

Entwicklung von Markern für die Durchsetzungsfähigkeit von Staphylokokken in Rohwurst-Fermentationen

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie Prof. Dr. Rudi F. Vogel
Industriegruppe(n):	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF), Bonn
	Projektkoordinator: Dr. Carl-Alfred Alpert, Frutarom Savory Solutions GmbH, Holdorf
Laufzeit:	2013 - 2017
Zuwendungssumme:	€ 271.150,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Fleisch kann als Rohmaterial für die Rohwurstherstellung weder sterilisiert noch pasteurisiert werden. Deswegen werden unvermeidlich kleine Zahlen an Bakterien in die Fermentation eingebracht, von denen sich diejenigen als intrinsische, sog. autochthone Mikrobiota durchsetzen, die an die jeweiligen Reifungsbedingungen am besten angepasst sind. Sie stammen in der Regel aus der autochthonen Mikrobiota der Schlachttiere. Durch den massiven Einsatz von Antibiotika (AB) in der Tierproduktion, insbesondere in den letzten 20 Jahren, hat sich die Zahl an Infektionen mit multiresistenten Bakterien vervielfacht. Hierbei stellt die mögliche Übertragung von AB-Resistenzgenen auf pathogene Bakterien und die daraus resultierende Unwirksamkeit klinisch angewandter Antibiotika das eigentliche Problem dar. AB-Resistenzgene lebensmittelassoziierten *Laktobazillen* und *Staphylokokken* können während der Fermentation und/oder im Intestinaltrakt auf andere Mikroorganismen übertragen werden. Es ist vielfach gezeigt, dass einige Spezies koagulase-negativer *Staphylokokken* als häufiger Bestandteil der autochthonen Mikrobiota in der Rohwurst AB-Resistenz-Gene tragen. Deshalb ist es sinnvoll, Starterkulturen einzusetzen, da diese vor deren Einsatz auf das Vorhandensein von

AB-Resistenzgenen oder weiteren Risikofaktoren (z. B. Bildung biogener Amine, Pathogenitätsfaktoren) überprüft werden können. Die grundsätzlichen Sicherheitsaspekte, die bei der Auswahl von Starterorganismen Beachtung finden, wurden in einer Stellungnahme der DFG-Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln zusammengefasst, die die Historie einer sicheren Anwendung (history of safe use) sowie den Qualified-Presumption-of-Safety (QPS)-Ansatz der EFSA einschließt. Während das unbeabsichtigte Einbringen von AB-Resistenzen durch Starterorganismen durch konsequente Auswahlkriterien damit beherrschbar ist, kann eine Minimierung von Stämmen mit AB-Resistenzen, die über die autochthone Mikrobiota des Schlachttiers in die Nahrungskette eingebracht werden nur über die Kontrolle ihres Wachstums in der Fermentation erreicht werden. Als Starterkulturen in fermentierten Fleischwaren werden fast ausnahmslos Stämme von *S. carnosus* und *S. xylosus* eingesetzt.

Mit den bisherigen Techniken ist eine weitergehende Zuordnung zu und Verfolgung von Stämmen während der Rohwurstfermentation nicht möglich. Daher werden für den Aufbau eines reproduzierbaren Testsystems zur zielgerichteten Prüfung der Durchsetzungsfähig-

keit der eingesetzten Starterkulturen eine standardisierte Konkurrenzmikrobiota und Methoden, die auf Stammebene diskriminieren, benötigt. Hierfür bietet sich die MALDI-TOF-MS-Analytik an.

Die Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-MS-Analytik hat bisher überwiegend in der klinischen Diagnostik, zur Identifizierung von Bakterien, Anwendung gefunden. Neben der Identifizierung auf Speziesebene ist es mittels geeigneter Auswertalgorithmen auch möglich, auf Biotyp- und ggf. Stammebene zu differenzieren.

Bakterielle Spezies enthalten Stämme, die jeweils unterschiedlich gut an ein spezifisches Habitat angepasst sind (Ökotypen). Gleichwohl können oftmals unterschiedliche Ökotypen aus demselben Habitat isoliert werden. Bisher war es beliebig schwierig, aus Gruppen von Stämmen unterschiedliche Ökotypen mit entsprechender Durchsetzungsfähigkeit analytisch zu fassen. Durchsetzungsfähigkeit ist jedoch eine der wichtigsten Voraussetzungen guter Starterkulturen in Lebensmittelfermentationen mit nicht pasteurisierbaren Rohmaterialien. Grundsätzlich bestimmt sich ein Ökotyp jedoch über seine genetische Ausstattung (Genotyp), der letztlich seine Durchsetzungsfähigkeit, gemessen an Wachstumsverhalten und Anpassung, bestimmt. Jeweils typische Gene, die einen Ökotyp begründen, können deswegen als Marker dienen, entlang derer Stämme als angepasst und durchsetzungsfähig im jeweiligen Habitat identifiziert werden. Innerhalb der koagulase-negativen *Staphylokokken* ist bisher nur ein Genom des Typstamms von *S. carnosus* verfügbar. Die fortschreitende Entwicklung erschwinglicher (Routine-)Methoden zur Genomsequenzierung hat die Möglichkeit zum umfassenden Genomvergleich von Stämmen und damit auch zur Differenzierung von (durchsetzungsfähigen) Ökotypen eröffnet. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Vielfalt möglicherweise kleiner als erwartet ist und damit eine begrenzte Zahl von Genomsequenzierungen einen guten Überblick zu den eingesetzten Ökotypen geben kann.

Ziel des Forschungsvorhabens war es zu prüfen, ob es möglich ist, mit einem solchen Ansatz Marker für die Durchsetzungsfähigkeit

von *S. carnosus*- und *S. xylosus*-Stämmen in der Rohwurstfermentation zu identifizieren.

Forschungsergebnis:

Es wurden 4 verschiedene Fleischchargen mit 2 verschiedenen Reifungsschemata über 14 Tage hinweg spontan gereift und an Tag 0 - 5, 7 und 14 Proben genommen. Diese Proben wurden hinsichtlich pH- und aw-Wert, Keimzahl der Laktobazillen und der Staphylokokken untersucht. Außerdem wurden je 96 Kolonien von drei verschiedenen Medien (TSA, BP, MRS) beprobt und mittels MALDI-TOF-MS-Analytik via „Direct-on-target-smear“-Methode identifiziert. So wurden insgesamt 16.632 Kolonien analysiert. Die Verfolgung der Mikrobiotaentwicklung über 14 Tage zeigte, dass im Prinzip zwei mögliche Endszenarien entstehen können: Die erste Möglichkeit bestand darin, dass sich je eine *Laktobazillen*- und eine *Staphylokokken*-Spezies durchsetzten, die zweite Möglichkeit umfasst, dass sich mehrere *Staphylokokken*-Spezies und mehrere *Laktobazillen*-Spezies durchsetzten.

Anhand der Identifizierungen aus den spontan fermentierten Rohwürsten wurden Clusteranalysen für die einzelnen *Staphylokokken*-Spezies durchgeführt, anhand derer die Verfolgung einzelner Spezies bzw. zum Teil auch Ökotypen über die Zeit möglich wurde. Da es Ziel des ersten Arbeitspaketes war, eine standardisierte Konkurrenzmikrobiota aufzubauen, wurden mögliche Kombinationen erstellt. Als Auswahlkriterien diente hierfür die Durchsetzung während der Reifung, die Häufigkeit des Vorkommens, die Physiologie relevanter Rohwurststressparameter und die Verfolgbarkeit über die verschiedenen Tage.

160 Stämme der beiden Spezies *S. carnosus* und *S. xylosus*, die als mögliche Starterkulturen in den Durchsetzungsversuchen eingesetzt werden sollten, wurden bezüglich ihres Wachstumsverhalten bei ansteigender Salzkonzentration (indirekte Bestimmung einer aw-Toleranz) oder/und sinkenden pH-Werten charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die beiden Spezies vor allem darin unterschieden, dass *S. xylosus* eher salztolerant ist, aber *S. carnosus* einem niedrigen pH-Werten standhält.

Des Weiteren wurden alle 160 Stämme bezüglich ihrer MALDI-TOF-MS-Massenspektrenprofile (als Hinweis auf unterschiedliche Peptidexpression) und ihrer genetischen Fingerprints via RAPD-PCR (als Hinweis auf größere inter- und intraspezifische Unterschiede im Genom) charakterisiert. Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Unterscheidung der beiden Subspezies von *S. carnosus* eindeutig möglich war, jedoch innerhalb einer Spezies kaum Unterschiede zu sehen sind. Auch die Ergebnisse von *S. xylosus* deuten auf zwei Untergruppen innerhalb dieser Spezies hin, allerdings ist hier keine Subspezies beschrieben.

Letztendlich konnte auf Grundlage der Daten der physiologischen Charakterisierung sowie unter Zuhilfenahme der RAPD-Cluster-Daten und der massenspektrometrischen Daten, eine Auswahl von 13 unterscheidbaren Stämmen getroffen werden, deren Genome sequenziert wurden. Die hochmolekulare genomische DNA der ausgewählten Staphylokokken wurde isoliert und ihre Qualität bestimmt. Im Anschluss daran wurde sie mittels SMRT-Technologie sequenziert, assembliert, zirkularisiert und annotiert. Es wurden gruppenspezifische Genomvergleiche durchgeführt, um mögliche Markergene für die Durchsetzungsfähigkeit zu finden. Da unterschiedlich stresstolerante Stämme von *S. carnosus* keine Unterschiede auf Genebene zeigten, wurde nach unterschiedlichen Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) in den Gruppen gesucht. Für *S. carnosus* subsp. *carnosus* wurden 110 SNPs gefunden, die in kodierenden Bereichen lagen. Von diesen 110 SNPs gab es 14, die beim Ablesen des jeweiligen Gens zu einem verfrühten Ablesestopp führen. Für *S. carnosus* subsp. *utilis* wurden 484 SNPs in kodierenden Bereichen gefunden. Es konnten zwei gruppenspezifische Gene für *S. xylosus* gefunden werden, die allerdings nicht mit der phänotypischen Klassifizierung der Gruppen korreliert. Bei weiterer Untersuchung der Genome konnten Unterschiede in der Genhäufigkeit bzw. dem Vorhandensein von Genen des sog. ADI-Pathways (Arginin-Deiminase Pathway) entdeckt werden. Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen einer höheren Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten und den Genomen hergestellt werden. Auch konnten Gene identifiziert werden, die mit einer besseren Salz- bzw. aw-

Toleranz einhergehen. Alle gefundenen Gene können mit dem Osmolytentransport oder deren Synthese assoziiert werden. Somit ist es möglich, Spezies- bzw. Subspezies-spezifische Unterschiede in den Genomen zu finden, die deren physiologische Unterschiede widerspiegeln.

Die ausgewählten Starterstämmen der drei Spezies *S. carnosus* subsp. *carnosus*, *S. carnosus* subsp. *utilis* und *S. xylosus* wurden auf ihre Durchsetzungsfähigkeit hin getestet. Dazu wurde ein Rohwurstmodellsystem etabliert, in dem unter gleichen Säuerungs- und Konkurrenzbedingungen getestet werden kann, wie sich die Stämme verhalten. Um einen gleichbleibenden Säuerungsabfall zu gewährleisten, wurden neben den Konkurrenten auch zwei Laktobazillen ausgewählt, die einen schnellen und einen moderaten Säuerungsabfall vorgeben. Die Wettbewerbsversuche zeigen über die Tage hinweg reproduzierbare Ergebnisse der prozentualen Anwesenheit der Starter. Für *S. carnosus* subsp. *carnosus* und *S. xylosus* können folgende Stämme als durchsetzungsfähig identifiziert werden: TMW 2.212, 2.218, 2.269 und TMW 2.1521 und 2.1523. Alle anderen Stämme sind nur schwach bis mäßig durchsetzungsfähig. Bei *S. carnosus* subsp. *utilis* konnte kein durchsetzungsfähiger Stamm identifiziert werden. Allerdings muss hier beachtet werden, dass es sich um ein „Worst-Case-Szenario“ handelt, bei dem der Starter in gleicher Keimzahl eingesetzt werden. Starter mit mäßiger Durchsetzungsfähigkeit könnten möglicherweise in hohen Keimzahlen vorgelegt noch einen Vorteil haben. Unter höherem pH-Druck wird die prozentuale Anwesenheit aller *S. carnosus*- subsp. -*carnosus*-Stämme begünstigt, bei *S. carnosus* subsp. *utilis* und *S. xylosus* zeigt sich ein negativer oder stagnierender Effekt. Die Vorhersagen der physiologischen Charakterisierung passen gut für *S. carnosus* subsp. *carnosus* und in zwei Drittel der Fälle für *S. carnosus* subsp. *utilis*. Für *S. xylosus* waren die Ergebnisse entgegengesetzt. Dies ist jedoch möglicherweise eine Folge der Auswahl, da hier die Trocknung in Form der Salztoleranz mit einbezogen wurde, was jedoch in den ersten Tagen bei diesem Versuchsaufbau nur eine sehr geringe Auswirkung hat und sich bei *S. xylosus* erst über eine längere Versuchsdauer zu einem

positiven Vorteil entwickeln kann.

Um ein stammspezifisches Monitoring während der Fermentation eindeutig zu ermöglichen, wurde auf Basis der bereits bekannten Massenspektren der Stämme eine dem Versuch spezifisch angepasste Subdatenbank erstellt und validiert. Durch die Erweiterung der klassischen Ethanolextraktionsmethode um Direktaufträge konnte eine Verbesserung der Stammidentifizierung erlangt werden. Es zeigt sich, dass einzelne Stämme eindeutig von anderen zu unterscheiden sind. Bei diesen Stämmen handelt es sich um TMW 2.212, 2.218, 2.1523 und 2.1602.

Für die Durchsetzungsversuche im industriellen Pilotmaßstab wurden nur Stämme ausgewählt, die eindeutig durchsetzungsfähig bzw. nicht nicht-durchsetzungsfähig und durch ihr Massenspektrum auch eindeutig verfolgbar waren. Es zeigte sich, dass die Durchsetzungsfähigkeit, die vorher im Rohwurstmodellssystem bestimmt wurde, teilweise reproduziert werden konnte. Die *S.-carneus*-subsp.-*carneus*-Stämme TMW 2.212 und 2.1347 zeigten sich trotz unterschiedlicher Durchsetzungsfähigkeit dominant während der Reifung über 45 Versuchstage hinweg. TMW 2.1347 war in der initialen Phase hierbei etwas weniger dominant. Die Durchsetzungsfähigkeit unterschied bei den *S.-xylosus*-Stämmen ebenfalls kaum, wobei sich beide Stämme nicht durchsetzungsfähig verhielten. Aus den Versuchsreihen kann man ableiten, dass sich die Vorhersagen aus den Wettbewerbsversuchen im Rohwurstmodellssystem für *S. carneus* subsp. *carneus* gut übertragen lassen, jedoch die Unterschiede dann im Pilotmaßstab prozentual nicht so groß sind. Für *S. xylosus* ist das System schwer übertragbar. Die vorgegebenen Reifungsbedingungen favorisieren hier nicht die Durchsetzungsfähigkeit.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die fleischverarbeitende Industrie in Deutschland gehört mit einem Jahresumsatz von ca. 15 Mrd. € und ca. 80.000 Beschäftigten zu den wichtigsten Branchen der Lebensmittelindustrie. Von ca. 700 produzierenden Unternehmen sind ca. 400 kleine und mittelständische Unternehmen.

Im Rahmen des Vorhabens konnte gezeigt werden, dass die Mikroorganismen, die in Rohwurstfermentationen eine Rolle spielen, sehr komplex anpassungsfähig sind, um sich in der Rohwurst durchzusetzen. Es war nicht möglich, innerhalb einer Spezies Marker abzuleiten, die einen Stamm als durchsetzungsfähiger kennzeichnen. Allerdings konnten Gene gefunden werden, die zwischen den beiden untersuchten Spezies (*S. carneus* und *S. xylosus*) eine höhere aw-Toleranz bzw. eine höhere Toleranz gegen niedrige pH-Werte widerspiegeln. So ist es möglich, auf Genomebene Unterschiede, die physiologisch festzustellen sind, zu erklären. Somit lässt sich nun wissenschaftlich begründen, dass bei schnell gereiften Salamis *S. carneus* einen Vorteil gegenüber *S. xylosus* hat, da *S. carneus* eine bessere Anpassung gegen niedrige pH-Werte zeigt. *S. xylosus* findet dafür Anwendung bei langsam gereiften Salamis, bei der die Sicherheit des Produktes auch über eine lange Trocknungsphase entscheidend geprägt wird, da hier *S. xylosus* für dieses Produkt eine sehr gute Anpassung hat. Dies bestätigen auch die Ergebnisse aus dem Rohwurstmodellssystem. *S.-carneus*-subsp.-*carneus*-Stämme werden unter höherem pH-Druck favorisiert, wohingegen *S.-xylosus*-Stämme hier einen Nachteil erfahren. Im Pilotmaßstab zeigten die ausgewählten *S.-carneus*-subsp.-*carneus*-Stämme eine große Zuverlässigkeit unter großem pH-Druck kombiniert mit einer gleich großen Anzahl Konkurrenten. Mit der Möglichkeit der eindeutigen Nachweisbarkeit durch ihr Massenspektrum kann die Dynamik dieser Stämme von möglichen autochthonen Stämmen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Des Weiteren ist aus den Ergebnissen der Genomik abzuleiten, dass auch Bakteriophagen eine Rolle in der Rohwurstreifung spielen könnten. Es war möglich, in vitro einen Prophagen zu induzieren und so eine Zelllyse zu provozieren. Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, dass dieser Phage auch in der Lage ist, andere Stämme zu infizieren und zu lysieren. Bei etwaigen Fehlerfermentationen sollte deshalb zumindest auch eine durch (Pro)phagen induzierte (Auto)lyse als Ursache in Betracht gezogen werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2017.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Str. 4, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3663
Fax: +49 8161 71-3327
E-Mail: Rudi.Vogel@wzw.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.