



AiF 19180 N

„Innovative Getränkezutaten mit mikrobiellen Exopolysacchariden zur chemischphysikalischen Stabilisierung trüber Getränke“

Forschungseinrichtung I: Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Institutsleiter: Prof. Dr. R. Vogel
Projektleiter: Dr. Frank Jakob

Forschungseinrichtung II: Hochschule Ostwestfalen-Lippe
ILT-NRW Institut für Lebensmitteltechnologie
Technikum und Labor für Getränketechnologie
Institutsleiter: Prof. Dr.-Ing. Jan Schneider
Projektleiter: M. Sc. Julian Huchtmann, M. Sc. Sören Rossmann

Koordinierung: Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V., Berlin
Dr. Erika Hinzmann

Laufzeit: 01. 10. 2016 – 30. 09. 2019
Förderung durch das BMWi über die AiF

Ausgangssituation:

Seit einigen Jahren steigen die Akzeptanz und die Verbrauchernachfrage für naturtrübe und trübe Getränke an. Die Getränkeindustrie hat daher einen großen Bedarf an natürlichen, breit einsetzbaren, stabilen Trübungssystemen (Cloud Systems). Auch die Stabilisierung von trüben Getränkeemulsionen und –grundstoffen bzw. den daraus hergestellten Getränken stellt aufgrund des großen Marktanteils dieser Getränke ein aussichtsreiches Marktpotenzial dar. Derzeit werden für Getränke meist Hydrokolloide als Stabilisatoren eingesetzt. Zu ihnen zählen Pektin, Johannisbrotkernmehl, Gummi arabicum oder Guarkernmehl und Stärken. Trotz der großen Vielzahl heute verfügbarer Stabilisatoren ist oft eine Kombination mehrerer dieser Zusatzstoffe nötig, um die gewünschten Eigenschaften zu erzielen und häufig bleibt das Ergebnis dennoch unbefriedigend. Mikrobielle Exopolysaccharide (EPS) sind eine bisher in diesem Bereich nicht ausgeschöpfte Quelle natürlicher Zutaten, die in



Fermentationen *in situ* gewonnen werden und zudem über die gewählten Stämme in ihren Eigenschaften beeinflusst werden können.

Forschungsziel:

Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Erarbeitung der anwendungsbezogenen Grundlagen für die wissensbasierte Nutzung mikrobieller EPS für die Entwicklung innovativer Getränkezutaten mit Funktionalitäten im Bereich der chemisch-physikalischen Stabilisierung von trüben alkoholfreien Getränken.

Die zentrale Arbeitshypothese hierbei war, dass durch die Nutzung EPS-bildender Stämme, die an die Fermentation von Saccharosehaltigen Substraten angepasst sind oder traditionell zur Herstellung von Getränken genutzt werden, eine neue Generation von technofunktionalen Getränkezutaten mit trübungsstabilisierenden und sensorisch attraktiven Eigenschaften hergestellt werden kann. Durch Auswahl von Stämmen und geeignete Zusammensetzung der Fermentationssubstrate und Fermentationsführungen können Getränkezutaten und -emulsionen (Trübungs- und Aromaemulsionen) mit unterschiedlichen EPS Fraktionen, die sich in ihrer Menge, Größe und Funktionalität unterscheiden, hergestellt werden. Dabei kann die Makromolekülstruktur von EPS erstmals auch mit den Zielgrößen Trübungsstabilisierung und Emulgierfähigkeit korreliert werden, die entscheidende Zielgrößen für die Stabilisierung von Getränken sind, und große Bedeutung auch in vielen anderen Lebensmitteln haben. Dies ermöglicht die wissensbasierte Beeinflussung der kolloidalen Stabilisierung von Getränken.

Zudem können über die Fermentationen sensorisch attraktive Genusssäuren wie Milch- und/oder Gluconsäure in die Getränke natürlicherweise eingebracht werden. Gleichwohl erlaubt deren Minimierung einen breiten Einsatz dieser Zutaten.

Forschungsergebnisse:

In diesem Projekt sollten Milchsäurebakterien aus Wasserkefir identifiziert werden, die zur *in situ* Produktion von Exopolysacchariden (EPS) in Fruchtsäften genutzt werden können. Zudem sollte die Eignung der gebildeten EPS und fermentierten Säfte als natürliche Getränkezutaten zur chemisch-physikalischen Stabilisierung trüber Getränke untersucht werden. Es zeigte sich, dass Isolate der Spezies *Lactobacillus hilgardii* und *Lactobacillus hordei* aus Wasserkefir hohe Mengen an α -1,6-verknüpften Glucose-Polymeren (Dextrane) aus Saccharose bilden und zur Fermentation von Apfel- und Traubensäften geeignet sind. Die an der Dextran-Biosynthese und Saccharoseverwertung beteiligten Enzyme konnten molekular charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet werden. Die gebildeten Dextrane wurden zudem bezüglich ihrer Verknüpfungstypen sowie ihrer Molekulargewichte detailliert analysiert. Zusätzlich konnte ein Bezug zwischen Dextransucrase-Domänen und Verknüpfungstypen sowie funktionalen Eigenschaften der Dextrane hergestellt werden. Es wurden Fermentationsparameter identifiziert, die zur Produktion von Dextranen mit viskosifizierenden und/oder trübungsbildenden Eigenschaften führen. Die zur Dextranbildung nötigen Dextransucrasen werden von den Bakterien in Abhängigkeit des pH-Wertes und ihres Substrats Saccharose sezerniert, was eine wissensbasierte Steuerung und Optimierung des EPS Produktionsprozesses in Säften ermöglicht. Es wurde festgestellt, dass die trübende Wirkung der durch *Lactobacillus hilgardii* gebildeten, viskosifizierenden Dextrane nur bei Produktion der Dextrane in Gegenwart der Zellen eintritt, wobei die durch *Lactobacillus hordei* produzierten, nicht viskosifizierenden Dextrane ihre trübende Wirkung auch bei zellfreier Herstellung erzielen.

Fermentate mit *Lactobacillus. hilgardii* TMW 1.828 auf Basis von Apfelsaft, Manuka Honig und Riesling Verjus erwiesen sich vielversprechend als aromagebende Getränkezutaten. Auch der Einsatz von *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 in Orangengrundstoffen war erfolgreich. Die Fermentation von Apfel- und Traubensäften zur Bildung einer lagerstabilen



Trübung auf Basis von Dextran konnte für *Lactobacillus hordei* TMW 1.1907 gezeigt werden. Dabei konnte die Struktur und Ausbeute der in situ produzierten EPS gezielt durch die Wahl der Fermentationsbedingungen und des Ausgangssaftes beeinflusst werden. Somit ist eine wissenschaftsbasierte Kontrolle der Fermentationen - auch hinsichtlich gebildeter Genussäuren - möglich.

Durch die Auswahl der Stämme konnten Getränkezutaten mit unterschiedlich trübenden, viskosen und aromatischen Eigenschaften hergestellt werden. Darüber hinaus wurden die fermentierten Getränkezutaten mit verdickenden EPS als förderlich hinsichtlich der Vollmundigkeit beschrieben und könnten beispielsweise in zuckerreduzierten Getränken Anwendung finden. Sensorisch wurden die Fermentationsprodukte überwiegend als positiv bewertet. Dextran-haltige Fermentate könnten aufgrund ihrer intrinsischen Trübung eine Alternative für kommerziell genutzte, trübungsbildende Getränkeemulsionen sein, die durch deklarationspflichtige Hydrokolloide stabilisiert werden. In der Zukunft könnte zusätzlich eine Konzentrierung der Fermentationsbrühen unter Vakuum sowie eine Gefriertrocknung interessant sein, um den EPS-Gehalt der Getränkezutaten weiter zu maximieren.

Insgesamt wurden im Rahmen dieses Projektes die Grundlagen zur Verwendung von mikrobiell erzeugten Dextranen in Getränken gelegt und die vielseitigen Einsatzgebiete der auf Fruchtsaftbasis produzierten Fermentate aufgezeigt. Es wurden dabei Möglichkeiten zur Produktion der EPS-haltigen Getränkezutaten und auch Rezepturen zur Herstellung alkoholfreier Modellgetränke auf Basis dieser Getränkezutaten erarbeitet.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die im Projekt ermittelten Daten liefern fundierte Informationen, die belegen, dass Milchsäurebakterien aus Wasserkefir dazu genutzt werden können, neuartige EPS-haltige Getränkezutaten mit funktionellem Mehrwert über Fermentation von Fruchtsäften herzustellen. Die gebildeten hochmolekularen Dextrane können zur Trübungstabilisierung von Getränken genutzt werden und vermitteln (auch) in Kombination mit weiteren produzierten Metaboliten eine sehr ansprechende Sensorik. Brauereien können somit über die im Projekt entwickelten Verfahren auf neuartige Getränkegrundstoffe zurückgreifen und nachhaltig ihr Getränkeportfolio erweitern. Die erzielten Ergebnisse zur Stoffwechselphysiologie und pH-Wert regulierten Dextranbildung von Wasserkefirorganismen eröffnen darüber hinaus neuartige Möglichkeiten zur Nutzung und Etablierung von Starterkulturen für Getränkefermentationen ohne gezielte in situ EPS Bildung. Insgesamt konnten sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus wirtschaftlicher Sicht neue Erkenntnisse zur Fruchtsaftfermentation durch Milchsäurebakterien erlangt werden, die unmittelbar wissenschaftsbasiert für weitere Getränkeentwicklungen genutzt werden können.

Publikationen:

Eckel, V. P., Ziegler, L. M., Vogel, R. F., & Ehrmann, M. (2019). *Bifidobacterium tibiigranuli* sp. nov. isolated from homemade water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, ijsem003936.

Eckel, V. P., Vogel, R. F., & Jakob, F. (2019). In situ production and characterization of cloud forming dextrans in fruit-juices. *International journal of food microbiology*, 306, 108261.

Münkel, F., Bechtner, J., Eckel, V., Fischer, A., Herbi, F., Jakob, F., & Wefers, D. (2019). Detailed structural characterization of glucans produced by glucansucrases from *Leuconostoc citreum* TMW 2.1194. *Journal of agricultural and food chemistry*.



Xu, D., Bechtner, J., Behr, J., Eisenbach, L., Geißler, A. J., & Vogel, R. F. (2019). Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *International journal of food microbiology*, 290, 141-149.

Xu, D., Behr, J., Geißler, A. J., Bechtner, J., Ludwig, C., & Vogel, R. F. (2019). Label-free quantitative proteomic analysis reveals the lifestyle of *Lactobacillus hordei* in the presence of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology*, 294, 18-26.

Bechtner, J., Xu, D., Behr, J., & Vogel, R. F. (2019). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus nagelii* and *Lactobacillus hordei* in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from water kefir. *Frontiers in Microbiology*, 10, 325.

Schmid, J., Bechtner, J., Vogel, R. F., & Jakob, F. (2019). A systematic approach to study the pH-dependent release, productivity and product specificity of dextransucrases. *Microbial cell factories*, 18(1), 1-8.

Bechtner, J., Wefers, D., Schmid, J., Vogel, R. F., & Jakob, F. (2019). Identification and comparison of two closely related dextransucrases released by water kefir borne *Lactobacillus hordei* TMW 1.1822 and *Lactobacillus nagelii* TMW 1.1827. *Microbiology*, 165(9), 956-966.

Rossmann, S., Wolff, V., Müller, U., & Schneider, J. (2017). Impact of Accelerated Shelf-life Tests on Physical Stability of Beverages Based on Weighted Orange Oil Emulsions. *Brewing Science*, 70, 31-38.

Konferenzbeiträge:

Posterbeiträge auf LAB12 2017

Posterbeitrag GDL Tagung 2018

Posterbeiträge auf EBC-Kongress 2019

Posterbeiträge auf FEMS-Congress 2019

Vortrag VLB Berlin Symposium alkoholfreie fermentierte Getränke 2019



Weitere Informationen:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Weihenstephaner Steig 16, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71 3663, Fax.: +49 8161 71 3327
E-Mail: rudi.vogel@wzw.tum.de

Prof. Dr.-Ing. Jan Schneider
Hochschule Ostwestfalen-Lippe
ILT-NRW Institut für Lebensmitteltechnologie
Technikum und Labor für Getränketechnologie
Liebigstraße 87, 32657 Lemgo
Tel.: +49 5261 702-582 Fax.: +49 5261 702 222
jan.schneider@hs-owl.de

Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V.
Neustädtische Kirchstr 7A, 10117 Berlin
Tel.: +49 30 209167-19, Fax: +49 30 209167-97
E-Mail: hinzmann@brauer-bund.de
<http://www.wifoe.org>

Das o.g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

