



AiF 16576 N

„Risikoanalyse im Flug - Differenzierung mikrobieller Kontaminaten in Getränken mit MALDI-TOF MS“

Forschungsstelle I: Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Institutsleiter: Prof. Dr. R. Vogel
Projektleiter Dr. Jürgen Behr

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

Laufzeit: 01.09.2010 – 31.08.2013
Förderung durch das BMWi über die AiF

Ausgangssituation:

Die Entwicklung von Getränken ist getrieben vom Wunsch nach Vielfalt, Naturbelassenheit und funktionellem Zusatznutzen. Gleichzeitig sollen sie eine lange Haltbarkeit, möglichst ohne Kühlung aufweisen. Die mikrobiologische Stabilität dieser Getränke, die eine Vielzahl von Zutaten enthalten können, hängt von diesen Materialien und vom verwendeten Wasser, sowie den Hygienebedingungen und Prozessschritten während Herstellung und Abfüllung ab. Gerade in „modernen“ alkoholfreien Getränken mit funktionellem Zusatznutzen oder Biermischgetränken mit geringem Alkoholgehalt können hierbei eine Vielzahl von Verderbsorganismen auftreten, die je nach Typ ggf. Aufschluss über den Ursprungsort der Kontamination und damit Hinweise auf die zielgerichtete Beseitigung geben können. Die Identifizierung dieser Organismen beinhaltet derzeit die kulturelle Isolierung mit nachfolgenden aufwändigen physiologischen oder molekularbiologischen Tests, z. B. durch PCR Analytik. Die massenspektrometrische Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS kann prinzipiell mit geringstem zeitlichem und materiellem Aufwand Mikroorga-



nismen identifizieren und sogar in Biotypen klassifizieren (eigene Vorarbeiten, AiF 14847). Die hierfür bisher verfügbaren Spektrendatenbanken beziehen sich jedoch weitgehend auf medizinisch relevante Organismen.

Forschungsergebnis:

MALDI-TOF MS wurde zur Identifizierung und Klassifizierung von getränkeverderbenden Mikroorganismen eingesetzt. Hierfür wurden verschiedene praxisorientierte Methoden zum Zellaufschluss getestet, wobei gut charakterisierte Organismen unterschiedlicher getränkeverderbsrelevanter Spezies/Gattungen herangezogen wurden. Im Anschluss daran wurden unter Verwendung der jeweils für optimal befundenen Aufarbeitungsmethode verschiedene kulturbedingte Parameter wie Nährstoffangebot, Sauerstoffverfügbarkeit und Wachstumsdauer, die möglicherweise die MALDI-TOF MS Spektren beeinflussen, untersucht. Dabei konnten zwischen Hefen und Bakterien deutliche Unterschiede festgestellt werden. Für Bakterien zeigte sich, dass die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen nur vergleichsweise geringen Einfluss auf das Peakmuster der Spektren ausübten und zu keinerlei Beeinträchtigung der Identifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI Biotyper führten. Dennoch waren die Unterschiede zumindest für den Parameter Nährstoffangebot groß genug um mit entsprechenden Klassifizierungsmodellen verlässlich zugeordnet werden zu können. Für die Hefen galt, dass die Identifizierung in Ausnahmefällen durch variierende Kultivierungsbedingungen erschwert wurde. Unterschiede in der Sauerstoffverfügbarkeit konnten zuverlässig zugeordnet werden und Tendenzen sowohl bei variierenden Nährstoffangeboten als auch bei dem Einfluss der Wachstumszeit festgestellt werden.

Die Subtypisierung von getränkeverderbenden Bakterien wurde am Beispiel *Lactobacillus brevis* durchgeführt. Etwa 90% der untersuchten Stämme dieser Spezies konnten korrekt auf Stammebene zugeordnet werden.

Da das Wachstum des „falschen“ Hefetyps ebenso eine Kontamination darstellt, wurde eine Subtypisierung für Hefen mit *Saccharomyces* Bierhefen durchgeführt, bei der eine Differenzierung in ober- (*S. cerevisiae*) und untergärige (*S. pastorianus*) Bierhefen zu 100% möglich war. Die Differenzierung bis auf Stammebene war bei den obergärigen Hefen zu 67% korrekt, wohingegen die untergärigen Hefen nur zu 28% zugeordnet werden konnten. Eine Gruppierung für obergärige Hefen anhand ihres Anwendungsgebiets bzw. Biertyps (Weizen-, Altbier, Ale) zeigte jedoch erste vielversprechende Ergebnisse. Zudem zeigt diese Differenzierungsmöglichkeit ein großes Potenzial für die Klassifizierung von Brauhefen entlang von Biertypen das in einem neuen Forschungsvorhaben geprüft werden soll.

Darüber hinaus wurden in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum für Brau- und Lebensmittelqualität neue Proben aus der Praxis gesammelt, die für die Validierung der Identifizierungsalgorithmen und Klassifizierungsmodelle verwendet wurden und als neue getränkeverderbsspezifische Isolate in die MALDI Datenbank aufgenommen wurden. Für Bakterien wurde eine korrekte Identifizierung auf Speziesebene in 88.1%, für Hefen in 90.6% der Fälle erzielt. Die Ergebnisse des Vorhabens bilden die Basis für die Umsetzung der routinemäßigen Identifizierung von getränkeverderbenden Mikroorganismen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Kontrolle getränkeverderbender Bakterien und Hefen ist ein wesentliches Ziel der Getränkeindustrie. Mit dem wirtschaftlichen Schaden durch Getränkeverderb ist zudem stets auch ein Imageverlust, z. B. durch Rückrufaktionen verbunden. Die knappen Ressourcen, die für die Qualitätssicherung zur Verfügung stehen, müssen deswegen aussagekräftige, schnelle und umfassende Qualitätskontrollverfahren bedienen. Die massenspektrometrische Identifizierung von Mikroorganismen ist eine neue Anwendung und verbindet eine hohe



Spezifität mit anderweitig nicht erreichbarer Analysengeschwindigkeit. Sie ermöglicht nicht nur die Identifizierung auf Speziesebene, sondern liefert auch eine sehr schnelle Unterscheidung von getränkeschädlichen von „harmlosen“ Organismen. Die zielgerichtete Erkennung dieser Bakterien und Hefen auf einer wissenschaftlich begründeten Basis und Erkenntnisse zur Lokalisierung des Infektionsherdes ist die besonders für kleine und mittlere Unternehmen von Bedeutung und möglich. KMUs sind im andauernden Konzentrationsprozess der Getränkeindustrie einem besonderen Druck nach Produktinnovation und Diversifizierung ausgesetzt, der ihren Markt sichert. Hieraus ist eine Vielzahl von Produkten entstanden, die neue Herausforderungen hinsichtlich der mikrobiologischen Sicherheit der Produkte aufzeigen. Die Kontrolle des Getränkeverderbs mit leistungsfähigen Nachweismethoden, die gezielte Maßnahmen ableiten lassen, kann deswegen zur Wettbewerbskraft solcher KMUs entscheidend beitragen. Durch den Einsatz der entwickelten Verfahren wird der Aufwand zur Qualitätssicherung minimiert, und es werden nur die tatsächlich notwendigen Maßnahmen ergriffen.

Veröffentlichungen:

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben AiF 16576 N

Beiträge in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Carola Kern, Julia Usbeck, Rudi Vogel und Jürgen Behr (2013): Optimization of Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry for the identification of bacterial contaminants in beverages. *Journal of Microbiological Methods*, 93: 185-191.

Julia Usbeck, Carola Kern, Rudi Vogel und Jürgen Behr (2013): Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiology*, 36: 379-387.

Posterpräsentationen:

Carola Kern, Patrick Preissler, Rudi Vogel und Jürgen Behr: Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains along their beer-spoiling potential using MALDI-TOF MS. World Brewing Congress 2012, Portland, USA

Carola Kern, Julia Usbeck, Rudi Vogel und Jürgen Behr: Identification of bacterial contaminants in beverages by MALDI-TOF MS. World Brewing Congress 2012, Portland, USA

Julia Usbeck, Carola Kern, Rudi Vogel und Jürgen Behr: Fast and reliable identification and differentiation of beverage spoiling yeasts by MALDI-TOF MS. World Brewing Congress 2012, Portland, USA

Julia Usbeck, Jürgen Behr und Rudi Vogel: Differentiation of top- and bottom-fermenting brewing yeasts and insight into their metabolic status by MALDI-TOF MS. World Brewing Congress 2012, Portland, USA



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

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 IGF-Vorhaben 16576 N der Forschungsvereinigung Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und Entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

