

Entwicklung eines kulturellen Schnellverfahrens zum Nachweis osmotoleranter Hefen unter Berücksichtigung der Gasbildung

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Hochschule Ostwestfalen Lippe Institut für Lebensmitteltechnologie ILT-NRW Labor Mikrobiologie Prof. Dr. Barbara Becker/Dr. Jens Pfannebecker
Industriegruppe:	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e. V. (BDSI), Bonn Projektkoordinator: Dr. Maritta Jacobs Pfeifer & Langen KG, Elsdorf
Laufzeit:	2012 – 2014
Zuwendungssumme:	€ 249.000,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Osmotolerante Hefen (OtH) können bei Zuckerkonzentrationen von 40 - 70 % wachsen und werden oft aus hoch zuckerhaltigen Lebensmitteln und Rohstoffen, wie z.B. Marmelade, Zuckersirup, Fruchtsaftkonzentrate, Trockenfrüchte, Melasse, Marzipan und Honig, isoliert. Auch Produkte, wie Dressings, Ketchup, Mayonnaise, Soja-Sauce und Kondensmilch, gelten als anfällig für eine Kontamination mit diesen Hefen. Die Stabilität hoch zuckerhaltiger Produkte hängt vor allem vom a_w -Wert, dem pH-Wert, dem Vorhandensein von Konservierungsmitteln und der Temperatur ab. Durch die Weiterverarbeitung kontaminierter Rohstoffe können auch Lebensmittel betroffen sein, in denen das Wachstum osmotoleranter Hefen nicht durch einen hohen osmotischen Druck eingeschränkt wird. Die Bedeutung der Kontamination durch OtH liegt in der langsamen, über lange Lagerzeiten beträchtlichen CO_2 -Bildung. Gasbildung führt zum Verderb der Produkte, z.B. bricht Marzipan auf. Geschlossene Verpackungen blähen auf (Bombagenbildung), platzen oder werden undicht. Durch Temperaturwechsel kann es zur Kondensierung von Wasserdampf auf der Oberfläche von Produkten kommen, der das Wachstum osmotoleranter Hefen beschleunigt. Zudem kommt es häufig zu sensorischen Veränderungen durch die Bildung von Stoffwechselprodukten, wie Essigsäure, Acetaldehyd und Lactat.

Hefen der Gattung *Zygosaccharomyces* gehören zu den am häufigsten isolierten Schadorganismen aus stark zuckerhaltigen Rohstoffen und Lebensmitteln und werden oftmals mit einem Lebensmittelverderb assoziiert. OtH bevorzugen meist höhere Wachstumstemperaturen (bis 40°C) und sind in der Regel auch gegenüber SO_2 , Essigsäure und Konservierungsmitteln, wie Benzoesäure oder Sorbinsäure, widerstandsfähig.

Zum Nachweis osmotoleranter Hefen werden in der Industrie bisher überwiegend individuelle „Hausmethoden“ der Unternehmen angewandt mit nicht optimierten Kulturmedien, Detektionszeiten von 10 bis 21 Tagen, einer nicht zuverlässigen Anzeige der Gasbildung und somit mit nicht vergleichbaren Ergebnissen.

Der Lebensmittelindustrie entstehen durch den Verderb zuckerhaltiger Lebensmittel hohe finanzielle Schäden. Die zeitnahe Detektion osmotoleranter Hefen hat Einfluss auf die Freigabe oder Sperrung von Rohstoffen und Produkten und damit auf Lagerzeiten und -kosten. Besonders kleine und mittelständische Unternehmen sind durch Kontaminationen ihrer Produkte mit OtH und etwaige Reklamationen ggf. sogar in ihrer Existenz gefährdet. Ein zuverlässiger Nachweis von OtH muss niedrige Keimzahlen erfassen, das Gasbildungsvermögen direkt anzeigen sowie schnell (< 10 Tage) und standardisiert für möglichst viele OtH anwendbar sein, damit die Un-

tersuchungsergebnisse vergleichbar sind.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, ein standardisiertes, kulturelles Verfahren zum sensitiven und schnellen (< 10 Tage) Nachweis osmotoleranter Hefen unter Berücksichtigung des Gasbildungsvermögens zu entwickeln, das vergleichbare, zuverlässige Ergebnisse in verschiedenen Matrices liefert.

Forschungsergebnis:

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in der Entwicklung eines optimierten Kulturmediums zum Nachweis osmotoleranter Hefen (OtH) der Gattungen *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Schizosaccharomyces* und *Debaryomyces*. Die Optimierungsstrategie zielte darauf ab, niedrige Keimzahlen von 10 - 100 KbE/g bei maximaler Gäraktivität in Nachweiszeiten von 3 - 7 Tagen zu detektieren. Grundlage für die Entwicklung des optimierten Mediums waren vergleichende Untersuchungen beschriebener Kulturmedien für OtH im RAMOS®-Parallelfärmer, bei der das geeignetste Medium in Bezug auf schnelles Wachstum und hohe Gasbildung ermittelt wurde. Im Anschluss wurden, ausgehend von einem Grundmedium aus Glucose und Hefeextrakt, Substanzen zur Förderung des Wachstums und der Gasbildung zugesetzt und im Parallelfärmer untersucht. Besonders die Zugabe von Ammoniumsalzen, Pepton, Malzextrakt und Thiamin führte zu einem schnelleren Einsetzen der Gärung und einer deutlichen Steigerung der maximalen Gäraktivität im Vergleich zu beschriebenen selektiven Kulturmedien. Beispielsweise konnte für *T. delbrueckii* eine Reduktion um 47 h bis zum Einsetzen der Gärung erzielt werden. Die maximale CO₂-Transferrate, ein Maß für die Gäraktivität der Hefen, wurde z.B. bei *Z. rouxii* und *T. delbrueckii* um das 2,9-fache im Vergleich zu den beschriebenen Medien gesteigert.

In Challengetesten wurden 9 hoch zuckerhaltige Matrices unter Berücksichtigung von 10 und 10² - 10³ KbE/g von *Z. rouxii* und *T. delbrueckii* in optimiertem Kulturmedium im Parallelfärmer untersucht. Insgesamt führten nur Produkte, wie Honiggranulat, mit sehr niedrigen a_w-Werten, zu geringerem Wachstum und Gasbildung im optimierten Medium. Die Inokulationsversuche mit *Z. rouxii* und *T. delbrueckii* zeigten, dass beim Vorhandensein niedriger Keimzahlen (10 KbE/g) in Rohstoffen und Produkten Nachweiszeiten von 3 Tagen in optimiertem Medium im Parallelfärmer möglich sind.

Das entwickelte Kulturmedium konnte in automatisierten kulturellen Systemen, wie BioLumix™ (IUL Instruments GmbH) und BacTrac 4300 (SY-Lab GmbH), zum OtH-Nachweis eingesetzt werden. Bei der Untersuchung von 100 KbE/ml wurden Nachweiszeiten von 20 h (*Z. rouxii*) bis 35 h (*T. delbrueckii*) realisiert. Somit wird den Betriebslaboren zuckerproduzierender und -verarbeitender Unternehmen die Möglichkeit eines schnellen Nachweises osmotoleranter Hefen in Form eines routinetauglichen, optimierten Nachweissystems an die Hand gegeben. Die Untersuchungsergebnisse machen deutlich, dass die Nachweiszeiten zur Detektion langsam wachsender Hefen, wie *T. delbrueckii*, unter Einsatz des entwickelten Kulturmediums verkürzt werden können. Das im Forschungsantrag angestrebte Ziel des Nachweises von OtH in 3 - 7 Tagen wurde erreicht.

Im Rahmen einer Feldstudie wurde das optimierte Kulturmedium im Vergleich zu den hausinternen Kulturmedien für OtH in 7 Betriebslaboren von Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses eingesetzt. Unter Einsatz des optimierten Kulturmediums konnten in insgesamt 188 Untersuchungen 47 Kontaminationen mit OtH nachgewiesen werden, während mit den hausinternen Methoden nur 39 detektiert wurden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Forschungsprojekt und die erzielten Ergebnisse sind von branchenübergreifender Bedeutung. Die Untersuchungen lieferten Daten und Methoden, die kleine und mittelständische Unternehmen aus eigener Leistung aufgrund fehlender Forschungskompetenzen und -kapazitäten selbst nicht generieren können. Die Ergebnisse sind relevant für alle Unternehmen, die zuckerhaltige Lebensmittel herstellen oder verarbeiten, besonders im Bereich der Süßwaren- und Getränkeindustrie (Fruchtsafthersteller). Der Einsatz des optimierten Kulturmediums gewährleistet Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Befunden und hilft, Rückrufaktionen, Rechtsstreitigkeiten und Schadensersatzleistungen zu reduzieren. Vor allem in Hinblick auf eine Verkürzung der Lagerzeiten bis zur Freigabe ist der Einsatz eines derartigen Verfahrens interessant. Darüber hinaus profitieren auch Dienstleistungslaboratorien von den im Projekt entwickelten Methoden und Verfahren, da sie hierdurch ihr Dienstleistungsportfolio erweitern können. Entscheidend ist, dass die Befunde unterschiedlicher Labore vergleichbar werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2014.
2. Pfannebecker, J., Schiffer-Hetz, C., Fröhlich, J. und Becker, B.: Development of a culture medium for osmotolerant yeast by use a parallel fermenter system and rapid microbiological testing. J. Microbiol. Meth. 130, 14-22 (2016).
3. Pfannebecker, J., Schiffer-Hetz, C. und Becker, B.: Kultivierung osmotoleranter Hefen – Vergleich unterschiedlicher Kulturmedien im Parallelfementer. Dt. Lebensmittel-Rundsch. 110, 117-123 (2014).
4. Pfannebecker, J., Schiffer-Hetz, C. und Becker, B.: Development of an optimized culture medium for osmotolerant yeasts by use of a parallel-fermenter-system. Food Micro. (Posterbeitrag) (2014).

Weiteres Informationsmaterial:

Hochschule Ostwestfalen Lippe
 Institut für Lebensmitteltechnologie ILT-NRW
 Labor Mikrobiologie
 Liebigstr. 87, 32657 Lemgo
 Tel.: +49 5261 702-296
 Fax: +49 5261 702-404
 E-Mail: barbara.becker@hs-owl.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
 Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
 Tel.: +49 228 3079699-0
 Fax: +49 228 3079699-9
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/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.