

Präzise und vereinfachte Identifizierung von mikrobiellen FTIR-Spektren zur Qualitätssicherung in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Forschungsstelle I:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung Abt. Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. S. Scherer/Dr. H. Seiler
Forschungsstelle II:	Technische Universität München Lehrstuhl für Fluidmechanik und Prozessautomation, Freising-Weihenstephan Prof. Dr. A. Delgado/Dr. T. Becker
Forschungsstelle III:	Universität Erlangen-Nürnberg Institut für Chemie- und Bioingenieurwesen, Lehrstuhl für Strömungsmechanik Prof. Dr. A. Delgado/Dr. R. Benning
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V., Bonn Projektkoordinatoren: R. Beduhn, J. Bauer GmbH & Co. KG, Wasserburg Dr. W. Jung, Hochland AG, Heimenkirch
Laufzeit:	2005 – 2007
Zuwendungssumme:	€ 327.900,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Die in der Lebensmittelindustrie für die Qualitätssicherung erforderliche Identifizierung von Mikroorganismen ist nach wie vor arbeitsaufwändig, teuer und speziell für Analysen ganzer Populationen mit erheblichem Aufwand verbunden. Die FTIR-Spektroskopie hat sich deshalb in den letzten Jahren zunehmend als kostengünstige und flexible Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen etabliert, wobei die Genauigkeit der Identifizierung eng mit dem angewandten Klassifizierungssystem verknüpft ist. Hier liegt noch eine Schwäche dieser Methode. Durch eine Optimierung der Algorithmen zur Spektrenauswertung könnte die Präzision der Identifizierung entscheidend verbessert und damit die Leistungsfähigkeit und Akzeptanz der Methode in der Industrie noch signifikant gesteigert werden.

Grundlage des Projektes sind die zwei von der Forschungsstelle 1 genutzten methodischen Varianten der FTIR-Spektroskopie: die konventionelle Spektroskopie identifiziert Mikroorganismen nach vorheriger Isolation, die FTIR-Mikrospektroskopie ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse ganzer Populationen ohne vorherige Isolation der Organismen.

Ziele des Forschungsvorhabens waren die Entwicklung künstlicher neuronaler Netze (KNN) zur vereinfachten und präzisierten Identifizierung von Mikroorganismen mit konventioneller FTIR-Spektroskopie in lebensmittelmikrobiologischen Anwendungen und die Ausweitung der Methode auf derzeit noch nicht identifizierbare, lebensmittelrelevante Mikroorganismen-Spektren sowie die Populationsanalyse eines ausgewählten mikrobiellen Käse-Reifungskonsortiums als Modellprojekt für nachfolgende Industrieapplikationen.

Forschungsergebnis:

Drei Gruppen von Mikroorganismen wurden im Zuge der Erstellung von KNN bearbeitet: Hefen, Enterobakterien und Milchsäurebakterien. Für Hefen und Milchsäurebakterien wurden KNN erstellt, die in der Validierung mit unabhängigen Daten mit 97,5 % bzw. 94 % eine ausgezeichnete Genauigkeit erzielten. Ferner konnte erreicht werden, Gruppen engverwandter Arten, die zuvor nicht differenziert werden konnten, zuverlässig zu trennen. Die so erhöhte Akkuratess ermöglichte zudem eine Erweiterung des Artenspektrums in der Referenzdatenbank. Da allerdings trotz dieser Erweiterung nicht alle bekannten und beschriebenen Arten abgedeckt werden konnten, wurde ein auf statistischen Methoden basierendes Verfahren zur Erkennung unbekannter Arten bzw. deren Spektren entwickelt. Durch die Kombination von Hauptkomponentenregression, Partial Least Squares Regression, Support Vector Machines und Fuzzy-Logik konnten durch einen hybriden Ansatz 92 % bis 98 % der unbekanntes Spektren aussortiert werden.

Für Enterobakterien war es nicht möglich, ein KNN zu trainieren, da hier die taxonomischen und biologischen Limitierungen keine klare Strukturierung zuließen, die jedoch eine Grundvoraussetzung für die Konzeption neuronaler Netze ist. Nichtsdestotrotz wurde im Projektverlauf eine Methode zur eindeutigen Identifizierung von Enterobakterien auf molekularbiologischer Basis etabliert, mit der alle Referenzstämme überprüft wurden.

Die Anwendung der FTIR-Mikrospektroskopie erfolgte am Monitoring der Entwicklung einer Starterkultur für Emmentaler Käse über die Säuerung und Reifung. Nach Adaption der Referenzdatenbank an die eingesetzte Starterkultur ergab die Analyse des Populationsverlaufes auf Artebene sehr präzise Ergebnisse, die in nur einem Bruchteil der Zeit erarbeitet werden konnten, der üblicherweise für Analysen dieses Umfangs benötigt wird.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die mikrobiologische Qualitätssicherung ist ein wesentlicher Faktor, der zum Erfolg eines Lebensmittelherstellers beiträgt. Die jährlichen Kosten hierfür liegen im fünf- bis sechsstelligen Bereich. Die FTIR-Spektroskopie stellt eine Methode zur physiko-chemischen Identifizierung von Mikroorganismen dar und hat den großen Vorteil, nur sehr geringe laufende Kosten zu

verursachen, die nur einen Bruchteil dessen betragen, was für alternative, im Routinebetrieb eines kleinen oder mittleren Unternehmens einsetzbare Techniken veranschlagt werden muss. Bei der Vielzahl der notwendigen Identifizierungen in der Lebensmittelindustrie besteht mit dieser Methode das Potential erheblicher Kostenreduktionen.

Die Methode gestattet auch, betriebseigene Isolate und Mikroorganismen als Referenzen in die Datenbanken zu integrieren, um somit ein maßgeschneidertes System zur Identifizierung von Hefen und Bakterien zu generieren. Die genaue Kenntnis und Dokumentation der Flora eines Betriebes kann von sehr großem Wert sein, wenn es bei Kontaminationsroutenanalysen gilt, den Herd einer Kontamination schnellstmöglich zu entdecken.

Die Tatsache, dass die FTIR-Spektroskopie bereits in milchwirtschaftlichen Untersuchungslaboratorien eingesetzt wird, ermöglicht auch kleinen Unternehmen, die sich kein eigenes Spektrometer anschaffen können oder wollen, die Nutzung der Methode.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2007.
2. Wenning, M., Büchl, N. und Scherer, S.: Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Biophoton* 3, 493-505 (2010).
3. Kessler, B., Benning, R., Wenning, M., Schmitt, J., Scherer, S. und Delgado, A.: Entwicklung eines hybriden Klassifizierungstools zur Identifizierung von Mikroorganismen mittels FTIR-Spektren. *Chemie Ingenieur Technik* 9, 1234 (2009).
4. Büchl, N.R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H. und Scherer, S.: Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier transform infrared spectra. *Yeast* 25, 787-798 (2008).
5. Wenning, M., Seiler H. und Scherer S.: Auch Bakterien haben Fingerabdrücke. *DMZ* 128 (12), 24-27 (2007).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und
Lebensmittelforschung, Abt. Mikrobiologie
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising-Weihenstephan
Tel.: 08161/71-3516, Fax: 08161/71-4492
E-Mail: siegfried.scherer@wzw.tum.de

Universität Erlangen-Nürnberg
Institut für Chemie- und Bioingenieurwesen
Lehrstuhl für Strömungsmechanik
Cauerstrasse 4, 91058 Erlangen
Tel.: 09131/85-29500, Fax: 09131/85-29503
E-Mail: adelgado@Istm.uni-erlangen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:

