

## Auswirkungen von Fusarienkontaminationen auf Qualitätsmerkmale von Braugetreide

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie Prof. Dr. Thomas Becker/Dr. Martina Gastl
<b>Forschungsstelle II:</b>	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Phytopathologie Prof. Dr. Ralph Hückelhoven/Dr. Michael Heß
<b>Forschungsstelle III:</b>	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Bioanalytik Weihenstephan, Freising Prof. Dr. Michael Rychlik
<b>Industriegruppen:</b>	Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö), Berlin Braugersten-Gemeinschaft e. V., München
	Projektkoordinator: Dipl.-Ing. Walter König Braugersten-Gemeinschaft e.V., München
<b>Laufzeit:</b>	2012 – 2015
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 623.000,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Getreidebasierte Lebensmittel müssen in mehrfacher Hinsicht Qualitätsanforderungen genügen: Aus lebensmittelrechtlicher Sicht, insbesondere bezüglich der für die Lebensmittelsicherheit relevanten Aspekte (vor allem Toxine), bezüglich verarbeitungsspezifischer Aspekte (Gewährleistung geforderter Spezifikationen, wie z. B. proteolytischer Malzmerkmale) sowie bezüglich agronomischer Aspekte (z. B. Pilzkontaminationen).

In der Brauwirtschaft haben in den letzten Jahren extreme Witterungsverhältnisse und damit verbundene Qualitätsdefizite für große Einbußen in der zur Verfügung stehenden Braugerstenmenge gesorgt. Die Qualität des Rohstoffs hat einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des Endprodukts Bier. Im Fokus der Qualitätskontrolle stehen hierbei vor

allem das zunehmende Auftreten von Fusarienkontaminationen bei Sommerbraugerste und die daraus resultierenden qualitativen Veränderungen.

Ein erhöhter Fusarienbefall birgt zudem das Risiko einer erhöhten Mykotoxinbelastung. Zur Minimierung gesundheitlicher Risiken für die Verbraucher wurden von der EU-Kommission Grenzwerte für Mykotoxine (z. B. für DON, OTA) in Lebensmitteln festgelegt. Aus verarbeitungstechnologischer Sicht führen vorhandene Infektionen erfahrungsgemäß zu veränderten Lösungseigenschaften während des Mälzungsprozesses und zu erhöhten Schwandwerten. Bei der Gerstenannahme muss anhand einer begrenzten Analysenzahl eine Entscheidung über die Qualität der Partie gefällt werden. Bisher werden der Befall bzw. die Intensität des Befalls mit Schimmelpilzen

hauptsächlich über eine Handbonitur, also mit Hilfe einer rein optischen Erkennung, erfasst. Mit dieser Methode wird jedoch nur die sichtbare Symptomatik erfasst, Kontaminationen, die keine Kornverfärbungen hervorrufen, bleiben unbeachtet. Analytisch wird oftmals nur der Gehalt des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) erfasst, welches aber vornehmlich in Weizen relevant ist. Da in Gerste ein anderes Spektrum an Fusarienarten auftritt als bei Weizen, liegen bezüglich pflanzenbaulicher Maßnahmen, wie Vorfrucht und Bodenbearbeitung, keine wissenschaftlich abgesicherten Kontrollmöglichkeiten vor.

Ziel des interdisziplinären Forschungsvorhabens war es deshalb, systematisch Daten zu erarbeiten, um – angefangen von der Rohware über den Verarbeitungsprozess hinweg – die Zusammenhänge zwischen Fusariumbefall, Symptomatik und Metaboliten (Mykotoxine, Schlüsselproteine, Abwehrsubstanzen) zu ermitteln. Die Untersuchungen sollten zur Erfassung des Status quo sowohl an repräsentativen Praxismustern erfolgen, als auch an gezielt inokuliertem Probenmaterial. Die Auswirkung einer erhöhten Mykotoxinbelastung sollte für das Produkt Bier anhand von Brauversuchen über den Bierbereitungsprozess hinweg bilanziert werden.

#### Forschungsergebnis:

Forschungsstelle 1 untersuchte in einem Monitoring den Einfluss von *Fusarium* spp. in Gerste und Malz. Hierbei wurden kommerziell erhältliche Gerstenmuster über einen Zeitraum von drei Jahren vermälzt und analysiert. Vor allem die Aussagekraft der Handbonitur stand hier im Fokus der Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss des Jahrganges auf die auftretende Symptomatik in den untersuchten Mustern. Mittels Korrelationsanalysen, bei denen ein Zusammenhang zwischen auftretender Symptomatik und DNA-Menge der *Fusarium* spp. ermittelt wurde, stellten sich klar *Fusarium avenaceum* und *Fusarium tricinctum* als diejenigen Spezies heraus, die die rote Verfärbung (Symptomatik) der Körner am meisten beeinflussten. Im Vergleich zu visuell nicht infizierten Körnern wurde ein 143-facher Anstieg bei der *Fusarium-avenaceum* (*F. a.*)-DNA-Menge und ein 268-facher Anstieg bei der *Fusarium-tricinctum* (*F. t.*)-DNA-Menge beobachtet. In Abhängigkeit der Häufigkeit, in der *F. a.* auftrat, konnte *F.*

*a.* als dominierende Spezies bei der Kornverfärbung ausgemacht werden. Des Weiteren wurden alle Muster einer vollen Malzanalyse unterzogen und durch Korrelationsanalysen der Einfluss von Fusarien auf die Malzqualität untersucht. So zeigte sich, dass vor allem Malzmerkmale mit dem Fusariumbefall korrelierten, die die Proteolyse betreffen.

In künstlich inokulierten Mustern (Feld- und Gewächshausinokulationen) wurde herausgearbeitet, welche *Fusarium* spp. die Proteolyse im Mälzungsprozess am meisten beeinflusst. Im Jahr 2012 korrelierten die DNA-Mengen von *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* signifikant mit der Menge des löslichen Stickstoffs (0,528 und 0,478). Im Jahr 2013 und 2014 korrelierte nur die *F. a.*-DNA-Menge mit dem gemessenen Gehalt an löslichem Stickstoff (0,726 und 0,514). In diesen Jahren war auch der Eiweißlösungsgrad signifikant mit den DNA-Mengen von *F. a.* beeinflusst (2013: 0,521; 2014: 0,480). Um Veränderungen im Proteinprofil während des Mälzungsprozesses herauszuarbeiten, wurden nach den Mälzungsschritten Proben entnommen (Rohfrucht, nach Weicharbeit, nach Keimung und nach der Darre). Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren, um das Material zu fixieren (Unterbrechung metabolischer Vorgänge im Korn). Anschließend wurden die Proteine der Proben mittels OSBORN-Fraktionierung und isoelektrischer Fokussierung fraktioniert. Die Auftrennung der Proteine nach deren Molekülgrößen erfolgte durch mikrofluide Kapillargelelektrophorese. Mit den erhaltenen Daten wurden Proteinkarten erstellt, die die Veränderungen des Proteinprofils während der Mälzung visualisierten. Damit einhergehend wurde auch der Verlauf des Aminosäurespektrums über den Mälzungsprozess verfolgt und erfasst.

Aufgabe von Forschungsstelle 2 war die Optimierung der Inokulationsmethoden. Verschiedene *Fusarium*isolate, die aus Gerstenmaterial stammten, wurden durch Gewächshausversuche auf Pathogenität und Virulenz überprüft. Eine ausreichende Anzahl von geeigneten Isolaten konnte identifiziert und konserviert werden. Anschließend wurden Inokulationsexperimente unter Gewächshaus- und Feldbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Pflanzen während der Blütezeit durch Sprühinokulation mit einer Sporensuspension infiziert. Zusätzlich wurde je ein nicht-inokuliertes Kontrollmuster bei jedem Versuch

mitgeführt. Der Inokulationserfolg wurde sowohl durch visuelle Bonitierung der entstandenen Symptomatik als auch durch Quantifizierung der pilzlichen DNA-Mengen (qPCR) im geernteten Gerstenmaterial untersucht. Alle Muster wurden für weitere Experimente auf eine ausreichende Kontamination überprüft. Für Gewächshausversuche (doppelt wiederholt) wurden die Sporensuspensionen von *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, und *F. tricinctum* auf Pflanzen der Sorte Grace und Scarlett aufgebracht.

*F. avenaceum* und *F. culmorum* verursachten eine höhere Fusarienkontamination als *F. langsethiae* und *F. sporotrichioides*. Im den Jahren 2013–2015 wurden Feldversuche in Parzellen durchgeführt. Für jede Sorte (2013: Grace, Scarlett; 2014–2015: Quench, Grace, Scarlett) wurde die Behandlung viermal durchgeführt. Analog zu den Gewächshausversuchen wurde im Vergleich zu den Kontrollversuchen die höchste Kontamination bei *F. avenaceum* und *F. culmorum* festgestellt. Jedoch konnte auch für die Inokulationsvarianten mit *F. graminearum*, *F. tricinctum*, *F. langsethiae* und *F. sporotrichioides* ebenso adäquat kontaminiertes Probenmaterial erzeugt werden. Eine weitere Aufgabe war es, die natürliche pilzliche Belastung in Praxismustern zu charakterisieren. Pro Jahr wurden 19–20 Muster mittels klassischer mykologischer Methoden und mittels quantitativer PCR auf ihre pilzliche Belastung untersucht. Hierbei wurde sowohl der allgemeine mykologische Status, als auch die spezies-spezifische *Fusarium*-Kontamination ermittelt. In jedem der untersuchten Jahre wurde auch ein erheblicher Befall mit Schwärzepilzen, z. B. *Alternaria* spp., sowie mit Bakterien beobachtet. Die spezifische Analyse auf *Fusarium*-Infektionen kristallisierte die Spezies *F. avenaceum*, *F. graminearum* und *F. tricinctum* als die dominierenden heraus.

Des Weiteren wurden Genexpressionsstudien durchgeführt, die den Einfluss der Fusarienkontamination auf die Expression von mälzungsspezifischen Enzymen während der Pflanzenentwicklung und dem Mälzungsprozess aufzeigen. Im ersten Schritt wurden spezifische Primer für die korrespondierenden Gene entwickelt. Das untersuchte Material stammte bei diesen Untersuchungen aus den Gewächshausversuchen. Die Proben stammten aus Ähren, die zu spezifischen Zeitpunkten nach der Inokulation beprobt wurden. Das

Material für die Untersuchung des Mälzungsprozesses wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Mälzungsprozesses genommen (siehe Proteinprofil von Forschungsstelle 1). Darauf folgte die RNA-Extraktion mit anschließender cDNA-Synthese. Die Daten wurden unter Zuhilfenahme einer quantitativen PCR erhoben. Mittels dieses Vorgehens konnte der Einfluss der Fusarienkontamination auf relevante amylolytische Gene nachgewiesen werden. Dieser Einfluss wurde nicht nur bei Probenmaterial aus der Mälzung bestimmt. Auch schon während der Pflanzenentwicklung wurden veränderte Expressionsraten der Targetgene durch die Fusarienkontamination festgestellt. Nach Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher *Fusarium* spp., die sich in ihrem Toxinbildungsvermögen unterscheiden, konnte keine generelle Verbindung zwischen der Kontaminationsstärke und der Intensität der Genexpression gefunden werden.

Forschungsstelle 3 untersuchte verschiedene *Fusarium*-Toxine (Typ B und Typ A Trichothecene, Enniatine, Beauvericin, Zearalenon und modifizierte Mykotoxine) in Gerstenmalz und Bier sowie über den kompletten Mälzungs- und Brauprozess hinweg. Dafür wurden zwei LC-MS/MS-Multi-Mykotoxin-Methoden basierend auf einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse für Getreide- und Bierproben entwickelt sowie vollständig validiert und etabliert. Als interne Standards wurden die kürzlich synthetisierten <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Mykotoxine eingesetzt (z.B. <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-acetyliertes DON, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-HT2-toxin, <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-T2-Toxin, <sup>15</sup>N<sub>3</sub>-Enniatine, <sup>15</sup>N<sub>3</sub>-Beauvericin).

Die Praxismusterproben (Gerstenmalz) aus den Jahren 2012, 2013 und 2014 waren hoch mit Enniatin B, DON und dem modifizierten Mykotoxin Deoxynivalenol-3-Glucosid (D3G) belastet. Vor allem die Proben aus dem Jahr 2012 waren stark kontaminiert. In den untersuchten Proben konnte Fusarenon X nicht detektiert werden.

Während des Mälzungs- und Brauprozesses veränderte sich der Gehalt an *Fusarium*-DNA mit dem Gehalt an *Fusarium*-Toxinen: Vor allem während der Keimungsphase war das Pilzwachstum mit zusätzlicher Mykotoxinproduktion verbunden. Dies zeigten auch die hohen Signifikanzniveaus der berechneten PEARSON-Korrelationskoeffizienten aus den jeweiligen *Fusarium*-Toxinen und der entsprechenden *Fusarium*-spp.-DNA über den Mälzungs-

prozess. Der teilweise beachtliche Anstieg mancher (modifizierter) Metabolite kann auf den Entgiftungsprozess in Pflanzen zurückgeführt werden. Während des Brauens konnten die unpolaren Fusarium-Toxine (Enniatine) größtenteils bereits mit den Trebern oder spätestens mit dem Heißstrub aus dem Prozess entfernt werden. Während der Fermentierung und Lagerung veränderten sich die Mykotoxingehalte der restlichen Fusarium-Toxine kaum.

Insgesamt 61 kommerziell erhältliche, biologische und konventionelle Biere aus Deutschland und anderen Ländern wurden auf ihr Toxinspektrum hin untersucht. Die neu entwickelte LC-MS/MS-Multi-Mykotoxin-Methode wurde verwendet, um die verschiedenen Bierproben zu analysieren. DON, D3G, 3-AcDON und Enniatin B konnten oberhalb der Nachweisgrenze in den Proben nachgewiesen werden. 15-AcDON, ZEA, HT2- und T2-Toxin sowie Enniatin B1, A1, A und Beauvericin waren nicht detektierbar. Die Kontamination der untersuchten Bierproben mit Fusarium-Toxinen war als gering einzustufen. Durch Bier scheint auch bei häufigem Genuss lediglich eine moderate Aufnahme an Fusarium-Toxinen verbunden zu sein. Um weiterhin ein sicheres Produkt von hoher Qualität erzeugen zu können, ist aber letztendlich ein gering belastetes Ausgangsmaterial unabdingbar.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Von den Ergebnissen profitieren insbesondere die Malz- und Brauindustrie (ca. 1.000 Unternehmen in Deutschland). Pro Jahr werden in Deutschland ca. 1,8 Mio. t Malz aus Gerste hergestellt; der Gesamtumsatz der Branche liegt bei ca. 700 Mio. €. Ein Großteil der Mälzereien ist mittelständisch strukturiert und zumeist regional aufgestellt; die Produktionsmengen liegen zwischen 1.000 t bis 300.000 t.

In der Brauwirtschaft gibt es in Deutschland ca. 1.300 Braustätten mit 35.000 Beschäftigten und einem Bierabsatz von ca. 98,3 Mio. hl/Jahr (Marktwert ca. 9 Mrd. €). Laut Statistischem Bundesamt sind ca. 66 % der Produktionsstätten kleinen und ca. 32 % mittelständischen Unternehmen zuzuordnen, die einen Gesamtbierausstoß von ca. 30 % abdecken.

Die Anforderungen an Lebensmittel stiegen in den vergangenen Jahren stetig an. Die Kenntnis systematischer Daten zur Fusarienproblematik kommt daher in der Qualitätssicherung von Braugerste große wirtschaftliche Bedeutung zu. Die Erkenntnisse ermöglichen eine gezielte Kontrolle und eine Sicherstellung hoher Produktqualitäten und können insbesondere in KMU Anwendung finden.

Die Untersuchungen zeigten, dass nicht alle Fusarium-Arten die gleiche Symptomatik hervorrufen. Es zeigte sich, dass vor allem die beiden Spezies *F. avenaceum* und *F. tricinctum* für die rote Symptomatik der Braumalze verantwortlich sind. Korrelationsanalysen der Daten zeigten den Einfluss von Fusarienkontaminationen auf Qualitätsmerkmale, den DNA-Gehalt und die Toxingehalte sowohl in Praxismustern als auch in Mustern der Inokulationsversuche.

Durch gezieltes Inokulieren von Getreide mit Fusariumsporen in Feld- und in Gewächshausversuchen konnte Kornmaterial gewonnen werden, mit dem die Auswirkungen verschiedener *Fusarium spp.* auf die Getreidequalität untersucht wurden. Mit diesen Mustern wurde die Veränderung des Proteinspektrums aufgrund von Fusarien untersucht. Hier zeigte sich, dass vor allem der Proteinbereich über 60 kDa maßgeblich verringert wird. Des Weiteren wurden mit diesen Mustern Genexpressionsanalysen durchgeführt. Hier konnte der Einfluss der Pilze auf Transkriptomebene anhand von Genexpressionsstudien nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass Fusarium die Expression amylolytischer und zytolytischer Enzyme signifikant erhöht. Im Rahmen des Projektes wurde außerdem eine Multimykotoxinmethode entwickelt, mit der es möglich ist, neben Mykotoxinen auch deren modifizierte Metaboliten analytisch zu erfassen.

Die Forschungsergebnisse leisten einen wertvollen Beitrag für zukünftige Arbeiten im Bereich der Resistenzzüchtung, der Produktsicherung im Mälzerei- und Brauereibereich (Aussagekraft der Handbonitur) und der Evaluierung der Qualität von Braugerstenmalz.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2015.
2. Habler, K., Gießinger, C., Hofer, K., Schuler, J., Moghari, S., Heß, M., Gastl, M. und Rychlik, M.: Fate of Fusarium To-

- xins during Brewing. J. Agric. Food Chem. 65, 190-198 (2017).
3. Geißinger, C., Becker, T., Gastl, M., Hofer, K., Heß, M., Hückelhofen, R., Habler, K. und Rychlik, M.: Auswirkungen von Fusarienkontaminationen auf die Qualität von Braugetreide. Brauwelt 48/49, 1440-1444 (2016).
  4. Baier, M., Geißinger, C., Hofer, K., Gastl, M. und Becker, T.: Fusariumkontamination und deren Einfluss auf Malzqualitätsmerkmale. Brauwelt 31/32, 902-903 (2016).
  5. Geißinger, C., Gastl, M. und Becker, T.: Vier Grundstoffe genau überwacht – Umfassende Analytik kontrolliert die Bierproduktion. Laborpraxis 9, 18-19 (2016).
  6. Habler, K. und Rychlik, M.: Multimycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for Fusarium toxins in cereals. Anal. Bioanal. Chem. 408 (1), 307-317 (2016).
  7. Hofer, K., Geißinger C., König, C., Gastl, M., Hückelhofen, R., Heß, M. und Coleman, A. D.: Influence of Fusarium isolates on the expression of barley genes related to plant defense and malting quality. J. Cer. Sci. 69, 17-24 (2016).
  8. Rychlik, M., Hofer, K., Gastl, M., Habler, K. Geißinger, C. und Hess, M.: Vom Feld in die Flasche – Wie lässt sich die Qualität von Bier sichern? Lab. & more 2, 28-33 (2015).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie  
Weihenstephaner Steig 20, 85354 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3261  
Fax: +49 8161 71-3883  
E-Mail: tbecker@wzw.tum.de

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW  
Lehrstuhl für Phytopathologie  
Emil-Ramann-Str. 2, 85350 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3681  
Fax: +49 8161 71-4538  
E-Mail: phyto@lrz.tum.de

Technische Universität München  
Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abt. Bioanalytik  
Alte Akademie 10, 85350 Freising  
Tel.: +49 8161 71-3381  
Fax: +49 8161 71-4216  
E-Mail: michael.rychlik@tum.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.