

DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung
von Lebensmitteln

SKLM



**Stellungnahme zur Behandlung von Lebensmitteln mit
hydrostatischem Hochdruck**

Endfassung vom: 12. Dezember 2019

Mitglieder und Gäste der DFG Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln 2017-2019

Mitglieder:

Prof. Dr. Jan Hengstler (Vorsitzender), Prof. Dr. Patrick Diel, Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, Prof. Dr. Bernd Epe, Prof. Dr. Tilman Grune, Dr. Ing. Volker Heinz, Prof. Dr. Thomas Henle, Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf, Prof. Dr. Henry Jäger, Prof. Dr. Angela Mally, Prof. Dr. Doris Marko, Prof. Dr. Ute Nöthlings, Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Ständige Gäste:

Prof. Dr. Peter Fürst, Prof. Dr. Sabine Kulling, Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen, Dr. Elke Röhrdanz, Dr. Richard H. Stadler, Prof. Dr. Stefan Vieths

Die Kommission dankt der Arbeitsgruppe „Lebensmitteltechnologie und –sicherheit“:

Dr. Ing. Volker Heinz (AG Vorsitzender), Dr. Kemal Aganovic, Dr. Niels Bandick, Dr. Johannes Bergmair, Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, Dr. Christian Hertel, Dr. Thomas Holzhauser, Prof. Dr. Henry Jäger, Prof. Dr. Reimar Johnen, Prof. Dr. Dietrich Knorr, Prof. Dr. Sabine Kulling, Dr. Robert Sevenich, Dr. Oliver Schlüter, Dr. Uwe Schwarzenbolz, Prof. Dr. Rudi Vogel, Herrn Quasigroch und den SKLM Mitarbeiterinnen Dr. Angelika Roth, Dr. Stephanie Hüser und Dr. Sabine Guth für die wissenschaftliche Unterstützung.

SKLM Kommissionssekretariat

Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfADo), Ardeystr. 67, 44139 Dortmund,
E-Mail: SKLM@ifado.de • Tel.: +49 231 1084 239 • Fax: +49 231 1084 308

Die AG „Lebensmitteltechnologie und –sicherheit“ der DFG-Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) befasst sich u.a. mit neuen Technologien, die für die Behandlung von Lebensmitteln entwickelt werden bzw. in Anwendung kommen. Die SKLM hat am 16.12.2019 zur Hochdruck-Behandlung von Lebensmitteln nach 1998 und 2004 erneut Stellung bezogen. Ziel dieser Stellungnahme ist, den 2004 formulierten Wissensstand und Forschungsbedarf zu aktualisieren, noch offene Fragen zu identifizieren und zu diskutieren, ob weiterhin eine Einzelfallbewertung der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln gefordert werden muss.

Stellungnahme zur Behandlung von Lebensmitteln mit hydrostatischem Hochdruck

Inhaltsangabe

Kurzfassung	1
Einleitung	5
Verfahrensaspekte	8
Mikrobiologische Aspekte	12
Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf Lebensmittelinhaltsstoffe	28
Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität	39
Rechtliche Aspekte	44
Hochdruckbehandlung in der Verpackung	45
Forschungsbedarf	49
Schlussbetrachtung	55
Anhang	56
Literatur	63

1 Kurzfassung

Für vegetative Bakterienzellen, bakterielle Endosporen, Viren und Parasiten gilt, dass neben der Kombination von Druck und Temperatur auch Faktoren wie Lebensmittelmatrix, Wassergehalt, gelöste Substanzen und pH-Wert einen Einfluss auf ihre Inaktivierung durch hydrostatischen Druck (high hydrostatic pressure, HHP) haben. Daher sollte die Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln getrennt nach Lebensmittelgruppen und ihren charakteristischen Eigenschaften betrachtet werden. Unterschiedliche Spezies, aber auch Stämme einer Spezies, reagieren verschieden sensitiv auf Druck, was bei der Abtötung von bakteriellen Endosporen wegen der sicherheitsrelevanten *Clostridium*-Spezies besonders bedeutsam ist. Bei Endosporen, zu deren Abtötung das High Pressure/Temperature Kombinationsverfahren (HPT) notwendig ist, muss zusätzlich beachtet werden, dass mit Druckerhöhung, je nach Temperatur, die Effizienz der Sporenabtötung abnehmen kann. Der Druck zur Abtötung von Viren liegt im Allgemeinen etwas unter dem, der zur Abtötung vegetativer Bakterienzellen notwendig ist, jedoch liegen gerade für die lebensmittelrelevanten humanen Virusarten kaum Daten vor. Parasiten lassen sich, je nach Spezies, durch vergleichsweise niedrigeren Druck als vegetative Bakterienzellen abtöten. Chemische Reaktionen laufen in unterschiedlichem Maße im Vergleich zu konventionellen, thermischen Verfahren ab, die Bildung neuer Stoffe wurde bisher nicht nachgewiesen. Der Einfluss auf Lebensmittelmatrix, Lebensmittelinhaltsstoffe und Enzyme unterscheidet sich ebenfalls von dem einer thermischen Behandlung. Hier sind bisher keine sicherheitsrelevanten Veränderungen beschrieben worden. Unter dem Gesichtspunkt des allergenen Potentials bei bestehender Sensibilisierung gegen nicht HHP-behandelte Lebensmittel ist das HHP-behandelte Lebensmittel eher dem unbehandelten Lebensmittel gleichzusetzen. Neosensibilisierungen gegen veränderte Proteinstrukturen wurden bislang nicht untersucht, sollten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Erste Erkenntnisse zu Veränderungen von Verpackungsmaterialien unter Druckeinfluss sind noch unzureichend mit Daten belegt.

1.1 Vegetative Bakterienzellen

Im Allgemeinen wird die druckinduzierte Inaktivierung vegetativer Bakterienzellen durch niedrige pH-Werte begünstigt, während eine geringe Wasseraktivität die Inaktivierungseffizienz eher vermindert. Die unterschiedliche Drucktoleranz der Zellen einer heterogenen Bakterienpopulation und die unterschiedlichen physiologischen

Zustände der vegetativen Bakterienzellen im Lebensmittel erschweren eine Vorhersage zur Effizienz der Abtötung durch HHP. Durch die Selektion drucktoleranter Zellen und Kontamination nachfolgender Produktchargen mit diesen Zellen könnte eine Druckbehandlung dieser Chargen nicht ausreichend wirksam sein. Aufgrund wissenschaftlicher Daten (Aganovic et al. 2021) und Erfahrungswerten aus der Praxis können jedoch für einige Lebensmittelgruppen, besonders mit niedrigem pH-Wert, die kühl gelagert werden, wie Getränke, Frucht- und Gemüsezubereitungen und für bestimmte Fleischerzeugnisse Bedingungen für eine ausreichend effiziente HHP-Behandlung abgeleitet werden. Voraussetzung ist, dass bei diesen Lebensmitteln die Keimung bakterieller Endosporen bzw. das Wachstum der sich daraus entwickelnden vegetativen Zellen ausgeschlossen sind. In Grenzbereichen, wie niedrige Druck- und/oder Temperaturbereiche, kurze Prozesszeiten, niedrige Wassergehalte, und erhöhter pH-Wert oder bei Lebensmitteln, für die ausreichend wissenschaftliche Daten und Erfahrungswerte fehlen, ist im Hinblick auf die Inaktivierung vegetativer Bakterienzellen jedoch eine Einzelfallbetrachtung erforderlich.

1.2 Bakterielle Endosporen

Zur Abtötung von bakteriellen Endosporen sind gut abgestimmte Druck-/Temperatur Kombinationsprozesse nötig. So kann die Sporeninaktivierung in HPT Kombinationsprozessen (100-120 °C) bei Verringerung des Drucks (von 600 auf 300 MPa) erhöht sein. Um die erfolgreiche Abtötung von Endosporen durch Hochdruck zu gewährleisten, sind weiterhin Einzelfallprüfungen für jede Lebensmittelart erforderlich, besonders bei niedrigen Temperaturen und/oder pH-Werten und bei Lebensmitteln, für die Toxin-bildende Clostridien relevant sind. Ein generischer Ansatz für die Bewertung der Auswirkungen von Lebensmittelkomponenten auf die Inaktivierung von Endosporen scheint bisher nicht möglich zu sein. Es bestehen große Unterschiede zwischen *Bacillus* und *Clostridium* Spezies bezüglich Sporulation und Abtötung durch Druck, was auch bei der Suche nach Surrogaten beachtet werden muss. Auch innerhalb der Spezies *C. botulinum* bedürfen die verschiedenen Typen einer differenzierten Betrachtung hinsichtlich einer erfolgreichen Abtötung durch Druck. Nach bisherigem Forschungsstand gibt es keine Surrogate für *C. botulinum* Typ E.

1.3 Viren

Die Inaktivierung von Viren ist, je nach Art und Stamm, durch HHP von etwa 400 MPa bei moderaten Temperaturen und Behandlungszeiten von einigen Minuten für viele Virus/Matrix-Kombinationen möglich. Obwohl die Anzahl an Studien zur Abtötung von Viren in verschiedenen Lebensmittelmatrixen zunehmen, sind die gewonnenen Erkenntnisse wegen fehlender Infektiositätstests und Einsatz von nur bedingt vergleichbaren Surrogatviren in ihrer Aussagekraft begrenzt.

1.4 Parasiten

Parasiten lassen sich, je nach Spezies, durch vergleichsweise niedrigeren Druck als vegetative Bakterienzellen abtöten. Eine Anwendung mit moderatem Druck, bei denen das Ziel ist, Parasiten zu inaktivieren, aber dennoch die Eigenschaften frischer bzw. weitgehend unbehandelter Produkte zu bewahren, besteht die Gefahr, die Druckhöhe zur erfolgreichen Abtötung zu unterschreiten. Da die eukaryotischen Parasiten sehr unterschiedlichen Tiergruppen angehören, können die erforderlichen Druckstufen, Temperaturwerte und Behandlungszeiten zu ihrer Abtötung stark variieren. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass in Einzelfällen bis zu 550 MPa bei Raumtemperatur zur vollständigen Abtötung erforderlich sein kann.

1.5 Chemische Reaktionen

Unter HHP werden kurzkettige Kohlenhydrate reaktiver und Dicarbonyl zu bislang unbekannten Produkten abgebaut. Druck bewirkt in Lebensmitteln während der HHP-Behandlung einen sinkenden pH-Wert, wodurch es in der Gesamtschau zu einer Verminderung von Maillard-Reaktionen kommt, insbesondere Reaktionen an Lysinresten nehmen ab, während Argininreste von einer verstärkten Derivatisierung betroffen sind. Es ist offen, ob die frühe Maillard-Reaktion durch Druck beschleunigt wird, die Bildung von Streckerprodukten, Furan und Acrylamid ist verringert. Da die Lipidoxidation in Abhängigkeit der Fettqualität verstärkt werden kann, ist vermehrt mit entsprechenden Reaktionen der Sekundärprodukte (Carbonyl) mit Aminosäuren zu rechnen. Zur Beurteilung einer druckabhängigen Nitrosaminbildung liegen keine ausreichenden Daten vor. Es wurden bisher keine unbekannten Reaktionsprodukte nachgewiesen.

1.6 Lebensmittelinhaltsstoffe und -struktur

Es wurde bislang keine direkte Wirkung von HHP auf Lebensmittelinhaltsstoffe bzw. auf kovalente Bindungen beschrieben. Die Struktur und die funktionellen Eigenschaften von Makromolekülen können beeinflusst werden, ohne dass bisher Auswirkungen auf die Lebensmittelsicherheit gezeigt wurden. Das gleiche gilt für die durch HHP hervorgerufenen Veränderungen der Zell- und Gewebestruktur im Lebensmittel. Der Gehalt an sekundären Pflanzenstoffen kann sich als Folge des Zellaufschlusses mit einhergehenden enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozessen bzw. stressinduzierten Zellstoffwechselreaktionen verändern. Der direkte Vergleich mit thermischen Haltbarmachungsverfahren ist aufgrund der unterschiedlichen Prozessabläufe und der unterschiedlichen Gewichtung der Parameter Druck und Temperatur kaum möglich. HHP behandelte Produkte sind bei minimiertem Temperatureinfluss bzgl. antinutritiver Inhaltsstoffe mit dem Frischprodukt vergleichbar.

1.7 Enzyme

Die Aktivitäten in Lebensmitteln relevanter Enzyme können durch HHP-Behandlung sowohl gesenkt als auch gesteigert werden. Darüber hinaus können die Verfügbarkeit von Substraten für enzymatische Reaktionen und die Zugänglichkeit funktioneller Gruppen, z.B. aufgrund druckbedingter Konformationsänderungen, verändert werden. Es gibt keine Hinweise, dass die beschriebenen Aktivitätsänderungen sicherheitsrelevant sind. Potentielle Beeinträchtigungen der Qualität müssen im Einzelfall berücksichtigt werden.

1.8 Allergenität

Die *in vitro* Datenlage zur Bewertung des allergenen Potentials HHP-behandelter Lebensmittel hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Demnach scheint HHP-Behandlung die Allergenität eines Lebensmittels für Konsumenten mit vorbestehender Sensibilisierung gegen das nicht HHP-behandelte Lebensmittel nicht oder nur geringfügig zu reduzieren. Eine Erhöhung der Allergenität durch HHP-Behandlung bei vorbestehender Sensibilisierung gegen nicht HHP-behandelte Lebensmittel erscheint nicht wahrscheinlich. Das allergene Potential HHP-behandelter Lebensmittel liegt demnach näher bei unbehandelten als bei thermisch behandelten Lebensmitteln.

Jeweilige Einzelfallprüfungen erscheinen nicht erforderlich, soweit als gesichert angesehen werden kann, dass das allergene Potential HHP-behandelter nicht höher als das unbehandelter Lebensmittel ist. Jedoch sollte die grundsätzliche Möglichkeit der Entstehung neuer (Neo-)Epitope durch strukturelle Veränderung von Allergenen bei hohen hydrostatischen Drücken und in der Folge von Neosensibilisierung berücksichtigt werden. Hierzu liegen bislang keine ausreichenden Daten vor, die eine allergologische Bewertung zulassen.

1.9 Verpackungen

Vorhandene Studien zur Eignung von Verpackungsmaterialien für die HHP-Behandlung liefern nur punktuelle Aussagen und systematische Untersuchungen unter Beachtung der umfassenden Bestimmungen zu Migrationsmessungen sind nicht vorhanden. Daher ist es nicht möglich, ein komplettes Bild für die Bewertung unterschiedlicher Packstoffe zu erstellen. Strukturell morphologische Veränderungen an Verpackungsmaterialien durch HHP-Anwendung konnten gezeigt werden. Eine umfassende Bewertung der Bedeutung dieser Veränderungen für die Lebensmittelsicherheit liegt jedoch nicht vor. Dies betrifft insbesondere auch den Bereich der HPT-Sterilisationsanwendungen sowie die Nutzung neuer, z.B. bioabbaubarer, Verpackungen.

2 Einleitung

Die DFG-Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) hat sich erstmalig 1998 mit der Hochdruckbehandlung, insbesondere von Fruchtsäften, beschäftigt und 2004 aufgrund der Ausweitung der Produktpalette die Bewertung dieses Verfahrens wieder aufgegriffen. Die zentrale Frage 2004 war, ob bei der Hochdruckbehandlung verfahrensbedingte chemische oder biologische Veränderungen eintreten, die sich auf die hygienischen, toxikologischen, allergologischen und ernährungsrelevanten Eigenschaften des Lebensmittels auswirken. Auch apparative und rechtliche Aspekte wurden diskutiert (SKLM 2004).

Die SKLM kam 2004 u.a. zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Bisherige Untersuchungen an auf dem Markt befindlichen, mit Hochdruck behandelten Produkten ergeben keine Hinweise auf mikrobielle, toxikologische oder allergene Risiken als Folge einer Hochdruckbehandlung, sind aber für eine

generelle Bewertung der mikrobiellen, toxikologischen oder allergenen Risiken und der Auswirkungen auf Inhaltsstoffe und Kontaminanten nicht ausreichend.

- Einzelfallprüfungen der hochdruckbehandelten Lebensmittel sind erforderlich.
- Produkt bzw. Prozess-spezifische Prüfparameter für die Sicherheitsbewertung hochdruckbehandelter Lebensmittel müssen nach anerkannten Standardkriterien etabliert werden.
- Informationen zur Spezifikation des behandelten Lebensmittels, zum angewandten Verfahren und dessen Prozessparametern sowie zu den verwendeten Anlagen und Verpackungsmaterialien sind erforderlich

Derzeit (Stand 2019) werden weltweit in über 400 industriellen Hochdruckanlagen (54 % davon in Nordamerika, 25 % in Europa, 12 % in Asien) mit einem globalen Gesamtvolumen von 100.000 Liter mehr als 1,5 Mio. Tonnen Produkt pro Jahr mit HPP behandelt. Etwa 59% der Anlagen befinden sich in Nordamerika, 24% in Europa und 18% in Asien (González-Angulo et al. 2021; Tonello-Samson 2018a; Tonello-Samson 2018b). Die Hochdruckbehandlung ist prinzipiell für alle Lebensmittel, die einen ausreichenden Wassergehalt und keine Luftblasen aufweisen, möglich, derzeit vorrangig auf dem Markt sind Obst- und Gemüseprodukte insbesondere Säfte und Getränke und bestimmte Fleisch-, Milch- und Fischprodukte (Tabelle 1; (Huang et al. 2017)).

Tabelle 1. Beispiele hochdruckbehandelter Produkte (Tonello-Samson 2018b)

Produkt	Prozessparameter	Funktion des Hochdrucks	Marktanteil
Säfte und Getränke	400-600 MPa 1 -5 min	Mikrobiologische Sicherheit und Haltbarkeitsverlängerung	30 %
Fleischerzeugnisse (Kochschinken, Pökelfleisch, Aufschnitt)	400-600 MPa 1-5 min	Mikrobiologische Sicherheit	30 %
Frucht-und Gemüsezubereitung (z.B. Avocado, Babyfood, Dips und Salsa)	500-600 MPa 5-10 min	Haltbarkeitsverlängerung und Enzyminaktivierung(Farberhalt) (Hayashi 2002)	28%
Meeresfrüchte und Schalentiere	250-350 MPa 30 – 90 s	Schalenentfernung, Ausbeutesteigerung, <i>Vibrio</i> -Inaktivierung (Tonello 2018)	7%
Ready-to-eat Meals	400-600 MPa 1 -5 min	Mikrobiologische Sicherheit und Haltbarkeitsverlängerung	3%
Milchprodukte	400-600 MPa 1 -5 min	Mikrobiologische Sicherheit und Haltbarkeitsverlängerung	2%

Hochdruckbehandlungen sind im Vergleich zu konventionellen Haltbarmachungsverfahren relativ teuer, sodass sie besonders für hochwertige Produkte, bei denen der Erhalt der Frische bzw. der Charakter eines unbehandelten Lebensmittels angestrebt wird (Zhang et al. 2019), angewendet werden. Die Kosten einer Hochdruckbehandlung können bei 0,1 bis über 1,0 €/kg liegen, abhängig von der Größe der Hochdruckkammer, Füllgrad und Prozessbedingungen (Druck und Zeit). Meistens werden je nach Menge und erreichbarem Füllgrad 0.45 €/kg und höher veranschlagt. Kosten einer konventionellen thermischen Behandlung (z.B. High Temperature Short Time, HTST) reichen von 0,005 bis zu 0,01 €/kg, abhängig vom Niveau der Wärmerückgewinnung; einer Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern von 0,01 bis zu 0,02 €/kg abhängig von Durchsatz und Betriebsstunden im Jahr (Aganovic 2017; Heinz and Buckow 2009).

Hochdruck wird an Lebensmitteln angewendet, um vor allem folgende Ziele zu erreichen:

1. Abtötung pathogener Organismen, wie Bakterien, Viren und Parasiten, die möglicherweise im Lebensmittel vorkommen
2. Verlängerung der Haltbarkeit (Abtötung lebensmittelverderbender Bakterien und Inaktivierung von Enzymen)
3. Physiko-chemische Veränderung der Lebensmittelmatrix (z.B. Texturveränderung)

Je nach Druck-Temperatur-Zeit-Bedingungen, die für die Behandlung des Lebensmittels gewählt werden, können folgende unerwünschte Auswirkungen auftreten:

1. Überleben pathogener Mikroorganismen
2. Überleben Lebensmittel verderbender Mikroorganismen
3. Unerwünschte chemische Reaktionen
4. Unerwünschte Effekte auf das allergene Potential

Es stellt sich die Frage, ob die Hochdruckbehandlung eines bestimmten Lebensmittels immer noch als Einzelfall („case by case“) geprüft werden sollte oder ob generelle Aussagen zur sicheren Anwendung von Hochdruck, zumindest für bestimmte Produktgruppen, gemacht werden können. Die SKLM greift daher in dieser Stellungnahme die Bewertung des Hochdruckverfahrens erneut auf und legt dabei den

Schwerpunkt auf die Behandlung mit hydrostatischem Druck (high hydrostatic pressure, HHP), der zurzeit gebräuchlichsten Anwendung. Andere Prozesse wie Homogenisierung oder Stoßwellen, die dynamischen Druck nutzen, oder die Anwendung von komprimierten Fluiden, wie Behandlung mit überkritischem CO₂ oder sub- oder superkritischem Wasser, werden in dieser Stellungnahme nicht berücksichtigt.

Eine HHP-Behandlung kann in einem Druckbereich von 100 bis 1000 MPa und einem Temperaturbereich von 0 °C bis 120 °C erfolgen. In vielen Einzelstudien (Aganovic et al., in press) wurde hydrostatischer Hochdruck mit Bedingungen von 100 bis 800 MPa und Temperaturen von 20 °C bis 60 °C angewendet. Hochdruckverfahren mit höheren Temperaturen von 100 °C bis zu 120 °C (high pressure/temperature, HPT) sind zur Abtötung bakterieller Sporen (Endosporen) erforderlich und werden in der Stellungnahme getrennt betrachtet. Die Druckhaltezeiten lagen in den beschriebenen Studien bei wenigen Minuten, wie bei industrieller Anwendung typisch, und gingen in Modelluntersuchungen bis in den Bereich von Stunden. Es gibt kaum Studien zur Wirkung von Hochdruck auf Lebensmittel, aus denen generische Aussagen abgeleitet werden können. Die vielen einzelnen Studien zeigen die Schwierigkeit, allgemeingültige HHP- und besonders HPT- Bedingungen zu ermitteln, die sichere Produkte garantieren.

Ziel dieser Stellungnahme ist es, anhand der neuen Literatur bis 2018 die potentiellen Auswirkungen des Hochdruckverfahrens auf Mikroorganismen und auf Struktur und Inhaltsstoffe der Lebensmittel in Kombination und im Vergleich zu konventionellen, insbesondere thermischen Verfahren aufzuführen. Vor dem Hintergrund des aktuellen Wissensstandes soll beurteilt werden, ob die 2004 geforderte Einzelfallprüfung weiterhin erfolgen sollte oder generische Aussagen zur Hochdruckbehandlung, zumindest für einzelne Lebensmittelgruppen, getroffen werden können.

3 Verfahrensaspekte

Um die physikochemischen Besonderheiten einer Hochdruckbehandlung und ihre Auswirkungen auf Lebensmittel bzw. Mikroorganismen zu verstehen, werden zunächst die physikalischen Grundlagen des Hochdrucks und einige technische Anforderungen sowie Entwicklungen erläutert.

Zur Überwachung und Beurteilung der Prozesshomogenität sind Messungen des Druckes und der Temperatur an kritischen Stellen unerlässlich. Eine

verfahrenstechnische Herausforderung ist es, Spitzen und Senken von Druck und Temperatur zu vermeiden (SKLM 2004). Es wurde bereits 2004 festgehalten, dass für den Hochdruckprozess Methoden entwickelt werden müssen, die es ermöglichen, die Temperatur an kritischen Stellen zu messen und auftretende Intensitätsspitzen oder –senken durch verfahrenstechnische Gegenmaßnahmen ausgleichen zu können.

3.1 Rahmenbedingungen einer Hochdruckanwendung

Druck ist eine intrinsische Eigenschaft eines thermodynamischen Systems und kann nicht getrennt von anderen Parametern wie Temperatur, Volumen oder Energie betrachtet werden. Mit Erhöhung des Drucks sinkt das Volumen und die Temperatur steigt. In Biomaterialien wirken sich Veränderungen von Druck oder Temperatur auf die molekularen Strukturen aus. Bei gut definierten Kombinationen von Druck (p) und Temperatur (T) treten Übergänge einer molekularen Phase A zu einer molekularen Phase B auf und können als Phasenübergangslinien in einem p - T -Diagramm aufgetragen werden.

Da es sich bei den meisten Lebensmitteln um Gemische zahlreicher Substanzen handelt, die häufig in unterschiedlichen Aggregatzuständen vorliegen (fest, flüssig oder gasförmig), ist die direkte Anwendbarkeit eines p - T -Diagrammes nicht möglich. In einem vereinfachten Ansatz kann Wasser, als Hauptbestandteil vieler Lebensmittel, betrachtet werden, um die für Lebensmittel relevanten Druck- und Temperaturbereiche zu identifizieren. Das Phasendiagramm von Wasser (Abb. 1) zeigt, dass der Bereich von 0 bis 100 °C, in dem sich bei Umgebungsbedingungen Wasser im flüssigen Zustand befindet, durch eine Druckerhöhung im Wesentlichen erweitert werden kann. Während eine Verschiebung um einige 10 °C ausreicht, um flüssiges Wasser einzufrieren oder zu verdampfen, ist ein Druckanstieg um 4 Größenordnungen erforderlich, um Wasser bei 20 °C zu kristallisieren. Dieses Phänomen wird von Natur aus nicht auf der Erdoberfläche beobachtet und erfordert technische Kompressionsgeräte.

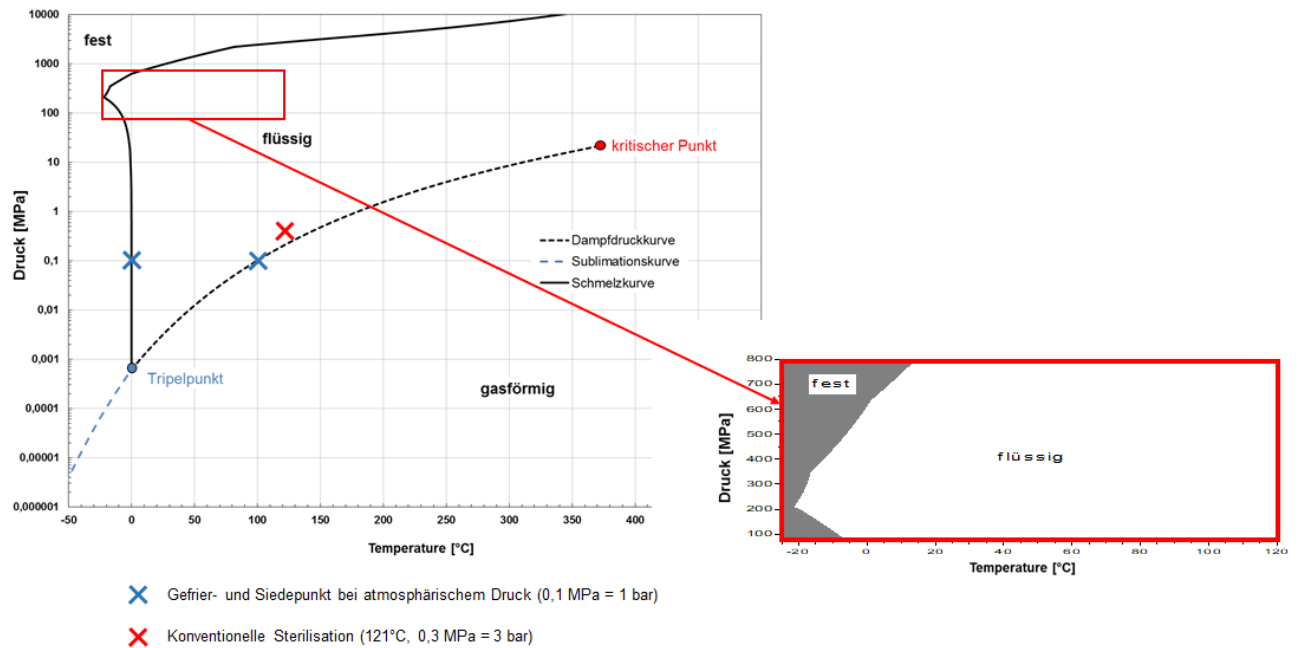


Abbildung 1: p-T-Diagramm von Wasser mit Phasenübergangslinien
(Bridgman 1912; Karino et al. 1994; Wagner et al. 1994).

Weißer Bereich des Ausschnittes: In der Stellungnahme berücksichtigter Bereich einer Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln; in diesem Bereich ist Wasser flüssig.

Eine typische Hochdruckanlage besteht aus einem Druckbehälter, einem System zum Druckaufbau, einer Prozesssteuerung zur Überwachung von Druck und Temperatur und einem Fördersystem (Elamin et al. 2015; Rastogi 2013; Ting 2010). Um die Druckstabilität zu gewährleisten, wird der Druckbehälter entweder aus einem Stück (monolithisch) oder mit aufwendigen Techniken aus verschiedenen Schichten hergestellt. Material- und konstruktionsbedingt werden meist Anlagentypen, die Druckbehälter mit einem Durchmesser von 40 cm und einem Volumen von 150 bis maximal 525 l aufweisen, in der Industrie verwendet.

Ein Druckaufbau auf 600 MPa (6000 bar) erfolgt in ca. 2 bis 5 min mit einer Erwärmung um ca. 4 °C pro 100 MPa. Unter diesen Bedingungen wird der Kern des zu behandelten Materials mit einer Temperaturfluktuation nach außen erwärmt. Hier sind Temperaturdifferenzen von bis zu 20 °C möglich. Unter typischen Prozessbedingungen ist kein vollständiger Temperatúrausgleich möglich. Behandlungstemperaturen unter 20 °C können nur durch Kühlung des Behälters gehalten werden, bei Temperaturen von 100 °C bis 120 °C führen Drücke über

400 MPa zu Materialproblemen des Behälters. Ein Druck von 1000 MPa gilt als technisch bedingte Grenze der industriellen Hochdruckbehandlung.

Beim jetzigen Stand der Entwicklung ist eine Hochdruckbehandlung mit relativ hohen Energie- und Prozesskosten verbunden. Die zukünftige Entwicklung der Behälter geht vor allem in Richtung einer Erhöhung des Füllvolumens mit verbessertem Füllungsgrad und kürzerer Zyklusdauer (schnellere Kompression und kürzere Druckhaltezeit), was zu einem reduzierten Energiebedarf und damit geringeren Kosten führen soll. Behälter mit größeren Volumina können jedoch zu einer ungleichen Temperaturverteilung mit Auswirkungen auf die Prozesshomogenität führen. Dies ist insbesondere der Fall, wenn Druck mit hoher Temperatur zur Inaktivierung bakterieller Endosporen kombiniert wird. Zudem können bei unterschiedlichen Lebensmittelbestandteilen und Druck-Temperatur Kombinationen Phasenübergänge auftreten. Die Grenzen der Hochdruckanwendung liegen derzeit bei dem eintretenden Phasenwechsel bei hohen und niedrigen Temperaturen. Die Anlagen werden oft in gekühlten Räumen betrieben, um die Kühlkette aufrecht zu erhalten und die Behandlungstemperatur trotz sich entwickelnder Kompressionswärme konstant zu halten, wodurch der Energieverbrauch und damit die Kosten wiederum ansteigen.

3.2 Technische Herausforderungen der Hochdrucktechnologie

Behandlungshomogenität und gleichmäßige Temperaturverteilung während des HHP-Prozesses müssen gewährleistet sein, was eine zuverlässige Erfassung von Strömungsprofilen und Strömungsverteilung während Druckaufbau und Druck-Haltezeit in der Hochdruckkammer erfordert. Das Thema ist umso komplexer unter Betracht verschiedenster Hochdruckanlagen, unterschiedlicher Dimensionen oder Volumina des Behälters in Kombination mit Druck und Temperatur, der Unterschiede zwischen einsetzbaren Druckübertragungsmedien (z.B. Wasser, Alkohol, Öl oder Mischungen) sowie der Vielfalt an Lebensmitteln und deren Zusammensetzung.

Eine inline-Temperaturmessung während einer Hochdruckbehandlung stellt noch immer eine große technische Herausforderung dar. Da eine Hochdruckkammer ein geschlossenes System unter hohem Druck ist, muss ein Sensor so konzipiert sein, dass dieser in der Lage ist, idealerweise das Signal drahtlos nach außen zu senden. Außerdem muss er möglichst klein, robust sowie druck- und temperaturstabil sein. Zugleich kann die Temperaturverteilung mit passender Software modelliert werden, wobei eine Validierung der Modellierung wünschenswert wäre. Eine weitere

Möglichkeit einer inline-Temperaturmessung stellt die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) dar. Die LDA ist ein optisches Messverfahren, mit dem die Temperatur berührungslos mittels eines Laserstrahls gemessen werden kann. Die Druckmessung an allen Stellen des Behälters ist nicht nötig, da der Druck hydrostatisch und uniform ist.

Bei den industriellen Anlagen wird meistens Wasser als Druckübertragungsmedium verwendet. Andere Druckübertragungsfluide könnten aufgrund ihrer adiabatischen Erwärmung und Phasenübergangsgrenzen im Vergleich zu Wasser zu einer besseren Behandlungshomogenität und Temperaturverteilung führen. Aufgrund der unterschiedlichen Kompressibilität könnten die verschiedenen Druckübertragungsfluide sowie Mischungen zu unterschiedlichen (schnelleren) Kompressionszeiten führen. Demzufolge können Druckaufbau- und Zykluszeiten reduziert werden.

Im Bereich Maschinenbau und Materialwissenschaft sind besonders Abdichtungs- und Ventiltechnik sowie Design der Hochdruckkammer besondere Herausforderungen, vor allem bei den Durchflussanlagen (Bulk-Anlage für pumpfähige Produkte), deren Risiko der Rekontamination höher ist. Aktuell ist eine Hochdruckanlage zur Behandlung von vor dem Abfüllprozess unverpackten, flüssigen Produkten (Mengenware/Bulkware) auf den Markt gekommen.

3.3 Zusammenfassung

Zurzeit sind in der Industrie weltweit ca. 420 Hochdruckanlagen mit einem Volumen von 150 bis 525 l und üblich angewendeten Prozessparametern von 300 bis 600 MPa bei 4 °C bis 20 °C und Haltezeiten unter 5 min in Verwendung (Tonello 2018). Wie schon in der Stellungnahme aus dem Jahr 2004, gilt weiterhin, dass die Überwachung und Beurteilung der Prozesshomogenität (Temperatur) an kritischen Prozesspunkten unerlässlich sind, um eine bessere Prozesskontrolle zu erreichen. Zurzeit gibt es keine passenden Temperatursensoren und nur vereinzelte Studien über Modellierung und Simulationen des Temperatur- und Strömungsprofils im Druckbehälter.

4 Mikrobiologische Aspekte

Im Jahr 2004 wurde eine Einzelfallprüfung zur mikrobiologischen Sicherheit mit Hochdruck behandelter Lebensmittel gefordert (SKLM 2004). Das bedeutet, dass jedes Produkt mit seinen spezifischen Eigenschaften, wie pH-Wert, a_w -Wert, Gehalt

an NaCl und anderen ionischen Substanzen, Gehalt an Saccharose und anderen nicht-ionischen Substanzen sowie Textur als Einzelfall auf eine ausreichende Abtötung gesundheitlich relevanter Mikroorganismen untersucht werden muss. In der vorliegenden Stellungnahme soll neben dieser Aussage der SKLM von 2004 auch die Schlussfolgerung diskutiert werden, dass für die Entwicklung und Bewertung von Prozessen die Charakterisierung hygienerelevanter Leitkeime notwendig ist. Im Folgenden wird die Abtötung vegetativer Bakterienzellen (äquivalent zur konventionellen thermischen Pasteurisation) und bakterieller Endosporen (Sterilisation), die eine besondere Herausforderung darstellen, vor allem in Bezug auf die Identifizierung von Leitkeimen, getrennt diskutiert.

4.1 Inaktivierung vegetativer Bakterienzellen

Vegetative Zellen lebensmittelrelevanter Mikroorganismen können bei Raumtemperatur durch hohen hydrostatischen Druck (HHP) im Bereich von 200 bis 600 MPa, der üblicherweise in industriellen Hochdruckanlagen angewendet wird (Aganovic et al., in press), inaktiviert werden (Georget et al. 2015; Mota et al. 2013; Rastogi et al. 2007; Wang et al. 2016). Die Inaktivierungskinetik für vegetative Bakterienzellen unter Druck zeigt eine abfallende Kurve, die jedoch wie bei thermischen Prozessen in einem "Sockel" (Tailing) enden kann. Es ist unklar, ob es sich bei diesem beobachteten „Tailing“ um drucktolerante Subpopulationen handelt (SKLM 2004).

Die genetische Heterogenität mikrobieller Populationen oder das Auftreten drucktoleranter Zellen aufgrund von Stressanpassung wird weiterhin als Ursache für das beobachtete „Tailing“ diskutiert (Mota et al. 2013; Tay et al. 2003). Bei niedrigen Druckniveaus von 20 bis 180 MPa treten hauptsächlich subletale, zelluläre Schäden auf, bei höheren Druckstufen von 200 bis 400 MPa führen letale Schädigungen zur Inaktivierung (Lado and Yousef 2002; Serment-Moreno et al. 2014). Neben den bereits 2004 beschriebenen Schädigungen, wie Proteindenaturierung, pH-Wert-Änderung, Dissoziation der Ribosomen (Bartlett 2002; Kaletunç et al. 2004; Molina-Gutierrez et al. 2002; Mota et al. 2013; Niven et al. 1999; Rastogi et al. 2007) scheinen bei ausreichend hohem Druck die Zellmembranen Phasenübergänge und Veränderungen der Fluidität zu durchlaufen, was eine Permeabilisierung der Zellmembranen zur Folge hat und die Denaturierung von Membranproteinen begünstigt (Winter and Jeworrek

2009). Im Allgemeinen sind eukaryotische Zellen wie Hefen und Schimmelpilze druckempfindlicher als prokaryotische Zellen wie Bakterien, wobei Gram-positive Bakterien resistenter sind als Gram-negative (Considine et al. 2008; Dumay et al. 2010; Georget et al. 2015).

4.1.1 Faktoren, die die HHP- Inaktivierung von vegetativen Bakterienzellen beeinflussen

Die Effizienz der Inaktivierung hängt stark von den Parametern Druck und Temperatur ab und kann auch bei Temperaturen unterhalb der Umgebungstemperatur (Arroyo et al. 1999) bis auf Temperaturen unter null ausreichend sein (Realini et al. 2011; Ritz et al. 2008). Endogene Faktoren des Lebensmittels wie die Art der Lebensmittelmatrix, die Einbettung der Bakterienzellen in die Lebensmittelmatrix und die Kombination von Faktoren wie pH-Wert, Wasseraktivität und/oder Konzentrationen gelöster, ionischer (z.B. Natriumchlorid) und nicht-ionischer (z.B. Saccharose) Stoffe, sind sehr unterschiedlich und beeinflussen in ihrer Gesamtheit die Wirksamkeit von HHP. Im Allgemeinen wird die druckinduzierte Inaktivierung bei niedrigem pH-Wert im Vergleich zum neutralen pH-Wert beschleunigt. In dehydrierten Lebensmittelmatrizes (z.B. getrocknete Gewürze, Milchpulver, trocken geräucherte Fleischprodukte) ebenso wie in Fettpartikeln oder in der Ölphase von Emulsionen vermindert die geringe Wasseraktivität die Inaktivierungseffizienz (Georget et al. 2015). Es gibt jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen der Wasseraktivität und der HHP-Inaktivierung, was darauf hindeutet, dass das Zusammenwirken mit gelösten Stoffen und/oder anderen Faktoren eine große Rolle spielt (Georget et al. 2015). Die Zugabe natürlicher antimikrobieller Wirkstoffe wie Bakteriocinen (z.B. Nisin), ätherischen Ölen oder deren Bestandteilen (z. B. Cavacrol, Citral) und Laktate hat sich als vielversprechend erwiesen, um die Inaktivierungseffizienz zu erhöhen (Adamcová et al. 2019; Chien et al. 2017; Gayán et al. 2012; Hauben et al. 1996; Ogihara et al. 2009).

Die Empfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber HHP hängt auch vom physiologischen Status der Zellen in der Lebensmittelmatrix ab. Neben dem Wachstumszustand (z.B. logarithmisch, stationär) können Stressreaktionen, die durch intrinsische und extrinsische Faktoren (z.B. Hitze- oder Kälteschock, osmotischer Stress oder Säurestress) verursacht werden, die Empfindlichkeit herabsetzen (Rendueles et al. 2011). Eine Studie zeigte, dass mehrere HHP-Behandlungen hintereinander anstelle einer Einzelbehandlung geeignet sind, drucksensitive

Bakterien bei verbessertem Erhalt der Produktqualität effektiver zu inaktivieren (Zhang et al. 2015); diese Strategie birgt jedoch, je nach Bakterienart, die Gefahr der Adaption an Druck und damit einer verminderten Inaktivierung (Mota et al. 2013).

4.1.2 Mathematische Modelle zur HHP-Inaktivierung

Um generische Ansätze einer Hochdruckbehandlung zu entwickeln und die Inaktivierung von Mikroorganismen durch HHP als Funktion der Behandlungszeit vorherzusagen, wurden mathematische Modelle beschrieben. Typischerweise wird bei der Druckinaktivierung von Mikroorganismen ein nichtlinearer Verlauf beobachtet, der auf eine multifaktorielle Inaktivierung hinweist. Es wurden zahlreiche primäre Modelle mit linearem, konkavem oder sigmoidalem Verlauf entwickelt, um die Inaktivierungskinetik zu beschreiben (Klotz et al. 2007; Serment-Moreno et al. 2014). Modelle wurden hauptsächlich für einzelne Bakterien- oder Hefearten, aber auch für Gruppen von Mikroorganismen, z.B. aerobe Bakterien, nicht nur in Labormedien (Koseki and Yamamoto 2007), sondern auch in zahlreichen Lebensmitteln entwickelt (Chakraborty et al. 2015; Parish 1998; Pilavtepe-Çelik et al. 2009; Van Opstal et al. 2005). Diese Modelle sind jedoch nur anwendbar, wenn die Behandlungsbedingungen wie z.B. Druck, Temperatur und pH-Wert konstant gehalten werden. Zur Beschreibung der Wirkung von Druck und/oder Temperatur auf die primären Modellparameter wurden nichtlineare sekundäre Modelle, z.B. das Bigelow-Modell (Santillana Farakos and Zwietering 2011), entwickelt, die auch für Lebensmittel geeignet sind (Dogan and Erkmen 2004; Koo et al. 2006; Pilavtepe-Çelik et al. 2009; Van Opstal et al. 2005). Bisher konnte kein allgemein gültiges Modell zur Beschreibung der mikrobiellen Inaktivierungskinetik durch HHP entwickelt werden, was auf die Komplexität der Inaktivierungskinetik und die bisher limitierten Daten zurückgeführt wird (Serment-Moreno et al. 2014; Serment-Moreno et al. 2015). Aufgrund der unterschiedlichen Mikrobiota in den verschiedenen Lebensmitteln und der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Spezies sowie der Komplexität der Lebensmittelmatrizes müssen Modelle entweder an den Einzelfall angepasst oder neue Modelle entwickelt werden, um die mikrobielle Inaktivierungskinetik für Einzelfälle vorhersagen zu können.

4.1.3 Zusammenfassung

Vegetative Bakterienzellen können mit einem Druck von 200 bis 600 MPa, auch bei moderaten Temperaturen, inaktiviert werden (Aganovic et al., in press). Die Abtötung ist u.a. abhängig von der Lebensmittelmatrix, dem pH-Wert und dem Wassergehalt. Aufgrund der wissenschaftlichen Datenlage basierend auf vielen Einzelstudien und der Erfahrungen aus der Praxis lassen sich für bestimmte Lebensmittelgruppen, besonders für saure Produkte, Bedingungen für eine HHP-Behandlung nennen, die bei Anwendung eines HACCP-Konzeptes (Hazard Analysis and Critical Control Points-Konzept¹) zu einem sicheren Produkt führen. Voraussetzung ist, dass bei diesen Lebensmitteln die Keimung bakterieller Endosporen bzw. das Wachstum der daraus entstehenden vegetativen Zellen durch endogene (z.B. pH-, a_w -Wert) oder exogene Faktoren (z.B. Temperatur) ausgeschlossen sind. Wegen der komplexen Abhängigkeiten sind keine allgemeinen Vorhersagen zur Abtötung von Bakterienzellen unabhängig vom Lebensmittel möglich und damit auch nicht die Bestimmung hygienerelevanter Leitkeime, die generell für HHP-Prozesse, unabhängig vom Lebensmittel, einsetzbar wären.

4.2 Inaktivierung bakterieller Endosporen (Sterilisation)

Durch kombinierte Druck-/Temperaturanwendung ist eine Inaktivierung lebensmittelrelevanter bakterieller Endosporen möglich, obwohl diese eine wesentlich höhere Resistenz gegenüber Druck aufweisen als vegetative Bakterienzellen (SKLM 2004). Zu beachten ist aber, dass Endosporen durch bestimmte Druck-/Temperaturkombinationen bei der Hochdruckbehandlung gegenüber einer thermischen Inaktivierung stabilisiert werden können (Margosch et al. 2006). Dies ist insbesondere bei der Entwicklung schneller Verfahren mit sehr hohen Drücken und Temperaturen zu berücksichtigen.

4.2.1 Endosporen bildende Bakterien

Endosporen bildende *Clostridium* (C.) – und *Bacillus* (B.) – Spezies sind Schlüsselbakterien für die Sicherheit und den Verderb schwach saurer (wärmebehandelter) Konserven. Sporen dieser Spezies können über 1000 MPa Druck bei Raumtemperatur tolerieren. Die Hitzeresistenz verschiedener bakterieller

¹https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/fragen_und_antworten_zum_hazard_analysis_and_critical_control_point_haccp_konzept.pdf

Endosporen korreliert nicht mit hoher Druckresistenz (Margosch et al. 2004a; Margosch et al. 2004b; Olivier et al. 2011); prinzipiell senkt/verkürzt Druck die erforderliche Inaktivierungstemperatur und/oder -zeit (Heinz and Knorr 1996; Margosch et al. 2003; Reddy et al. 1999; San Martin et al. 2002; Wuytack et al. 1998).

4.2.2 Hochdruck-Hochtemperaturverfahren zur Inaktivierung von Endosporen

Es wurden besondere Hochdruck- /Temperaturverfahren (HPT) entwickelt, die die adiabatische Erwärmung während des Druckanstiegs nutzen, um Lebensmittel zu sterilisieren (siehe Kapitel 2 zur Verfahrenstechnik). Obwohl das Wissen über zugrundeliegende Mechanismen deutlich zugenommen hat, sind immer noch nicht alle Aspekte der Sporeninaktivierung gut verstanden. Umfassende Übersichten zur Inaktivierung von Sporen durch Druck (Lenz and Vogel 2015) und zum Verhalten von Endosporen in komplexen Lebensmittelmatrizen unter Druck (Georget et al. 2015) stehen zur Verfügung.

Die meisten Studien zur Endosporen-Inaktivierung unter Hochdruckbedingungen wurden an Modellorganismen wie *B. subtilis* und anderen Lebensmittelverderbern der Spezies *Bacillus*, z.B. *Geobacillus stearothermophilus*, *B. coagulans* und *B. amyloliquefacies*, durchgeführt und befassen sich mit molekularen Mechanismen der Hochdruckinaktivierung, darunter Veränderungen der Sporenmembran, Freisetzung von Dipicolinsäure (DPA) und die Beteiligung der Keimungsmaschinerie (Reineke et al. 2013a; Reineke et al. 2013b). Relevant für die Lebensmittelsicherheit sind jedoch ausschließlich Toxin-bildende *Bacillus*- und *Clostridium*- Spezies, z.B. *B. cereus*, und *C. perfringens* sowie insbesondere die Neurotoxin-bildenden *C. botulinum*-Typen, für die vergleichsweise wenig Daten verfügbar sind.

Die Unterscheidung zwischen *Bacillus*- und *Clostridium*- Spezies ist hierbei entscheidend, da die Inaktivierung bakterieller Endosporen durch Druck als Druck-induzierte Sporenkeimung und anschließende Inaktivierung gekeimter Sporen angesehen wird und Sporenkeimung gattungsspezifisch abläuft (Margosch et al. 2004b; Reineke et al. 2013a). Verfügbare Daten für *B. subtilis* (Reineke et al. 2013a), *B. amyloliquefaciens* (Margosch et al. 2006; Margosch et al. 2004a) und *C. botulinum* (Lenz et al. 2015; Margosch et al. 2006; Margosch et al. 2004a) legen zwar nahe, dass es einige grundlegende Gemeinsamkeiten zwischen *Clostridium*- und *Bacillus*-Sporen gibt, aber verschiedene Formen von Isoeffektkurven der DPA-Freisetzung und Sporeninaktivierung spiegeln große Unterschiede in der Reaktion der *Bacillus*- und

Clostridium-Sporen auf HPT-Behandlungen wider, z.B. der Sporen von *B. subtilis* (Reineke et al. 2012; Reineke et al. 2013a; Reineke et al. 2013b), *B. amyloliquefaciens* (Margosch et al. 2006; Margosch et al. 2004a) und *C. botulinum* (Margosch (Lenz et al. 2015; Margosch et al. 2006; Margosch et al. 2004a)). Insbesondere die Wirksamkeit von niedrigem Druck und mäßiger Temperatur, die die DPA-Freisetzung in einem der natürlichen Keimungsphysiologie ähnlichen Weg induzieren (Paidhungat and Setlow 2000; Paidhungat and Setlow 2001; Rode and Foster 1966; Wang et al. 2011), scheint bei verschiedenen *Clostridium*-Sporen deutlich schwächer zu sein (Hölters et al. 1999; Lenz et al. 2015; Margosch 2004; Reddy et al. 1999) als bei *B. subtilis* (Doona et al. 2014; Georget et al. 2014; Gould and Sale 1970; Kong et al. 2014; Margosch et al. 2006; Paidhungat et al. 2002; Reineke et al. 2012; Reineke et al. 2013a; Reineke et al. 2013b; Torres and Velazquez 2005; Wuytack et al. 1998). Auch bei erhöhten Druck-/Temperatur-Bedingungen, bei denen eine nicht-physiologische DPA-Freisetzung zu einer schnellen Sporeninaktivierung führt, können beträchtliche Unterschiede in der Kinetik der DPA-Freisetzung und in Inaktivierungsraten zwischen *Clostridium*- und *Bacillus*-Spezies gefunden werden, (z.B. *C. botulinum* (Lenz et al. 2015; Margosch 2004; Margosch et al. 2004a; Reddy et al. 1999; Reddy et al. 2006), *B. subtilis* (Margosch (Margosch 2004; Reineke et al. 2013a))). Diese Unterschiede in der Inaktivierung sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Sporenbestandteile der *Clostridium*- und *Bacillus*-Sporen, die an der HPT-vermittelten Inaktivierung beteiligt sind, zurückzuführen (Adams et al. 2013; Burns et al. 2010; Cartman and Minton 2010; Gutelius et al. 2014; Paredes-Sabja et al. 2009; Paredes-Sabja et al. 2011).

Die Keimung der Spezies aus der Ordnung *Bacillales* läuft über einen Protease-unabhängigen Weg mit den Cortex-lytischen Enzymen SleB und CwlJ ab (Burns et al. 2010; Cartman and Minton 2010; Paredes-Sabja et al. 2011), während der Protease-abhängige Weg mit dem Cortex-lytischen Enzym SleC (Adams et al. 2013; Paredes-Sabja et al. 2009) nicht vorhanden ist (Paredes-Sabja et al. 2011). *Clostridiales* können Gene, die für Komponenten einer der beiden als auch beide Wege codieren, besitzen, die Keimung läuft aber meist über den Protease-abhängigen Weg ab, da Komponenten des ersteren häufig nicht funktionsfähig sind (Paredes-Sabja et al. 2011).

Die aufeinanderfolgenden Schritte aus schneller DPA-Freisetzung, partieller Kernhydratisierung, daraus folgender Aktivierung der Cortex-lytischen Enzyme, Cortex-Lyse, weiterer Kern-Rehydratisierung und daraus resultierender Inaktivierung

wurden für *Bacillus*-Sporen unter hohem Druck / erhöhten Temperaturen vorgeschlagen (Black et al. 2007; Paidhungat et al. 2002; Reineke et al. 2011; Setlow 2003; Wuytack et al. 1998), sind aber in ähnlicher Weise für *Clostridium*-Sporen unwahrscheinlich, da das Cortex-lytische Enzyme SleC des Protease-abhängigen Weges durch DPA-Freisetzung oder Kern-Rehydratisierung nicht aktiviert wird (Paredes-Sabja et al. 2008; Wang et al. 2012). Selbst innerhalb der heterogenen Gruppe von *C. botulinum* scheint es unmöglich, die Wirkung von HPT-Behandlungen auf Sporen vorherzusagen. So gelten Druck/Temperatur-Zonen der Sporenstabilisierung, die für proteolytische *C. botulinum* Stämme (Typ B) nachgewiesen wurden, (Margosch et al. 2006; Margosch et al. 2004a) nicht für nicht-proteolytische Stämme (Typ E) (Lenz et al. 2015).

Neuere Studien in Lebensmittelmodellsystemen und in verschiedenen Lebensmitteln konnten die Sporenstabilisierung durch hohen Druck gegen Hochtemperaturinaktivierung für Typ B-Stämme bestätigen. So konnte für *C. botulinum* Typ B gezeigt werden, dass bei einer gegebenen Temperatur (100, 110 und 120 °C) die Sporeninaktivierung erhöht wurde, wenn der Druck, z.B. von 600 auf 300 MPa, reduziert wurde (Maier et al. 2018).

4.2.3 Faktoren, die die HHP-Inaktivierung von Endosporen beeinflussen

Mögliche baroprotektive oder synergistische Wirkung endogener Lebensmittelparameter wie Fette, Zucker, Salze, pH-Wert und Wasseraktivität auf die HPT-Inaktivierung bakterieller Endosporen sind noch nicht gut untersucht. In Analogie zu Beobachtungen mit vegetativen Zellen wurde spekuliert, dass gelöste Stoffe auch in die innere Sporenmembran eindringen, mit Zellbestandteilen interagieren und möglicherweise zu einer verzögerten DPA-Freisetzung und Sporen-Inaktivierung führen könnten (Ananta et al. 2001; Georget et al. 2015; Sevenich et al. 2013; Sevenich et al. 2015; Sevenich et al. 2014). In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde die HPT-Inaktivierung von *C. botulinum*-Sporen in vier spezifischen Fertiggerichten und Modellsystemen mit identischem pH-Wert und identischer Wasseraktivität verglichen (Maier 2019). Die Modellsysteme enthielten gleiche Mengen an wichtigen Lebensmittelbestandteilen, sowie Ersatzkomponenten für die Hauptklassen Fett, Protein, Kohlenhydrate und Salz. Obwohl die Inaktivierungskurven der Sporen in Lebensmittelmodellen und echten Lebensmitteln ähnlich waren, variierte die Gesamtzahl der überlebenden Sporen. Darüber hinaus war es nicht möglich, aus

der Wirkung einer einzelnen Hauptlebensmittelkomponente auf die Wirkungen von komplexen Gemischen und Matrixeffekten auf Endosporen vom *C. botulinum*-Typ zu schließen. Dies legt nahe, dass der Einfluss von Lebensmittelmatrizes auf die HPT-Inaktivierung von Endosporen von dem, der für die HPP-Inaktivierung vegetativer Zellen beschrieben wird, abweichen könnte und komplexer und differenzierter als bisher angenommen ist (Maier 2019). Eine Übersicht über Studien, die die Abtötung von Sporen in Lebensmitteln untersucht haben, wurde zusammengestellt (Aganovic et al., in press).

4.2.4 Zusammenfassung

Die HPT-Inaktivierung von Bacilli und Clostridien ist differenziert zu betrachten. Für die Bestimmung der Lebensmittelsicherheit in Bezug auf Toxin-bildende Clostridien ist eine Fall-zu-Fall-Untersuchung für mit HPT behandelte Lebensmittel erforderlich, besonders bei niedrigen Temperaturen und/oder pH-Werten. Verschiedene Studien mit generischem Ansatz zeigen, dass die Auswirkungen von Lebensmittelkomponenten auf die Inaktivierung von Endosporen schwierig zu bewerten sind und generelle Aussagen bisher nicht möglich zu sein scheinen. Aufgrund fundamentaler Unterschiede ist es unwahrscheinlich, dass echte Surrogate (Leitkeime) für *Clostridium*-Sporen zum Zwecke der Bewertung der Wirksamkeit von HPT-Prozessen unter den *Bacillus*-Arten gefunden werden können. Für die proteolytischen *C. botulinum*-Typen A und B könnte *C. sporogenes* als Surrogat fungieren, da der Unterschied zwischen diesen Organismen auf die Toxinbildung beschränkt ist. Für den nicht-proteolytischen Typ E können zurzeit keine Surrogate vorgeschlagen werden.

4.3 Viren

In der Stellungnahme von 2004 wurde festgehalten, dass Viren grundsätzlich durch Hochdruck inaktiviert werden können, aber wenig Daten vorhanden sind. Eine generelle Aussage war zur damaligen Zeit nicht möglich (SKLM 2004).

4.3.1 Lebensmittel-relevante Viren

Die wichtigsten Viren, die durch Lebensmittel übertragen werden, sind Norovirus und Rotavirus, Verursacher einer Gastroenteritis, sowie Hepatitis A- und E-Virus, Verursacher einer infektiösen Hepatitis. Diese Viren sind RNA-Viren ohne Virushülle,

die im Allgemeinen eine hohe Stabilität gegenüber den meisten Umweltbedingungen aufweisen. Die üblicherweise identifizierten Lebensmittelmatrizes, die an Krankheitsausbrüchen beteiligt sind, sind für die einzelnen Viren unterschiedlich. Norovirus, Rotavirus und Hepatitis A-Virus werden über menschlichen Kot ausgeschieden und kontaminieren hauptsächlich Lebensmitteloberflächen während der Handhabung von Lebensmitteln. Darüber hinaus wurden Schalentiere und Beeren oft als Virusübertragungsvehikel identifiziert, die durch Kontakt mit Abwasser während ihres Wachstums kontaminiert werden. Im Gegensatz dazu ist das Hepatitis E-Virus zoonotisch und weit verbreitet in subklinisch infizierten Schweinen und Wildschweinen. Fleisch und Fleischprodukte, die aus infizierten Tieren gewonnen werden, sind daher als Infektionsquelle des Menschen mit diesem Virus anzusehen (Giannini et al. 2018; Szabo et al. 2015).

4.3.2 Überblick über die HHP-Inaktivierung von Viren

Die ausgeprägte Stabilität gegenüber einem gegebenen Umweltfaktor kann zwischen den Viren und auch zwischen verschiedenen Typen des gleichen Virus beträchtlich variieren. Dies wurde wiederholt in Hitzestabilitätsstudien (Arthur and Gibson 2015) und auch für HHP-Behandlungen (siehe unten) gezeigt.

Studien zur Inaktivierung durch HHP wurden für verschiedene Virus-Arten (Anhang, Tabelle 2) wie u.a. für Hepatitis A-Virus (Pavoni et al. 2015), Humanes Norovirus (Li et al. 2013a), Vogel-Influenzavirus (Isbarn et al. 2007), Rotavirus (Araud et al. 2015), Humanes Adenovirus (Kovac et al. 2012) sowie verschiedene humanpathogene Picornaviren (Kingsley et al. 2004) einschließlich des Poliovirus (Kingsley et al. 2002) veröffentlicht. Die HHP wird auch eingesetzt, um inaktivierende Verfahren zur Impfstoffherstellung zu entwickeln (Dumard et al. 2013) oder die Ausbreitung tierpathogener Viren durch importierte Fleischprodukte zu kontrollieren (Buckow et al. 2017).

In den zahlreichen Studien zur Inaktivierung von Viren in Lebensmitteln, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, erwies sich meist eine Behandlung mit 400 MPa für 5 Minuten bei 4 °C als wirksam ($>4 \log_{10}$ Abnahme), wobei die Lebensmittelmatrizes eine Rolle bei der Virusstabilität spielen. Die Effizienz von HHP war darüber hinaus von verschiedenen Faktoren insbesondere von der untersuchten Virusspezies abhängig, so dass in einigen Studien deutlich höhere Druck/Zeit-Kombinationen für eine signifikante Inaktivierung notwendig waren. Auch können

verschiedene Genotypen der gleichen Virusspezies unterschiedliche Stabilitäten gegenüber HHP zeigen, wie für Humanes Norovirus und Rotavirus gezeigt wurde (Araud et al. 2015; Li et al. 2013a; Lou et al. 2016; Ye et al. 2015).

Die unterschiedlichen Mechanismen der Virusinaktivierung durch HHP sind bisher nicht vollständig bekannt. Eine Zerstörung oder Deformation des viralen Kapsids wurde nach HHP nachgewiesen, obwohl die Antigenität des Virus weitgehend erhalten blieb (Dumard et al. 2013; Lou et al. 2011). Im Gegensatz dazu war das Virusgenom nach HHP-Behandlung offensichtlich nicht oder nur leicht geschädigt (Lou et al. 2011; Sánchez et al. 2011).

4.3.3 Faktoren, die die HHP-Inaktivierung von Viren beeinflussen

Faktoren, die die Effizienz der HHP-Behandlung je nach Höhe und Dauer des Druckes beeinflussen, sind Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration und die Zusammensetzung der Einbettungsmatrix. Während mehrere Studien für Noroviren eine höhere Effizienz von HHP bei tiefen Temperaturen mit einem Optimum bei 0 °C zeigen (Huang et al. 2014b; Lou et al. 2015), wurden für Hepatitis A-Viren bei 20 °C im Vergleich zu 5 °C bessere Ergebnisse erzielt (Kingsley and Chen 2009). Während niedrige pH-Werte zu einer besseren Inaktivierung des Hepatitis A-Virus führten (Kingsley and Chen 2009), war die Inaktivierung des Humanen Norovirus bei neutralem pH-Wert effizienter als bei niedrigem pH-Wert (Li et al. 2013a; Lou et al. 2016). Zunehmende Konzentrationen von Natriumchlorid führen zu einer niedrigeren HHP-Effizienz für das Hepatitis A-Virus (Kingsley and Chen 2009). Die Zugabe von Calciumchlorid zeigte eine signifikante Schutzwirkung gegen HHP-Inaktivierung des Norovirus (Sánchez et al. 2011) und Adenovirus (Kovac et al. 2012). Das Hepatitis A-Virus wurde in marinierten Schalentieren durch HHP im Vergleich zu nicht marinierten Schalentieren wirksamer inaktiviert (Pavoni et al. 2015). Norovirus war an getrockneten Beeren im Vergleich zu frischen Beeren deutlich resistenter gegen HHP-Inaktivierung (Huang et al. 2014b; Li et al. 2013a). Eine kürzlich durchgeführte Studie bestätigte Unterschiede in der Stabilität des Norovirus gegenüber HHP, je nachdem ob es in grünen Zwiebeln oder in Salsa enthalten war (Sido et al. 2017). In den meisten Studien wurden nur wenige unterschiedliche Druck/Temperatur/Zeit-Kombinationen untersucht. Es gibt Studien zur Entwicklung von Modellen, die eine Vorhersage der Virusinaktivierung in Abhängigkeit verschiedener Parameterkombinationen ermöglichen (Buckow and Heinz 2008).

4.3.4 Surrogatviren und alternative Methoden zur Bewertung der Virusinaktivierung

Für viele im Lebensmittelbereich relevanten Viren, wie z.B. das Humane Norovirus und das Hepatitis E-Virus, existieren bisher keine effizienten Zellkultursysteme, um deren Infektiosität direkt zu testen. Kürzlich veröffentlichte neuartige Zellkultursysteme für Humane Noroviren (Ettayebi et al. 2016; Jones et al. 2014) sind vielversprechend, aber für größere Stabilitätsstudien bisher noch nicht anwendbar. Im Falle des Hepatitis E-Virus scheinen kürzlich von chronisch infizierten Patienten isolierte Virusstämme, die ein erhöhtes Zellkulturwachstum zeigen, für die Verwendung in Virusinaktivierungsstudien geeignet zu sein (Cook et al. 2017). Bisher wurden diese Systeme aber noch nicht zur Untersuchung des Einflusses von HHP auf die Infektiosität von Viren verwendet. Dies wurde vorwiegend mit Hilfe ähnlich aufgebauter und ähnlich empfindlicher Viren (Surrogatviren), die einfacher auf Infektiosität getestet werden können, ermittelt. Alternativ werden molekulare Kapsid-Integritätstests, d.h. Isolierung von Viruspartikeln und Prüfung auf Funktionalität, eingesetzt.

Die hauptsächlich verwendeten Surrogatviren für Humanes Norovirus waren Murines Norovirus (Huang et al. 2014b; Lou et al. 2011; Sánchez et al. 2011), Felines Calicivirus (Chen et al. 2005; Kingsley and Chen 2008) et al., 2005, Kingsley und Chen, 2008) und in einer neueren Studie das Tulane-Virus, ein Calicivirus aus Affen (Li et al. 2017). Die Bedeutung der Daten zu den Surrogatviren für das Norovirus ist jedoch umstritten (Richards 2012). Bisher wurde eine Studie mit verschiedenen Viren und Bakteriophagen, die als Surrogate für das Hepatitis E-Virus mit HHP behandelt wurden, publiziert (Emmoth et al. 2017).

Es gibt eine Humanstudie zum Humanen Norovirus in Austern, in der die Infektiosität nach HHP-Behandlung direkt an Freiwilligen untersucht wurde, gefolgt von der Analyse ihrer Virusausscheidung (Leon et al. 2011). In dieser Studie war eine Behandlung bei 600 MPa für 5 Minuten für die vollständige Inaktivierung notwendig. Im Gegensatz dazu war das Murine Norovirus bereits nach einer HHP-Behandlung bei 400 MPa für 2 min vollständig inaktiviert (Lou et al. 2011). Auch die Ergebnisse aus Kapsid-Integritätstests müssen mit Vorsicht interpretiert werden. Intakte Viruspartikel werden hierbei durch Bindung an Rezeptormoleküle gereinigt, gefolgt von einem Nachweis des verpackten Virusgenoms durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). In den meisten Fällen wurde diese Methode

nicht durch direkten Vergleich mit Infektiositätsassays überprüft. Mindestens eine Studie zeigte jedoch eine gute Übereinstimmung dieser Technik mit einem Tierinfektiositätstest, bei dem gnotobiotische Ferkel (d.h. möglichst keimfrei aufgezogen) mit menschlichen Noroviren inokuliert wurden und die Virusausscheidung gemessen wurde (Lou et al. 2015).

4.3.5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Viren hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber HHP-Behandlung untersucht sowie Faktoren, die ihre Stabilität beeinflussen, identifiziert. Aufgrund der Notwendigkeit aufwändiger Zellkulturen oder molekularer Techniken wurden in den meisten dieser Studien jedoch nur einige wenige Analysepunkte untersucht, und umfassendere kinetische Studien und Vorhersagemodelle fehlen meist. Die $\log_{10}$ -Reduktion eines Virus, die nötig ist, um ein sicheres Lebensmittel zu erhalten, ist bis jetzt noch nicht definiert. Außerdem fehlen Zellkultursysteme zur Infektiositätsbestimmung besonders von den relevanten Virus-Arten Humaner Norovirus und Hepatitis E-Virus, wodurch bisher nur Abschätzungen zu deren Inaktivierung auf der Basis von Surrogatviren und molekularer Techniken erfolgten.

4.4 Parasiten

In der Stellungnahme von 2004 wurde das Thema der Hochdruckinaktivierung von lebensmittelrelevanten Parasiten aufgrund fehlender Daten nicht aufgegriffen. Die Inaktivierung von Parasiten mittels hydrostatischem Druck wurde seit 2004 weitergehend untersucht und prinzipiell nachgewiesen.

4.4.1 Lebensmittel-relevante Parasiten

Parasiten, die über Lebensmittel übertragen werden und Krankheiten beim Menschen verursachen können, gehören zu den Protozoen oder zu den Helminthen.

Protozoen sind einzellige Eukaryonten, die freilebend oder parasitär sein können. Parasitäre Protozoen sind in der Lage, sich im Menschen zu vermehren, was zu ihrer Verbreitung beiträgt und auch die Entwicklung schwerer Infektionen aus nur einem einzigen Organismus zur Folge haben kann. Zu den für den Menschen infektiösen Protozoen zählen die Toxoplasmen, Amöben, Krypto- und Sarkosporidien und Geißeltiere wie Giardia und Leishmania.

Helminthen sind Würmer, die freilebend oder parasitär sein können. Bekannteste parasitäre Vertreter sind Bandwürmer (Cestoden) und Saugwürmer (Trematoden) aus dem Stamm der Plattwürmer (Plathelminthes), Spulwürmer (z.B. *Ascaris*), *Trichinella* und Anisakidae aus dem Stamm der Fadenwürmer (Nematoden) und verschiedene menschliche Darmparasiten, wie *Moniliformis*, aus dem Stamm der Kratzwürmer (Acanthocephala).

Lebensmittelbedingte Infektionen mit Parasiten sind selten, können aber erhebliche gesundheitliche Auswirkungen haben. Unter den 24 (potenziell) durch Lebensmittel übertragbaren Parasiten, die von der FAO/WHO 2012 (FAO/WHO, 2014) zur Risikoeinstufung aufgelistet wurden, kann die Übertragung von 14 von ihnen mit Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Meeres- als auch Süßwasserfische, Süßwasserkrustentiere, Schweinefleisch, Rindfleisch und Wildtierfleisch, seltener Muscheln und Milch) erfolgen. Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs können fäkal verunreinigt sein und zu Überträgern von Parasiten werden (Painter et al. 2013).

Der Rohverzehr von leichtverderblichen oder kontaminierten Produkte oder die minimale Verarbeitung von Produkten tierischen Ursprungs sind Hauptursache für die Übertragung von Parasiten. Fischprodukte wie Sushi, Sashimi und Ceviche, oft infiziert mit *Anisakis simplex* (Mo et al., 2014; Robertson, 2018), oder kurz bzw. nicht gegarte Fleischprodukte wie Tartar, Carpaccio und thailändisches Khao Soi sind Lebensmittel, die mit Parasiten belastet sein können. Einige Kochtechniken, wie z.B. kurze Garzeiten, oder andere Zubereitungsarten tierischer Produkte (z.B. Fermentation, Trocknung, Gefrieren, etc.) reichen möglicherweise zur Inaktivierung der Parasiten nicht aus. Eine Möglichkeit der Inaktivierung bei angestrebtem Erhalt der Frische bietet die Anwendung von hydrostatischem Hochdruck.

4.4.2 Überblick über die HHP-Inaktivierung von Parasiten

Untersuchungen zur Wirkung von HHP wurden überwiegend mit *Anisakis simplex* (Spulwurm), Trichinellen, Toxoplasma und *Cryptosporidium parvum* (Protozoen) durchgeführt (Anhang, Tabelle 3).

Anisakis-Larven wurden aus Fischgewebe isoliert und nach HHP-Behandlung bis 200 MPa für 10 Minuten bei 0 °C und 15 °C auf ihre Beweglichkeit als Indikator für das Überleben untersucht. Oberhalb von 140 MPa werden die Larven erfolgreich abgetötet, unterhalb von 140 MPa muss die Behandlungszeit für einen Prozesserfolg um bis zu eine Stunde verlängert werden. Druckzyklen erhöhten den Prozesserfolg im

Vergleich zu einer einzigen Druckbehandlung und ähnlicher Behandlungszeit (Molina-Garcia und Sanz, 2002).

Eier von *Ascaris suum* (Schweinespulwurm) wurden mit unterschiedlich hohem HHP behandelt. HHP über 300 MPa verhinderte die Zellteilung und damit die Entwicklung der Eier, darunter entwickelten sich in Abhängigkeit der Druckhöhe 2 % der Eier nach einer Behandlung mit 250 MPa bis 98 % nach einer Behandlung von 138 MPa (Rosypal et al., 2011).

Auswirkungen von HHP (100 bis 550 MPa, 1 min) auf die Lebensfähigkeit von *Toxoplasma gondii* Oozysten wurden anhand von Fütterungsversuchen an Mäusen untersucht. Oozysten, die mit über 340 MPa behandelt wurden, waren für Mäuse nicht infektiös, unbehandelte oder unter 270 MPa behandelte Oozysten lösten eine akute Toxoplasmose aus. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten keine strukturellen Veränderungen der Oozysten nach einer Behandlung bis 550 MPa (Lindsay et al., 2005).

In einer weiterführenden Studie wurden die Auswirkungen einer HPP-Behandlung (100 bis 400 MPa für bis zu 90 Sekunden) auf lebensfähige Gewebezysten von *Toxoplasma gondii* VEG (Typ III) in Schweinehackfleisch untersucht. Die mit über 300 MPa behandelten Gewebezysten führten zu keiner Infektion in Mäuse. Bei einer Behandlung unter 200 MPa kam es unabhängig von der Behandlungszeit zu einer Infektion (Lindsay et al., 2006).

Himbeeren wurden mit 5×10^4 Oozysten von *Toxoplasma gondii* VEG (Typ III) beimpft und mit 100 bis 500 MPa für 60 s behandelt. Es waren 340 MPa für 60 Sekunden notwendig, um eine Infektion mit den inokulierten Proben zu verhindern (Lindsay et al., 2008).

In einer anderen Studie wurden *Cryptosporidium parvum* Oozysten in Apfel- und Orangensaft suspendiert und mit etwa 550 MPa für bis zu 120 Sekunden behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass HHP *C. parvum* Oozysten nach 30 Sekunden um mehr als $3,4 \log_{10}$ inaktiviert hat. Proben, die 60 Sekunden und länger mit HHP behandelt wurden, zeigten keine Infektiosität (Slifko et al., 2000).

Für *Cyclospora cayetanensis* (Protozoen), nachweisbar an Lebensmitteln, die fäkal verunreinigt waren und Darminfektionen auslösten, gibt es keine Tests auf Infektiosität. *Eimeria acervulina* (Geflügel-Kokzidiose) gilt als Surrogat für diesen Parasiten. In einer Studie wurden Himbeeren und Basilikum mit verschiedenen hohen Mengen an sporulierten *Eimeria acervulina* Oozysten (10^4 und 10^6 Oozysten) beimpft

und mit 550 MPa bei 40 °C für 2 Minuten behandelt. Die aus den Druck-behandelten Produkten isolierten Oozysten wurden an Masthühner verfüttert. Die Hühner blieben asymptomatisch und schieden keine Oozysten aus (Kniel et al., 2007).

Die Auswirkungen von HHP (140 bis 550 MPa für 1 Minute) auf die Infektiosität von *Encephalitozoon cuniculi* Sporen (Encephalitozoonose bei Kaninchen) wurde *in vitro* an Wirtszellen untersucht. Es wurde kein Einfluss auf die Infektiosität der mit 140 MPa behandelten Sporen beobachtet. Die mit über 200 MPa behandelte Sporen zeigten eine Verringerung der Infektiosität. Nach der Behandlung über 345 MPa konnten die Sporen die Wirtszellen nicht mehr infizieren. Es wurden keine morphologischen Veränderungen an druckbehandelten Sporen mit der Transmissions-Elektronenmikroskopie beobachtet (Jordan et al., 2005).

4.4.3 Methoden zum Nachweis der Inaktivierung

Die infektiöse Einheit für Parasiten kann ein Individuum (z.B. Amöbe), ein Ei oder ein Larvenstadium (Helminthen) oder auch vier bis acht Individuen (reife Oozysten) sein. Für Parasiten, die Gewebezysten bilden, kann eine infektiöse Einheit (die Gewebezyste) daher auch aus einigen wenigen bis zu ca. 1000 Individuen pro Gewebezyste (z.B. *Toxoplasma*) bestehen. Aufgrund der variierenden Infektionseinheiten können logarithmische Inaktivierungsverläufe nur beschrieben werden, wenn die zu Grunde liegende Infektionseinheit benannt wird (z.B. Gewebezyste, Zyste, Oozyste, Ei). Parasiten auf oder in Lebensmitteln wachsen oder vermehren sich während der Lagerung im Gegensatz zu bakteriellen Erregern nicht. Infolgedessen kann eine Reduktion um zwei- oder drei Zehnerpotenzen für parasitäre Kontamination bereits sehr bedeutsam sein (Franssen et al, 2019).

Die Übertragungsstadien der meisten lebensmittelbedingten Parasiten erfordern ein Wirtstier und können deswegen nicht im Labor kultiviert werden. Die bisherige Standardmethode zur Beurteilung der Inaktivierung von Parasiten ist die Bestimmung der Infektiosität mittels Bioassay. Die Verwendung von Versuchstieren ist dabei jedoch umstritten. In neueren Studien wurden Untersuchungen der Infektiosität anhand von Ersatzindikatoren durchgeführt. Solche validierten Indikatoren können z. B. der Verlust der Entwicklungsfähigkeit eines Parasiten sein, eine mikroskopische Bewertung der Motilität bzw. der morphologischen Integrität oder molekularbiologische Methoden zur Bewertung genetischer Aktivitäten (Rousseau et al., 2018).

4.4.4 Zusammenfassung

Parasiten, die über Lebensmittel übertragen werden können, sind eine sehr heterogene Gruppe aus einzelligen Eukaryonten und Helminthen. Sie vermehren sich nicht auf dem Lebensmittel und gelangen teilweise durch unsaubere Produktionsbedingungen auf die Lebensmittel. Generell kann bei einer Hochdruckbehandlung zur Inaktivierung von vegetativen Bakterien von einer begleitenden inaktivierenden Wirkung auf Parasiten ausgegangen werden. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass auch für die Parasiten die Bedingungen zur Inaktivierung je nach Parasitenart und Lebensmittel variieren können. Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen kann jedoch abgeleitet werden, dass unter den industrierelevanten Druck/Zeit/Temperaturbedingungen von 550 MPa, 2 min und 20 °C Parasiten soweit geschädigt werden, dass keine Infektiosität sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln mehr nachweisbar ist (Anhang, Tabelle 3). Wenn die vollständige Inaktivierung der Parasiten bei niedrigeren Druckstufen ein Prozessziel ist, muss ggf. die erfolgreiche Wirkung überprüft werden, da unterhalb von 300 bis 350 MPa die Effizienz der Abtötung bisher untersuchter Parasiten abnimmt. Bei Meeresfrüchten, Schalentieren und „ready to eat“-Lebensmitteln, Produkte, die bereits mit HHP kommerziell behandelt werden (Tabelle 1), sollte dies bei vermutetem Parasitenbefall berücksichtigt werden.

5 Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf Lebensmittelinhaltsstoffe

In der Stellungnahme von 2004 wurde festgehalten, dass untersucht werden muss, ob das Verfahren im Vergleich zu konventionell behandelten Erzeugnissen Veränderungen der chemischen Zusammensetzung und/oder Struktur der Lebensmittelinhaltsstoffe bewirkt (SKLM 2004).

Diese Veränderungen können das Resultat der direkten Wirkung des Hochdrucks auf Inhaltsstoffe sein oder durch das Einwirken auf den Ablauf chemischer Reaktionen hervorgerufen werden, welche stoffliche Veränderungen zur Folge haben. Bei der Betrachtung zellstrukturierter Lebensmittelsysteme ist zudem noch die mögliche Beeinflussung der Zell- und Gewebestruktur durch die Hochdruckbehandlung zu berücksichtigen. Hieraus können sich indirekte Auswirkungen auf die Stabilität sowie die analytische Erfassung von Lebensmittelinhaltsstoffen ergeben.

5.1 Einfluss auf chemische Reaktionen

Die SKLM hat 2004 darauf hingewiesen, dass prinzipiell solche chemischen Reaktionen unter Druck beschleunigt werden können, deren Reaktions- und Aktivierungsvolumina negativ sind (SKLM 2004). Aus der organischen Chemie bekannte Beispiele wie Zykloadditionen und Bildung von Sulfonium- oder Phosphonium-Salzen sind im Lebensmittel mangels geeigneter Reaktionspartner von untergeordneter Bedeutung. Im Vergleich zur Sicherheitsbewertung von 2004 wurden durch gezielte Untersuchungen lebensmittelnaher Modellsysteme nach HHP-Behandlung deutliche Fortschritte in der Bewertung einzelner chemischer Aspekte erzielt.

5.1.1 Reaktionen kurzkettiger Kohlenhydrate

Im Allgemeinen sind Kohlenhydrate hochdruckstabil. Aus Untersuchungen zur Mutarotation von Monosacchariden, z.B. die Mutarotation der Glucose, die mit Druck beschleunigt wird, kann allerdings eine höhere Reaktivität abgeleitet werden (Andersen and Gronlund 1979). In Versuchen mit Rohmilch wurde bestätigt, dass das Aktivierungsvolumen der Isomerisierung von Laktose zu Laktulose ein negatives Vorzeichen hat (Martínez-Monteagudo and Saldaña 2015) und bei 600 MPa, 120°C und 15 Minuten Haltezeit eine Laktulosekonzentration von 650 mg/L erreicht wurde. Wegen der extremen Bedingungen liegt dieser Wert aufgrund der Kinetik der Laktulosebildung in einer Größenordnung, die im Grenzbereich zwischen kommerzieller, konventioneller UHT-Milch (135 bis 150 °C für wenige Sekunden) und Sterilmilch (110-120°C für 10-30 Minuten) gefunden werden kann (Cattaneo et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurde am Beispiel von Laktose in alkalischer Lösung unter Hochdruck eine Verlangsamung der Isomerisierung beschrieben (Moreno et al. 2003b). Eine erhöhte Reaktivität findet man auch für Dicarbonyle, die als Zuckerabbauprodukte in der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion auftreten. Diese reagieren sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Proteinen zu bislang nicht näher charakterisierten Produkten weiter (Schwarzenbolz et al. 2017; Schwarzenbolz and Henle 2010). Mögliche Triebfeder dieses Ablaufes kann eine druckverstärkte Aldolreaktion sein, die in Maillard-System beschrieben ist und dort zu Verschiebungen der Aromazusammensetzung führt (Schieberle et al. 2005).

Bisher wurden keine weitergehenden Untersuchungen zur Auswirkung von Druck auf Karamellisierungsreaktionen, das heißt auf verfahrensbedingte Reaktionen von Kohlenhydraten, beschrieben.

5.1.2 Maillard-Reaktion

Die Maillard-Reaktion, die Reaktion zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und Aminokomponenten, beeinflusst Farbe und Aroma von Lebensmitteln, und Auswirkungen der Produkte auf die menschliche Gesundheit werden in der Literatur diskutiert (Henle 2007). Da Druck in Ionenmilieus, wie sie in Lebensmitteln üblich sind, zu einer pH-Absenkung führt, wird die Maillard-Reaktion (MR) bei der Messung von Summenparametern wie Bräunung verlangsamt (Tamaoka et al. 1991). Für einzelne Stadien konnten im Modellsystem Aktivierungsvolumina ermittelt werden, die allerdings lediglich für den initialen Kondensationsschritt negativ, also beschleunigend, waren (Isaacs and Coulson 1996). Bei deutlich alkalischen pH-Werten, die in Lebensmitteln nicht auftreten, wird eine Beschleunigung der frühen und fortgeschrittenen Maillard-Reaktion beschrieben (Isaacs and Coulson 1996; Moreno et al. 2003a).

Gezielte Untersuchungen zur Druckauswirkung auf definierte Maillard-Systeme lieferten für Reaktionen an Lysinresten bis dato zur überwiegenden Mehrheit verlangsamende Auswirkungen (Bristow and Isaacs 1999; Buckow et al. 2011; Hill et al. 1996; Schwarzenbolz et al. 2017; Schwarzenbolz et al. 2002). Als Grund wird die verstärkte Protonierung der ϵ -Aminogruppe unter Druck angesehen (Schwarzenbolz et al. 2017). Lediglich zu Amadori-Produkten, wie beispielsweise Fructoselysin, die quantitativ bedeutsame MR-Produkte sind, wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt widersprüchliche Aussagen gemacht (Ma et al. 2017; Moreno et al. 2003a). Von dieser Ausnahme abgesehen führt der Druckeinfluss zu einer Reduzierung der Maillard-Reaktion an Lysinresten (Ruiz et al. 2016).

Im Gegensatz dazu zeigen Untersuchungen, dass Reaktionen an Argininresten mit Druck beschleunigt werden können. Verschiedene Produkte (z.B. Pentosidin (Schwarzenbolz et al. 2000) oder Carboxymethylarginin (Alt and Schieberle 2005) werden nach Druckbehandlung in höheren Konzentrationen nachgewiesen, als in äquivalenten Ansätzen unter Atmosphärendruck. Allerdings handelt es sich bei diesen Verbindungen um Minorkomponenten, die selbst im Modellansatz unter nicht praxisrelevanten Bedingungen (Pentoseüberschuß, 60 °C, 600 MPa, 2 h Haltezeit) nur

Konzentrationen erreichten (im genannten Fall bis 4,3 mg Pentosidin/100 g Protein), die in handelsüblichen Lebensmitteln auch gefunden werden (z.B. Röstkaffee 4,0 mg/100g Protein (siehe: (AGE-database 2019); AGEs are advanced glycation end products)). Weitere typische Verbindungen stellen Kondensationsprodukte von Arginin mit Dicarbonylen (Zuckerabbauprodukte), sogenannte Hydroimidazolone, dar (Hellwig and Henle 2014). Auch hier kann im HPT Modellsystem die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden (Alt and Schieberle 2005).

Für das kinetische Verhalten des Strecker-Abbaus, der im Zuge der Maillard-Reaktion zur Bildung aromaaktiver Aldehyde und Pyrrazine führt, konnte ein verlangsamernder Einfluss des Druckes gezeigt werden (Kebede et al. 2017).

Grundsätzlich konnten unter Hochdruck keine neuartigen MR-Produkte nachgewiesen werden.

5.1.3 Lipidoxidation

Die Autoxidation von Lipiden verläuft über einen Radikalkettenmechanismus, die auch von Druck beeinflusst werden kann (Tauscher 1995). Untersuchungen an Linolensäure bestätigten die Auffassung, dass die Startphase durch Druck verlangsamt und die Kettenfortpflanzung beschleunigt wird (Martinez-Monteagudo and Saldaña 2014). Kettenabbruchsreaktionen sind diffusionskontrolliert und werden daher unter Druck vermindert. Entsprechend sind die Ausgangsqualität der Lipide und die Anwesenheit pro-oxidativer Stoffe (z.B. Metallionen) während der Behandlung ausschlaggebend für den Druckeinfluss. In hochdruckbehandelten, gelagerten Lebensmitteln verkürzte sich oftmals die Induktionsphase und damit die Lagerstabilität (Buckow et al. 2013; Cheah and Ledward 1996; Segovia Bravo et al. 2012; Simonin et al. 2012). Als Ursache wird die Freisetzung von Pro-Oxidantien während der Druckbehandlung aus der Lebensmittelmatrix angesehen (Bolumar et al. 2012). Darüber hinaus beeinflussen viele Randbedingungen wie pH-Wert, Wassergehalt, Antioxidantien Fettsäurespektrum und enzymatischen Aktivitäten den Verlauf der Lipidoxidation während einer Druckbehandlung und der anschließenden Lagerung, was die Vergleichbarkeit von Untersuchungen erschwert.

5.1.4 Prozesskontaminanten

Die Bildung von Prozesskontaminanten ist hauptsächlich abhängig von der Hitzeintensität einer thermischen Behandlung. Die Verringerung der thermischen

Belastung während der HHP-Behandlung führt zu niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu herkömmlichen thermischen Behandlungen. Als Ersatz für die thermische Sterilisation, die besonders hohe Temperaturen nutzt, ist die HHP-Sterilisation von besonderem Interesse. Es gibt Hinweise, dass unter Druck andere bzw. verlangsamte Maillard-Reaktionswege in Abhängigkeit von z.B. pH-Wert, der Behandlungszeit und dem Druckniveau ablaufen, die zu geringerer Belastung mit AGEs führen. Hinsichtlich einer toxikologischen Bewertung wirkt sich die unter Druck verminderte Bildung prozessinduzierter Kontaminanten wie Furan (Sevenich et al. 2013), Acrylamid (De Vleeschouwer et al. 2010; Keramat et al. 2011) aber auch Dicarbonylen (siehe auch 4.1.2) eher positiv aus. Für 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF), dessen toxikologische Relevanz fragwürdig ist (Abraham et al. 2011), konnte in Karamell eine reduzierte Bildung beschrieben werden (Guan et al. 2011), während im komplexeren Lebensmittel ein Konzentrationsanstieg nach HHP gefunden wurde (Liu et al. 2014). Allerdings gibt es nur begrenzte Informationen zur Druckabhängigkeit der Reaktionskinetik bei HP-Sterilisation. Weiterhin zu beachten ist, dass viele Ergebnisse im Labormaßstab erfolgt sind, deren Übertragbarkeit auf kommerzielle Anwendungen nicht geklärt ist.

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) benötigen zur Bildung drastische Temperaturbedingungen z.B. unvollständige Verbrennung, die im kommerziellen Einsatz von HHP oder HPT nicht erreicht werden. Daher ist mit einer produktionsbedingten Entstehung nicht zu rechnen (Segovia Bravo et al. 2012).

Zu N-Nitrosoverbindungen gibt es lediglich in einer Literaturstelle Hinweise, dass diese unter erhöhtem Druck bei Anwesenheit von Nitrit und sekundären Aminen gebildet werden können (Segovia Bravo et al. 2012).

5.1.5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnten bei Untersuchungen zur Maillard-Reaktion, also mit Beteiligung einer Aminokomponente, unter HHP deutliche Fortschritte gemacht werden. Obwohl noch nicht alle Fragen geklärt sind, kann im Allgemeinen kein Anstieg unerwünschter Verbindungen insbesondere von Lysinderivaten (z.B. AGEs) oder das Auftreten neuartiger Verbindungen beobachtet werden. Davon abzugrenzen sind Um- und Abbaureaktionen von Kohlenhydraten ohne Aminokomponente, die laut den vorhandenen Berichten durch Druck beschleunigt werden. Im Bereich der Kohlenhydrate und Lipidoxidation sind trotz neuer Erkenntnisse noch nicht

ausreichend Details des reaktiven Verhaltens für eine allgemeine Bewertung vorhanden. Allerdings legt eine Einschätzung der vorhandenen Literatur nahe, dass generelle Aussagen mit Hilfe weiterer Untersuchungen unter Einsatz moderner Verfahren möglich werden.

5.2 Einfluss auf Inhaltsstoffe und die Struktur von Lebensmitteln

In der Stellungnahme von 2004 wurde darauf hingewiesen, dass über Inhaltsstoffe und ihr Verhalten unter hydrostatischem Druck nur wenige Daten vorliegen (SKLM 2004). In den letzten Jahren haben sich viele Studien mit dem Einfluss von HHP auf Lebensmittelinhaltsstoffe und -strukturen, die teilweise auch Aspekte der Lebensmittelsicherheit betreffen, befasst (Aganovic et al., in press).

Ein Effekt von hydrostatischem Hochdruck auf die Primärstruktur von Lebensmittelinhaltsstoffen ist in üblichen Druckbereichen, die weit unter 2 GPa liegen, aufgrund der sehr geringen Kompressibilität kovalenter Bindungen nicht zu erwarten (Aertsen et al. 2009). Im Gegensatz dazu wird die räumliche Struktur von Makromolekülen durch eine Hochdruckbehandlung aufgrund der Kompressibilität der Raumstruktur beeinflusst und es ergibt sich ein dynamisches Verhalten von Makromolekülen unter Druck (Balasubramaniam 2016). Eine Hochdruckbehandlung kann daher neben der Anwendung zur Haltbarmachung von Lebensmitteln auch zur gezielten Modifizierung von Lebensmittelstrukturen eingesetzt werden.

5.2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

Bei sekundären Pflanzenstoffen handelt es sich um niedrigmolekulare Lebensmittelinhaltsstoffe, die keiner direkten Beeinflussung durch eine Hochdruckbehandlung unterliegen. Effekte der Hochdruckbehandlung auf die Zellstruktur des Pflanzengewebes und damit auf enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse können jedoch mit Auswirkungen auf sekundäre Pflanzenstoffe verbunden sein.

In einigen Fällen wurde ein Anstieg an Phenolen nach HHP-Behandlung festgestellt (Sánchez-Moreno et al. 2005), der nach Angaben der verschiedenen Autoren hauptsächlich auf bessere Extrahierbarkeit aufgrund von stärkerem Zellaufschluss nach Druckbehandlung zurückzuführen ist. Die unter Umständen in größeren Mengen freigesetzten ernährungsphysiologisch wertvollen Stoffe können während nachfolgender Verarbeitungsschritte enzymatischen oder nicht-enzymatischen

Reaktionen, insbesondere Oxidationsprozessen, unterliegen (Wang et al. 2018). Ihr Verlust ist für die Sicherheit der Produkte aber nicht relevant. Der stärkere Zellaufschluss könnte aber auch zu einer höheren Extraktion antinutritiver Stoffe führen, wie z.B. Trypsin inhibierende Malanoidine aus schwarzem Knoblauch (Zhao et al. 2019), welche eine Bedeutung für die Produktsicherheit haben kann.

Kontroverse Ergebnisse zu ernährungsphysiologischen Effekten sekundärer Pflanzenmetabolite führen zu Diskussionen hinsichtlich Risiko und Nutzen dieser Stoffe. Auch für konventionell behandelte Produkte liegen in vielen Fällen keine klaren Informationen über Konzentrationsschwellen mit positiven oder negativen Auswirkungen verschiedener Sekundärmetabolite auf die Gesundheit vor. Auftretenden Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung auf diese Stoffe kann daher keine generelle Konsequenz für die Produktqualität und –sicherheit zugeordnet werden.

5.2.2 Vitamine

Vitamine sind, wie schon 2004 festgestellt (SKLM 2004), in der Regel druckstabil. Bei Folaten wurden jedoch signifikante Abbauraten unter Druck beobachtet, die auch auf molekularer Ebene erklärt werden konnten (Verlinde et al. 2009). Für Carotinoide, Chlorophylle und Tocopherole wurden nach einer Hochdruckbehandlung pflanzlicher Lebensmittel höhere Gehalte gefunden als im unbehandelten Material. Dies deutet auf eine Verbesserung der Extrahierbarkeit dieser Verbindungen unter Druck hin (Arnold et al. 2014; Westphal et al. 2018).

Vorliegende Untersuchungen zur HHP-Behandlung ziehen dabei Vergleiche zum unbehandelten Ausgangsmaterial oder zum thermisch behandelten Produkt. Letzteres ist dabei nur sehr eingeschränkt möglich, da die Vergleichbarkeit beider Behandlungen aufgrund unterschiedlicher Prozessergebnisse im Hinblick auf die mikrobielle Inaktivierung bzw. Produktstabilisierung nicht gegeben ist. Eine Reduzierung des Vitamingehaltes könnte einerseits auf einen verstärkten Zellaufschluss einhergehend mit erhöhter Oxidation bzw. enzymatischer Aktivität zurückzuführen sein. Andererseits führen Studien eine Erhöhung des Vitamingehaltes nach HHP-Behandlung ebenfalls auf einen Zellaufschluss zurück, der eine verbesserte Extrahierbarkeit bei der analytischen Konzentrationsbestimmung zur Folge hat. Sicherheitsrelevant wären kritische Abbauprodukte im Vergleich zu unbehandelten oder herkömmlich

behandelten Produkten, und auch starke Vitaminverluste der HHP-behandelten Produkte müssten als negativer Effekt angesehen werden.

5.2.3 Polysaccharide

Für Polysaccharide ist eine druckinduzierte Modifikation der physiko-chemischen Eigenschaften bekannt. Dies kann eine bei Druckbehandlung veränderte Wasserbindung bzw. einsetzende Gelbildung oder die Verringerung der Verkleisterungstemperatur mit Relevanz für das thermische Verhalten von Inhaltsstoffen umfassen (Bolumar et al. 2016). Inzwischen sind bei Drücken oberhalb des technologisch relevanten Bereiches (> 650 MPa) auch Veränderungen auf molekularer Ebene beobachtet worden. Je nach Art und Herkunft ist Stärke unterschiedlich strukturiert, und abhängig davon können sowohl 1,4- wie auch 1,6-glykosidische Bindungen betroffen sein, deren Hydrolyse zu einer Verkleinerung der Stärkemoleküle führt (Szwengiel et al. 2018). Möglicherweise kann dies auch Effekte auf die Freisetzung Stärke-assoziiierter Moleküle haben, wie es z.B. bei thermischer Prozessierung beschrieben wird (De Girolamo et al. 2016). Dies wurde für HHP-Behandlungen bisher nicht untersucht.

5.2.4 Proteine

Für Proteine ist eine druckinduzierte Denaturierung bekannt, die reversibel oder irreversibel sein und mit einer Aggregation oder Gelbildung einhergehen kann. Die Veränderung der Konformation von Proteinen unter Hochdruck bewirkt ein kleineres spezifisches Volumen und kann die Dissoziation oligomerer Proteine bei Drücken unter 200 MPa und die Umfaltung von monomeren Proteinen bei höheren Drücken umfassen (Yang and Powers 2016).

Zur chemischen Stabilität unter HHP gibt es nur wenige Daten. Es ist bekannt, dass Muskelproteine von oxidativen Prozessen betroffen sein können (Lund et al. 2011). In den wenigen Studien, die sich speziell der Proteinoxidation unter Hochdruck widmen, wurde entweder eine Steigerung der Oxidation durch die Druckbehandlung (Fuentes et al. 2010) oder keine Beeinflussung festgestellt (Cava et al. 2009). Aus diesen widersprüchlichen Angaben lassen sich derzeit noch keine grundsätzlichen Einschätzungen ableiten. Erste Arbeiten deuten jedoch an, dass die Lagerstabilität der Produkte beeinflusst wird (Villamonte et al. 2017). Hinweise zu negativen Auswirkungen auf die nutritive oder mikrobielle Produktsicherheit gibt es z.Zt. nicht.

5.2.5 Kontaminanten und Rückstände

Monochlorpropandiole (2-MCPD, 3-MCPD), deren Fettsäureester und Glycidol-Fettsäureester gelangen als Prozesskontaminanten über die Raffination von Speisefetten in Lebensmittel. Studien zum Verhalten von 3-MCPD als Leitkomponente zeigen unter Hochdruckbedingungen keine signifikanten Konzentrationsänderungen, so dass im Zuge einer HPT-Behandlung weder mit einer Neubildung noch mit einem Abbau dieser Verbindungen zu rechnen ist (Sevenich et al. 2013; Sevenich et al. 2015).

Es gibt Publikationen, die eine Abnahme von Mykotoxinen in Lebensmitteln unter HHP-Behandlung beschreiben, es liegen aber keine Informationen über zugrundeliegende Mechanismen vor. Die allgemeine Relevanz dieser Beobachtung ist zudem fraglich, da nicht die Verarbeitung, sondern die Kontrolle der Rohstoffe maßgeblich für die Reduktion der Mykotoxinbelastung in Lebensmitteln ist (Avsaroglu et al. 2015; Hao et al. 2016; Tokuşoğlu et al. 2010). Eine veränderte Freisetzung von Mykotoxinen, wie sie unter bestimmten Bedingungen für thermische Prozesse beschrieben ist (De Girolamo et al. 2016; Rychlik et al. 2014), wurde für eine Hochdruckbehandlung noch nicht untersucht.

Wenige Studien beschreiben eine Abnahme von Pestiziden im Produkt durch HHP-Behandlung, hier liegen ebenfalls keine Informationen über zugrundeliegende Mechanismen vor, die diese Beobachtungen stützen. Auch hier ist nicht die Verarbeitung der ausschlaggebende Faktor, sondern ebenfalls die Kontrolle der Rohstoffe (Iizuka et al. 2013).

5.2.6 Zell- und Gewebestruktur

In den meisten Fällen geht eine Hochdruckbehandlung mit einer Veränderung der Textur zellstrukturierter Lebensmittelsysteme einher. Wesentliche Ursachen sind dabei die Beeinflussung von Zellmembran und Zellwand, welche bei Produkten mit einem hohen Porenanteil durch die unterschiedliche Kompressibilität des Gewebematerials und der eingeschlossenen Luft verstärkt wird. Die Folge ist für pflanzliche Produkte eine Gewebeerweichung und eine Zerstörung intrazellulärer Strukturen (Gonzalez and Barrett 2010). Damit verbunden sind die Freisetzung von Zellinhaltsstoffen sowie verstärkte Enzym- und Oxidationsreaktionen. Ähnliche Zellaufschlusseffekte sind bei anderen mechanischen oder thermischen Prozessen zu beobachten. Bei thermischen Prozessen ist der Zellaufschluss jedoch eine Folge der

Temperaturerhöhung, durch die es gleichzeitig zur Inaktivierung von Enzymen und damit zur Verminderung enzymatischer Reaktionen kommen kann. Ein Vergleich von Druck- mit Temperaturverfahren an Karotten auf Basis identischer mikrobiologischer Inaktivierungsraten zeigt, dass Gewebestrukturen im Gegensatz zur Pasteurisation (HHP) erst mit dem Sterilisationsprozess (HPT) ähnlich stark geschädigt werden, wie bei rein thermischen Verfahren (Knockaert et al. 2011; Vervoort et al. 2012).

Einerseits kann der Zellaufschluss zur Destabilisierung und damit ggf. zur Beschleunigung von Abbauprozessen beitragen, andererseits werden eine bessere Extrahierbarkeit und damit vermeintlich höhere Gehalte an Lebensmittelinhaltsstoffen nach Hochdruckbehandlung beschrieben. Der Effekt einer Zunahme von Sekundärmetaboliten kann möglicherweise auch auf eine Stressreaktion der vitalen Zelle zurückgeführt werden.

In Abhängigkeit betrachteter Inhaltsstoffe und deren Einbindung in die Zellstruktur, der Gewebeeigenschaften des Lebensmittels, der Intensität der Hochdruckbehandlung sowie der Höhe des daraus resultierenden Zellaufschlusseffektes und einsetzender Enzymreaktionen und Abbauprozesse können die oben beschriebenen Veränderungen in unterschiedlichem Maße auftreten.

Resultierende Auswirkungen auf die Lebensmittelsicherheit sind bisher nicht beschrieben.

5.2.7 Zusammenfassung

Ein direkter Einfluss der Wirkung von HHP auf niedermolekulare Lebensmittelinhaltsstoffe konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Eine Erhöhung oder Verringerung des Gehaltes dieser Stoffe kann indirekten Effekten wie z.B. dem Aufschluss der Zell- und Gewebestruktur oder möglicherweise der stressinduzierten Bildung von Sekundärmetaboliten zugeordnet werden.

Hochdruckbehandelte Produkte sind bzgl. ernährungsphysiologisch vorteilhafter aber auch nachteiliger sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe näher am unbehandelten als am thermisch behandelten Produkt einzuordnen. Für bestimmte Rohstoffe geht von der konventionellen thermischen Prozessierung eine Reduzierung antinutritiver Effekte aus. Dieser Effekt ist bei einer Hochdruckbehandlung nicht oder nur in geringerem Ausmaß zu erwarten. Prozesseffekte der Hochdruckbehandlung sind im Allgemeinen schwächer ausgeprägt als bei thermischer Behandlung. Ein direkter Vergleich von

Qualität und Haltbarkeit auf Basis äquivalenter mikrobiologischer und enzymatischer Inaktivierung ist bis jetzt nicht in ausreichendem Maße erfolgt.

Eine HHP-Behandlung zeigt in Abhängigkeit der Behandlungsintensität eine deutliche Beeinflussung von Makromolekülen. Technofunktionelle Eigenschaften von Proteinen und Polysacchariden werden durch die Hochdruckbehandlung modifiziert. Gleiches gilt für die strukturellen Eigenschaften von Zellen und Gewebe pflanzlicher und tierischer Herkunft.

Eine gesundheitliche Bedenklichkeit dieser Veränderungen konnte bisher nicht gezeigt werden.

5.3 Einfluss auf Enzyme

Neben der Inaktivierung von Mikroorganismen zielt die Anwendung von Hochdruck bei der Lebensmittelverarbeitung auch darauf ab, unerwünschte in Lebensmitteln enthaltene Enzyme, wie z.B. Lipasen, zu inaktivieren. Mögliche Bedenken beziehen sich auf die Auswirkungen von hohem Druck auf Enzymaktivitäten (Inaktivierung oder Verstärkung) und auf Substratspezifitäten. In der Stellungnahme von 2004 wurde festgehalten, dass die Beeinflussung der Konformation von Proteinen durch Hochdruck in entsprechenden Systemen detailliert untersucht werden sollte (SKLM 2004). Die Erfahrungen des letzten Jahrzehnts lassen sich wie folgt zusammenfassen:

5.3.1 Einfluss von Hochdruck auf Enzymaktivitäten

Es gibt Enzyme, die infolge von Zeit/Druck-Kombinationen, die üblicherweise in der Lebensmittelverarbeitung angewendet werden, signifikant inaktiviert werden. Auf der anderen Seite gibt es mehrere Enzyme, bei denen eine Erhöhung der Aktivität bei Hochdruckbehandlung beobachtet wurden (Eisenmenger and Reyes-De-Corcuera 2009).

Sowohl Inaktivierungen als auch Aktivitätssteigerungen werden von der Lebensmittelmatrix beeinflusst. Daten, die allgemeine Schlussfolgerungen oder Vorhersagen hinsichtlich der Auswirkungen eines bestimmten Lebensmittels auf das Verhalten eines Enzyms unter hohem Druck erlauben, sind jedoch nicht verfügbar.

Die untersuchten Lebensmittelenzyme betreffen hauptsächlich Qualitätsaspekte von Lebensmitteln. So können Änderungen durch hohen Druck, z.B. erhöhte Aktivität einer Polyphenoloxidase, unerwünschte Folgen für die Qualität des Lebensmittels haben (erhöhte, enzymatische Bräunung). Es wurden jedoch nicht von Problemen in

Zusammenhang mit der Lebensmittelsicherheit berichtet, die sich aus der Veränderung der Enzymaktivitäten bei Hochdruckbehandlung ergeben.

5.3.2 Einfluss von Hochdruck auf Substratspezifitäten

Die Anwendung von Hochdruck kann Konformationsänderungen von Substraten zur Folge haben, was zu einer veränderten Zugänglichkeit von funktionellen Gruppen führt, die für die enzymatische Katalyse benötigt werden. Zum Beispiel ist natives Rinder- β -Lactoglobulin (bLGL) kein Substrat für mikrobielle Transglutaminase (mTG). Nach Inkubation des Proteins mit mTG bei 40 °C und 400 MPa für 1 h wurden vier von neun Glutaminresten als für die mTG-katalysierte Reaktion zugänglich identifiziert. Dies deutete auf eine teilweise Entfaltung von bLGL unter Druck und Exposition von zuvor nicht zugänglichen Glutaminresten hin (Partschfeld et al. 2007). In ähnlicher Weise stellt Hühnereiweiß-Lysozym (HEWL) kein Substrat für mTG bei Atmosphärendruck dar. Nach Inkubation von HEWL mit mTG unter hohem Druck (400-600 MPa) bei 40 °C für 30 Minuten wurde jedoch die Bildung einer Isopeptid-Vernetzung zwischen Lysin in Position 1 und Glutamin in Position 121 beobachtet, was auf eine druckinduzierte Entfaltung des Proteins hinweist (Schuh et al. 2010). Bisher wurden keine Änderungen der Substratspezifitäten aufgrund von hochdruckinduzierten Enzymmodifikationen berichtet.

5.3.3 Zusammenfassung

Unter den für Lebensmittel relevanten Enzymen gibt es sowohl Vertreter, deren Aktivität durch Hochdruck erniedrigt wird, als auch solche, bei denen es unter Hochdruck zu einer Erhöhung der Aktivität kommen kann. Durch Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln kann außerdem die Zugänglichkeit und Verfügbarkeit von Substraten für Enzyme verändert werden. Derzeit gibt es keine Hinweise, dass Veränderungen der Aktivitäten von Enzymen in Lebensmitteln unter Hochdruck sicherheitsrelevant sind. Potentielle Beeinträchtigungen der Qualität, z.B. durch erhöhte enzymatische Bräunung, müssen im Einzelfall geprüft werden.

6 Einfluss der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität

Im Jahr 2004 gab es nur sehr wenige Studien zur Allergenität von mit Hochdruck behandelten Lebensmitteln. Eine Erhöhung der Allergenität durch Hochdruckbehandlung wurde, da technologische insbesondere thermische Verfahren

zu einer partiellen Inaktivierung des allergenen Potentials führen, als wenig wahrscheinlich angesehen, konnte aber aufgrund der wenigen damals vorliegenden Studien nicht ausgeschlossen werden (SKLM 2004). Zwischenzeitlich liegen verschiedene Studien vor, so dass eine neue Bewertung des Einflusses der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Lebensmitteln angezeigt ist.

6.1 Auswirkung von HHP auf Proteinstrukturen und mögliche Auswirkung auf Allergenität

Durch Behandlung mit HHP werden nicht-kovalente Bindungen (z.B. ionische, hydrophobe, Wasserstoffbrücken) beeinflusst, wodurch Änderungen in den Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen induziert werden. Dies kann zu reversibler und teilweise irreversibler Entfaltung, Denaturierung, Aggregation und Gelatinierung führen (Huang et al. 2014a; Somkuti and Smeller 2013; Vanga et al. 2015). In der Folge können sich insbesondere strukturell definierte allergene Determinanten (Epitope) von Proteinen verändern, was Einfluss auf ihre Eigenschaft zur Bindung allergenspezifischer Antikörper des Isotyps IgE haben kann. Entsprechend kann sich das allergene Potenzial nach HHP-Behandlung verändern. Isolierte strukturelle Analysen technologisch behandelter allergener Proteine lassen in der Regel keine direkten Aussagen zu Art und Umfang des hieraus resultierenden allergenen Potenzials zu. Folglich wurden solche Studien, die ausschließlich strukturelle Veränderungen nach HHP-Behandlung untersuchten, nicht berücksichtigt. Ebenso wurden Studien zur Antigenität allergener Proteine oder Proteinfractionen unter Verwendung von in Tieren generierten allergenspezifischen Antikörpern, aber ohne Charakterisierung bezüglich der Erkennung humaner IgE bindender Determinanten, nicht berücksichtigt.

6.2 Kriterien für die Auswahl der Studien

Ausgewertet wurden solche Studien, die den Einfluss von HHP-Behandlung an allergenen Lebensmitteln oder Lebensmittelproteinen anhand geeigneter allergener Parameter untersuchten. Diese schließen die qualitativen und quantitativen Bindungseigenschaften von allergenspezifischem IgE, die biologisch funktionale Aktivierung von Effektorzellen wie Basophilen und Mastzellen, allergische Hautprovokationen sowie allergische Reaktionen nach oraler Aufnahme bzw. Provokation ein. Letztere in vivo Untersuchungen haben die größte Aussagekraft

bezüglich der Auslösung allergischer Reaktionen, während reine IgE-Bindungsdaten lediglich Hinweise auf eine mögliche veränderte Allergenität bei vorbestehender Sensibilisierung geben können.

6.3 Übersicht über die ausgewählten Studien

Die meisten der berücksichtigten Studien beschränken sich auf die Beschreibung der reinen IgE-Bindungseigenschaften pflanzlicher und tierischer Lebensmittel und allergener Proteine nach HHP-Behandlung, häufig im Bereich von Drücken zwischen 100 und 800 MPa und einer Anwendungsdauer von 5 bis 60 min. Untersucht wurden Pflanzensamen (Sojabohne, Mandel, Ginkgo, Weizen, Buchweizen), Früchte und Gemüse (Apfel, Ananas, Karotte, Sellerie), Kuhmilch und Hühnerei, sowie Fleisch (Rind), Fisch (Barsch, Karpfen), Schalen- und Weichtiere (Garnele, Kalmar) (Anhang, Tabelle 4: Referenz 1-34). Neben Untersuchungen, die ausschließlich HHP als technologisches Verfahren einsetzten (Anhang, Tabelle 4: Referenz 1,3,6-12,14-17,21,24-26,28-32,34), liegen Daten zur kombinierten Behandlung durch HHP und Erhitzung (über 50 bis 115 °C) (Anhang, Tabelle 4: Referenz 12,13,26,33) bzw. HHP und enzymatischer Hydrolyse (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Alcalase, Neutrase, Corolase) (Anhang, Tabelle 4: Referenz 2,4,5,18-20,22,23) vor. Die überwiegende Mehrzahl an Studien erfolgte in vitro als IgE-Bindungsversuch mit humanem Allergiker IgE (Anhang, Tabelle 4: Referenz 1,2,5-9,12,13,15-22,26-34) bzw. mittels humanen Basophilenaktivierungs- bzw. Mediatorfreisetzungsversuchen (Anhang, Tabelle 4: Referenz 11,14,15,25,28,29,30). Wenige in vivo Studien (Hautprovokation, orale Provokation) wurden mit Allergikern durchgeführt (Anhang, Tabelle 4: Referenz 10,11,14). Ebenfalls wurden nur wenige Studien im murinen Modell durchgeführt (Anhang, Tabelle 4: Referenz 3,4,23,24,33). Als Untersuchungsproben wurden sehr häufig wässrige oder gepufferte Lebensmittelsuspensionen (einschließlich Säfte) und Gesamtproteinextrakte (Anhang, Tabelle 4: Referenz 1-8,11,12,14,17-19,31,32), häufig Einzelallergene (Weizen Alpha Amylase Inhibitor, Apfel Mal d 1, Karotte Dau c 1, Sellerie Api g 1, Milch β -Lactoglobulin, Hühnerei Ovomucoid und Ovalbumin, Rinderserum Albumin, Rinder Gammaglobulin, Schalen- und Weichtier Tropomyosin) (Anhang, Tabelle 4: Referenz 9,11,14,16,20-23,25,27-30,33,34) und seltener ganze Lebensmittel (Apfel und Apfelschale, Sellerieknolle, Milch, Eipulver in Rinderhack) (Anhang, Tabelle 4: Referenz 10,13,15,24,26) verwendet.

6.4 Auswertung der Ergebnisse unter allergologischen Gesichtspunkten

HHP als einzelnes technologisches Verfahren führte in den meisten Fällen zu keiner (Anhang, Tabelle 4: Referenz 1,2,6,11,12,14,16,17,28,31,32) oder einer geringfügigen (Anhang, Tabelle 4: Referenz 7,9,13,15,26,29,30,34) Reduzierung der IgE-Bindungseigenschaften. In einer einzelnen Studie zu Milchproteinen führte die HHP-Behandlung zu einer geringfügigen Erhöhung der IgE-Bindung, mit statistischer Signifikanz bei nur einem Druckwert von 200 MPa (Anhang, Tabelle 4: Referenz 21). Zusätzliche thermische Behandlung führte überwiegend zu einer Reduzierung der IgE-Bindungskapazität (Anhang, Tabelle 4: Referenz 12,13,26,33). Die Kombination von HHP und Protease(n) führte überwiegend zu einer Reduzierung der IgE-Bindung (Anhang, Tabelle 4: Referenz 2,4,5,18,19,20,22,23), wobei die HHP-Behandlung primär zur beschleunigten Proteolyse eingesetzt wurde. Da HHP als einzelne Behandlungsmethode die IgE-Bindung nicht oder nur geringfügig reduziert, ist in der Kombination mit Proteasen oder Erhitzung die verringerte IgE-Bindung auf die (beschleunigte) Proteolyse oder Erhitzung der Allergene zurückzuführen. In Versuchen zur *in vitro* Basophilenaktivierung (human) oder Mediatorfreisetzung (human) führte HHP als einzelnes Behandlungsverfahren zu keiner oder nur geringfügigen Reduzierung der Allergenität (Anhang, Tabelle 4: Referenz 11,14,25,28,29,30).

In *in vivo* Hauttestungen von Birkenpollenallergikern mit Apfelallergie zeigte sich eine reduzierte Allergenität HHP-behandelter Äpfel (Meyer-Pittroff et al. 2007), aber keine reduzierte Allergenität von HHP-behandeltem Apfelsaft (Houska et al. 2009a). In beiden Fällen nehmen die Autoren Bezug auf Mal d 1, das thermolabile Birkenpollen assoziierte Hauptallergen von Apfel. Jedoch fehlen individuelle Daten zu den molekularen Sensibilisierungsmustern, so dass weitere Rückschlüsse aus den gegensätzlichen Ergebnissen in Bezug auf dezidierte Sensibilisierungsmuster nicht möglich sind. Auch HHP-behandelter Karottensaft wies keine verringerte Allergenität im Hauttest von Birkenpollenallergikern mit Karottenallergie auf (Heroldova et al. 2009). In der oralen Provokation mit HHP-behandelten Äpfeln tolerierten 19 Birkenpollen-assoziierte Apfelallergiker HHP-behandelte Äpfel (Meyer-Pittroff et al. 2007). Die Autoren vermuten die Inaktivierung der Birkenpollen assoziierten Hauptallergens Mal d 1 als Ursache einer reduzierten Allergenität. Jedoch stieg die Basophilenaktivierung *in vitro* nach HHP-Behandlung von Mal d 1 an, was ein gegensätzliches Ergebnis darstellt. In der oralen Provokation von 10 Patienten mit

Birkenpollen-assoziiierter Apfelallergie mit HHP-behandeltem Apfelsaft wiesen 10 Allergiker allergische Reaktionen gegen unbehandelten Saft und 5 Allergiker gegen den HHP-behandelten Saft auf (Houska et al. 2009a). In der oralen Provokation von 5 Karottenallergikern wiesen 5 Allergiker allergische Reaktionen gegen unbehandelten Karottensaft und 3 Allergiker gegen den HHP-behandelten Saft auf (Heroldova et al. 2009). Tendenziell ergab sich bei Birkenpollen assoziierten Allergien gegen Apfel bzw. Karotte keine oder eine geringe Reduzierung der Allergenität nach HHP-Behandlung.

6.5 Zusammenfassung

Methodische Einschränkungen in den Studien ergeben sich meistens in einer unvollständigen klinischen Charakterisierung der Allergiker und den geringen Allergikerzahlen (oftmals deutlich weniger als zehn). Viele Studien wurden zudem mit Serumpools anstelle Einzelseren durchgeführt, so dass sich prinzipiell Verzerrungen in den Ergebnissen durch Seren von Patienten mit dominanten Antikörperantworten ergeben können. Nur vereinzelte Studien enthalten Ergebnisse zur oralen Provokation von Allergikern mit HHP-behandelten Lebensmitteln. Die große Mehrzahl der Daten zur Allergenität basiert auf *in vitro* Untersuchungen zur IgE-Bindungseigenschaft HHP-behandelter Proben oder deren biologische Aktivität auf Effektorzellen der allergischen Reaktion. Viele Studien basieren auf wässrigen Gesamtproteinextrakten oder isolierten Einzelallergenen von Lebensmitteln ohne weitere Berücksichtigung der Lebensmittelmatrix. Die zugrundeliegenden Studien weisen ein breites Spektrum im Bereich der gewählten Parameter Druck, Zeit, Matrix, thermische Belastung und zusätzliche enzymatische Proteolyse auf.

Aus den vorliegenden Ergebnissen der ausgewerteten Studien lässt sich dennoch schlussfolgern, dass eine HHP-Behandlung von Lebensmitteln die Allergenität sehr wahrscheinlich nicht oder nur geringfügig reduziert. Damit liegt die Allergenität HHP-behandelter Lebensmittel näher an unbehandelten als an thermisch behandelten Lebensmitteln. Eine Erhöhung der Allergenität von Lebensmitteln durch HHP-Behandlung kann aus der vorliegenden Datenbasis nicht abgeleitet werden. Alle abgebildeten Studien adressieren die Allergenität HHP-behandelter Lebensmittel bei vorhandener Sensibilisierung gegen Lebensmittel, die nicht HHP behandelt wurden. Die grundsätzliche Möglichkeit der Entstehung neuer (Neo-) Epitope durch strukturelle Veränderung von Allergenen bei hohen hydrostatischen Drücken und in der Folge von Neosensibilisierung wird bislang nicht allergologisch adressiert.

7 Rechtliche Aspekte

Seit dem Inkrafttreten der Verordnung EG Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel („novel food“) und neuartige Lebensmittelzutaten am 15. Mai 1997 (Referenz) und deren Ablösung durch die Verordnung 2015/2283 am 1. Januar 2018 (Referenz) sollte ein Lebensmittel als neuartiges Lebensmittel eingestuft werden und der Zulassung bedürfen, wenn es mit einem vor dem 15. Mai 1997 nicht für die Lebensmittelherstellung in der Union verwendeten Herstellungsverfahren hergestellt wurde, das bedeutende Veränderungen seiner Zusammensetzung oder Struktur (nicht im chemischen Sinne) bewirkt, die seinen Nährwert, seine Verstoffwechselung oder seinen Gehalt an unerwünschten Stoffen beeinflussen.

Nach der Verordnung (EU) 2015/2283 über neuartige Lebensmittel (Novel Food-Verordnung) sind Lebensmittel dann neuartig, wenn sie vor dem 15. Mai 1997 noch nicht in nennenswertem Umfang in der Europäischen Union für den menschlichen Verzehr verwendet wurden und zudem bestimmten, in der Novel Food-Verordnung näher bezeichneten Lebensmittelkategorien angehören. Eine dieser Kategorien nennt „Lebensmittel, bei deren Herstellung ein vor dem 15. Mai 1997 in der Union für die Herstellung von Lebensmitteln nicht übliches Verfahren angewandt worden ist, das bedeutende Veränderungen der Zusammensetzung oder Struktur eines Lebensmittels bewirkt, die seinen Nährwert, seine Verstoffwechselung oder seinen Gehalt an unerwünschten Stoffen beeinflussen“.

Ob ein mittels Hochdruckverfahren hergestelltes Erzeugnis der Novel Food-Verordnung unterfällt, ist eine Frage der Einzelfallprüfung.

Neuartige Lebensmittel müssen gesundheitlich bewertet und zugelassen sein, bevor sie in den Verkehr gebracht werden dürfen. Ferner muss sichergestellt sein, dass die Verbraucherinnen und Verbraucher durch die Verwendung eines neuartigen Lebensmittels nicht irregeführt werden.

Welche neuartigen Lebensmittel eine Zulassung erhalten haben, geht aus der Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 zur Erstellung der Unionsliste der neuartigen Lebensmittel hervor. Die in der Liste aufgeführten Lebensmittel dürfen in den Verkehr gebracht werden, wenn die dort angegebenen Verwendungsbedingungen, spezifischen Kennzeichnungsvorschriften, Spezifikationen und sonstigen Anforderungen eingehalten werden.

Die Lebensmittelunternehmer sind eigenverantwortlich für ihre Produkte und prüfen daher in eigener Zuständigkeit, ob ein Lebensmittel unter die Novel Food-Verordnung fällt oder nicht.

Sollte bei einem Lebensmittelunternehmer allerdings Unsicherheit bezüglich der Einstufung eines Erzeugnisses als neuartiges Lebensmittel bestehen, kann er die zuständige Behörde des Mitgliedstaats konsultieren, in dem er das Erzeugnis zuerst auf den Markt bringen möchte. In Deutschland ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) die dafür zuständige Behörde. Die konkrete Ausgestaltung dieses Konsultationsverfahrens einschließlich der vom Lebensmittelunternehmer beizubringenden Informationen findet sich in der Durchführungsverordnung (EU) 2018/456 über die Verfahrensschritte bei der Konsultation zur Bestimmung des Status als neuartiges Lebensmittel.

Die Informationen über den Novel Food-Status von Erzeugnissen veröffentlicht die Europäische Kommission auf ihrer Internetseite.²

Der Vollzug der lebensmittelrechtlichen Vorschriften obliegt in Deutschland den zuständigen Behörden der Länder.

8 Hochdruckbehandlung in der Verpackung

In der Stellungnahme von 2004 wurde festgehalten, dass in Bezug auf Druckeffekte auf Verpackungsbestandteile beispielsweise zu untersuchen sei, ob sich unter Druck die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Polymere so ändern, dass eine beschleunigte Diffusion von Weichmachern wie z. B. Phthalaten daraus resultiert.

Auch fehlen Untersuchungen zum Verhalten von Restmonomeren und flüchtigen organischen Stoffen unter Hochdruck (SKLM 2004).

In den vergangenen Jahren gab es einen entsprechenden Erkenntnisgewinn bezüglich Verpackungsmaterialien, die sich für die Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln eignen. Es sind bereits Review-Artikel verfügbar, die die wissenschaftliche Lage zum Thema Hochdruckbehandlung und Verpackung zusammenfassen, wie z.B. zu generellen Anforderungen an Packstoffe bei unterschiedlichen HHP-Behandlungen ((Juliano et al. 2010), siehe auch Tabelle 5).

² https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food_en

Tabelle 5: Generelle Ansprüche an Verpackungen (verändert nach (Juliano et al. 2010))

Integritätsanforderung ^a (max. erwartete(r) Druck/Temperatur)	HP-LT (600 MPa/80 °C)	HP-HT (800 MPa/133 °C)	Steriler Retortenbeutel ^b (0.2 MPa/133 °C)
Sichtbare Integrität	Kein Abblättern und Aufblähen	Kein Abblättern und Aufblähen	Keine Delaminierung und kein Aufblähen
Sauerstoffdurchlässigkeit (max. Abweichung 12%)	Produktabhängig	0,5-1,0 ml/m ² /Tag (für handelsübliche Produkte) 0.06 ml/ m ² /Tag (US-militärische Produkte)	0,5-1,0 ml/m ² /Tag (für handelsübliche Produkte) 0.06 ml/ m ² /Tag (US-militärische Produkte)
Wasserdurchlässigkeit (max. Abweichung 12%)	Produktabhängig	0,01 g/ m ² /Tag oder produktabhängig	0,01 g/ m ² /Tag oder produktabhängig
Siegelnahfestigkeitseigenschaften (max. Abweichung 25%)	Materialabhängig	Materialabhängig	Siegelnahstärke 2-3,5 kg/100 mm; Bindungsstärke 150-500 g/10 ml; Berstprüfung 7,5 kg/15 mm Naht
Physikalische Eigenschaften (Dehnbarkeit, Ausdehnung, Elastizitätsmodul (max. Abweichung 25%))	Materialabhängig	Materialabhängig	Materialabhängig
Gesamtmigration von Verpackungskomponenten in Lebensmittelsimulantien	<10 mg/dm ²	<10 mg/dm ²	<10 mg/dm ²
Maximaler Kopfraum ^{ad}	Bis zu 30%	Bis zu 30%	Bis zu 30%
Hohe thermische Leitfähigkeit ^d	Nicht notwendig	Notwendig	Notwendig

^a(Lambert et al. 2000a; Lambert et al. 2000b); benötigter Kopfraum nach japanischem Standard

^b(Venugopal 2006)

^c EUR-Lex - 31990L0128 - EN - EUR-Lex - europa.eu

https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=uriserv:OJ.L_.1990.075.01.0019.01.DEU

^d noch nicht definiert als einheitliches Selektionskriterium

Es gibt eine Reihe von Integritätsanforderungen für diese Verpackungsmaterialien, die für deren Verwendung in verschiedenen Produktanwendungen eingehalten werden müssen. Dazu gehören visuelle Integrität, Gasdurchlässigkeit, Dichtungs- und physikalische Festigkeitseigenschaften sowie die Migration chemischer Stoffe in die verpackten Lebensmittel. Auswertungen zur visuellen Integrität, Gasdurchlässigkeit, Dichtheit der Siegnähte und zu physikalischen Eigenschaften der Verpackungsmaterialien bei unterschiedlichen HHP-Behandlungen werden in der Literatur häufig besprochen, es fehlen aber meist einzelne Informationen, um ein komplettes Bild für die Eignung diverser Packstoffe zu erstellen.

Zur Auswahl der optimalen Verpackung für HHP-Behandlungen können Rahmenbedingungen genannt werden (Singh 2017):

- Die Verpackungsfolien und -behälter komprimieren stärker als Wasser unter HHP.
- Studien zeigen, dass sich die Sauerstoffbarriere (OTR) und die Wasserdampfbarriere (WVTR) im HHP-Prozess im Allgemeinen sogar

verbessert, da unter hohem Druck die Volumenreduktion zu einer Zunahme der Kristallinität der Polymer-Moleküle führen kann.

- Bei 600 MPa komprimiert sich das Volumen des Wassers/Lebensmittels um 15 %; entsprechend muss die Verpackung mindestens um diesen Wert flexibel sein unter zusätzlicher Beachtung der Verdichtung ggf. vorhandener Kopfraumgase.
- Ethyl-Vinyl-Alkohol Verbunde (EVOH-Verbunde) scheinen unter dem Gesichtspunkt der Barriere-Eigenschaften die beste Wahl zu sein. Lamine mit Aluminium, metallisierte Filme sowie SiO_x-Beschichtungen scheinen weniger gut geeignet zu sein. Behälter aus Glas oder Metall sind nicht zu empfehlen.

8.1 Beobachtbare Veränderungen von Packstoffen unter HHP

Viele Studien beschreiben auffällige Veränderungen in den Eigenschaften der Packstoffe unter HHP-Einwirkung.

Vielfach wurde über Probleme mit Mehrschicht-Verbundmaterialien (multi-material-multy-layer structures) berichtet, die sich bei der Verwendung in HHP-Prozessen ergeben können. Hier werden vor allem Delaminationsphänomene bis hin zur strukturellen Zerstörung besonders der Verbunde mit Aluminium oder anderen anorganischen Komponenten wie Al-, AlO_x- oder SiO_x-Bedampfungen berichtet (Juliano et al. 2010; Mensitieri et al. 2013), auch in Ergebnissen des CORNET Programmes AiF 26 N „Verpackungsmaterial für Hochdruckbehandlung (HiPP)“ (Packaging material for High Pressure Treatment)³ beschrieben. .

Weiterhin müssen Kopfräume gefüllt mit Gas vermieden werden; die unterschiedliche Kompressibilität zwischen Wasser und Gas kann zu einer Beschädigung der Verpackung führen, auch die Kapazität der Hochdruckanlage kann bei Vermeidung eines Kopfraumes besser genutzt werden (Juliano et al. 2010).

8.2 Stoffübergänge aus Verpackungsmaterialien

Die Datenlage zu Stoffübergängen aus Verpackungsmaterialien ins Lebensmittel (Migration) ist unter HHP schlechter als zur generellen Eignung diverser Packstoffe. Einige Studien haben zwar punktuell das Migrationsverhalten verschiedener Packstoffe untersucht, aber nicht umfassend und nicht immer basierend auf relevanten

³ <https://www.fei-bonn.de/gefoerderte-projekte/projektdatenbank/cor-net-aif-26-en.projekt>

rechtlichen Bestimmungen zu Migrationsmessungen und –grenzwerten (zumindest für den europäischen Wirtschaftsraum). Es muss bei klassischen HHP-Behandlung unterschieden werden, ob eine Änderung des Migrationsverhaltens tatsächlich durch den angewendeten höheren Druck oder durch die in der Regel parallel auftretende Temperaturerhöhung (Richtwert: 10 °C Temperaturerhöhung ergibt eine Verdoppelung der Migration) hervorgerufen wird.

Es gibt Hinweise, dass HHP die Migration sowohl aus PP (Polypropylen) als auch aus PET (Polyethylenterephthalat)-Filmen in 10 % Ethanol im Vergleich zu thermischer Behandlung verringerte (Song and Koontz 2016). Die anschließende Lagerung der mit HHP behandelten Folien führte nicht zu signifikanten Unterschieden in der Migration im Vergleich zu rein thermisch behandelten Proben. Prinzipiell schätzen die Autoren gängige Kunststoffe aus dem Bereich der Lebensmittelverpackung für die HHP-Anwendung hinsichtlich Migration als sicher ein.

Das Migrationsverhalten von Kunststoff(verbund)en wurde ebenfalls im Rahmen des CORNET Projektes HiPP (2011) untersucht. Mit einer Ausnahme waren dabei die Ergebnisse sowohl der Gesamt- als auch der spezifischen Migrationstests im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben. Die Migration der Leitsubstanz (CAS 2082-79) einer Plastikart (PETX12/PET23/PE50) war über der gesetzlich vorgeschriebenen Grenze. Die Annahme, dass erhöhte Kristallinität der Polymere bei hohen Drücken eventuell sogar zu einer Abnahme der Migrationsneigung führen könnte, wurde aber nicht bestätigt. Prinzipiell könnten HHP-Bedingungen eine Verdichtung der amorphen Domänen von Polymeren, eine Zunahme der Schmelz- und Kristallisationstemperatur und einen Wechsel der Morphologie der kristallinen und amorphen Domänen in Polymerfolien fördern (Mensitieri et al. 2013).

8.3 “Neue” Packstoffe und Ausblick

Vereinzelte gibt es auch Studien über die HHP-Tauglichkeit „neuer“ Packstoffe, die zum Beispiel aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen oder bioabbaubar sind, wie etwa Polymilchsäure (PLA) (Sansone et al. 2012), die auf ihre Tauglichkeit hinsichtlich HHP-Behandlung untersucht wurde.

Die Wirkung von HHP auf PLA wurde im Hinblick auf strukturell/morphologische Veränderungen (z.B. Kristallinität, Dichte, Orientierung) und funktionalen Eigenschaften (z.B. Schmelzverhalten und Gasübergangstemperatur, Permeabilität und Löslichkeit von Gasen und Wasserdampf) analysiert. Es wurde festgestellt, dass

HHP-Pasteurisierung keine bauliche und funktionale Eigenschaft des behandelten Materials in erheblichem Maße beeinflusst. Umgekehrt fördert die HPT-Sterilisation die Hydrolyse des Materials, begleitet von einer Zunahme der Kristallinität und einer Abnahme der Dichte der amorphen Phase in Abhängigkeit des Temperatur-/Druckverlaufs. Diese Auswirkungen führen zu einer inakzeptablen Versprödung und Trübung des Materials, so dass es für HPT-Sterilisationsanwendungen ungeeignet ist.

8.4 Zusammenfassung

Eine HHP-Behandlung kann durch Delaminationsphänomene bei Mehrschicht-Verbundmaterialien, durch mangelnde Flexibilität für den Ausgleich der Volumenverringerung unter Druck sowie durch eine Komprimierung eines zu großen Kopfraumes zu einer Beschädigung der Verpackung führen. Das Migrationsverhalten unter Druck ist unzureichend untersucht, die vorhandenen Daten zeigen bisher, dass keine Migration stattfindet. Bisher vorhandene Studien beschreiben auch eine Verringerung der Migration durch eine Veränderung der Kristallinität von Packstoff-Polymeren unter Druck. Erste Untersuchungen zur Tauglichkeit von bioabbaubaren Packstoffen, z.B. auf Polymilchsäure-Basis, konnten eine Eignung für Behandlungen im HHP-Pasteurisationsbereich, jedoch nicht im HPT-Sterilisationsbereich bei höheren Temperaturen zeigen.

9 Forschungsbedarf

Obwohl durch langjährige HHP-Anwendung Erfahrungswerte für einige Lebensmittelgruppen existieren und allgemeingültige Bedingungen für diese genannt werden können, wird folgender Forschungsbedarf zur Verbesserung des Verfahrens im Hinblick auf die Sicherheit der Produkte und zur Ausweitung der Anwendung genannt.

Bei der Verfahrenstechnik ist die Entwicklung von Temperatursensoren zur Messung der Temperaturverteilung unter Berücksichtigung der Strömungsprofile während Druckaufbau und Druck-Haltezeit besonders für HPT-Kombinationsprozesse wünschenswert.

Die Abtötung vegetativer Bakterienzellen sollte noch stärker unter Berücksichtigung weiterer Lebensmittelgruppen und Grenzbereiche untersucht werden. Systematische Untersuchungen wären wünschenswert, um Bedingungen zur Herstellung sicherer Produkte, die bereits in der Praxis angewendet werden, zu bestätigen und zu

erweitern. Die Ermittlung von Indikatorkeimen für die verschiedenen Lebensmittelgruppen und apathogener Surrogate zur Prozessvalidierung wären hilfreich.

Für die HPT-Behandlung zur Abtötung bakterieller Endosporen besteht Forschungsbedarf zum Ablauf der druckinduzierten Keimung, zur Identifizierung von Surrogaten und zu wirksamen Druck-/Temperaturkombinationen bezüglich der Endosporen verschiedener *Clostridium*- und *Bacillus*-Spezies bei unterschiedlichen Lebensmittelbedingungen.

Bisher sind keine sicherheitsrelevanten Auswirkungen der unter Hochdruck ablaufenden chemischen Reaktionen und Veränderungen im Lebensmittel festgestellt worden. Durch die detaillierte Aufklärung zentraler Reaktionswege an Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen muss das Ziel weiterer Forschung ein zentrales Verständnis der unter Hochdruck ablaufenden Reaktionen mit der Möglichkeit zu generelleren Aussagen über ihren Ablauf sein. Bei Untersuchungen zum Einfluss auf Lebensmittelstrukturen sollten die Folgen des veränderten Zellaufschlusses auf nachteilige Effekte, besonders für die Lagerung der Lebensmittel, untersucht werden. Die Untersuchungen zum allergenen Potential sollte auf weitere Lebensmittelarten ausgeweitet werden und gemäß Standards der Allergieforschung durchgeführt werden. Auch zur Neosensibilisierung durch hochdruckbehandelte Lebensmittel aufgrund veränderter Proteine und Allergene sollten weiterführende Forschungsarbeiten erfolgen.

Das Verhalten von Verpackungsmaterialien unter Hochdruck sollte systematisch auf Migration von Stoffen untersucht werden.

Für die verschiedenen Bereiche lassen sich folgende, detaillierte Forschungsempfehlungen ableiten:

9.1 Verfahrenstechnik

- Entwicklung von Temperatursensoren mit drahtloser Signalübertragung und Modellierung und Validierung der Temperaturverteilung.
- Untersuchungen zur Behandlungshomogenität und Temperaturverteilung, bzw. Mapping von Strömungsprofilen und Strömungsverteilung mit verschiedenen Lebensmitteln während Druckaufbau und Druck-Haltezeit in der Hochdruckkammer, Modellierung und Simulationen des Temperatur- und Strömungsprofils.

- Anwendbarkeit anderer Druckübertragungsmedien anstelle von Wasser unter Berücksichtigung von Behandlungshomogenität und Temperaturverteilung und Reduzierung von Druckaufbau- und Zykluszeiten.
- Im Bereich Maschinenbau und Materialwissenschaft sollten besonders Abdichtungs- und Ventiltechnik sowie Design der Hochdruckkammer unter Berücksichtigung des Risikos der Rekontamination ausgearbeitet werden.
- Entwicklung von Konzepten bzw. Materialien, die das HPT Kombinationsverfahren technisch realisierbar machen.
- Weiterentwicklung der Messtechnik zur Messung und Beherrschung der Temperaturfelder in HPT Anlagen während des Prozesses (bei niedrigen Temperaturen für die Inaktivierung vegetativer Bakterienzellen weitgehend irrelevant, bei hohen Temperaturen entscheidend für die Inaktivierung von Endosporen in jeder Packung unabhängig von der Position in der Anlage).

9.2 Vegetative Bakterienzellen

- Identifizierung von Indikatorkeimen zur Überprüfung der Prozesseffizienz bzw. apathogener Surrogate zur Prozessvalidierung.
- Erarbeitung mathematischer Modelle zur Vorhersage der Inaktivierungseffizienz als Schritt hin zur generischen Beurteilung
- Einfluss des Zellstatus sowie der Einbettung der Bakterienzellen in Matrixbestandteile des Lebensmittels auf die Drucktoleranz.
- Vertiefte Erkenntnisse über die Wirkmechanismen der Inaktivierung zum verbesserten Verständnis der Abhängigkeit der Effizienz von endogenen Lebensmittelfaktoren bei vegetativen Bakterienzellen und bakteriellen Endosporen.

9.3 Bakterielle Endosporen

- Die Sporenkeimungsmechanismen und Cortexlyse verschiedener Arten von *C. botulinum*, *C. perfringens* und *B. cereus* sollten auf molekularer Ebene charakterisiert werden, um gezielte HPT-Kombinationsprozesse zu ihrer Inaktivierung zu entwickeln.
- Charakterisierung der Unterschiede im „spore coat“ unterschiedlich drucktoleranter *Clostridium botulinum* Sporen.

- Weitere Untersuchungen zum Einfluss von endogenen Lebensmittelfaktoren, auch unter Beachtung von Substanzen, die in geringen Mengen vorkommen, auf die Inaktivierung von Endosporen sowohl in einfachen Ansätzen als auch in komplexen Systemen.

9.4 Viren

- Es sollten Systeme zur direkten Infektiositätsmessung der Lebensmittel-relevanten Viren, besonders Humaner Norovirus und Hepatitis E-Virus, zum Nachweis der HHP-Wirkung auf ihre Infektiosität entwickelt werden. Neue Entwicklungen bei Zellkultur-Systemen für diese Viren sollten verstärkt aufgegriffen werden.
- Weiterhin sollten Studien zur Inaktivierung von Viren, besonders des Hepatitis E-Virus, in Fleischprodukten begonnen werden, da diese als bewährte Lebensmittelmatrizes für die HHP-Behandlung bekannt sind und für einige Virus-Arten ein wichtiges Übertragungsvehikel darstellen.

9.5 Parasiten

- Entwicklung von Infektiositätstests für verschiedene Parasiten, z.B. tiermodell-freie Bioindikatorsysteme.
- Weiterführende Untersuchungen zur Inaktivierung von Parasiten durch HHP in für sie typischen Lebensmittelmatrizes.

9.6 Chemische Reaktionen

- Weitere Untersuchungen zu chemischen Veränderungen von Lebensmitteln, mit dem Ziel generellere Aussagen treffen zu können.
- Für kurzkettige Kohlenhydrate steht primär das Verhalten von Mono- und Disacchariden mit Bezug zu Konfiguration und Reaktivität unter Druck im Vordergrund.
- Da Dicarbonyl zentrale Zwischenprodukte eines Kohlenhydratabbaus darstellen, sollte deren druckinduzierte Bildung und Weiterreaktion auf molekularer Ebene untersucht werden.
- Zur genaueren Beurteilung der Maillard-Reaktion unter Druck wären konkretere Angaben zur Kinetik und Quantität der Furosin-Bildung sowie zu Argininderivaten wünschenswert.

- Zu oxidativen Prozesse an Aminosäuren und Proteinen liegen aktuell keine Daten mit Bezug zu HHP vor.
- Der druckbedingte Verlauf der Lipidoxidation sollte anhand konkreter Fettsäuren und/oder definierten Triglyceriden untersucht werden. Ein Ziel könnte es sein, reaktive Zwischenprodukte zu identifizieren, die die große Variabilität des Reaktionsverlaufes mit Bezug zu verschiedenen Randbedingungen erklären.
- Carbonyle, die als Sekundärprodukte der Lipidoxidation entstehen, können analog zu Sacchariden mit Proteinen reagieren. Der Verlauf und das Ausmaß derartiger „Lipierungsreaktionen“ sind unter Druck völlig offen.
- Die Hinweise auf die Bildung von N-Nitrosaminen sind bis dato viel zu vage und bedürfen einer systematischen Untersuchung.
- Aufklärung der komplexen Reaktionsabläufe durch Einsatz neuer analytischer Methoden wie die nicht zielgerichtete Massenspektrometrie.

9.7 Auswirkungen auf Lebensmittel

- Weitere Untersuchungen zur Modifizierung von Makromolekülen und daraus resultierenden Veränderungen wie z.B. veränderte Verdaubarkeit HHP-behandelter Lebensmittel.
- Weitere Untersuchungen zu indirekten Effekten resultierend aus dem Zellaufschluss und der Begünstigung enzymatischer und nicht-enzymatischer Prozesse sowie von Stressreaktionen bzw. zur Veränderung von Inhaltsstoffen als Folge dieser Effekte.
- Erweiterung der bisher untersuchten Prozessintensitäten im Hinblick auf die Durchführung der Hochdruckbehandlung bei erhöhten Temperaturen (HPT, Hochdrucksterilisation) und Etablierung von Vergleichsszenarien mit konventionellen thermischen Prozessen im Hinblick auf eine vergleichbare mikrobielle und biochemische Produktstabilisierung.
- Erweiterung der bisherigen Untersuchungen im Hinblick auf die Veränderung von Lebensmittelinhaltsstoffen während der Lagerung nach der Hochdruckbehandlung.
- Im Falle der Veränderung von Inhaltsstoffen ist zu klären, ob durch gebildete Stoffe ein gesundheitliches Risiko besteht bzw. bei einer Reduzierung des

Gehaltes an Nährstoffen im Vergleich zum üblicherweise verzehrten Produkt das Risiko einer Mangelversorgung zu erwarten ist.

- Klärung, inwieweit z.B. eine verstärkte Freisetzung von Stoffen, z.B. Metallionen oder Matrix-gebundenen Stoffen durch Zellaufschlusseffekte direkt oder als Resultat auftretender Folgeaktionen ein Gesundheitsrisiko darstellen kann.

9.8 Auswirkung auf Allergenität

- Die Effekte von HHP-Behandlung sollten nicht nur *in vitro*, sondern insbesondere durch *in vivo* Hauttestungen und Lebensmittelprovokationen untersucht und die bisherigen Schlussfolgerungen aus den vereinzelt *in vivo* Studien überprüft werden.
- Gleichsam sollten über die bisher untersuchten Früchte und Gemüse hinaus weitere wichtige Lebensmittel(-gruppen) in *in vivo* Studien untersucht werden.
- Dabei kommt der klinischen Charakterisierung der Allergiker eine große Bedeutung zu, so dass insbesondere Allergiker mit bestätigter Lebensmittelallergie in oralen Provokationsstudien, bevorzugt doppel-blind und plazebo-kontrolliert durchgeführt, eingeschlossen werden sollten.
- Mögliche Aspekte von Neosensibilisierungen durch strukturelle Veränderungen von Proteinen und Allergenen sollten in geeigneten Zell- und Tiermodellen untersucht werden.

9.9 Hochdruckbehandlung in der Verpackung

- Untersuchungen zum Verhalten von Polymeren unter hohen Drücken sowie zu resultierenden positiven bzw. negativen Eigenschaftsveränderungen des Packstoffs, vor allem auch im Hinblick auf die bereits diskutierten Änderungen der Kristallinität von Kunststoffen.
- Untersuchungen zur Struktur und Morphologie von Packstoffen unter HHP-Bedingungen unter Berücksichtigung mehrschichtiger Strukturen sowie ggf. auftretender Migrationsphänomene.
- Forschungsergebnisse zum mechanischen Verhalten der verschiedenen Stoffe sollten zur Konzeption und Optimierung von Verpackungsmaterialien für HHP-Anwendungen führen.
- In Entwicklung befindliche Verpackungskonzepte zu Verbundwerkstoffen mit hochdruckinduzierten Funktionen (wie z.B. der maßgeschneiderten Freisetzung

von Konservierungsstoffen in das Lebensmittel) bedürfen einer umfassenden Bewertung.

10 Schlussbetrachtung

Die HHP-Behandlung ist eine aufwendige Technologie, die bereits seit Anfang der 90er Jahre für die Haltbarmachung von Fruchtsäften eingesetzt wird und seit Anfang 2000 kontinuierlich für weitere Lebensmittelsorten Anwendung findet. Die Frage, ob die Hochdruckbehandlung eines bestimmten Lebensmittels als Einzelfall („case by case“) geprüft werden muss oder ob generelle Aussagen zur sicheren Anwendung von Hochdruck, gemacht werden können, hängt vom Lebensmittel und dem angestrebten Produkt ab. Die Bedingungen einer HHP-Anwendung, mit der eine Haltbarkeit vergleichbar mit der der Pasteurisierung angestrebt wird, können mittlerweile durch Erfahrungen aus der Praxis und vielen Studien für einzelne Lebensmittelgruppen, wie Fruchtsäfte und andere Getränke, Frucht- und Gemüsezubereitungen und bestimmte Fleischerzeugnisse benannt werden, ohne aber genaue Grenzwerte, wie z.B. zu Druck, Temperatur, pH-Wert und a_w -Wert, die noch zu sicheren Produkten führen, angeben zu können. Bedingungen, bei denen vegetative Bakterienzellen abgetötet werden, sind zur Inaktivierung von Viren und Parasiten meist ausreichend. Mit der Zielsetzung, durch HHP-Behandlung die Eigenschaften frischer bzw. weitgehend unbehandelter Produkte zu bewahren, kann eine Behandlung an den Wirkungsgrenzen eine unzureichende Abtötung von Krankheitserregern zur Folge haben. Auch sollte beachtet werden, dass HHP-Behandlungen im Vergleich zu konventionellen Verfahren das allergene Potential weniger stark vermindern. Dies kann für Allergiker, entgegen bisheriger Erfahrungswerte mit beispielsweise erhitzten Lebensmitteln, Einfluss auf die Auswahl sicherer Lebensmittel haben. Beim HPT-Kombinationsverfahren zur Abtötung bakterieller Endosporen muss jedes Lebensmittel als Einzelfall auf Wirksamkeit der Behandlung überprüft werden. Die Datenlage zum Einfluss der HHP-Behandlung auf die Verpackung ist sehr begrenzt.

11. Anhang

Tabelle 2: Inaktivierung von Viren durch HHP-Behandlung

Virus	Matrix	HPP Parameter	Bestimmung der Infektiosität	Inaktivierung (log ₁₀ -Abnahme)	Referenz
Feline Calicivirus	Zellkulturüberstand	200-250 MPa; 2-4 min; -10 bis 50 °C	TCID ₅₀ in Zellkultur	200 MPa, 4 min: 5 log ₁₀ (- 10°C), 0,3 log ₁₀ (20°C), 4 log ₁₀ (50°C)	(Chen et al. 2005)
Feline Calicivirus	Schweineleber	200-400 MPa; 1-10 min; 12 °C	TCID ₅₀ in Zellkultur	400 MPa, 5 min: 4-5 log ₁₀	(Emmoth et al. 2017)
	Schinken			400 MPa, 5 min: 0,5-1,5 log ₁₀	
Hepatitis A Virus	Austern	350-500 MPa; 1 min; 20-50 °C	PFU in Zellkultur	400 MPa: 1,5 log ₁₀ 500 MPa: 4,5 log ₁₀	(Kingsley and Chen 2009)
Hepatitis A Virus	Muscheln	400-600 MPa; 20 °C	TCID ₅₀ in Zellkultur	500 MPa; 25 min:	(Pavoni et al. 2015)
Humaner Adenovirus	Zellkulturüberstand	250-600 MPa; 4 °C	TCID ₅₀ in Zellkultur	400 MPa; 93 sec oder 600 MPa; 4 sec: >6 log ₁₀	(Kovac et al. 2012)
Humaner Norovirus	Austern	400, 600 MPa; 5 min; 6 °C	Orale Aufnahme durch Freiwillige	Nur bei 600 MPa: Vollständige Inaktivierung	(Leon et al. 2011)
Humaner Norovirus	Kotsuspension	200-600 MPa; 4 °C	Kapselintegritätstest (PGM-PCR)	600 MPa; 5 min: >4 log ₁₀ (GII.4 Stamm) oder 1–2 log ₁₀ (GII.1 and GII.6 Stamm)	(Lou et al. 2016)
Humaner Norovirus	Frühlingszwiebeln Salsa	100-600 MPa; 2 min; 1 °C	Kapselintegritätstest (PGM-PCR)	600 MPa; 2 min; 1 °C: Abnahme um 3 log ₁₀ (GI.1 Stamm) oder 4 log ₁₀ (GII.4 Stamm)	(Sido et al. 2017)
Humaner Picornavirus	Zellkulturüberstand	400-600 MPa; 21 °C	PFU in Zellkultur	500 MPa; 5 min: >4 log ₁₀ (Coxsackievirus A3, humaner Parechovirus-1); 600 MPa; 5 min: Keine Inaktivierung (Aichivirus, Coxsackievirus B5)	(Kingsley et al. 2004)

Muriner Norovirus	Erdbeerpuree	300-450 MPa; 2 min; 4 und 20 °C	PFU in Zellkultur	400 MPa: 4 log ₁₀ (4°C) und 2 log ₁₀ (20°C)	(Lou et al. 2011)
	Kopfsalat			400 MPa: 5 log ₁₀ (4°C) und 1 log ₁₀ (20°C)	
Muriner Norovirus	Erdbeerpuree	350 MPa; 0, 5, 10 min; 20 °C	PFU in Zellkultur	350 MPa; 2 min: >4 log ₁₀ (0°C) oder <1 log ₁₀ (20°C)	(Huang et al. 2014b)
Muriner Norovirus	Frühlingszwiebeln Salsa	300 MPa; 2 min; 1 °C	PFU in Zellkultur	4 log ₁₀	(Sido et al. 2017)
Rotavirus	Zellkulturüberstand, Austern	200-450 MPa; 4 °C und 20 °C	PFU in Zellkultur	Verschiedene Stämme zeigen verschiedene Stabilität	(Araud et al. 2015)
	Zellkulturüberstand,			Höhere Inaktivierung bei 4 °C als bei 10 °C	
	Austern			400 MPa; 2 min, 4 °C und 20°C: >4 log ₁₀	
Tulane Virus	Zellkulturüberstand	100-550 MPa; 2 min; 4 und 21 °C	PFU in Zellkultur	200 MPa: 2 log ₁₀ (21°C) und 3 log ₁₀ (4°C)	(Li et al. 2017)

Tabelle 3: Inaktivierung von Parasiten durch HHP-Behandlung

Parasit	Matrix	Behandlungsparameter	Bestimmung der Wirkung (Vitalität, Infektiosität)	Ergebnis	Referenz
<i>Anisakis simplex</i> (stage III)	H ₂ O deionisiert; Sterile Kochsalzlösung (0.9% NaCl); z. T. Fischfilet (Sandwich)	2,35 l; 50, 100, 120, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300 MPa; 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 240 min; 0 bis 15 °C	Vitalität: Mobilitätstest; Fluoreszenz bei 312 nm; Färbung mit Methyleneblau Infektiosität: nicht bestimmt	Ab 120 MPa und 7 min ist eine Wirkung erkennbar. Ab 170 MPa und 25 min (190 MPa und 15 min, bzw. 200 MPa und 10 min) wird eine sichere Inaktivierung unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Vitalitätsparameter beschrieben.	(Molina-García and Sanz 2002)
<i>Anisakis simplex</i> (Larven)	Bauchklappen und Eingeweide von Heilbutt bzw. Flunder	2 l; 14, 69, 138, 207, 276, 345, 414, 552 MPa, 30, 60, 90, 180 sec, 10 °C	Vitalitätstest	100% Abtötung der Larven: 30 bis 60 s/414 MPa, 90 bis 180 s/276 MPa, 180 s/207 MPa	(Dong et al. 2003)
<i>Anisakis simplex</i> L3	Meeraal inokuliert	150, 200, 250, 300 MPa; 1, 5 min; 25 °C	Vitalitätstest, optisch;	Unter Berücksichtigung von Produktsicherheit und Lebensmittelqualität werden 200 MPa für 5 min als optimale Behandlungsparameter für die behandelten Produkte angegeben.	(Lee et al. 2016c)
<i>Anisakis simplex</i> L3	Isolierte Larven in H ₂ O _{dest} ; befallener Seehecht;	2,35 l; 100, 200, 300, 350 MPa; 1, 2x1, 2, 2x2, 5, 15 min; 12 bis 24 °C	Vitalitätstest mittel Kameraanalyse; Emmissionsanalyse nach UV-Beleuchtung (366 nm); Infektiosität mittels Immunoblotting	Unter Berücksichtigung von Produktsicherheit und Lebensmittelqualität werden 200 MPa bei längerer Haltezeit als optimale Behandlungsparameter für die behandelten Produkte angegeben.	(Vidacek et al. 2009)
<i>Anisakis simplex</i>	Isolierte Larven in Zellkulturmedium (Eagles fluid); befallene ganze Markrelen;	35 l; 100, 200, 300 MPa; 5 min; 22 °C	Untersuchung der Vitalität mittels Stereomikroskop.	Nach einer Behandlung bei 300 MPa konnte keine Vitalität der Larven in der Fischmatrix nachgewiesen werden.	(Brutti et al. 2010)
Eier von <i>Ascaris suum</i>	Leitungswasser	35 l; 138, 207, 241, 276, 345, 414, 552, 600 MPa; 10, 20, 30, 60 sec; T [°C]: nicht benannt	Vitalität: Entwicklungsrate, mikroskopisch; Infektiosität: nicht bestimmt	Bei einem Druck von 276 MPa und höher konnte nach einer Behandlungszeit von 60 s keine Embryonierung festgestellt werden.	(Rosypal et al. 2007)
Eier von <i>Ascaris suum</i> und <i>Trichuris vulpis</i>	Leitungswasser	35 l; 138, 207, 241, 250, 276, 300, 345, 350, 400, 414, 500, 552, 600 MPa; 60 sec; T [°C]: nicht benannt	Vitalität: Entwicklungsrate, mikroskopisch; Infektiosität: nicht bestimmt	Keine Larvenentwicklung aus den Eiern nach einer Behandlung bei Drücken größer/gleich 400 MPa.	(Rosypal et al. 2011)
<i>Toxoplasma gondii</i> Oozysten	Ausgewogene Salzlösung (Hanks' balanced salt solution (HBSS)); H ₂ O _{dest}	V [l]: 35; 100, 140, 200, 270, 340, 400, 480, 550 MPa; 60, 90, 120, 180 sec; T [°C]: nicht benannt	Infektiosität über Maus-Bioassay	Keine Infektionen nach einer Druckbehandlung bei 340 Mpa und höher. Keine strukturellen Veränderungen der Oozysten bis einschließlich 550 MPa.	(Lindsay et al. 2005)

<i>Toxoplasma gondii</i> Oozysten	Inokuliertes gehacktes Schweinefleisch	35 l; 100, 200, 300, 400 MPa; 30, 60, 90 sec; T [°C]: nicht benannt	Infektiosität mittels Toxoplasma Agglutination Test (MAT)	Eine Behandlung von <i>T. gondii</i> - haltigem Hackfleisch mit HPP bei 300 oder 400 MPa für 30 Sekunden oder länger eliminierte vollständig die Infektionsfähigkeit bei Mäusen.	(Lindsay et al. 2006)
<i>Toxoplasma gondii</i> Oozysten	Inokulierte Himbeeren	35 l; 100, 200, 250, 270, 300, 340, 400, 500 MPa; 60 sec; T [°C]: nicht benannt	Infektiosität über Maus- Bioassay.	Hochdruckbehandlung bei 340 MPa und höher um eine Infektiosität der inokulierten Proben zu verhindern.	(Lindsay et al. 2008)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	H ₂ O de-ionisiert; PBS Puffer; Apfelsaft; Orangensaft	2 l; 552 MPa; 30, 45, 60, 90; 120 sec T [°C]: 20 °C	Vitalität: Mikroskopische Untersuchung; Infektiosität: FDM Infektiositätstest	552 MPa: Keine Infektiosität nach einer Behandlungszeit von 60 s und länger.	(Slifko et al. 2000)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Inokulierte Amerikanische Austern	35 l; 305, 370, 400, 480, 550 MPa; 60, 120, 180, 240, 360 sec; T [°C]: keine Angabe	Quantifizierung mittels Immunoassay und Fluoreszenzmikroskop; Infektiosität mittels Maus- Bioassay	Maximale Reduktion der Infektiosität um 93% nach einer Behandlung bei 550 MPa für 180 s.	(Collins et al. 2005)
<i>Trichinella spiralis</i>	Muskel infizierter Mäuse	V [l]: keine Angabe; 100, 150, 200, 300 MPa; 10 min; T [°C]: 25 °C	Histologische Untersuchungen. Kein direkter Test der Vitalität und Infektiosität.	Deutliche Änderungen bei 300 MPa	(Ohnishi et al. 1994)
<i>Trichinella spiralis</i>	Infizierter Kaumuskel vom Schwein; inokulierte Salami	35, 55, 2 l; 483, 600 MPa; 5, 7, 10, 12 bzw. 1, 2, 3, 4, 5, 7 min; 19 °C bis T _{max} 31 bzw. 37 °C)	Vitalität: mikroskopische Untersuchungen, Infektiosität: Maus- Bioassay	Vitalität und Infektiosität unterhalb des Detektionslimits nach allen Versuchen. Keine Inaktivierungsdaten zu Salami, da der Produktionsprozess bereits lethal ist.	(Porto-Fett et al. 2010)
<i>Eimeria acervulin</i> Surrogat für <i>Cyclospora cayetanensis</i>	Himbeeren, Basilikum	V: nicht benannt; 550 MPa; 2 min; 40 °C	Fütterung an Vögel	Keine Infektion	(Kniel et al. 2007)
<i>Hymenolepis diminuta</i> Eier	Isolierte Eier in Salzlösung (Hanks' balanced salt solution (HBSS))	35 l; 100, 200, 300, 400, 500, 600 MPa; 60 sec; T [°C]: keine Angabe	Färbung mittels Trypanblau zum Vitalitätsnachweis der Onkosphäre	Nach einer Druckbehandlung von 300 MPa und höher konnte keine Vitalität festgestellt werden	(Merwad et al. 2011)

Tabelle 4: Auswirkung der HHP-Behandlung auf die Allergenität

Ref. Nr..	Hülsenfrüchte, Nüsse, Samen	Allergen	Matrix	HHP Prozessparameter	Einfluss der HHP Behandlung auf die Allergenität	Referenz
1	Mandel	Mandel Gesamtproteinextrakt	Puffer, pH 7,0	600 MPa, 4-70°C, 5-15 min	→	(Li et al. 2013b)
2	Buchweizen	Buchweizen Gesamtproteinextrakt	Puffer, pH unbekannt	600 MPa, 1-5 min	→	(Lee et al. 2016a)
3	Ginkgo	Ginkgosamenprotein	Puffer, pH 8,0	100-700 MPa, 20 min	↓	(Zhou et al. 2016a)
4	Ginkgo	Ginkgosamenprotein	Wässrige Lösung	100-400 MPa, 20 min, enzymatische Hydrolyse (Papain, Alcalase, Pepsin, Neutrase)	↓, →	(Zhou et al. 2016b)
5	Sojabohne	Sojabohnen Molke	Wässrige Dispersion	100-300 MPa, 40-50°C, 15 min, enzymatische Hydrolyse (Alcalase, Neutrase, Corolase)	↓	(Peñas et al. 2006c)
6	Sojabohne	Sojabohne, Sojakeimling, Tofu	Wässrige Dispersion	300 MPa, 40°C, 15 min	→, ↓	(Peñas et al. 2011)
7	Sojabohne	Sojabohne	in Wasser gequollen	100-500 MPa, 25°C, 20 min	→↓	(Yang et al. 2014)
8	Sojabohne	Sojaproteinisolat (SPI) Lösung (1%)	Puffer, pH 6,8	350 MPa, 20°C, 16 min	↓	(Li et al. 2016)
9	Weizen	Weizen α -Amylase Inhibitor (AAI)	Puffer, pH 7,4	100-600 MPa, 10°C, 10 min	→↓	(Yamamoto et al. 2010b)
	Früchte, Gemüse					
10	Apfel	Apfel	Apfel	600 MPa, 5 min	↓	(Meyer-Pittroff et al. 2007)
11	Apfel	Apfelsaft, Homogenat (Golden Delicious), rekombinantes Mal d 1 Hauptallergen	Puffer, pH 7,0	400-550 MPa, 30-50°C, 3-10 min	→, →↓	(Houska et al. 2009a)
12	Apfel	Apfel (Golden Delicious) Gesamtproteinextrakt	Wässriger Extrakt	400-800 MPa, 20-80°C	→	(Fernandez et al. 2009)
13	Apfel	Apfelschale	Schale	700 MPa, 20°C oder 115°C, 10 min	→↓	(Husband et al. 2011)
14	Karotte	Karottensaft und rekombinantes Dau c 1 Hauptallergen	Puffer, pH unbekannt	400-550 MPa, 30-50°C, 3 und 10 min	→, →↓	(Heroldova et al. 2009)

15	Sellerie	Sellerieknolle	Nach Behandlung, Extraktion in Puffer, pH 7,4	600 MPa, 20°C,	→↓	(Jankiewicz et al. 1997)
16	Sellerie	rekombinantes Api g 1 Hauptallergen	Puffer, pH 7,4	500 MPa, 30-50°C, 10-20 min	→	(Houska et al. 2009b)
17	Ananas	Ananassaft	Saft, nach HHP Gesamtprotein präzipitiert und in Wasser gelöst	200-500 MPa, 20-50°C, 20 min	→	(Liang et al. 2015)
	Kuhmilch, Hühnerei					
18	Kuhmilch	Molkenprotein	Puffer, pH 8,0	100-300 MPa, 37°C, 15 min, enzymatische Hydrolyse (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin)	↓, ↑	(Peñas et al. 2006a)
19	Kuhmilch	Molkenprotein	Wässrige Lösung	100-300 MPa, 40-70°C, 15 min, enzymatische Hydrolyse (Corolase, Alcalase, Neutrase, Papain)	↓	(Peñas et al. 2006b)
20	Kuhmilch	natürliches β-Lactoglobulin (β-LG)	Puffer, pH 2,5 (Pepsin)	400 MPa, 5-120 min, 37°C, enzymatische Hydrolyse (Pepsin)	↓	(Chicón et al. 2008b)
21	Kuhmilch	natürliches β-Lactoglobulin (β-LG), Molkenproteinisolat (MPI)	Puffer, pH 6,8 oder pH 2,5	200 oder 400 MPa, 10 oder 30 min	→↑	(Chicón et al. 2008a)
22	Kuhmilch	MPI: natürliches β-Lactoglobulin (β-LG), α-Lactalbumin	Puffer, pH 2,5 (Pepsin) or pH 6,8 (Chymotrypsin)	200 and 400 MPa, 37°C, 10-60 min, enzymatische Hydrolyse	→↓	(Chicón et al. 2009)
23	Kuhmilch	natürliches β-Lactoglobulin, hydrolysiert	Puffer, pH 6,8 (Chymotrypsin) oder pH 2,5 (Pepsin)	400 MPa, 5 min (Pepsin) oder 20 min (Chymotrypsin) Hydrolyse; Kontrollhydrolyse 24 h bei Umgebungsdruck (Chymotrypsin)	↓	(Lopez-Exposito et al. 2012)
24	Kuhmilch	Milch	Milch	unbekannt; keine Angaben	↓	(Lee et al. 2016b)
25	Hühnerei	Eiklar Ovomucoid (OVO)	unbekannt	100-600 MPa, 10°C, 10 min	→↓	(Odani et al. 2007)

26	Hühnerei	1% Eipulver in Rinderhack	Rindfleisch	600 MPa, 20°C, 10 min	→↓	(Hildebrandt et al. 2010)
27	Hühnerei	Ovalbumin (OVA), Eiklarprotein (EW)	Puffer, pH 7,5 (OVA)/ pH 7,7 (EW)	400 MPa, 40°C, 30 min, w/o Transglutaminase (TG) Behandlung	→	(Ma et al. 2015)
	Fleisch, Fisch, Schalentiere, Mollusken					
28	Rindfleisch	Bovines Serumalbumin (BSA)	unbekannt	100-600 MPa, 5-7°C, 10 min	→↓	(Suzuki et al. 2004)
29	Rindfleisch	Bovines Gammaglobulin (BGG)	unbekannt	100-600 MPa, 5-7°C, 5 min	→↓	(Mikami et al. 2007)
30	Rindfleisch	Bovines Gammaglobulin (BGG)	Puffer, pH 7,4	100-600 MPa, 5-7°C, 5 min	→↓	(Yamamoto et al. 2010a)
31	Fisch	Forellenbarsch	Extrakt in Puffer, pH 7,5	100-400 MPa, 20°C, 15 min; 300 MPa, 20°C, 5-30 min	→	(Liu et al. 2012)
32	Fisch	Silberkarpfen	Extrakt in Puffer, pH 7,5	100-300 MPa, 20°C, 10-60 min	→	(Liu and Xue 2010)
33	Garnele	Tropomyosin (TM) von Litopenaeus vannamei	Puffer, pH 7,0	100-600 MPa, 25-75°C, 2,5-30 min	↓	(Long et al. 2015)
34	Tintenfisch	Natürliches Tropomyosin Tod p 1	Puffer, pH 7,5	200-600 MPa, 20°C, 20 min	↓	(Jin et al. 2015)

Legende

→	unverändert
↓	verringert
↑	erhöht
→↓	leicht verringert
→↑	leicht erhöht

12. Literatur

- Abraham K, Gurtler R, Berg K, Heinemeyer G, Lampen A, Appel KE (2011) Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Mol Nutr Food Res* 55(5):667-78 doi:10.1002/mnfr.201000564
- Adamcová M, van Andel V, Strohalm J, Houška M, Ševčík R (2019) Effect of high-pressure processing and natural antimicrobials on the shelf-life of cooked ham. *Czech Journal of Food Sciences* 37(1):57-61
- Adams CM, Eckenroth BE, Putnam EE, Doublié S, Shen A (2013) Structural and functional analysis of the CspB protease required for *Clostridium* spore germination. *PLoS pathogens* 9(2):e1003165 doi:10.1371/journal.ppat.1003165
- Aertsen A, Meersman F, Hendrickx ME, Vogel RF, Michiels CW (2009) Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends in biotechnology* 27(7):434-441
- Aganovic K (2017) Impact comparison of thermal, pulsed electric fields and high pressure preservation of watermelon and tomato juice: From fingerprint to footprint. Laboratory of Food Technology, KU Leuven PhD Thesis
- Aganovic K, Hertel C, Vogel RF, et al. (2021) Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20(4):3225-3266 doi:10.1111/1541-4337.12763
- AGE-database (2019) <https://tu-dresden.de/mn/chemie/lc> database for advanced glycation end product.
- Alt N, Schieberle P (2005) Model studies on the influence of high hydrostatic pressure on the formation of glycated arginine modifications at elevated temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(14):5789-97 doi:10.1021/jf050615l
- Ananta E, Heinz V, Schlüter O, Knorr D (2001) Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2(4):261-272
- Andersen B, Gronlund F (1979) High-pressure kinetics of glucose mutarotation *Acta Chemica Scandinavica Ser A* 33:275-280
- Araud E, DiCaprio E, Yang Z, et al. (2015) High-Pressure Inactivation of Rotaviruses: Role of Treatment Temperature and Strain Diversity in Virus Inactivation. *Appl Environ Microbiol* 81(19):6669-6678
- Arnold C, Schwarzenbolz U, Boehm V (2014) Carotenoids and chlorophylls in processed xanthophyll-rich food. *LWT - Food Science and Technology* 57(1):442-445
- Arroyo G, Sanz PD, Prestamo G (1999) Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *Journal of applied microbiology* 86(3):544-56
- Arthur SE, Gibson KE (2015) Comparison of methods for evaluating the thermal stability of human enteric viruses. *Food Environ Virol* 7(1):14-26 doi:10.1007/s12560-014-9178-9
- Avsaroglu M, Bozoglu F, Alpas H, Largeteau A, Demazeau G (2015) Use of pulsed-high hydrostatic pressure treatment to decrease patulin in apple juice. *High Pressure Research* 35(2):214-222
- Balasubramaniam VM (2016) *High Pressure Processing of Food*. Springer New York, New York, NY
- Bartlett D (2002) Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1595(1):367-381
- Black E, Wei J, Atluri S, et al. (2007) Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *Journal of applied microbiology* 102(1):65-76
- Bolumar T, Middendorf D, Toepfl S, Heinz V (2016) Structural Changes in Foods Caused by High-Pressure Processing *High Pressure Processing of Food*. Springer, p 509-537
- Bolumar T, Skibsted LH, Orlén V (2012) Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food Chem* 134(4):2114-20 doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.013
- Bridgman PW Water, in the liquid and five solid forms, under pressure. In: *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 1912. vol 47. JSTOR, p 441-558

- Bristow M, Isaacs N (1999) The effect of high pressure on the formation of volatile products in a model Maillard reaction. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2*:2213-2218
- Brutti A, Rovere P, Cavallero S, D'Amelio S, Danesi P, Arcangeli G (2010) Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. *Food Control* 21(3):331-333
- Buckow R, Bingham J, Daglas S, Lowther S, Amos-Ritchie R, Middleton D (2017) High pressure inactivation of selected avian viral pathogens in chicken meat homogenate. *Food Control* 73:215-222
- Buckow R, Heinz V (2008) High pressure processing—a database of kinetic information. *Chemie Ingenieur Technik* 80(8):1081-1095
- Buckow R, Sikes A, Tume R (2013) Effect of high pressure on physicochemical properties of meat. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(7):770-86 doi:10.1080/10408398.2011.560296
- Buckow R, Wendorff J, Hemar Y (2011) Conjugation of bovine serum albumin and glucose under combined high pressure and heat. *Journal of agricultural and food chemistry* 59(8):3915-23 doi:10.1021/jf104336w
- Burns DA, Heap JT, Minton NP (2010) SleC is essential for germination of *Clostridium difficile* spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *J Bacteriol* 192(3):657-64 doi:10.1128/JB.01209-09
- Cartman ST, Minton NP (2010) A mariner-based transposon system for *in vivo* random mutagenesis of *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 76(4):1103-9 doi:10.1128/AEM.02525-09
- Cattaneo S, Masotti F, Pellegrino L (2008) Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk. *European food research and technology* 226(5):1099-1106
- Cava R, Ladero L, González S, Carrascosa A, Ramírez MR (2009) Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(1):76-81
- Chakraborty S, Rao PS, Mishra HN (2015) Empirical model based on Weibull distribution describing the destruction kinetics of natural microbiota in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure processing. *Int J Food Microbiol* 211:117-127
- Cheah PB, Ledward DA (1996) High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat science* 43(2):123-34
- Chen H, Hoover DG, Kingsley DH (2005) Temperature and treatment time influence high hydrostatic pressure inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Journal of food protection* 68(11):2389-94
- Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R (2008a) Immunoreactivity and digestibility of high-pressure-treated whey proteins. *International Dairy Journal* 18(4):367-376
- Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R (2009) Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocolloids* 23(3):593-599
- Chicón R, López-Fandiño R, Alonso E, Belloque J (2008b) Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of β -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. *Journal of dairy science* 91(3):928-938
- Chien S-Y, Sheen S, Sommers C, Sheen L-Y (2017) Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Uropathogenic *E. coli* in ground beef by high pressure processing and citral. *Food Control* 73:672-680
- Collins MV, Flick GJ, Smith SA, et al. (2005) The Effect of High-Pressure Processing on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Recovered from Experimentally Exposed Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(6):500-504
- Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD (2008) High-pressure processing--effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiol Lett* 281(1):1-9
- Cook N, D'Agostino M, John R (2017) Potential Approaches to Assess the Infectivity of Hepatitis E Virus in Pork Products: A Review. *Food Environ Virol* 9(3):243-255 doi:10.1007/s12560-017-9303-7

- De Girolamo A, Lattanzio VM, Schena R, Visconti A, Pascale M (2016) Effect of alkaline cooking of maize on the content of fumonisins B1 and B2 and their hydrolysed forms. *Food Chem* 192:1083-9 doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.059
- De Vleeschouwer K, Van der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx ME (2010) The effect of high pressure-high temperature processing conditions on acrylamide formation and other Maillard reaction compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(22):11740-8 doi:10.1021/jf102697b
- Dogan C, Erkmen O (2004) High pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering* 62(1):47-52
- Dong FM, Cook AR, Herwig RP (2003) High Hydrostatic Pressure Treatment of Finish To Inactivate *Anisakis simplex*. *Journal of food protection* 66(10):1924–1926
- Doona CJ, Ghosh S, Feeherry FF, et al. (2014) High pressure germination of *Bacillus subtilis* spores with alterations in levels and types of germination proteins. *Journal of applied microbiology* 117(3):711-720
- Dumard CH, Barroso SP, de Oliveira GA, et al. (2013) Full inactivation of human influenza virus by high hydrostatic pressure preserves virus structure and membrane fusion while conferring protection to mice against infection. *PloS one* 8(11):e80785
- Dumay E, Chevalier-Lucia D, López-Pedemante T (2010) High pressure and food conservation, Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI (2009) High pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 45(5):331-347
- Elamin WM, Endan JB, Yosuf YA, Shamsudin R, Ahmedov A (2015) High Pressure Processing Technology and Equipment Evolution: A Review. *Journal of Engineering Science and Technology Review* 8(5):75-83
- Emmoth E, Rovira J, Rajkovic A, et al. (2017) Inactivation of Viruses and Bacteriophages as Models for Swine Hepatitis E Virus in Food Matrices. *Food Environ Virol* 9(1):20-34 doi:10.1007/s12560-016-9268-y
- Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. (2016) Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* 353(6306):1387-1393 doi:10.1126/science.aaf5211
- Fernandez A, Butz P, Tauscher B (2009) IgE binding capacity of apple allergens preserved after high pressure treatment. *High Pressure Research* 29(4):705-712
- Fuentes V, Ventanas J, Morcuende D, Estevez M, Ventanas S (2010) Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat science* 85(3):506-14 doi:10.1016/j.meatsci.2010.02.024
- Gayán E, Torres JA, Paredes-Sabja D (2012) Hurdle approach to increase the microbial inactivation by high pressure processing: effect of essential oils. *Food Engineering Reviews* 4(3):141-148
- Georget E, Kapoor S, Winter R, et al. (2014) In situ investigation of *Geobacillus stearothermophilus* spore germination and inactivation mechanisms under moderate high pressure. *Food Microbiol* 41:8-18
- Georget E, Sevenich R, Reineke K, et al. (2015) Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 27:1-14
- Giannini P, Jermini M, Leggeri L, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R (2018) Detection of Hepatitis E Virus RNA in Raw Cured Sausages and Raw Cured Sausages Containing Pig Liver at Retail Stores in Switzerland. *Journal of food protection* 81(1):43-45 doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-270
- González-Angulo M, Serment-Moreno V, Queirós RP, onello-Samson C (2021) Food and Beverage Commercial Applications of High Pressure Processing. In K Knoerzer & K Muthukumarappan (Eds), *Innovative Food Processing Technologies* (pp 39-73) Oxford: Elsevier
- Gonzalez ME, Barrett DM (2010) Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *Journal of food Science* 75(7):R121-R130

- Gould G, Sale A (1970) Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Microbiology* 60(3):335-346
- Guan YG, Yu P, Yu SJ, Xu XB, Shi WH, Sun WW (2011) Effects of pressure on the glucose-ammonium sulphite caramel solutions. *Food Chem* 127(2):596-601 doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.049
- Gutelius D, Hokeness K, Logan SM, Reid CW (2014) Functional analysis of SleC from *Clostridium difficile*: an essential lytic transglycosylase involved in spore germination. *Microbiology* 160(1):209-16 doi:10.1099/mic.0.072454-0
- Hao H, Zhou T, Koutchma T, Wu F, Warriner K (2016) High hydrostatic pressure assisted degradation of patulin in fruit and vegetable juice blends. *Food Control* 62:237-242
- Hauben KJ, Wuytack EY, Soontjens CC, Michiels CW (1996) High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of food protection* 59(4):350-355
- Hayashi R (2002) *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Elsevier Science.
- Heinz V, Buckow R (2009) Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5(1):73-81
- Heinz V, Knorr D (1996) High pressure inactivation kinetics of bacillus subtilis cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnology* 10(2):149-161
- Hellwig M, Henle T (2014) Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew Chem Int Ed Engl* 53(39):10316-29 doi:10.1002/anie.201308808
- Henle T (2007) Dietary advanced glycation end products--a risk to human health? A call for an interdisciplinary debate. *Mol Nutr Food Res* 51(9):1075-8 doi:10.1002/mnfr.200700067
- Heroldova M, Houska M, Vavrova H, et al. (2009) Influence of high-pressure treatment on allergenicity of rDau c1 and carrot juice demonstrated by in vitro and in vivo tests. *High Pressure Research* 29(4):695-704
- Hildebrandt S, Schütte L, Stoyanov S, Hammer G, Steinhart H, Paschke A (2010) In vitro determination of the allergenic potential of egg white in processed meat. doi:10.1155/2010/238573. *Journal of Allergy (Cairo)* 2010
- Hill VM, Ledward DA, Ames JM (1996) Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *Journal of agricultural and food chemistry* 44(2):594-598
- Hölters C, Van Almsick G, Ludwig H (1999) High pressure inactivation of anaerobic spores from *Clostridium pasteurianum* *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Springer, p 65-68
- Houska M, Heroldova M, Vavrova H, et al. (2009a) Is high-pressure treatment able to modify the allergenicity of the main apple juice allergen, Mal d1? *High Pressure Research* 29(1):14-22
- Houska M, Kminkova M, Strohm J, et al. (2009b) Allergenicity of main celery allergen rApi g1 and high-pressure treatment. *High Pressure Research* 29(4):686-694
- Huang H-W, Wu S-J, Lu J-K, Shyu Y-T, Wang C-Y (2017) Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control* 72:1-8
- Huang HW, Hsu CP, Yang BB, Wang CY (2014a) Potential Utility of High-Pressure Processing to Address the Risk of Food Allergen Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(1):78-90
- Huang R, Li X, Huang Y, Chen H (2014b) Strategies to enhance high pressure inactivation of murine norovirus in strawberry puree and on strawberries. *International journal of food microbiology* 185:1-6
- Husband FA, Aldick T, Van der Plancken I, et al. (2011) High-pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. *Molecular nutrition & food research* 55(7):1087-1095
- Iizuka T, Maeda S, Shimizu A (2013) Removal of pesticide residue in cherry tomato by hydrostatic pressure. *Journal of food Engineering* 116(4):796-800
- Isaacs NS, Coulson M (1996) The effect of pressure on processes modelling the Maillard reaction. *Progress in Biotechnology* 13:479-484

- Isbarn S, Buckow R, Himmelreich A, Lehmacher A, Heinz V (2007) Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*® 70(3):667-673
- Jankiewicz A, Baltes W, Bögl KW, et al. (1997) Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Science of food and Agriculture* 75(3):359-370
- Jin Y, Deng Y, Qian B, Zhang Y, Liu Z, Zhao Y (2015) Allergenic response to squid (*Todarodes pacificus*) tropomyosin Tod p1 structure modifications induced by high hydrostatic pressure. *Food and Chemical Toxicology* 76:86-93 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.002>
- Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. (2014) Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346(6210):755-9 doi:10.1126/science.1257147
- Juliano P, Koutchma T, Sui Q, Barbosa-Ca'novas G, Sadler G (2010) Polymeric-based food packaging for high-pressure processing. *Food Engineering Reviews* 2:274–297
- Kaletunç G, Lee J, Alpas H, Bozoglu F (2004) Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and environmental microbiology* 70(2):1116-1122
- Karino S, Hane H, Makita T (1994) Behavior of water and ice at low temperature and high pressure.. In: High Pressure Bioscience, R Hayashi, S Kunugi, S Shimada, and A Suzuki, eds, San-Ei Suppan Co, Kyoto, 2-9
- Kebede B, Grauwet T, Andargie T, et al. (2017) Kinetics of Strecker aldehyde formation during thermal and high pressure high temperature processing of carrot puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 39:88-93
- Keramat J, Leball A, Prost C, Soltanizadeh N (2011) Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food and Bioprocess Technology* 4:340-363
- Kingsley DH, Chen H (2008) Aqueous matrix compositions and pH influence feline calicivirus inactivation by high pressure processing. *Journal of food protection* 71(8):1598-603
- Kingsley DH, Chen H (2009) Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus. *Int J Food Microbiol* 130(1):61-4 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.004
- Kingsley DH, Chen H, Hoover DG (2004) Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus Res* 102(2):221-4 doi:10.1016/j.virusres.2004.01.030
- Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E, Richards GP (2002) Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *Journal of food protection* 65(10):1605-9
- Klotz B, Pyle DL, Mackey BM (2007) New mathematical modeling approach for predicting microbial inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 73(8):2468-78 doi:10.1128/AEM.02211-06
- Kniel KE, Shearer AE, Cascarino JL, Wilkins GC, Jenkins MC (2007) High hydrostatic pressure and UV light treatment of produce contaminated with *Eimeria acervulina* as a *Cyclospora cayentanensis* surrogate. *Journal of food protection* 70(12):2837-42 doi:10.4315/0362-028x-70.12.2837
- Knockaert G, De Roeck A, Lemmens L, Van Buggenhout S, Hendrickx M, Van Loey A (2011) Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry* 125(3):903-912
- Kong L, Doona CJ, Setlow P, Li Y-q (2014) Monitoring rates and heterogeneity of high-pressure germination of *Bacillus* spores by phase-contrast microscopy of individual spores. *Applied and environmental microbiology* 80(1):345-353
- Koo J, Jahncke ML, Reno PW, Hu X, Mallikarjunan P (2006) Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in phosphate-buffered saline and in inoculated whole oysters by high-pressure processing. *Journal of food protection* 69(3):596-601
- Koseki S, Yamamoto K (2007) A novel approach to predicting microbial inactivation kinetics during high pressure processing. *Int J Food Microbiol* 116(2):275-82 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.008
- Kovac K, Bouwknecht M, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D (2012) Evaluation of high hydrostatic pressure effect on human adenovirus using molecular

- methods and cell culture. *International Journal of Food Microbiology* 157(3):368-374
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.006>
- Lado BH, Yousef AE (2002) Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection* 4(4):433-440
- Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier J, Laborde-Croubit S, Cabannes M (2000a) New packaging solutions for high pressure treatments of food. *High Pressure Research* 19:597–602
- Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier J, Laborde-Croubit S, Cabannes M (2000b) Packaging for high-pressure treatments in the food industry. . *Packaging Technology and Science* 13:63-71
- Lee C, In S, Han Y, Oh S (2016a) Reactivity change of IgE to buckwheat protein treated with high-pressure and enzymatic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(6):2073-2079
- Lee J, Choi E-J, Park SY, et al. (2016b) High-pressure processing of milk alleviates atopic dermatitis in DNCB-induced Balb/c mice. *Dairy Science & Technology* 96(1):67-78
- Lee KH, Park SY, Ha SD (2016c) Inactivation of *Anisakis simplex* L3 in the flesh of white spotted conger (*Conger myriaster*) by high hydrostatic pressure and its effect on quality. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33(6):1010-5
doi:10.1080/19440049.2016.1183108
- Lenz CA, Reineke K, Knorr D, Vogel RF (2015) High pressure thermal inactivation of *Clostridium botulinum* type E endospores - kinetic modeling and mechanistic insights. *Front Microbiol* 6:652 doi:10.3389/fmicb.2015.00652
- Lenz CA, Vogel RF (2015) Pressure-Based Strategy for the Inactivation of Spores. *Subcell Biochem* 72:469-537 doi:10.1007/978-94-017-9918-8_23 [doi]
- Leon JS, Kingsley DH, Montes JS, et al. (2011) Randomized, double-blinded clinical trial for human norovirus inactivation in oysters by high hydrostatic pressure processing. *Applied and environmental microbiology* 77(15):5476-5482
- Li H, Zhu K, Zhou H, Peng W, Guo X (2016) Comparative study of four physical approaches about allergenicity of soybean protein isolate for infant formula. *Food and Agricultural Immunology* 27(5):604-623
- Li X, Chen H, Kingsley DH (2013a) The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI. 1 and GII. 4 human noroviruses. *International journal of food microbiology* 167(2):138-143
- Li X, Huang R, Chen H (2017) Evaluation of Assays to Quantify Infectious Human Norovirus for Heat and High-Pressure Inactivation Studies Using Tulane Virus. *Food Environ Virol* 9(3):314-325
doi:10.1007/s12560-017-9288-2
- Li Y, Yang W, Chung S-Y, et al. (2013b) Effect of pulsed ultraviolet light and high hydrostatic pressure on the antigenicity of almond protein extracts. *Food and Bioprocess Technology* 6(2):431-440
- Liang J, Xu J, Pan J, Ge M, Zong K (2015) Identification of the Main Allergenic Proteins in High Hydrostatic Pressure Pineapple Juice and Assessing the Influence of Pressure on their Allergenicity. *International Journal of Food Properties* 18(10):2134-2144
- Lindsay DS, Collins MV, Holliman D, Flick GJ, Dubey JP (2006) Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *J Parasitol* 92(1):195-6 doi:10.1645/GE-631R.1
- Lindsay DS, Collins MV, Jordan CN, Flick GJ, Dubey JP (2005) Effects of high pressure processing on infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for mice. *J Parasitol* 91(3):699-701 doi:10.1645/GE-425R
- Lindsay DS, Holliman D, Flick GJ, Goodwin DG, Mitchell SM, Dubey JP (2008) Effects of high pressure processing on *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries. *J Parasitol* 94(3):757-8
doi:10.1645/GE-1471.1
- Liu C-Y, Tao S, Liu R, Chen F-S, Xue W-T (2012) Is high pressure treatment able to modify the allergenicity of the largemouth bass allergens? *High Pressure Research* 32(4):551-556

- Liu F, Li R, Wang Y, Bi X, Liao X (2014) Effects of high hydrostatic pressure and high-temperature short-time on mango nectars: changes in microorganisms, acid invertase, 5-hydroxymethylfurfural, sugars, viscosity, and cloud. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 22:22-30
- Liu R, Xue W (2010) High-pressure treatment with silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein and its allergic analysis. *High Pressure Research* 30(3):438-442
doi:10.1080/08957959.2010.507955
- Long F, Yang X, Wang R, Hu X, Chen F (2015) Effects of combined high pressure and thermal treatments on the allergenic potential of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) tropomyosin in a mouse model of allergy. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29:119-124
- Lopez-Exposito I, Chicon R, Belloque J, Lopez-Fandino R, Berin MC (2012) In vivo methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of beta-lactoglobulin are immunologically inert. *J Dairy Sci* 95(2):541-8 doi:10.3168/jds.2011-4646
- Lou F, DiCaprio E, Li X, et al. (2016) Variable High-Pressure-Processing Sensitivities for Genogroup II Human Noroviruses. *Appl Environ Microbiol* 82(19):6037-45 doi:10.1128/AEM.01575-16
- Lou F, Neetoo H, Chen H, Li J (2011) Inactivation of a human norovirus surrogate by high-pressure processing: effectiveness, mechanism, and potential application in the fresh produce industry. *Applied and environmental microbiology* 77(5):1862-1871
- Lou F, Ye M, Ma Y, et al. (2015) A Gnotobiotic Pig Model for Determining Human Norovirus Inactivation by High-Pressure Processing. *Appl Environ Microbiol* 81(19):6679-87
- Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estevez M (2011) Protein oxidation in muscle foods: a review. *Mol Nutr Food Res* 55(1):83-95 doi:10.1002/mnfr.201000453
- Ma X, Lozano-Ojalvo D, Chen H, Lopez-Fandiño R, Molina E (2015) Effect of high pressure-assisted crosslinking of ovalbumin and egg white by transglutaminase on their potential allergenicity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29:143-150
- Ma Xj, Gao Jy, Tong P, Li X, Chen Hb (2017) Tracking the behavior of Maillard browning in lysine/arginine-sugar model systems under high hydrostatic pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*
- Maier MB (2019) High pressure temperature inactivation of *Clostridium botulinum* endospores in low-acid foods and food model systems. *Diss.*, Technische Universität München
- Maier MB, Schweiger T, Lenz CA, Vogel RF (2018) Inactivation of non-proteolytic *Clostridium botulinum* type E in low-acid foods and phosphate buffer by heat and pressure. *PLoS One* 13(7):e0200102 doi:10.1371/journal.pone.0200102
- Margosch D (2004) Behaviour of bacterial endospores and toxins as safety determinants in low acid pressurized food. Dissertation, Technische Universität München
- Margosch D, Ehrmann MA, Buckow R, Heinz V, Vogel RF, Ganzle MG (2006) High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. *Appl Environ Microbiol* 72(5):3476-81 doi:10.1128/AEM.72.5.3476-3481.2006
- Margosch D, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2003) Rolle der Dipicolinsäure bei der druckinduzierten Inaktivierung bakterieller Endosporen. Poster, vorgestellt bei dem 5. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM und DGHM in Seeon, Mai (2003).
- Margosch D, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2004a) Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *J Food Protect* 67(11):2530-2537
- Margosch D, Ganzle MG, Ehrmann MA, Vogel RF (2004b) Pressure inactivation of *Bacillus* endospores. *Appl Environ Microbiol* 2004 Dec;70(12):7321-8
- Martínez-Monteagudo S, Saldaña M (2015) Kinetics of lactulose formation in milk treated with pressure-assisted thermal processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 28:22-30
- Martinez-Monteagudo SI, Saldaña MD (2014) Chemical reactions in food systems at high hydrostatic pressure. *Food Engineering Reviews* 6(4):105-127

- Mensitieri G, Scherillo G, Iannace S (2013) Flexible packaging structures for high pressure treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17:12-21
- Merwad AMA, Mitchell SM, Zajac AM, Flick GJ, Lindsay DS (2011) Effects of high pressure processing on hatching of eggs of the zoonotic rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Veterinary Parasitology* 176(2-3):185-188
- Meyer-Pittroff R, Behrendt H, Ring J (2007) Specific immuno-modulation and therapy by means\ of high pressure treated allergens. *High Pressure Research* 27(1):63-67
- Mikami N, Matsuno M, Hara T, Nishiumi T, Suzuki A (2007) Effects of High Pressure Treatment on IgE-Specific Binding Activity and Structure of Bovine Gamma Globulin. *High Pressure Biosci Biotechnol* 1(1):245-251
- Molina-García AD, Sanz P (2002) *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *Journal of Food Protection®* 65(2):383-388
- Molina-Gutierrez A, Stippl V, Delgado A, Gänzle MG, Vogel RF (2002) In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Applied and environmental microbiology* 68(9):4399-4406
- Moreno FJ, Molina E, Olano A, López-Fandiño R (2003a) High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(2):394-400
- Moreno FJ, Vaillant-Barka F, Olano A (2003b) Effect of high pressure on isomerization and degradation of lactose in alkaline media. *Journal of agricultural and food chemistry* 51:1894-1896
- Mota MJ, Lopes RP, Delgadillo I, Saraiva JA (2013) Microorganisms under high pressure—Adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnology advances* 31(8):1426-1434
- Niven GW, Miles CA, Mackey BM (1999) The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli*: an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology* 145(2):419-425
- Odani S, Kanda Y, Hara T, Matuno M, Suzuki A (2007) Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Allergenicity and Structure of Chicken Egg White Ovomucoid. *High Pressure Bioscience and Biotechnology* 1(1):252-258
- Ogihara H, Yatuzuka M, Horie N, Furukawa S, Yamasaki M (2009) Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. *Food Control* 20(11):963-966
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.004>
- Ohnishi Y, Ono T, Shigehisa T (1994) Histochemical and morphological studies on *Trichinella spiralis* larvae treated with high hydrostatic pressure. *International journal for parasitology* 24(3):425-7 doi:10.1016/0020-7519(94)90094-9
- Olivier SA, Bull MK, Stone G, et al. (2011) Strong and consistently synergistic inactivation of spores of spoilage-associated *Bacillus* and *Geobacillus spp.* by high pressure and heat compared with inactivation by heat alone. *Applied and Environmental Microbiology* 77(7):2317-2324
doi:10.1128/aem.01957-10
- Paidhungat M, Setlow B, Daniels WB, Hoover D, Papafragkou E, Setlow P (2002) Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6):3172-3175
- Paidhungat M, Setlow P (2000) Role of Ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 182(9):2513-2519
- Paidhungat M, Setlow P (2001) Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 183(13):3982-3990
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, et al. (2013) Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 19(3):407-15 doi:10.3201/eid1903.111866
- Paredes-Sabja D, Setlow B, Setlow P, Sarker MR (2008) Characterization of *Clostridium perfringens* spores that lack spoVA proteins and dipicolinic acid. *J Bacteriol* 190(13):4648-4659
doi:10.1128/Jb.00325-08

- Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR (2009) SleC is essential for cortex peptidoglycan hydrolysis during germination of spores of the pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 191(8):2711-20 doi:10.1128/JB.01832-08
- Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR (2011) Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. Trends Microbiol 19(2):85-94 doi:10.1016/j.tim.2010.10.004
- Parish ME (1998) High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. J Food Safety 18(1):57-65
- Partschfeld C, Richter S, Schwarzenbolz U, Henle T (2007) Modification of beta-lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: localization of reactive glutamine residues. Biotechnology journal 2(4):462-8 doi:10.1002/biot.200600226
- Pavoni E, Arcangeli G, Dalzini E, et al. (2015) Synergistic effect of high hydrostatic pressure (HHP) and marination treatment on the inactivation of hepatitis A virus in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Food and environmental virology 7(1):76-85
- Peñas E, Gomez R, Frias J, Baeza ML, Vidal-Valverde C (2011) High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. Food Chemistry 125(2):423-429
- Peñas E, Préstamo G, Baeza ML, Martínez-Molero MI, Gomez R (2006a) Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. International Dairy Journal 16(8):831-839
- Peñas E, Restani P, Ballabio C, Préstamo G, Fiocchi A, Gomez R (2006b) Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. Journal of Food Protection® 69(7):1707-1712
- Peñas E, Restani P, Ballabio C, Préstamo G, Fiocchi A, Gómez R (2006c) Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. European Food Research and Technology 222(3-4):286-290
- Pilavtepe-Çelik M, Buzrul S, Alpas H, Bozoğlu F (2009) Development of a new mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* by high hydrostatic pressure in carrot juice and peptone water. Journal of Food Engineering 90(3):388-394
- Porto-Fett ACS, Call JE, Shoyer BE, et al. (2010) Evaluation of fermentation, drying, and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Trichinella spiralis* in raw pork and Genoa salami. International Journal of Food Microbiology 140(1):61-75
- Rastogi N, Raghavarao K, Balasubramaniam V, Niranjan K, Knorr D (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. Critical reviews in food science and nutrition 47(1):69-112
- Rastogi NK (2013) Recent Developments in High Pressure Processing of Foods. Springer US, New York, USA
- Realini CE, Guardia MD, Garriga M, Perez-Juan M, Arnau J (2011) High pressure and freezing temperature effect on quality and microbial inactivation of cured pork carpaccio. Meat science 88(3):542-7 doi:10.1016/j.meatsci.2011.02.008
- Reddy NR, Solomon HM, Fingerhut GA, Rhodehamel EJ, Balasubramaniam VM, Palaniappan S (1999) Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. J Food Safety 19(4):277-288
- Reddy NR, Tetzloff RC, Solomon HM, Larkin JW (2006) Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures. Innovative Food Science & Emerging Technologies 7(3):169-175
- Reineke K, Doehner I, Schlumbach K, Baier D, Mathys A, Knorr D (2012) The different pathways of spore germination and inactivation in dependence of pressure and temperature. Innovative Food Science & Emerging Technologies 13:31-41
- Reineke K, Mathys A, Heinz V, Knorr D (2013a) Mechanisms of endospore inactivation under high pressure. Trends in microbiology 21(6):296-304

- Reineke K, Mathys A, Knorr D (2011) The impact of high pressure and temperature on bacterial spores: inactivation mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa. *J Food Sci* 76(3):M189-97 doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02066.x [doi]
- Reineke K, Schlumbach K, Baier D, Mathys A, Knorr D (2013b) The release of dipicolinic acid--the rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *Int J Food Microbiol* 162(1):55-63
- Rendueles E, Omer M, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT-Food Science and Technology* 44(5):1251-1260
- Richards GP (2012) Critical review of norovirus surrogates in food safety research: rationale for considering volunteer studies. *Food and environmental virology* 4(1):6-13
- Ritz M, Jugiau F, Federighi M, Chapleau N, de Lamballerie M (2008) Effects of high pressure, subzero temperature, and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in buffer and smoked salmon. *Journal of food protection* 71(8):1612-8
- Rode LJ, Foster JW (1966) Quantitative aspects of exchangeable calcium in spores of *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 91(4):1589-1593
- Rosypal AC, Bowman DD, Holliman D, Flick GJ, Lindsay DS (2007) Effects of high hydrostatic pressure on embryonation of *Ascaris suum* eggs. *Veterinary Parasitology* 145(1-2):86-89
- Rosypal AC, Zajac AM, Flick GJ, Bowman DD, Lindsay DS (2011) High pressure processing treatment prevents embryonation of eggs of *Trichuris vulpis* and *Ascaris suum* and induces delay in development of eggs. *Veterinary Parasitology* 181(2-4):350-353
- Ruiz AG, Xi B, Minor M, et al. (2016) High-Pressure-High-Temperature Processing Reduces Maillard Reaction and Viscosity in Whey Protein-Sugar Solutions. *Journal of agricultural and food chemistry* 64(38):7208-7215
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, et al. (2014) Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res* 30(4):197-205 doi:10.1007/s12550-014-0203-5
- San Martin MF, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG (2002) Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(6):627-45 doi:10.1080/20024091054274
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, Elez-Martínez P, De Ancos B, Martín-Belloso O, Cano MP (2005) Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(11):4403-4409
- Sánchez G, Aznar R, Martínez A, Rodrigo D (2011) Inactivation of human and murine norovirus by high-pressure processing. *Foodborne pathogens and disease* 8(2):249-253
- Sansone L, Aldi A, Musto P, Di Maio E, Amendola E, Mensitieri G (2012) Assessing the suitability of polylactic acid flexible films for high pressure pasteurization and sterilization of packaged foodstuff. *Journal of Food Engineering* 111(1):34-45
- Santillana Farakos SM, Zwietering MH (2011) Data analysis of the inactivation of foodborne microorganisms under high hydrostatic pressure to establish global kinetic parameters and influencing factors. *Journal of food protection* 74(12):2097-2106
- Schieberle P, Hofmann T, Deters F (2005) Influence of high hydrostatic pressure on aroma compound formation in thermally processed proline-glucose mixtures. ACS Publications, Washington D.C
- Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2010) Cross-linking of hen egg white lysozyme by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: localization of reactive amino acid side chains. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(24):12749-52 doi:10.1021/jf103490w
- Schwarzenbolz U, Förster A, Henle T (2017) Influence of high hydrostatic pressure on the reaction between glyoxal and lysine residues. *European Food Research and Technology*:1-7
- Schwarzenbolz U, Henle T (2010) Non-enzymatic modifications of proteins under high-pressure treatment. *High Pressure Research* 30:458-465

- Schwarzenbolz U, Klostermeyer H, Henle T (2000) Maillard-type reactions under pressure: formation of pentosidine. *European Food Research and Technology* 211(208-210)
- Schwarzenbolz U, Klostermeyer H, Henle T Maillard reaction under high hydrostatic pressure: studies on the formation of protein-bound amino acid derivatives. In: *International Congress Series*, 2002. vol 1245. Elsevier, p 223-227
- Segovia Bravo K, Ramírez R, Durst R, et al. (2012) Formation Risk of Toxic and Other Unwanted Compounds in Pressure-Assisted Thermally Processed Foods. *Journal of food science* 77(1)
- Serment-Moreno V, Barbosa-Cánovas G, Torres JA, Welte-Chanes J (2014) High-pressure processing: kinetic models for microbial and enzyme inactivation. *Food Engineering Reviews* 6(3):56-88
- Serment-Moreno V, Fuentes C, Barbosa-Cánovas G, Torres JA, Welte-Chanes J (2015) Evaluation of high pressure processing kinetic models for microbial inactivation using standard statistical tools and information theory criteria, and the development of generic time-pressure functions for process design. *Food and Bioprocess Technology* 8(6):1244-1257
- Setlow P (2003) Spore germination. *Curr Opin Microbiol* 6(6):550-6
- Sevenich R, Bark F, Crews C, et al. (2013) Effect of high pressure thermal sterilization on the formation of food processing contaminants. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 20:42-50
- Sevenich R, Bark F, Kleinstueck E, et al. (2015) The impact of high pressure thermal sterilization on the microbiological stability and formation of food processing contaminants in selected fish systems and baby food puree at pilot scale. *Food Control* 50:539-547
- Sevenich R, Kleinstueck E, Crews C, et al. (2014) High-Pressure-Thermal Sterilization: Food safety and food quality of baby food puree. *J Food Sci* 79(2):M230-M237 doi:10.1111/1750-3841.12345
- Sido RF, Huang R, Liu C, Chen H (2017) High hydrostatic pressure inactivation of murine norovirus and human noroviruses on green onions and in salsa. *International journal of food microbiology* 242:1-6
- Simonin H, Duranton F, de Lamballerie M (2012) New Insights into the High-Pressure Processing of Meat and Meat Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11
- Singh P (2017) Effective Packaging Solutions For HPP. HHP Summit 2017.
<https://universalpure.com/wp-content/uploads/2017/08/2017-HPP-Summit-Presentation-PremSingh-Teinnovations.pdf>.
- SKLM (2004) Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln. Sicherheitsbewertung des Hochdruck-Verfahrens.
http://dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2004/sklm_hochdruck_2004.pdf.
- Slifko TR, Raghubeer E, Rose JB (2000) Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. *Journal of food protection* 63(9):1262-7
- Somkuti J, Smeller L (2013) High pressure effects on allergen food proteins. *Biophysical chemistry* 183:19-29 doi:10.1016/j.bpc.2013.06.009
- Song Y, Koontz J (2016) Ensuring Migration Safety of Food Contact Polymers Treated With High Pressure Processing. 6th International Symposium on Food Packaging –Scientific Developments Supporting Safety and Innovation. http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/10/AbstractBio_Song.pdf.
- Suzuki A, Hara T, Koyama H, et al. (2004) Effect of high pressure treatment on the allergenicity of bovine serum albumin evaluated by histamine release assay using sera from allergic patients and human basophilic KU812F cells. *Proceedings of the 50th International Congress of Meat Science & Technology*:1163-1166
- Szabo K, Trojnar E, Anheyer-Behmenburg H, et al. (2015) Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method. *Int J Food Microbiol* 215:149-56 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013
- Szwengiel A, Lewandowicz G, Gorecki AR, Blaszcak W (2018) The effect of high hydrostatic pressure treatment on the molecular structure of starches with different amylose content. *Food Chem* 240:51-58 doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.082

- Tamaoka T, Itoh N, Hayashi R (1991) High pressure effect on Maillard reaction. *Agricultural and biological chemistry* 55(8):2071-2074
- Tauscher B (1995) Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 200(1):3-13
- Tay A, Shellhammer TH, Yousef AE, Chism GW (2003) Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of food protection* 66(11):2057-2061
- Ting E (2010) High-Pressure Processing Equipment Fundamentals. In: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas GV, Balasubramaniam VM, Dunne CP, Farkas DF, Yuan JTC (eds) *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Wiley-Blackwell, p 20-27
- Tokuşoğlu Ö, Alpas H, Bozoğlu F (2010) High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(2):250-258
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.11.005>
- Tonello-Samson C (2018a) Commercial applications of HPP and irradiation (ionizing radiation). Oral presentation at IFT-EFFoST 2018 International Nonthermal Processing Workshop and Short Course, September 25-27, Sorrento, Italy.
- Tonello-Samson C (2018b) HPP successful applications and trends: HPP market growth & Hiperbaric Bulk technology. Oral presentation at IFT-EFFoST 2018 International Nonthermal Processing Workshop and Short Course, September 25-27, Sorrento, Italy.
- Tonello SC (2018) Commercial applications of HPP & irradiation (ionizing radiation). International Nonthermal Processing Workshop and Short Course, Oral presentation at IFT-EFFoST September 25-27, Sorrento, Italy
- Torres JA, Velazquez G (2005) Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering* 67(1-2):95-112
- Van Opstal I, Vanmuysen SC, Wuytack EY, Masschalck B, Michiels CW (2005) Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International journal of food microbiology* 98(2):179-191
- Vanga SK, Singh A, Raghavan V (2015) Review of Conventional and Novel Food Processing Methods on Food Allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr*:0 doi:10.1080/10408398.2015.1045965 [doi]
- Venugopal V (2006) Retort pouch packaging. In: *Seafood processing: adding value through quick freezing, retortable packaging, cook-chilling and other methods*. CRC Press, New York,:197–215
- Verlinde PH, Oey I, Deborggraeve WM, Hendrickx ME, Van Loey AM (2009) Mechanism and related kinetics of 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during combined high hydrostatic pressure-thermal treatments. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(15):6803-14
doi:10.1021/jf900832g
- Vervoort L, Van der Plancken I, Grauwet T, et al. (2012) Thermal versus high pressure processing of carrots: A comparative pilot-scale study on equivalent basis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 15:1-13
- Vidacek S, de las Heras C, Solas MT, Rodriguez Mahillo AI, Tejada M (2009) Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(13):2228-2235
- Villamonte G, Pottier L, de Lamballerie M (2017) Influence of high-pressure processing on the oxidative processes in pork batters: efficacy of rosemary extract and sodium ascorbate. *European Food Research and Technology*:1-10
- Wagner W, Saul AB, Pruß A (1994) International equations for the pressure along the melting and along the sublimation curve of ordinary water substance. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 23:515-527
- Wang CY, Huang HW, Hsu CP, Yang BB (2016) Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(4):527-540
doi:10.1080/10408398.2012.745479

- Wang G, Paredes-Sabja D, Sarker MR, Green C, Setlow P, Li YQ (2012) Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*. Journal of applied microbiology 113(4):824-36 doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05387.x
- Wang G, Zhang P, Paredes-Sabja D, et al. (2011) Analysis of the germination of individual *Clostridium perfringens* spores and its heterogeneity. Journal of applied microbiology 111(5):1212-1223 doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05135.x
- Wang J, Barba FJ, Sorensen JC, et al. (2018) High pressure effects on myrosinase activity and glucosinolate preservation in seedlings of Brussels sprouts. Food Chem 245:1212-1217 doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.018
- Westphal A, Schwarzenbolz U, Boehm V (2018) Effects of high pressure processing on bioactive compounds in spinach and rosehip puree. European Food Research and Technology 244(3):395-407
- Winter R, Jeworrek C (2009) Effect of pressure on membranes. Soft Matter 5(17):3157-3173
- Wuytack EY, Boven S, Michiels CW (1998) Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. Applied and environmental microbiology 64(9):3220-3224
- Yamamoto S, Mikami N, Matsuno M, et al. (2010a) Effects of a high-pressure treatment on bovine gamma globulin and its reduction in allergenicity. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 74(3):525-30 doi:10.1271/bbb.90715
- Yamamoto S, Takanohashi K, Hara T, Odani S, Suzuki A, Nishiumi T (2010b) Effects of a high-pressure treatment on the wheat alpha-amylase inhibitor and its relationship to elimination of allergenicity. Journal of Physics: Conference Series 215(1):012170
- Yang H, Yang A, Gao J, Chen H (2014) Characterization of Physicochemical Properties and IgE-Binding of Soybean Proteins Derived from the HHP-Treated Seeds. Journal of food science 79(11):C2157-C2163
- Yang J, Powers JR (2016) Effects of High Pressure on Food Proteins. In: Balasubramaniam V., Barbosa-Cánovas G., Lelieveld H. (eds) High Pressure Processing of Food. Food Engineering Series. Springer, New York, NY
- Ye M, Lingham T, Huang Y, et al. (2015) Effects of High-Hydrostatic Pressure on Inactivation of Human Norovirus and Physical and Sensory Characteristics of Oysters. Journal of food science 80(6):M1330-M1335
- Zhang Y, Jiao S, Lian Z, Deng Y, Zhao Y (2015) Effect of single- and two-cycle high hydrostatic pressure treatments on water properties, physicochemical and microbial qualities of minimally processed squids (*todarodes pacificus*). J Food Sci 80(5):E1012-20 doi:10.1111/1750-3841.12851
- Zhang ZH, Wang LH, Zeng XA, Han Z, Brennan CS (2019) Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. International journal of food science & technology 54(1):1-13
- Zhao Y, Jiang Y, Ding Y, Wang D, Deng Y (2019) High Hydrostatic Pressure-Assisted Extraction of High-Molecular-Weight Melanoidins from Black Garlic: Composition, Structure, and Bioactive Properties, , Article ID 1682749. Journal of Food Quality:1-8
- Zhou H, Wang C, Ye J, Chen H, Tao R, Cao F (2016a) Effects of high hydrostatic pressure treatment on structural, allergenicity, and functional properties of proteins from ginkgo seeds. Innovative Food Science & Emerging Technologies 34:187-195
- Zhou H, Wang C, Ye J, Tao R, Chen H, Cao F (2016b) Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing on the Hydrolysis and Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds. Food and Bioprocess Technology 9:839-848