

Entwicklung von Markern für die Durchsetzungsfähigkeit von Milchsäurebakterien 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:	Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie e.V. (BVDF), Bonn
	Projektkoordinator: Dr. Carl Alpert Frutarom Savory Solutions GmbH, Holdorf
Laufzeit:	2015 - 2018
Zuwendungssumme:	€ 249.750,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Fleisch kann als Rohmaterial weder sterilisiert noch pasteurisiert werden und stellt somit aufgrund einer kleinen Zahl autochthoner Bakterien ein Risiko für Produzenten und Verbraucher dar. Durch den Einsatz von Starterkulturen werden diese Bakterien weitestgehend unterdrückt, was die Produktsicherheit erhöht. Neben der gesundheitlichen Unbedenklichkeit der Produkte, die auch für den Verbraucher an oberster Stelle steht, spielt auch die Attraktivität des Aromas eine besondere Rolle. Allerdings kommt es trotz etablierter Hürdentechnologie und dem Einsatz von Starterkulturen immer wieder zu Fehlfermentationen und Fehlchargen; auch Rückrufaktionen sind nicht auszuschließen.

Um die wirtschaftlichen Folgen solcher Fehlfermentationen zu minimieren, müssen technologische oder analytische Strategien entwickelt werden. Durch charakterisierte und nachweislich durchsetzungsfähige Stämme können Fehlchargen vermieden, Reifungsabläufe optimiert und gleichbleibende Produktqualitäten garantiert werden. Auch die Erhöhung der Produktsicherheit kann durch den gezielten Einsatz dominanter Stämme ermöglicht werden.

Für eine Lösung des Problems sind grundlegende Kenntnisse über die Durchsetzungsfähigkeit von elementarer Bedeutung. Nur wenige Untersuchungen befassen sich bislang explizit mit der Durchsetzungsfähigkeit von Starterkulturen auf Stammebene. Eine intensive Literaturrecherche ergab, dass eine Verfolgung auf Stammebene prinzipiell möglich, aber mit großem Aufwand und hohen Kosten verbunden ist. Stammspezifische PCR-Arrays oder gar Sequenzierungen sind in der Regel von Rohwurstproduzenten und in Hochdurchsatzproduktionen nicht leistbar.

Ziel des Forschungsvorhabens war deshalb die Etablierung einer neuen Methodik zur Verfolgung von Starterkulturen während der Fermentation, die grundsätzlich eine Hochdurchsatzanalytik erlaubt. Weiterhin sollte die beobachtete Durchsetzungsfähigkeit auf genomischer wie physiologischer Ebene untersucht und mögliche Marker abgeleitet werden. Mittels solcher Marker sollte auch die Determinierung neuer nutzbarer und durchsetzungsfähiger Starterkulturen für die Rohwurstproduktion ermöglicht werden.

Forschungsergebnis:

Um die Durchsetzungsfähigkeit der Spezies *L. curvatus* und *L. sakei* ermitteln zu können, war es zunächst notwendig, die zugrundeliegende biologische Vielfalt zu erfassen. Basierend auf RAPD-PCR-Daten, stammenspezifischen MALDI-TOF-Massenspektroskopie (MS)-Clustern und Stressantwort (Kältestress, oxidativer Stress) von 49 *L. sakei*- und 29 *L. curvatus*-Stämmen konnten 20 Stämme der Spezies *L. curvatus* und *L. sakei* selektiert und für weitere Analysen eingesetzt werden.

Die Durchsetzungsfähigkeit der Stämme konnte anhand eines neu etablierten Modellsystems basierend auf MALDI-TOF-MS ermittelt und in industriellen Ringversuchen verifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass es grundsätzlich zwei Strategien gibt, die zu einer Dominanz in Rohwurst führen. Eine Kombination aus kompatiblen Stämmen erwies sich hier als erfolgreich.

Alle Stämme wurden auf genomischer Ebene intensiv charakterisiert und auf Markergene untersucht. Aufgrund der multifaktoriell begründeten Durchsetzungsfähigkeit konnten jedoch keine eindeutigen Markergene abgeleitet werden. Dennoch war es möglich, basierend auf Genomvergleichen in Korrelation mit den Durchsetzungsversuchen verschiedene Faktoren der Durchsetzungsfähigkeit zu erkennen. Die Stämme zeigten signifikante Unterschiede in Genen, die Enzyme und Transporter von Stoffwechselwegen beeinflussen. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der Physiologie der Stämme wider. Es gibt Stämme, die in einer Co-Dominanz – und nur in einer solchen – durchsetzungsfähig sind. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass diese Stämme verschiedene Substrate im Fleisch als Nische besetzen und dominieren können. Wenn Stämme kombiniert werden, die unterschiedliche Nischen besetzen können, werden die autochtonen Bakterien unterdrückt. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Produktion von Bacteriocinen als klarer Wettbewerbsvorteil zur Etablierung einer stabilen Dominanz innerhalb der Rohwurst dient.

Auf Basis aller Ergebnisse des Projektes kann festgehalten werden, dass die Durchsetzungsfähigkeit von Starterkulturen im Wesentlichen multifaktoriell begründet ist

und nicht auf klar definierte Markergene zurückgeführt werden kann. Die Analysen ergaben eine hohe Biodiversität der Stämme und suggerierten zwei Möglichkeiten der Etablierung von Dominanz und Durchsetzungsfähigkeit. Generell scheint die Kombination von mehreren Startern vielversprechend zu sein. Ein Verfolgen von Stämmen auf Stammebene mittels MALDI-TOF-MS ist möglich und kann sowohl bei der Produktüberwachung und Qualitätskontrolle als auch zum Zweck der Identifizierung neuer Starterorganismen Verwendung finden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Unternehmen der Fleischwarenindustrie, Starterkulturenhersteller und Lebensmitteluntersuchung weisen überwiegend mittelständischen Charakter auf und gelten als kleine und mittelständische Unternehmen (KMU). Die fleischverarbeitende Industrie in Deutschland hat einen Jahresumsatz von ca. 15 Mrd. € mit Wachstumsraten im zweistelligen Bereich und ca. 80.000 Beschäftigten.

Die erzielten Ergebnisse sind gleichermaßen essentiell für die Existenzsicherung von Starterkulturenherstellern wie von Unternehmen der fleischverarbeitenden Industrie. Durch die neuen Möglichkeiten zur Verfolgung von Starterkulturen auf Stammebene während der Fermentation können Fehlchargen vermieden und Ausfälle durch Rückrufaktionen minimiert werden. MALDI-TOF-Massenspektroskopie kann als Kontrolle und Überwachungssystem fungieren und auch speziell für den Nachweis von Fehlorganismen genutzt werden. Die Qualität bestehender, aber auch neu gefundener Starterkulturen kann mittels der erarbeiteten Methoden beurteilt werden. Der Nutzen der Methode begründet sich darüber hinaus in einer nachweisbar höheren Sicherheit von Lebensmitteln, was von den Produzenten werbeteknisch für den Export genutzt werden kann und was ihre Wettbewerbsfähigkeit auf globalen Märkten sichert. Der Erkenntnisgewinn über Strategien der Durchsetzungsfähigkeit erlaubt eine Entwicklung neuer Stämme, was wiederum Chancen für Unternehmen birgt, sich zu diversifizieren, sichere Produkte in abgeänderter Form oder neue Produkte bzw. Produktlinien zu generieren.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht (2018).
2. Janßen, D., Dworschak, L., Ludwig, C., Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F.: Interspecies assertiveness of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei* in sausage fermentations. Intern. J. Food Microbiol. 11 (331) DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108689](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108689) (2020).
3. Janßen, D., Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F.: Monitoring of assertive *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* strains using an industrial ring trial experiment. J. Appl. Microbiol. 126 (2), 545-554 (2019).
4. Eisenbach, L., Geißler, A. J., Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F.: Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* supports the development of starter strain combinations. Microbiol. Res. 221, 1-9 (2019).
5. Janßen, D., Eisenbach L., Ehrmann, M. A. & Vogel, R. F.: Assertiveness of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in a fermented sausage model. Intern. J. Food Microbiol. 285, 188-197 (2018).
6. Eisenbach, L., Janßen, D., Ehrmann, M.A. & Vogel R. F.: Comparative genomics of *Lactobacillus curvatus* enables prediction of traits relating to adaptation and strategies of assertiveness in sausage fermentation. Intern. J. Food Microbiol. 286, 37-47 (2018).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Straße 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 125, 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 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.