur des aktiven (schwarz) und des passiven (rot) Elements des kalorimetrischen Gassensors, sowie die Temperaturdifferenz (grün), die dem Sensorsignal entspricht und mit der H_2O_2 -Konzentration korreliert.

Abbildung 4 beinhaltet die REM-Aufnahmen zur morphologischen Untersuchung der IDE-Strukturen und der Sporen vor und nach dem Sterilisationsprozess. Die beiden oberen Bilder zeigen die Elektrodenstrukturen und die Sporen vor der Sterilisation, die unteren Bilder zeigen die Sporen nach dem Sterilisationsprozess. Eine Veränderung der Morphologie der Sporen, d.h. eine Deformation kann durch die REM-Analyse nachgewiesen werden. Diese Änderungen führen zu einer Änderung der Impedanz-Signale, die von den Interdigital-Elektroden mittels Impedanzspektroskopie erfasst werden. Die normierten Impedanzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Normiertes Impedanz-Signal, das mit dem sporenbasierten Biosensor in Bezug auf die unterschiedlich angewendeten H_2O_2 -Konzentrationen erzielt wurde.

H_2O_2 -Konzentration (% v/v)	Normierte Impedanz (%)
Blanker Sensor	100
0	94
2,2	95
4,1	92
5,7	87
7,1	88
7,7	83

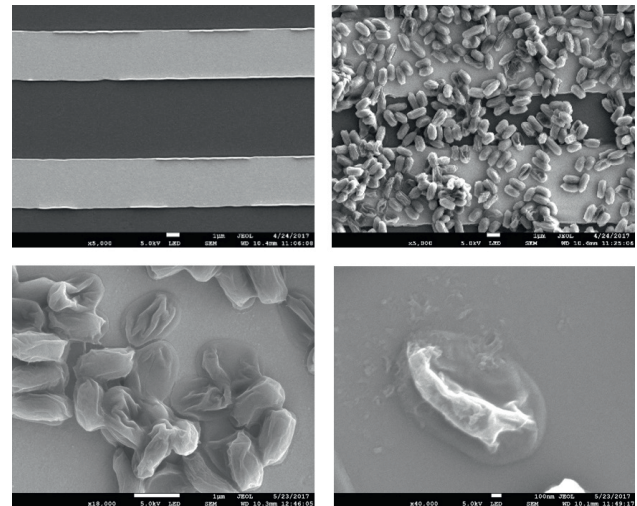


Abbildung 4: REM-Aufnahmen der Sporen auf den IDE-Strukturen. Die oberen beiden Bilder zeigen die IDE-Strukturen und die darauf immobilisierten Sporen. Die unteren beiden Bilder zeigen die „deformierten“ Sporen nach der Sterilisation. Eine Veränderung der Morphologie ist aufgetreten.

Zusammenfassend lässt sich belegen, dass die Synergie dieser beiden Sensortypen als ein kombiniertes Sensorarray eine wesentlich spezifischere multi-parameterbasierte Fehleranzeige in aseptischen Abfüllmaschinen im Vergleich zum Stand der Technik bezüglich Wasserstoffperoxid-Detektionsmethoden ermöglicht.

Literatur

- [1] POGHOSSIAN, A.; GEISLER, H.; SCHÖNING, M.J.: Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection: In: *Biosen. and Bioelectron.* (2019), Nr. 140, S. 111272.
- [2] ANSARI, A.; DATTA, A.K.: An overview of sterilization methods for packaging materials used in aseptic packaging systems. In: *Food Bioprod. Process.* 81 (2003), Nr. 1, S. 57–65.
- [3] JILDEH, Z.B. WAGNER, P.H. SCHÖNING, M.J.: Sterilization of objects, products, and packaging surfaces and their characterization in different fields of industry: the status in 2020. In: *Phys. Status Solidi (A)*. (2021), S. 2000732.
- [4] RYSSTAD, G.; KOLSTAD, J.: Extended shelf life milk - advances in technology. In: *Int. J. Dairy Technol.* 59 (2006), Nr. 2, S. 85–96.
- [5] ROBERTSON, G.L.: *Legislative and Safety Aspects of Food Packaging*. Book series. (2013), CRC Press.
- [6] CERNY, G.: Testing of aseptic machines for efficiency of sterilization of packaging materials by means of hydrogen peroxide. In: *Packag. Technol. Sci.* 5 (1992), Nr. 2, S. 77–81.
- [7] KULYS, J.: Flow-through amperometric sensor for hydrogen peroxide monitoring in gaseous media. In: *Sens. Actuators B. Chem.* 9 (1992), Nr. 2, S. 143–147.

- [8] VERMA A.L.; SAXENA, S.; SAINI, G.S.S.; GAUR, V.; JAIN, V.K.: Hydrogen peroxide vapor sensor using metal-phthalocyanine functionalized carbon nanotubes. In: *Thin Solid Films*. 519 (2011), Nr. 22, S. 8144–8148.
- [9] XU, M.: Trace vapor detection of hydrogen peroxide: An effective approach to identification of improvised explosive devices. Dissertation, The University of Utah (2014).
- [10] ARREOLA, J.; KEUSGEN, M.; WAGNER, T.; SCHÖNING, M.J.: Combined calorimetric gas- and spore-based biosensor array for online monitoring and sterility assurance of gaseous hydrogen peroxide in aseptic filling machines. In: *Biosens. Bioelectron.* (2019), Nr.143, S. 111628.
- [11] OBERLÄNDER, J.; BROMM, A.; WENDELER, L.; IKEN, H.; DURAN, M.P.; GREEFF, A.; KIRCHNER, P.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M.J.: Towards a biosensor to monitor the sterilisation efficiency of aseptic filling machines. In: *Phys. Status Solidi*. 212. (2015), Nr. 6, S. 1299–1305.
- [12] VAHIDPOUR, F.; OBERLÄNDER, J.; SCHÖNING, M.J.: Flexible calorimetric gas sensors for detection of a broad concentration range of gaseous hydrogen peroxide: A step forward to online monitoring of food-package sterilization processes. In: *Phys. Status Solidi* 215 (2018), Nr. 15, S.1800044.
- [13] OBERLÄNDER, J.; MAYER, M.; GREEFF, A.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M.J.: Spore-based biosensor to monitor the microbicidal efficacy of gaseous hydrogen peroxide sterilization processes. In: *Biosens. Bioelectron.* 104 (2018), S. 87–94.
- [14] OBERLÄNDER, J.; KIRCHNER, P.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M.J.: Flexible polyimide-based calorimetric gas sensors for monitoring hydrogen peroxide in sterilisation processes of aseptic filling machines. In: *Proceedings of Sensors and Measuring Systems* (2014), S. 1–4.
- [15] KIRCHNER, P.; REISERT, S.; PÜTZ, P.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M.J.: Characterisation of polymeric materials as passivation layer for calorimetric H₂O₂ gas sensors. In: *Phys. Status Solidi* 209 (2012), Nr. 5, S. 859–863.
- [16] ARREOLA, J.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M.J.: Towards an immobilization method for spore-based biosensors in oxidative environment. In: *Electrochim. Acta*. 302 (2019), S. 394–401.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die finanzielle Unterstützung der folgenden Projekte: „EfficientSterile“, gefördert durch Mittel der Europäischen Union und dem Land NRW im Rahmen des Programms EFRE.NRW 2014-2020 und „SteriSens“, gefördert mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Programms FHprofUnt. Ebenfalls gedankt sei H. Iken und J. Arreola bei der technischen Unterstützung von einzelnen Experimenten.