

Gewinnung, Charakterisierung und Einsatz von Chitinasen aus kälteangepassten Bakterien zur Konservierung von flüssigen, halbfesten und festen Lebensmitteln - vor allem Backwaren

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	ttz Bremerhaven, BILB/EIBT Prof. Dr. Klaus Lösche/Sonja Guttmann
Forschungsstelle II:	Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven Prof. Dr. Karin Lochte/Dr. Elisabeth Helmke
Industriegruppe:	Verband Deutscher Großbäckereien e.V., Düsseldorf
	Projektkoordinator: Bart Sikken Bäckerei und Konditorei Gerhard Sikken OHG, Emden
Laufzeit:	2011 - 2013
Zuwendungssumme:	€ 418.500,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Eine Konservierung von Lebensmitteln wird zunehmend bedeutender, um vor allem die Verzehr-Sicherheit für die Verbraucher zu erhöhen, andererseits um auch den verlängerten Distributionswegen Rechnung tragen zu können. Neben klassischen Konservierungsverfahren werden mehr und mehr biologische Haltbarmachungsverfahren bzw. Verfahren eines sog. „bio-control“ in den Fokus der Überlegungen und Maßnahmen gerückt.

Bei physikalischen Verfahren können thermische und athermische Verfahren unterschieden werden, die jeweils produktspezifisch angewendet werden können. Derart produktbelastende Verfahren, die Hitze, Druck, Strahlung, Begasung mit Schutzgas sowie Kühlung oder Tiefgefrieren anwenden, minimieren oder verhindern ein mikrobielles Wachstum i.d.R. jedoch nicht, ohne weitere (z.T. unerwünschte) Veränderungen der Produktqualitäts Eigenschaften zu generieren.

Chemische Konservierungsmethoden verwenden natürliche und synthetische Konservierungsstoffe, wie z.B. Antioxidantien, Chelatbildner oder ähnliche Stoffe (Deklaration mittels E-Nummern,

z.B. Sorbaten, Propionaten, Acetaten, Geschmacksstoff auf Alkoholbasis). Der Einsatz vieler der o.g. traditionellen Konservierungsstoffe wird von den Verbrauchern zunehmend abgelehnt. Akzeptierte Alternativen, wie die „Natural Antimicrobials“ (z.B. Bacteriocine, Lactoferrin, Zimtaldehyd (Zimt)), sind jedoch überwiegend schlecht verfügbar, relativ unspezifisch, nicht ausreichend thermostabil und nicht ausreichend solubilisiert oder sie verändern Aroma und Geschmack des jeweiligen Produktes nachteilig.

Von mikrobiologischer Konservierung wird gesprochen, wenn Lebensmittel fermentiert werden, z.B. Sauerteig, Joghurt, Sauerkraut, Bier etc., oder ihnen z.B. eine Schutzkultur zugegeben wird.

Anhand der o.g. und vielfach aktuell eingesetzten Konservierungsverfahren wird deutlich, dass Bedarf an einem ‚natürlich‘ operierendem Konservierungsmittel besteht, welches nicht nur die Haltbarkeit verlängert, sondern gleichzeitig auch keine sensorischen oder qualitativen Nachteile mit sich bringt. Vor diesem Hintergrund kann durch den Einsatz von kälteangepassten Chitinasen ein Konservierungskonzept genutzt werden, bei dem ein Lebensmittel wenig aufwändig (oh-

ne komplexe Anlagentechnik) und nicht produkt-schädigend auch z.B. bei Raumtemperaturen mikrobiologisch haltbarer hergestellt und gelagert werden kann. Gleichermäßen liefert der Einsatz kälteangepasster Chitinasen oder kälteangepasster Enzyme allgemein die Möglichkeit, eine langanhaltende Frische und mikrobielle Haltbarkeit der Lebensmittel unter Kühl- und Raumtemperaturen zu generieren.

Die hydrolytische Desintegration namentlich von Zellwand-Bausteinen bei Schimmelpilzen (u.a. Chitin und β -Glucan) kann theoretisch durch den Einsatz von Chitinasen erfolgreich durchgeführt werden und so ein Wachstum dieser Verderbniserreger minimiert und/oder unterbunden werden. Die mikrobielle Haltbarkeit von Backwaren und anderen festen, halbfesten oder flüssigen Lebensmitteln wird i.d.R. durch unerwünschtes Schimmelwachstum limitiert, so dass durch Nutzung von kälteangepassten Chitinasen, die auch bei Raumtemperatur katalytisch wirksam sind, ein neuartiges Instrument eines „bio-control“ entwickelt werden kann.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, bakterielle, kälteaktive Chitinasen zu identifizieren, die einfach und preiswert zu produzieren sind und durch deren Zusatz eine Schimmelpilzentwicklung in Lebensmitteln verhindert werden kann.

Forschungsergebnis:

Chitinaseproduzierende Bakterienstämme aus den Polarmeeren konnten erfolgreich vom Alfred-Wegener-Institut für Polar und Meeresforschung (AWI) reaktiviert und auf Chitinaseaktivität getestet werden. Um aus der reaktivierten Stammkollektion geeignete antifungale Enzymproduzenten herauszufinden, wurden unterschiedliche Methoden zum schnellen Nachweis der Enzymaktivitäten sowie der Lyse von Schimmelpilzmyzel und -sporen entwickelt. Bei dem Screening zeigten insbesondere Grampositive Bakterien gute Chitinaseaktivität und ein deutliches antifungales Potential. Auf diese Gruppen fokussierten sich die weiteren Untersuchungen. Wegen des beachtlichen Anteils von β -Glucan in Pilzzellwänden wurde das Screening noch auf Stämme mit β -1,3-Glucanaseaktivität ausgeweitet. Der Versuch, sehr gute β -1,3-Glucanasebildner mit sehr guten Chitinasebildnern zu kombinieren, erbrachte allerdings nicht die erwartete deutliche Steigerung der antifungalen Aktivität.

Bei den in die engere Wahl gekommenen Stämmen wurde die Stabilität der Enzyme und die Möglichkeiten einer Steigerung der Enzymaktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass es kein generelles Verfahren für alle Stämme gibt. Bei den meisten Stämmen wirkte sich aber der Zusatz von Chitin positiv auf die Chitinaseausbildung und der Zusatz von Pilzmyzel positiv auf die Glucanaseausbildung aus. Eine Dosierung von Tween vor dem Abernten der Mikroorganismenkulturen steigerte bei einigen Stämmen ebenfalls die Chitinaseaktivität. Andererseits konnte der vermutete negative Einfluss des Abzentrifugierens und der Sterilfiltration auf die Enzymaktivitäten bei der Aufbereitung der Überstände nicht bestätigt werden. Das Aufkonzentrieren der Überstände mittels Ultrafiltration steigerte nicht nur die Enzymaktivitäten, sondern auch die antifungale Wirkung. Es ist daher davon auszugehen, dass die antifungale Wirkung hauptsächlich enzymatischen Aktivitäten und nicht Sekundärmetaboliten zuzuordnen ist.

Die unaufgereinigten in der späteren Phase des Projektes aufkonzentrierten Enzymsysteme wurden in zuvor entwickelten, mikrobiologischen Diagnostikverfahren (in vitro) der Forschungsstelle 1 auf antifungale Aktivität gegen ausgewählte Verderbniserreger geprüft. Hierbei zeigten die kälteangepassten, enzymaktiven Fermentationsüberstände sowohl im Agardiffusionstest als auch im Submersverfahren antifungale Aktivität, die im Gegensatz zu konventionell eingesetzten Konservierungsmitteln (Sorbinsäure) pH-unabhängig operieren. Besonders im Submersverfahren führte die Zugabe von kälteangepassten Fermentationsüberständen vergleichsweise zu einer geringeren Keimbelastung als unter Zugabe von konventionellen Konservierungsmitteln. Diese Analysen wurden durch weitere direkte Verfahren, wie Ecologenansätze, bei denen Pilzkultur und Enzymproduzent nur durch eine bakteriendichte Membran getrennt sind, ergänzt. Auch hier wurden sehr überzeugende antifungale Effekte erhalten wie auch bei den LIVE/DEAD-Untersuchungen. Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben ebenfalls deutliche Schädigungen der Pilzzellwände unter Einwirkung der antifungalen Bakterien und der Hefe *K. lactis*.

Um die antifungale Wirkungsweise der Chitinasen/ β -1,3-Glucanasen neben den mikrobiologischen Analysen in Lebensmitteln zu erfassen, wurden Modellsysteme von Kuchenmassen und Schnittbrot (mit verschiedenen pH-Werten), sowie ein Weizenvollkornbrot durch die For-

schungsstelle 1 entwickelt und intern standardisiert (in situ).

Die Brote wurden nach dem Backen und Auskühlen mit dem jeweiligen Konservierungsmittel besprüht und verschweißt gelagert. Bei den Massen wurde das jeweilige Konservierungsmittel zu der ungebackenen Masse homogen eingetragen und ebenfalls verschweißt gelagert. Diese o.g. Modellsysteme wurden nach unterschiedlichen Lagerdauern bei verschiedenen Temperaturen mikrobiologisch untersucht. Hierbei konnte der kälteangepassten Chitinase (resp. dem Fermentationsmedium) keine antifungale Aktivität zugeschrieben werden. Modellsysteme, denen kälteangepasste Fermentationsüberstände zugegeben worden sind, zeigten eine annähernd ähnliche Keimbelastung wie die Referenz, die ohne Zugabe eines Konservierungsmittels gelagert worden ist.

Die für die Modellsysteme eingesetzten Fermentationsüberstände waren nach Upscalingprozessen, nach unterschiedlichen Ansätzen zur Optimierung der Enzymaktivitätsproduktion, nach Versuchen zur geeignetsten Aufbewahrung bzw. Stabilisierung und nach Entwicklung einer geeigneten Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration produziert worden. Die in den Überständen befindlichen Chitinasen und Glucanasen wurden mit Hilfe von Zymogrammen und unterschiedlichen Aktivitätstests u.a. auch in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert charakterisiert. Dabei konnte bestätigt werden, dass eine Chitinase vom Stamm 1700 im optimalen pH-Bereich von 4,5 bis 5,5 die höchste Aktivität bei sehr niedrigen Temperaturen (4° bis 12°C) entwickelt. Das Aktivitätsoptimum einer Glucanase lag ebenfalls im niedrigen pH-Bereich, allerdings waren hier die optimalen Temperaturen höher.

Obwohl biochemische Charakterisierungen und mikrobiologische Analysen unter optimalen Bedingungen im Agardiffusionstest und im Submersverfahren (in vitro) vielversprechende Ergebnisse zur antifungalen Aktivität der kälteangepassten Chitinasen lieferten, konnten in den realen Backsystemen (Modelle – in situ) keine deutlich inhibierenden Reaktionen beobachtet werden. Demzufolge kann abgeleitet werden, dass in den untersuchten und mit enzymaktiven Fermentationsüberständen behandelten Modellsystemen von Brot und rohen Sandmassen eine zu geringe Aktivität an Chitinase und β -Glucanase einerseits zugänglich ist und

andererseits keine antifungalen Effekte festgestellt werden konnten.

In Lebensmitteln mit höheren Wassergehalten, wie z.B. Säften oder Sauermilchprodukten, könnten diese Enzyme möglicherweise eine bessere Aktivität entwickeln. Vor diesem Hintergrund erscheint namentlich eine Optimierung des Produktions- und vor allem des Aufreinigungsverfahrens notwendig, um kälteangepasste antifungale Enzymaktivitäten zu generieren. Offenbar sind chitinolytische Aktivitäten allein nicht ausreichend, um erwünschte und ausreichend lytische Wirkungen zu erzielen. Es bedarf offenbar immer auch einer β -Glucanase-Aktivität in Gegenwart eine Chitinase, um ggf. dementsprechend technische Enzymsysteme als effektives Konservierungsmittel im Rahmen eines „bio-control“ wirtschaftlich nutzen zu können.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Das Backwarengewerbe in Deutschland ist mittelständisch geprägt. Neben rund 16.500 handwerklichen Bäckereien bestimmen ca. 60 mittelgroße industrielle Bäckereien und nur 4 große Betriebe die Brotherstellung. Insgesamt sind ca. 135.000 Beschäftigte im Backgewerbe tätig, der Jahresumsatz der Branche beträgt ca. 15 Mrd. €. Die ca. 40 Hersteller von Backgrundstoffen für das Backgewerbe beschäftigen ca. 8.000 Mitarbeiter und erwirtschaften einen Jahresumsatz von ca. 1,5 Mrd. €. Die Zahl der Handwerksbäckereien sinkt seit Jahren deutlich, während die Zahl von Bake-Off-Stationen in Supermärkten und Selbstbedienungsbäckereien im Niedrigpreissegment zunimmt.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes konnten erste wichtige Grundbausteine gelegt werden, um zu klären, inwieweit kälteaktive, antifungal wirksame Enzymsysteme, wie Chitinase, als Konservierungsmittel industriell einsetzbar sind. Nach weiteren Untersuchungen und/oder Modifikationen und finaler Implementierung der kälteangepassten Chitinase für kommerzielle Lebensmittel-Produkte, könnten Backwarenproduzenten durch Einsatz kälteaktiver Enzyme, wie Chitinasen, ihre Waren länger haltbar und hygienisch und toxikologisch sicherer lagern und anbieten. Ein vorzeitiger mikrobieller Verderb könnte so minimiert werden, die Qualitätsmerkmale einer Ware würden erhöht und einer Vernichtung von Lebensmittel könnte entgegengewirkt werden. Der Anteil an verschimmeltem Brot u.a.m. würde sich reduzieren. Mit qualitativ besseren und umweltfreundlicher produzierten Produkten

könnten insbesondere kleine und mittelständische Unternehmen der Konkurrenz der Supermarkt- und Discounter-Produkte besser standhalten. Durch die verlängerte Haltbarkeit bestünde außerdem die Möglichkeit, handwerkliche Produkte besser überregional zu vertreiben und damit neue Märkte zu erschließen. Eine Umsatzsteigerung wäre möglich, zumal teure Neuanschaffungen von Geräten oder Einrichtungen zur Etablierung der Methode nicht nötig sind. Dieses könnte sich auch auf die Preiskalkulation und auf die Wettbewerbsfähigkeit auswirken. Wettbewerbsvorteile ergeben sich nicht nur bei verpackten Lebensmitteln, wie Schnittbrot, die im sauren pH-Wertbereich liegen, noch größere Marktvorteile sind bei solchen Produkten zu erwarten, die im neutralen und leicht basischen pH-Bereich liegen, wo Sorbinsäure und Propionsäure unwirksam sind, oder nur noch in sehr hohen Konzentrationen wirken. Wettbewerbsvorteile sind auch bei Toastbrot, Hamburger Buns o.ä. zu erwarten, deren Verpackungen u.a. mit Alkohol mikrobiell haltbar gemacht werden. Dieses ist eine ernährungsphysiologisch kritisch zu betrachtende Methode, die auf absehbare Zeit nicht mehr zulässig sein wird. Nach aktuellem Stand der Technik stehen bisher keine praktikablen Alternativen zur Verfügung, so dass der Einsatz kalteaktiver Chitinasen ein aussichtsreicher Weg wäre. Auch Produzenten von Kühlprodukten hätten mit dem neuen Konservierungssystem Wettbewerbsvorteile, denn Unterbrechungen der Kühlkette (+ 8°C) bei Kühlprodukten, wie z.B. Brotaufstrich, führen zu kostspieligen Ausfällen. Mit kalteaktiver Chitinase versehene Kühlprodukte würden eine kurzfristige Erwärmung ohne Schaden überstehen, da die Chitinasen auch bei Raumtemperatur aktiv bleiben.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI Schlussbericht 2013.
2. Guttman, S., Lademann, T., Neumann, S., Ringer, R., Willers, S., Helmke, E. und Lösche, K.: Einsatz von kalteangepassten Chitinasen zur Konservierung von Brot- und Backwaren. Brot Backw. 2, 50-53 (2014).
3. Guttman, S., Neumann, S., Ringer, R., Helmke, E. und Lösche, K.: Use of enzymes to preserve baked products. Baking biskuit 2, 70-73 (2014).

Weiteres Informationsmaterial:

ttz Bremerhaven, BILB – EIBT
Am Lunedeich 12, 27572 Bremerhaven
Tel.: +49 471 97297-12
Fax: +49 471 97297-22
E-Mail: loesche@ttz-bremerhaven.de

Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven
Tel.: +49 471 4831-1460
Fax: +49 471 4831-1425
E-Mail: ehelmke@awi-bremerhaven.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 9079699-9
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.