

Vorhersage der Bildung hitzestabiler Peptidasen durch kältetolerante Pseudomonaden in Rohmilch

- Anschluss zu AiF 16588 N -

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abt. Mikrobiologie Prof. Dr. Siegfried Scherer/Dr. Mareike Wenning/Dr. Genia Lücking
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Uwe Bedau, Milchwerke Mittelelbe GmbH, Stendal
Laufzeit:	2016 - 2019
Zuwendungssumme:	€ 249.020,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Bakterielle Enzyme, wie Peptidasen in Rohmilch, stellen aufgrund ihrer potentiellen Hitze-resistenz ein Problem für die Qualität länger haltbarer Produkte, wie z.B. H-Milch oder Milchpulver, dar. Auch geringe Mengen von Enzymen, die die Hitzebehandlung während der Herstellung überstehen, können im Laufe einer längeren Lagerung die Milchproteine und das MilCHFett so verändern, dass die texturale bzw. sensorische Qualität der Endprodukte erheblich beeinträchtigt wird. Bedingt durch die hohe Psychrotoleranz der verursachenden Mikroben steigt die Relevanz dieser Organismen für die Qualität der Rohwaren mit zunehmender Lagerdauer, was für die heutzutage üblichen Abholintervalle für Rohmilch von bis zu 3 Tagen zunehmend problematisch ist.

Aufbauend auf den Ergebnissen des IGF-Projekts AiF 16588 N war es Ziel des Forschungsvorhabens, statt eines direkten Nachweises der Enzyme ein genetisches Nachweissystem zu etablieren, das eine Vorhersage der enzymatischen Belastung ermöglicht. Dafür muss bekannt sein, welche genetischen Strukturen in *Pseudomonas*-Genomen mit einer erhöhten Peptidasebildung korrelieren. Diese Signaturen sollten als Zielsequenzen für zwei PCR-Assays

genutzt und letztere anschließend validiert werden.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurde zunächst ein Multiplex-qPCR-Assay für den spezifischen Nachweis der häufigsten proteolytischen *Pseudomonas*-Arten in Rohmilch entwickelt. Als Ziel-DNA wurde das Peptidasegen *aprA* gewählt und für die Generierung der Primerpaare und TaqMan-Sonden spezies-spezifische Sequenzabschnitte im *aprA*-Gen von acht ausgewählten *Pseudomonas*-Arten identifiziert. Zum Gattungsnachweis wurde eine weitere Sonde und ein Primerpaar gegen das hoch konservierte *rpoB*-Gen hergestellt. Alle Primer und Sonden wiesen im Multiplex-PCR-Ansatz eine hohe Spezifität und Sensitivität auf. Die durch den qPCR-Assay gemessenen Ct-Werte konnten mit *Pseudomonas*-Zellzahlen, die auf CFC-Agar bestimmt wurden, erfolgreich korreliert werden. Auch die Validierung des Assays anhand von 42 industriellen Rohmilchproben lieferte sehr gute Ergebnisse: Vorkommen und Häufigkeit der acht *Pseudomonas*-Arten fielen innerhalb der Milchproben stark unterschiedlich aus, was die Relevanz des spezies-spezifischen Nachweissystems unterstreicht. Die

durch die qPCR ermittelten Pseudomonas-Gesamtkeimzahlen der Rohmilchproben waren größtenteils mit den durch Ausplattieren bestimmten Werten vergleichbar. Folglich kann der Multiplex-qPCR-Assay künftig zur Berechnung der Pseudomonaden-Gesamtzellzahl sowie der Zellzahl einzelner proteolytischer Arten in Rohmilch herangezogen werden. Dadurch wird eine Einschätzung der Rohmilchqualität hinsichtlich der Peptidasenbelastung durch Pseudomonas ermöglicht.

Ein zweiter qPCR-Assay wurde entwickelt zur Detektion eines Zielgens, das idealerweise mit starker Peptidaseproduktion korreliert. Hierfür wurde das prtA-Gen gewählt, das einen variablen Bestandteil des aprA-Operons darstellt und mit einer erhöhten Peptidaseaktivität in Zusammenhang stehen könnte. Der prtA-spezifische Singleplex qPCR-Assay wies ebenfalls eine gute Spezifität und Reaktionseffizienz auf und auch die Analyse von 35 Rohmilchproben war erfolgreich. Für beide Assays zeigte sich ein ähnlich guter Zusammenhang zwischen der proteolytischen Aktivität der industriellen Rohmilchproben und der durch die Assays ermittelten Anzahl an hoch proteolytischen Arten (Assay 1) bzw. prtA-positiven Pseudomonaden (Assay 2). Folglich eignen sich beide genetische Nachweissysteme zur Abschätzung der Peptidaseaktivität durch Pseudomonaden in Rohmilch, auch wenn für eine genauere Risikobewertung und Definition von kritischen Grenzwerten eine umfangreichere Validierung mit mehr Milchproben erforderlich ist.

Um weitere Erkenntnisse zur Peptidase-Synthese zu erlangen, wurde der Einfluss der Milchlagerdauer auf die Peptidaseproduktion untersucht. Versuche mit beimpften H-Milchproben zeigten, dass die Peptidaseaktivität von 21 verschiedenen Pseudomonas-Stämmen über den Inkubationszeitraum von acht Tagen bei 6 °C stetig zunahm und die Höhe der Enzymaktivität dabei starke art- und stammspezifische Unterschiede aufwies. Um die Belastung realer Proben mit hitzeresistenten Peptidasen zu bestimmen, wurde die Peptidaseaktivität von 136 unbeimpften Rohmilchproben nach zweiwöchiger Lagerung bei 37 °C mit Hilfe des sensitiven Fluorescamin-Assays quantifiziert. In 11 % der Proben konnte eine Peptidaseaktivität detektiert werden, in sechs Proben davon war die Aktivität > 0,1 pkat/ml und lag somit im kritischen Bereich für das Auftreten einer Süßgerinnung innerhalb von 4 Monaten. Die ermittelten

Gesamt- und Pseudomonas-Keimzahlen der Rohmilchproben schwankten erheblich (zwischen 10^3 und 10^7 KbE/ml), allerdings konnte keine direkte Korrelation zwischen der Pseudomonas-Keimzahl und der Enzymaktivität festgestellt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Temperatur auf die Peptidaseaktivität und die aprA- und prtA-Transkriptmenge näher analysiert. Die Analyse von 16 verschiedenen Pseudomonas-Isolaten in H-Milch bei unterschiedlichen Temperaturen (6 °C, 12 °C und 30 °C) ergab sehr große Unterschiede in der Höhe der Peptidaseaktivität, die sich z.T. gut in den unterschiedlichen aprA- und prtA-Transkriptmengen widerspiegelten. Für die Mehrzahl der Isolate war sowohl die Peptidaseaktivität als auch die aprA-Transkription bei niedrigen Temperaturen (6 °C bis 12 °C) wesentlich höher als bei 30 °C. Die Temperatur gilt folglich als ein wichtiger Einflussfaktor der Peptidaseproduktion, deren komplexe Regulation weiterer Aufklärung bedarf. Darüber hinaus war die Höhe der Peptidaseaktivität und der Genexpression stark von der jeweiligen Spezies bzw. der vorliegenden aprA-Operonstruktur abhängig.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Milchindustrie verarbeitete 2018 in 160 Unternehmen mit ca. 38.000 Beschäftigten rund 31 Mio. t Rohmilch und erwirtschaftete damit einen Umsatz von über 26 Mrd. €. Ein Drittel dieses Umsatzes entfiel auf den Export von Erzeugnissen. Gerade die Erschließung neuer Absatzmärkte außerhalb Europas ist mit der Notwendigkeit längerer Produktlagerzeiten, u.U. auch bei höheren Temperaturen, verbunden. Die Präsenz hitzestabiler Peptidasen ist deshalb ein massives wirtschaftliches Problem. Es sind Fälle bekannt, in denen belastete Rohwaren zu Schäden im Bereich von mehreren Millionen Euro geführt haben. Die Sicherstellung einer hohen Endproduktqualität und die Vermeidung von Schadensfällen ist deshalb von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung für die Hersteller, spart Kosten für Rückrufaktionen, sichert damit Absatzmärkte und ist somit ein wesentlicher Faktor für den wirtschaftlichen Erfolg, gerade kleinerer Unternehmen.

Eine Reduktion der Keimzahlen von Pseudomonas in Rohmilch ist allerdings für Molkereien nur sehr schwer durchzusetzen, da die Ursachen häufig außerhalb oder am Rande ihres

Einflussbereichs liegen. Für eine Senkung der Pseudomonas-Keimzahlen sind die Molkereien auf die Mitwirkung der ca. 65.000 Milcherzeugerbetriebe in Deutschland angewiesen; Milch, die am freien Markt zugekauft wird, liegt ohnehin außerhalb des Kontrollbereichs der Milchverarbeiter.

Im Monitoring der Milchprüfringe und Landeskontrollverbände wird derzeit nur die Keimzahl erfasst, die jedoch keinen Rückschluss auf die enzymatische Belastung der Milch zulässt. Wirksame Prüfverfahren, wie die im Projekt entwickelten Pseudomonas-spezifischen qPCR-Systeme, ermöglichen den Molkereien, diesen Parameter künftig in ihre Qualitätssicherung mit einzubinden. Über die Quantifizierung der hoch proteolytischen oder prtA-positiven Pseudomonaden ist eine schnelle Einschätzung der Peptidaseaktivität in Rohmilch möglich. Hierauf können Molkereien reagieren, indem sie z.B. die Verarbeitung enzymatisch belasteter Rohware in Richtung von Produkten steuern, bei denen sich im Rahmen der Haltbarkeit erst spät oder gar keine negativen Auswirkungen auf die Produktqualität ergeben.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
 Zentralinstitut für Ernährungs- und
 Lebensmittelforschung (ZIEL)
 Abt. Mikrobiologie
 Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising
 Tel.: +49 8161 71-3516
 Fax: +49 8161 71-4512
 E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
 Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
 Tel.: +49 228 3079699-0
 Fax: +49 228 3079699-9
 E-Mail: fei@fei-bonn.de

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2019.

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

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 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.