Verpakkingen in de strijd me

TNO Voeding ontwikkelde de 'bio-switch'. De technologie is gebaseerd op een biopolymere matrix waarin een antimicrobiële component wordt ingesloten. De enzymen die micro-organismen uitscheiden, breken deze matrix (gedeeltelijk) af waardoor de beschermende component vrijkomt en verdere groei wordt tegengegaan. Andere toepassingen liggen in het verschiet.

Ondanks hygiënische productieomstandigheden zijn of raken (eind)producten besmet met micro-organismen. Verdere uitgroei moet met het oog op de houdbaarheid dan wel veiligheid zo veel mogelijk worden voorkomen. TNO Voeding ontwikkelde daarop een nieuwe technologie waarbij het micro-organisme zelf zijn bestrijding in werking zet en zo vroegtijdig in de kiem wordt gesmoord. Inmiddels is het punt van 'proof-of-principle' bereikt en wordt samen met een producent van verpakkingsmaterialen aan dit concept gewerkt. Daarnaast blijken er diverse andere toepassingsmogelijkheden te zijn, waarbij geïnduceerde afgifte van een component een algemeen kenmerk is.

Andere toepassingen zijn smaakmaskering en maagpassage

Concept

Het concept is een actieve antimicrobiële verpakking (figuur 1 en kader 'Antimicrobiële actieve verpakking'). Lysozym, een natuurlijke antimicrobiële component uit kippeneieren, werd ingesloten op een zetmeelgebaseerde matrix. Micro-organismen die in de nabijheid hiervan groeien, zullen enzymen (amylases) uitscheiden om dit zetmeel af te breken. Het vrijkomende lysozym zal de microbiële groei op het voedingsmiddel remmen.
Het voordeel van deze verpakkingsmethode is dat lysozym alleen werkzaam is op de plaats en het moment waar en wanneer dat nodig is. Naar verwachting zal dit leiden tot een verlengde houdbaarheid, terwijl er minder van de antimicrobiële component nodig is. TNO verwacht dat dit concept vooral toepassing vindt bij voedingsmiddelen waarvan bekend is dat initiële besmetting met micro-organismen zou kunnen optreden aan het voedseloppervlak voor of tijdens het verpakken.

Principe

Algemeen omschreven bestaat de bio-switch uit een matrix van gecross-linkte biopolymeren met daarin een actieve component, waarbij de afgifte van de actieve component plaatsvindt als reactie op een externe stimulus. Deze externe stimulus kan, zoals in het geval van de actieve verpakking, een enzym zijn wat aangrijpt op de polymere matrix. Daarnaast kan de stimulus een vergadering in pH, temperatuur of zoutsterkte zijn, of de aanwezigheid van een bepaalde metaboliet. De concepten die tot nu toe zijn ontwikkeld, zijn alle gebaseerd op ionogene interactie tussen de matrix en actieve component. Dit betekent dat de matrix is opgebouwd uit een negatief of positief geladen biopolymeer. Hiervoor zijn polymeren te gebruiken die van nature lading bevatten, zoals pectine en gelatine. Ook is het mogelijk met behulp van chemische modificatie lading op polymeren als zetmeel en cellulose aan te brengen. Doordat de ladingsdichtheid op het polymeer, het type polymeer en de mate van cross-linking te variëren zijn, is het mogelijk op basis van het bio-switch-concept een groot aantal matrices te ontwikkelen. Deze matrices kunnen zeer uiteenlopende eigenschappen krijgen. Ook kunnen dan zeer diverse actieve componenten ingesloten en geïnduceerd vrijgelaten worden. Tot op heden is de beperking dat deze componenten geladen dienen te zijn. Behalve antimicrobiële componenten kan de actieve component bijvoorbeeld ook een neutraceutical of farmaceutical zijn.

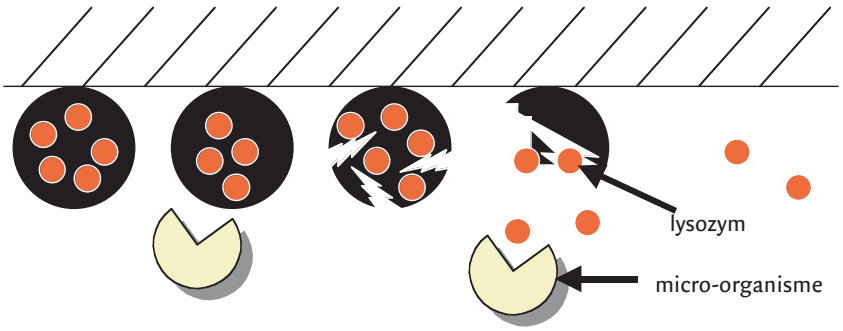

Fig. 1 Schematische weergave van de actieve antimicrobiële verpakking. Micro-organismen zullen amylases uitscheiden die de op zetmeel gebaseerde matrix zullen openbreken, waardoor lysozym vrijkomt en er remming van microbiële groei optreedt.

Kinetiek

Met behulp van fluorescente probes is het mogelijk om de kinetiek van zowel opname als afgifte van componenten uit polymere matrix te bestuderen. Door de probes is het mogelijk om onder andere de maximale beladingsgraad van de matrix te bepalen. Ook kunnen relaties worden gelegd tussen ladingsdichtheid en de mate van cross-linking van de matrix en de snelheid van afgifte van de

t micro-organismen

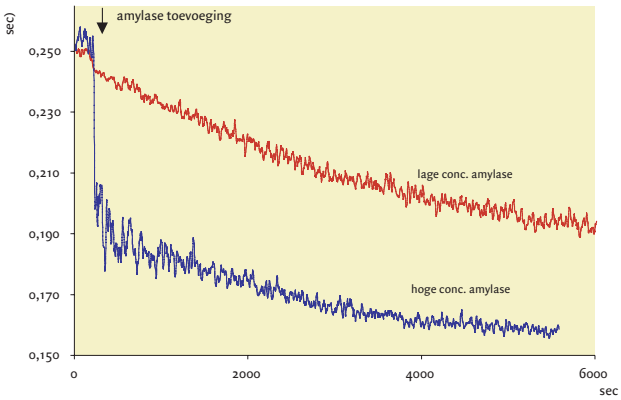

Fig. 2 Kinetiek van afgifte van een fluorescente probe uit een op zetmeel gebaseerde matrix onder invloed van twee verschillende concentraties amylase. De halfwaardetijd van de fluorescentie levensduur van deze probe in oplssing is 0,15 µseconde, terwijl deze 0,25 µseconde is wanneer probe is ingesloten in de biopolymere matrix.

actieve component in de tijd. Met de kennis die de gelegde relaties opleveren is het vervolgens mogelijk om een bioswitch te ontwikkelen die voldoende robuust is voor een bepaalde toepassing en ook zo gevoelig mogelijk reageert op de externe stimulus.
Er is voor deze studies gebruik gemaakt van het feit dat de fluorescentielevensduur van de probe ruthenium-bipyridill in oplossing anders is dan wanneer deze component ingesloten is in een biopolymere matrix. Door dit verschil in fluorescentielevensduur is het deel van de probe dat zich in de matrix bevindt in de tijd te volgen. Een voorbeeld van een dergelijk experiment is te zien in figuur 2, waarbij toevoeging van verschillende concentraties amylase aan een bio-switch op basis van zetmeel tot een verschillende snelheid van afgifte van de fluorescente probe leidt.

'Proof-of-principle'

Er is gekozen voor zetmeel als basis voor de polymere matrix om tot een 'proof-of-principle' van een antimicrobiële verpakking te komen. Hiervoor is zetmeel selectief geoxideerd, waardoor negatieve ladingen worden aangebracht. Vervolgens is het zetmeel chemisch gecrosslinkt tot een polymeer netwerk. Dit netwerk is vervolgens gefragmenteerd tot deeltjes van ongeveer 100 µm. Dergelijke deeltjes bleken in staat om lysozym volledig in te sluiten.
Aangetoond werd dat gedurende enkele dagen er nauwelijks enige lysozym uit de matrix weglekt. Wanneer vervolgens amylase wordt toegevoegd, vindt er in een tijdsbestek van minuten een sterke afgifte van lysozym plaats.
Om te bepalen of de deeltjes met daarin lysozym ook in staat zijn effectief op te treden tegen bacteriën, werden deeltjes aangebracht in het midden van een agarplaat waarop de bacterie *Bacillus licheniformis* was gegroeid. Na een nacht incubatietijd werd rond de plaats waar de matrixdeeltjes waren aangebracht een heldere zone zichtbaar. Die heldere zone geeft aan dat de groei van de bacterie sterk wordt geremd door de deeltjes (figuur 3).

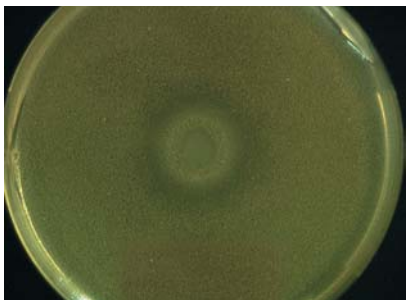

Fig. 3 Remming van groei van *Bacillus licheniformis* in de nabijheid van deeltjes met daarin lysozym.

Andere toepassingen

Behalve de actieve voedingsverpakking wordt er momenteel door TNO Voeding aan diverse andere toepassingen op basis van het bio-switch-concept gewerkt. Daar zijn ook enkele voedingstoepassingen bij. Door bijvoorbeeld het geschikte type biopolymeer te kiezen, is het mogelijk een bepaalde component op een bepaalde plaats in het verteringskanaal te laten vrijkomen. Een matrix gebaseerd op zetmeel zal in de mond worden afgebroken onder invloed van in het speeksel aanwezige amylase. Een matrix gebaseerd op eiwit zal daarentegen pas door pepsine (of de verandering van pH) in de maag worden afgebroken, terwijl weer andere stoffen pas in de dunne darm/begin dikke darm vrij zullen komen met behulp van enzymen van daar aanwezige darmflora.
Toepassingsmogelijkheden zijn onder andere smaakmaskering (van bijvoorbeeld ijzer), calciumverrijking en maagpassage van zuur- of proteasegevoelige neutraceuticals.

De antimicrobiële verpakking zal naar verwachting leiden tot een verlengde houdbaarheid

Antimicrobiële actieve verpakking

Voedingsverpakkingen worden omschreven als actieve verpakking wanneer zij een stof afgeven aan of onttrekken aan de inhoud van de verpakking en daarmee de kwaliteit en/of houdbaarheid van het levensmiddel beïnvloeden. Antimicrobiële verpakkingen of voedselcontactmaterialen zijn in te splitsen in twee categorieën: actieve (conserveermiddel afgevende) oppervlakken en 'niet actieve' oppervlakken. De eerste, actieve, geeft een antimicrobiële stof af aan het levensmiddel met als doel de houdbaarheid van het levensmiddel te verlengen. De tweede, de 'niet actieve', heeft als doel het voedselcontactoppervlak te decontamineren, maar heeft geen invloed op het levensmiddel zelf.

Hans Boumans, Arielle de Jong en Ted Slaghek
Dr. ir. H. Boumans, TNO Voeding, 030-6944106, boumans@voeding.tno.nl; Ir.A.R. de Jong, TNO Voeding, 030-6944674, dejong@voeding.tno.nl; dr. T.M. Slaghek, TNO Voeding.