

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

TU-München/Weihenstephan

Name der Forschungsstelle

AIF 14847N

AIF-Vorhaben-Nr

01.08.06 bis 31.12.08

Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum: 01.08.06 bis 31.12.08

Zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten Forschungsvorhaben

Forschungsthema: Charakterisierung von Hopfenresistenzmechanismen für
Nachweis und Inaktivierung bierverderbender Bakterien.

Freising-Weihenstephan, 15.03.09

Ort, Datum

Unterschrift des Projektleiters

AIF 14847

Zusammenfassung

Forschungsziel	Stand der Forschung
1. Identifizierung konstitutiver und übertragbarer Hopfenresistenzmechanismen durch 2D-Gelelektrophorese in <i>Lactobacillus (L.) species</i>	Das Bierverderbnispotential von <i>L. species</i> als Grundlage für die Charakterisierung konstitutiver Hopfenresistenzmechanismen wurde bestimmt und die Proben mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert.
2. Charakterisierung membrangebundener und cytoplasmatischer Hopfenresistenzmechanismen in <i>Lactobacillus species</i>	Charakterisierung von <i>horA</i> , <i>n ramps</i> , <i>recR</i> , <i>argR</i> , <i>map</i> , <i>horC</i> , ... Mn-haltiger Proteine, neuem Hopfenwirkmechanismus, Transmembrane Redox-Reaktion, Absterben an „metabolic exhaustion“ (NADH Verlust), Mangan-Efflux Bestimmung für Bierverderber, Leben bei niedrigem Mn-Spiegel, fehlen von Proteinen in Bierverderbern, Bierverderber sind metabolische Minimalisten
3. Untersuchung der Verbreitung und Mobilität der Hopfenresistenz in <i>Lactobacillus species</i>	Bestimmung unterschiedlicher Kategorien an Bierverderbern auf physiologischer und Proteomeebene, Verteilung relevanter Hopfentoleranzgene entspricht nicht den Kategorien, Vorhandensein von „stillen“ Genen
4. Beitrag induzierbarer, konstitutiver und übertragbarer Hopfenresistenzmechanismen zu Wachstum und Überleben in Bier	qualitativ erfassbar, für eine quantitative Erfassung fehlen geeignete Modelle für Überexpression, Hinweise auf interspecies Übertragungen aus Gensequenzen (<i>L. brevis</i> <=> <i>L. backii</i>) wurden erarbeitet.
5. Charakterisierung der Hopfenresistenz von <i>Megasphaera</i> und <i>Pectinatus</i>	alle Stämme natürlicherweise hopfenresistent (äußere Membran), Nachweis auf Spezies level ausreichend, Wachstum wahrscheinlich auf der Basis von Maltooligosacchariden, org. Säuren
6. Identifizierung der für den Nachweis jeweils geeigneten Gene der untersuchten Zielorganismen	relevante Gene sind „statistisch verteilt“, teils still, nicht durch PCR erfassbar, weitere Gene über den Proteomansatz mangels Genomdaten nicht identifizierbar (es sind jedoch typische Proteine erkennbar), auf Basis der Ergebnisse konnte der Nachweis mittels Bierdurchgang erheblich beschleunigt werden. In einem Anschlussvorhaben sollen diese Genomdaten erarbeitet und analysiert werden.

Die im Forschungsantrag formulierten Forschungsziele wurden weitgehend erreicht, teils sogar übertroffen, und sind oben den im Abschlussbericht aufgeführten Forschungsergebnissen gegenübergestellt. Die Zuwendungen wurden zur Erreichung der oben gelisteten Forschungsziele angemessen verwendet.

**Kurzbericht der Forschungsstelle
AIF-Vorhaben-Nr.: AIF 14847N**

1. Forschungsthema: Charakterisierung von Hopfenresistenzmechanismen für Nachweis und Inaktivierung bierverderbender Bakterien

2. Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Bier stellt für Bakterien eine feindliche Umgebung dar, die durch vielerlei Hürden deren Wachstum oder Überleben stark einschränkt. Dennoch gibt es eine Reihe von Organismen, die in der Lage sind in Bier zu wachsen und es zu verderben. Die größte Bedeutung unter den Gram-positiven Bierverderbern haben Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus* und *Pediococcus*. Allein *Lactobacillus brevis* verursacht mehr als die Hälfte des mikrobiellen Verderbs von Bier. Daneben sind Gram-negative Anaerobier am Bierverderb beteiligt. Typische Vertreter wurden als Stämme der Gattung *Megasphaera* und *Pectinatus* beschrieben. Gegenwärtig kommerziell verfügbare bzw. in Entwicklung befindliche molekularbiologische Testsysteme zum Nachweis bierschädlicher (Milchsäure)-Bakterien beruhen mangels Kenntnis der Hopfenresistenzmechanismen auf dem spezies- oder gattungsspezifischen Nachweis von Bakterien oder Bakteriengruppen, die erfahrungsgemäß zum Bierverderb beitragen können. Gleichzeitig ist jedoch zweifelhaft, ob sich die Fähigkeit zum Bierverderb tatsächlich auf Gattungs- oder Artebene zurückführen lässt, oder ob alle Stämme innerhalb einer Art diese Fähigkeit besitzen. Vielmehr gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Hopfenresistenz eine dynamische Eigenschaft ist, die stammspezifisch, induzierbar und auf andere Bakterien übertragbar sein kann. Für einen sicheren und spezifischen Nachweis bierverderbender Bakterien ist es daher notwendig, Mechanismen, Induzierbarkeit, Verbreitung und Übertragbarkeit von Hopfenresistenzmechanismen zu kennen. Nachweissysteme können sich damit an der spezifischen Eigenschaft anstatt der phylogenetischen Verwandtschaft orientieren. Zudem kann so für unterschiedliche Bierverderber gezeigt werden, ob und wann ein gattungs- bzw. artspezifischer Nachweis aussagekräftig ist, bzw. durch ein spezifischeres Testsystem ersetzt werden muss.

Die Kenntnis der spezifischen Toleranzeigenschaften bildet einerseits die Grundlage für eine spezifische und schnelle Erkennung bierverderbender Milchsäurebakterien. Andererseits können diese als Ziele für eine schonende Eliminierung von Bierverderbern in der Brauerei dienen, indem Prozesse auf die Schädigung dieser Mechanismen ausgerichtet werden und die jeweils geeigneten Maßnahmen ergriffen werden.

3. Forschungsziel, Ergebnisse und Lösungsweg

3.1 Forschungsziel

Ziel des Vorhabens ist es, Mechanismen, Verbreitung und Übertragbarkeit von Hopfenresistenzmechanismen umfassend zu charakterisieren, eine Kategorisierung bierverderbender Bakterien auf der Basis dieser Eigenschaften zu ermöglichen, die bisherigen Nachweissysteme an den relevanten Eigenschaften zu orientieren und die Grundlage für die Ableitung sinnvoller Vermeidungsstrategien zu schaffen. Hierbei sollen neben induzierbaren, auch konstitutive und übertragbare Resistenzmechanismen untersucht werden.

3.1.1 Angestrebte Forschungsergebnisse

Wissenschaftlich-technische Ergebnisse:

- Identifizierung konstitutiver und übertragbarer Hopfenresistenzmechanismen durch 2D-Gelelektrophorese in *Lactobacillus* species
- Charakterisierung membrangebundener und cytoplasmatischer Hopfenresistenzmechanismen in *Lactobacillus* species
- Untersuchung der Verbreitung und Mobilität der Hopfenresistenz in *Lactobacillus* species
- Beitrag induzierbarer, konstitutiver und übertragbarer Hopfenresistenzmechanismen zu Wachstum und Überleben in Bier
- Charakterisierung der Hopfenresistenz von *Megasphaera* und *Pectinatus*

- Identifizierung der für den Nachweis jeweils geeigneten Gene der untersuchten Zielorganismen

3.1.2 Innovativer Beitrag der angestrebten Forschungsergebnisse

Der innovative Beitrag lässt sich in sich grob in zwei Innovationsfelder einteilen:

- Verfahrensinnovation
 - Zielsichere Früherkennung von Bierverderbern nach ihrer Relevanz mittels metabolischer Tests
- Weiterentwicklung eines Verfahrens
 - Weiterentwicklung etablierter PCR basierter Nachweißverfahren

3.2 Lösungsweg zum Erreichen des Forschungsziels

Am **Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie** liegen umfangreiche Erfahrungen mit genetischen und biochemischen Untersuchungen von Milchsäurebakterien vor. Hierunter befinden sich auch zahlreiche Studien, in denen mittels Proteomics die Stressreaktionen und Stresstoleranz von Bakterien untersucht wurden. Weiter wurden Arbeiten zur Bestimmung von biophysikalischen Eigenschaften bakterieller Zellmembranen durchgeführt. Dieser Erfahrungs- und Methodenpool stellt eine breite Basis für dieses Projekt dar.

3.3. Erzielte Ergebnisse

Durch 2D-Gelelektrophorese wurden die säure- und hopfeninduzierbaren Proteine als auch konstitutive Hopfenresistenzmechanismen von *L. brevis* identifiziert. Die Hopfenstressantwort von *L. brevis* beinhaltet Mechanismen zur Stabilisierung des intrazellulären pH-Werts, zum Schutz vor oxidativem Stress, zur Erhaltung der Redoxbalance, der Energiegewinnung, zum Schutz der genetischen Information und zur Erhaltung der Enzymfunktion. Es wurden neue am Bierverderb beteiligte Enzyme zur Unterscheidung von bierverderbenden Milchsäurebakterien von nicht-bierverderbenden Milchsäurebakterien gefunden. Die identifizierten hopfeninduzierbaren und überexprimierten Proteine stammen aus vielen unterschiedlichen Stoffwechselwegen. Es zeigte sich, dass bei über 50% der Enzyme die Funktion strikt von Mn^{2+} als Cofaktor abhängig ist. Bei einem Screening der gefundenen hopfenresistenzkodierenden Gene in *L. brevis* Stämmen mit stark unterschiedlichem Verderbspotential zeigte sich, dass sowohl stark als auch schwach bierverderbende Stämme Hopfenresistenzgene tragen können. Die DNA-Sequenzierung dieser Gene ergab, dass diese teilweise durch Mutationen inaktiviert waren. Somit ist ein reiner Präsenz/Absenz PCR-Nachweis mit den im Projekt mittels Proteomics identifizierten Hopfenresistenzmechanismen nicht möglich. Jedoch stellen die im Projekt identifizierten Hopfenresistenzmechanismen nur den Teil der Bierverderbsmechanismen dar, die mit dem vorhandenen Genom des schwach bierverderbenden *L. brevis* Stammes (ATCC 367) identifizierbar sind. Da kein Genom eines potenten Bierverderbers existiert, sind die weiteren im Proteombild sichtbaren, aber bisher unbekanntenen Resistenzmechanismen, auch mit modernsten analytischen Methoden bisher nicht ohne weiteres greifbar (die Identifizierung des hopfeninduzierbaren Protein HI10 als Phosphoenolpyruvatcarboxylase mittels Denovo- Sequenzierung dauerte 2 Jahre). Dennoch wurde durch die Vielzahl an identifizierten Proteinen ein neues Bild von der in den Bierverderb involvierten zellulären Mechanismen geschaffen, die weitere interessante Fragestellungen zur inhibitorischen Wirkung von Hopfen im Bier aufwarfen. Daher wurde im Projekt die membranassoziierte Hopfenhemmwirkung und der Einfluss von Mangan auf diese genau charakterisiert. Es zeigte sich, dass die antibakterielle Wirkung von Hopfeninhaltsstoffen aus der Wirkung von Hopfen als Protonenionophore, welche den intrazellulären pH –Wert senken, sowie zusätzlich in hohem Maße aus deren Redoxreaktivität, die eine oxidative Zellschädigung herbeiführt, resultiert. Diese Hemmeigenschaften des Hopfens konnten durch fluoreszenzoptische-, als auch Wachstumsversuche von schwach und stark bierverderbenden *L. brevis* Stämmen in der Gegenwart von Protonenionophoren oder oxidativ wirksamen Desinfektionsmitteln verifiziert werden. Kinetische Wachstumsversuche in Gegenwart dieser Hemmstoffe können darüber hinaus eine Unterscheidung von stark und schwach bierverderbenden *L. brevis* ermöglichen. Basierend auf obigen Ergebnissen (vgl. z.B. Redoxbalance) wurde ein meta-

bolischer Bierverderber-Test unter Verwendung eines Tetrazoliumsalzes wurde entwickelt und evaluiert. Der Test lieferte schnelle, reproduzierbare Ergebnisse, die eine klare Kategorisierung von Bierverderbern ermöglichten. Am deutlichsten waren die Unterschiede in einem hellen Exportbier (16,7 mg Isohumulon/l) zu erkennen. Die Bierverderber mit hohem Verderbspotential konnten bereits nach 26 bis 80 h detektiert werden. Vorteil des Testverfahrens ist die Anwendungsmöglichkeit direkt im betroffenen Bier. Somit konnte die Praxisrelevanz dieses grundlagenforschungsorientierten Ansatzes gezeigt werden. Außerdem bildeten die Daten dieser Analyse die Grundlage für die Kategorisierung von *L. brevis* in drei Verderbstypen und die Charakterisierung konstitutiver Resistenzmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass die permanente Expression von Proteinen, die Säure- und Alkoholstresswirkungen kompensieren bzw. neutralisieren (Arginindeiminase), das Wachstum in Bier erleichtern. Die reine Präsenz bekannter Resistenzfaktoren wie *hitA*, *horA* und *horC* kann das Wachstum in Bier alleine nicht erklären, da diese erst durch Hopfen induziert werden und damit die Schutzfunktion im nicht-adaptierten Zustand fraglich ist. Vielmehr sind es zunächst die allgemeinen Stressantworten (ClpL-Protease, Alkoholdehydrogenase), die dem Bakterium das Überleben im Bier ermöglichen. Weiter wurde ein metabolischer Bierverderbervitalitätstest auf Basis des fluoreszierenden Farbstoffes Resorufin (aus Resazurin) mit dem der aktuelle Redoxstatus (vgl. inhibitorische Hopfenwirkung) eines Bakteriums bestimmt werden kann, entwickelt. Hierbei kann eine Abschätzung der Fähigkeit eines Bakteriums zum Stoffwechsel (Überleben) in Bier innerhalb von wenigen Stunden (5h) bis Tagen (7d) getroffen werden.

Zur Abschätzung möglicher Unterschiede in der Hopfenresistenz der Gattungen *Megasphaera* und *Pectinatus* wurden sechs Isolate untersucht. Zur ihrer näheren Charakterisierung wurde deren Stoffwechsel analysiert. Dabei wurden sowohl die Verwertung von Kohlenhydraten, als auch von Aminosäuren mittels HPLC-Analytik betrachtet. Ferner wurden Wachstumsversuche bei unterschiedlichem pH-Wert, Alkoholgehalt, Laktatgehalt und Hopfengehalt durchgeführt. Mit Hilfe dieser Verfahren konnte festgestellt werden, dass sowohl Alkohol- als auch Laktatzugabe in das Kulturmedium in geringen Mengen einen positiven Effekt auf das Wachstum der untersuchten Mikroorganismen ausüben. Laktatwerte über 150 mM unterbanden das Wachstum völlig. Durch hohe Hopfengabe lassen sich alle untersuchten Stämme der beiden Gattungen nicht inaktivieren. Ein niedriger (oder hoher > 7) pH-Wert stellte die größte Hürde für das Wachstum dieser gram-negativen Bierverderber dar. Einzig bei subletaler Schädigung der Organismen durch kurzzeitigen Kontakt mit geringen Mengen Sauerstoff oder Gefrieren der Kulturen wurde durch sonst harmlose Hopfen-, Alkoholkonzentrationen eine völlige Inaktivierung der Organismen erzielt. Eine Unterscheidung dieser Gattungen anhand der Hopfenresistenz zur Detektion in Brauereien ist nicht möglich, aber auch nicht erforderlich. Somit kann das etablierte Verfahren des Gattungs- oder Speziesnachweises als ausreichend gelten.

Aus den im Projekt erzielten Ergebnissen können durch Veränderungen in der Fermentation das Verderbspotential der Biere verringert werden. Die Brauhefe verbraucht während der Gärung nur ca. 40% des vorhandenen Arginins. Durch gezielten Einsatz von Hefen, die Arginin verstoffwechseln, kann die Hopfenanpassung der Bierverderber erschwert werden. Andererseits kann ein Bier mit einem erhöhten Arginingehalt als Selektivmedium für stark hopfenresistente *L. brevis* Stämme dienen, die den Löwenanteil der vorkommenden Infektionen darstellen (Technologisches Seminar 2004, Brauerei Lehrstuhl I, TU Weihenstephan). Dies könnte zu einer Verbesserung des bisherigen Nachweissystems (Bierdurchgang) und vor allem in Verbindung mit den oben genannten Stoffwechseltests zu einer drastischen Beschleunigung des Nachweises führen. Ebenso kann eine Analyse des Brauwassers und der Rohstoffe in Bezug auf den Magnesium und vor allem Mangangehalt wichtige Erkenntnisse liefern. Mineralstoffe stellen einen wichtigen Bestandteil für das Bier dar, denn ohne Mineralstoffe, wie z. B. Zink, Magnesium und Mangan, könnte die Hefe sich nicht vermehren. Im Bier sind nach der Gärung noch etwa 30 mg/l Magnesium enthalten und 0,10 mg/l Mangan. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Magnesium- und Manganbedürfnisse der Brauhefe wesentlich geringer sind

als die der Milchsäurebakterien. Bei Wachstumsversuchen mit Bierverderbern in Medium mit herabgesetztem Magnesium und Mangan Gehalt wurde eine deutliche Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und der gebildeten Zellmasse festgestellt. Inwieweit eine Kontrolle dieser Parameter möglich erscheint, ist zu diskutieren. Eine mögliche Reduzierung des Mangan- und Magnesiumgehaltes zusammen mit einer Argininlimitierung im fertigen Bier kann als Hürdenkonzept zur Vorbeugung von Bierverderb dienen.

Gegenüberstellung der Ergebnisse zu den angestrebten Zielen und Begründung des Personaleinsatzes

Der Personaleinsatz ist für die geleistete Arbeit angemessen (vgl. Anlage 1; Langversion).

4. Wirtschaftliche Bedeutung des Forschungsthemas für kleine und mittlere Unternehmen (KMU)

4.1 Voraussichtliche Nutzung der angestrebten Forschungsergebnisse

- in den Fachgebieten Lebensmitteltechnik und -mikrobiologie
- in den Wirtschaftszweigen Brauwirtschaft und Ernährungsgewerbe

4.2 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Innerhalb dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass sich die Methode der Proteomik zur Identifizierung von Toleranzeigenschaften von bierverderbenden Milchsäurebakterien eignet. Aus den bisher erzielten Ergebnissen können einmal durch Veränderungen in der Fermentation, durch gezielten Einsatz von Hefen, die Arginin verstoffwechseln, das Verderbspotential der Biere verringert werden. Andererseits kann ein Bier mit einem erhöhten Arginingehalt als Selektivmedium für stark hopfenresistente *L. brevis* Stämme dienen, die den Löwenanteil der vorkommenden Infektionen darstellen. Dies könnte zu einer Verbesserung des bisherigen Nachweissystems (Bierdurchgang) und vor allem zu einer Beschleunigung des Nachweises führen. In Kombination mit den entwickelten metabolischen Testverfahren wird hierbei eine deutliche Beschleunigung des Bierverderbernachweises erreicht. Diese können auch ohne Spezialausrüstung kostengünstig durchgeführt werden, da eine qualitative Einschätzung des Testergebnisses auch mit bloßem Auge möglich ist. Eine Kontrolle des Mineralstoffgehalts des fertigen Bieres kann nicht nur dem Verbraucher wichtige Informationen zum Gesundheitswert liefern, sondern kann auch als Teil eines Hürdenkonzepts zur Verbesserung der Haltbarkeit des Bieres dienen. Die untersuchten Gram-negativen Bierverderberspezies der Gattungen *Pectinatus* und *Megasphaera* konnten nicht hinsichtlich der Hopfenresistenz unterschieden werden. Zur Detektion in Brauereien kann das etablierte Verfahren des Gattungs- oder Speziesnachweises als ausreichend gelten. Weiter konnte gezeigt werden, dass erhöhte Laktatwerte im Bier, die z.B. von gleichzeitig vorhandenen bierverderbenden Milchsäurebakterien herrühren können, für das Wachstum von *Pectinatus* und *Megasphaera* Spezies förderlich sind. Das frühzeitige Erkennen von Teilen (z.B. Milchsäurebakterien durch beschleunigte Nachweisverfahren wie z.B. dem Tetrazoliumtest) dieser Konsortien hilft bei der Erkennung von möglichen Verderbsfällen.

5. Beabsichtigte Umsetzung der angestrebten Forschungsergebnisse

Durch wissenschaftliche Publikation in Journalen und Fachorganen sowie Vorträgen auf einschlägigen Veranstaltungen wird ein uneingeschränkter Zugang zu den Ergebnissen sichergestellt. Die Ergebnisse können in den jährlichen Brauwissenschaftlichen Seminaren des Weihenstephaner Campus dargestellt werden und erreichen in diesem direkten Technologietransfer unmittelbar die Anwender solcher neuer Entwicklungen. Die Ergebnisse stehen auch dem Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität zur Verfügung, das diese in seinen Beratungen einsetzen kann. Die wichtigsten Ergebnisse werden über die Website der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft publiziert und erreichen so alle Mitglieder und Interessierte.

6. Durchführende Forschungsstellen

- Forschungsstelle
Technische Universität München
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

- Lehrstuhlinhaber:
- Projektleiter:

Prof. Dr. rer. nat. R. Vogel
Prof. Dr. rer. nat. R. Vogel