



AiF 16840 N

„Entwicklung isothermer PCR-Nachweissysteme zur schnellen und einfachen Detektion Mykotoxin-bildender und Gushing-relevanter *Fusarium*-Arten in Braugetreide und Malz“

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

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

Laufzeit: 01.01.2011 – 30.06.2014
Förderung durch das BMWi über die AiF

Ausgangssituation:

Der Befall von Gerste bzw. Malz mit Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* beeinflusst die Qualität der daraus hergestellten Biere in dreifacher Weise:

1. Gushing bezeichnet das spontane Überschäumen von Flaschenbier nach sachgemäßer Öffnung. Neben technologischen Ursachen beim sog. sekundären Gushing, lässt sich das primäre Gushing auf Mängel in der Qualität des verwendeten Malzes zurückführen. Diese werden durch den Befall mit Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* verursacht. Es wird vermutet, dass dem Überschäumen ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung Schaumaktiver Proteine zu Grunde liegt, wodurch eine Destabilisierung von ansonsten stabilen Mikrobblasen auftritt. Es werden Proteine aus der Klasse der Hydrophobine und der Fungispumine als Auslöser diskutiert.
2. Lytische Enzyme werden von Schimmelpilzen in ihr Substrat abgegeben, um dieses zu erschließen. Hierdurch werden hochmolekulare Polymere (Stärke, Eiweiß, Fett) in ihre monomeren Bestandteile abgebaut. Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren und andere Nährstoffe



können so durch die Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden. Im Falle von Getreide und Malz kommt es durch die Enzymaktivität zu dem als *Premalting* bekannten Phänomen. In der aktuellen Forschung wird untersucht, ob hitzestabile Proteasen, die für die qualitätsrelevante *Fusarium*-Arten wie *F. culmorum* und *F. graminearum* beschrieben wurden, an dem beobachteten Abbau des Schaumproteins nsLTP1 während der Lagerung von Gushing-Bieren beteiligt sind.

3. Mykotoxine sind toxische Produkte des Sekundärstoffwechsels filamentöser Pilze. In der Literatur sind etwa 160 verschiedene Substanzen beschrieben, die allein durch Vertreter der Gattung *Fusarium* gebildet werden. Dabei haben Mykotoxine aus der Gruppe der Trichothecene, sowie die Fumonisine und das östrogen wirksame Zearalenon die größte Bedeutung für die Qualität und die Sicherheit von Brauereirohstoffen.

Neben den beschriebenen wissenschaftlich-technische Problemen, die sich durch eine *Fusarium*-Kontamination von Braugetreide und Malz ergeben, birgt die Verarbeitung solcher Rohstoffe für die Brauereien auch ein hohes wirtschaftliches und rechtliches Risiko. Das wirtschaftliche Risiko ergibt sich aus vergeblich aufgewendeten Produktionskosten, Kosten durch den Rückruf betroffener Chargen und Umsatzverlusten. Die rechtlichen Folgen resultieren aus der möglichen Bildung von Mykotoxinen, für die gesetzliche Grenzwerte existieren.

Ziel der Forschungsarbeiten war die Entwicklung von Verfahren, die es erlauben, den Befall von Getreide und Malz mit qualitätsmindernden *Fusarium*-Pilzen in deutlich kürzerer Zeit und mit geringerem Aufwand an Laborausstattung zu erfassen, als dies mit dem bisherigen Stand der Technik möglich war.

Forschungsergebnisse:

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden verschiedene, auf dem Verfahren der loop-mediated isothermal amplification (LAMP) beruhende Nachweisverfahren für solche Pilze entwickelt, die im Bereich der Malz- und Brauindustrie einen sehr umfangreichen Einfluss auf die Qualität des hergestellten Malzes und des daraus hergestellten Bieres haben. Mit einem der Tests lassen sich in Gruppen-spezifischer Weise Pilze nachweisen, die zum Gushing von Bier führen. Mit dem anderen Test können Pilze detektiert werden, die zu einer Belastung von Braugetreide und Malz mit Trichothecen-Mykotoxinen führen. Beide genannten Nachweisverfahren wurden im Rahmen der Arbeiten optimiert und auf ihre Spezifität getestet. Für beide Verfahren konnte ein sehr hohes Maß an Spezifität gezeigt werden. Die entwickelten Tests wurden nach Ausarbeitung eines schnellen Verfahrens zur Probenaufbereitung für die Untersuchung von Probenmaterialien aus der betrieblichen Praxis eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass beide Verfahren für eine Anwendung zur Untersuchung von Proben etwa im Bereich der Wareneingangskontrolle geeignet sind. Abschließend wurde für den Test zum Nachweis von Gushing-auslösenden Pilzen demonstriert, wie sich derartige Testverfahren durch Vakuumtrocknung in eine Anwender-freundliche Form bringen lassen. Anwendungsmöglichkeiten für die entwickelten Verfahren bestehen im Bereich der Wareneingangskontrolle in Mälzereien und Brauereien aber auch im Bereich der Befallsuntersuchung von *Fusarium*-Arten in Getreide bereits auf dem Feld. Dabei können die Verfahren zu einem deutlich schnelleren Ergebnis führen, als dies mit den bisher zur Verfügung stehenden Verfahren möglich war.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die erzielten Forschungsergebnisse liefern einen innovativen Beitrag zu einem neuen Verfahren. Auf der Basis der Forschungsergebnisse können durch interessierte Hersteller Test Kits für die Verwendung in Betrieben der Brau- und Mälzungsindustrie sowie in der Landwirtschaft als neue Produkte entwickelt werden.



Die Anwendung von LAMP-basierten Tests für den Nachweis qualitätsrelevanter Fusarium-Arten bietet eine anwenderfreundliche und kostengünstige Alternative zu bestehenden Verfahren. In diesem vorwettbewerblichen Forschungsvorhaben konnten alle Voraussetzungen für die Entwicklung kommerzieller Tests erarbeitet werden, die bei der Wareneingangskontrolle der Mälzerei und der Brauerei einen ersten Anhaltspunkt über das Vorliegen eines Gushing-Potenzials oder möglicher Mykotoxin-Belastungen in Malz und Getreide liefern.

Das Auftreten von Gushing und von Mykotoxinen im Bier kann zu einer empfindlichen Beeinträchtigung der Wettbewerbsfähigkeit deutscher Brauereien und Mälzereien führen. Daher ist es notwendig, den Betrieben Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit denen sie in einfacher Weise die Anwesenheit von Pilzen mit dem Potenzial zur Auslösung von Gushing und zur Bildung von Mykotoxinen in den Rohstoffen überprüfen können. Insbesondere KMU sind dabei auf Verfahren angewiesen, die ohne großen Aufwand an Geräten und Spezialkenntnissen durchgeführt werden können. Die im Rahmen der Arbeiten entwickelten Verfahren bieten diese Möglichkeit und können daher die Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit von KMU deutlich steigern.

Veröffentlichungen:

Denschlag, C., Vogel, R.F., Niessen, L., 2012. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing Fusarium spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International Journal of Food Microbiology* 156, pp. 189-196. 52

Denschlag, C., Vogel, R.F., Niessen, L., 2013. Hyd5 gene based analysis of cereals and malt for gushing-inducing Fusarium spp. by real-time LAMP using fluorescence and turbidity measurement. *International Journal of Food Microbiology* 162, pp. 245- 251.

Denschlag, C., Rieder, J., Vogel, R.F., Niessen, L., 2014. Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing Fusarium species in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 177, pp. 117–127.

Denschlag, C., Vogel, R.F., Niessen, L. Schnelltest für Fusarien. *Brauwelt* 20/2014, pp. 608-610.

Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.



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 16840 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.

