

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

## Sachbericht zum Teilprojekt 2 des Verbundprojekt AMPLIFY

Laura Teichmann, Juliane Kretzschmar, Maike Berssen, Tobias Neddermann

<b>Zuwendungsempfänger:</b> Frutarom Production GmbH jetzt NovaTaste Production GmbH Projektleiter: Dr. Tobias Neddermann	<b>Förderkennzeichen:</b> 031B0826B
<b>Vorhabenbezeichnung:</b> AMPLIFY – Pipeline und Zellfabriken zur Identifikation und Produktion neuer antimikrobieller Peptide <b>Teilprojekt 2 (Frutarom):</b> Screening	
Laufzeit des Vorhabens:	01.02.2020 – 30.04.2023

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B0826B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor

## **Teil 1: Kurzbericht**

### **1.1 Ursprüngliche Aufgabenstellung, wissenschaftlicher und technischer Stand**

Bacteriocine sind antimikrobielle Peptide (AMPs), die natürlicherweise von einer Reihe von Bakterien produziert werden. Aufgrund ihrer Aktivität gegen pathogene und lebensmittelverderbende Organismen besitzen AMPs hohes kommerzielles Potenzial als Konservierungsmittel in Lebensmitteln und Getränken oder als Ersatz von Antibiotika in Futtermitteln und Tiernahrung. Allerdings ist Nisin derzeit das einzige industriell produzierte und im Lebensmittelbereich als Konservierungsmittel zugelassene AMP auf dem Markt. In den letzten Jahren wurden eine Reihe neuer AMPs mit potenter Wirkung gegen verschiedene Bakterien isoliert und charakterisiert. Die Nutzung des vollen kommerziellen Potenzials neuer AMPs und die Ausweitung des Marktes auf pharmazeutische Anwendungen werden jedoch momentan noch durch unrentable Produktions- und Reinigungsprozesse eingeschränkt. Ziel des Projektes AMPLIFY ist daher die Entwicklung einer integrierten Pipeline zur Identifizierung, Charakterisierung und der wirtschaftlichen und nachhaltigen Produktion von natürlich vorkommenden AMPs. Das Gesamtkonzept umfasst die Generierung von AMP-Sensorstämmen und rekombinanten mikrobiellen Zellfabriken unter Verwendung der synthetischen Biologie sowie die Verbesserung der Produktionsprozesse mit natürlichen und rekombinanten Produktionsstämmen.

### **1.2 Ablauf des Vorhabens**

Insgesamt wurde das Projekt AMPLIFY in fünf miteinander verknüpfte und voneinander abhängige Teilprojekte an vier Standorten durchgeführt. Im Teilprojekt 1 (Universität Ulm) wurden AMP-Sensorstämme relevanter humanpathogener und nicht-pathogener Lebensmittelkeime, die pH-sensitive Proteine exprimieren, generiert. Über die ratiometrischen Fluoreszenz-Eigenschaften dieser Proteine liefern die hergestellten Sensorbakterien sofortige Information über eine Schädigung von Membran und pH-Homöostase durch AMPs. Mit Hilfe dieser Sensorbakterien wurden in Teilprojekt 2 Verfahren zum Hochdurchsatz-Screening etabliert und dazu verwendet, die Sammlung an Starterkulturen des Industriepartners IFF-Frutarom, jetzt NovaTaste auf neue AMP-produzierende Kandidaten zu durchsuchen und die identifizierten Kandidaten zu charakterisieren. Parallel dazu werden rekombinante Zellfabriken des biotechnologischen Plattform-Organismus *Corynebacterium glutamicum* für die großtechnische, wirtschaftliche und nachhaltige Produktion von AMPs generiert (Teilprojekt 3, Universität Ulm). Teilprojekt 4 (Forschungszentrum Jülich) widmete sich der Analyse und Optimierung der Prozesse zur Produktion von AMPs mit natürlichen und rekombinanten Produktionsstämmen. Gleichzeitig erlaubte der Einsatz der oben beschriebenen Sensorbakterien die Etablierung eines Workflows zur Messung der Titer der AMPs während der fermentativen Produktion sowie die Messung der Qualität und Aktivität der Produkte nach Aufreinigung. In neu entwickelten Microfluidic-Systemen können diese Sensorbakterien verwendet werden, um die Effekte der produzierten AMPs auf Produktions- und Zielorganismen auf Einzelzellebene zu untersuchen (Teilprojekt 5, Universität Bielefeld, UBIE).

### **1.3 wesentliche Ergebnisse**

Im vorliegenden Abschlussbericht werden hauptsächlich die Ergebnisse des Teilprojekts 2 dargelegt. Allerdings erforderte das Projekt über die gesamte Laufzeit ein hohes Maß an Kooperation zwischen den Partnern. Daher wird im Bericht, soweit aufgrund der durchgeführten Arbeiten angebracht und für das Verständnis der Ergebnisse des Teilprojekts

2 nötig, auch auf Ergebnisse anderer Teilprojekte eingegangen.

In Teilprojekt 2 wurde zunächst eine projektbezogene Stammsammlung etabliert, die aus geeigneten Stämmen für die Suche nach neuen AMPs bestand und ca. 400 Stämme und über 10 verschiedene Species umfasste. Für jeden Stamm wurden geeignete Kultivierungsbedingungen gefunden und zellfreie Überstände für ein anschließendes Screening erzeugt.

In Arbeitspaket 1.2 des Projektpartners Universität Ulm wurde mithilfe von Biosensoren eine Plattform für Hochdurchsatz-Screenings im Mikrotiterplatten-Format sowie mittels Durchflusszytometrie etabliert, die in Arbeitspaket 1.3 verwendet wurde, um mit mehreren Biosensoren die in Teilprojekt 2 produzierten Überstände von ca. 400 Stämmen der Sammlung von IFF Frutarom (jetzt NovaTaste) auf mögliche AMPs zu durchmustern. Parallel dazu wurde in Teilprojekt 2 mit etablierten Methoden nach möglichen AMPs gesucht. Dabei wurde ein sehr umfangreiches Screening mittels Agar Drop Test einem Screening mittels Well-Diffusion Assay vorgeschaltet.

Nach ausgedehnten Primär und Sekundär-Screenings konnten so ca. 20 Kandidaten identifiziert werden, deren Genome zur Identifikation der entsprechenden Gencluster für die Produktion von AMPs in Teilprojekt 3 des Universitätspartners Ulm sequenziert wurden. In Teilprojekt 2 erfolgte währenddessen eine Charakterisierung der natürlichen Produzenten der gefundenen AMPs. Dabei wurden wesentliche funktionelle Eigenschaften der Mikroorganismen erfasst und verglichen, um eine mögliche Eignung für den Einsatz in Lebensmitteln zu prüfen und deren Sicherheit zu gewährleisten.

Um diesen Aspekt weiter zu vertiefen, wurden mit den identifizierten Kandidatenstämmen Untersuchungen in einem Lebensmitteltestsystem durchgeführt und ihre Hemmwirkung gegen Listerien näher charakterisiert. Gleichzeitig wurde auch auf die grundlegenden Eigenschaften von Starterkulturen in Lebensmitteln geachtet.

Im letzten Arbeitspaket des Teilprojekt 2 fand ein Upscaling vom ursprünglichen Reagenzglas Maßstab in einen 2L Laborbioreaktor statt, um erste Hinweise auf einen kontrollierten Bioprozess zur Produktion dieser Mikroorganismen zu erhalten. Dabei wurde sowohl die Fermentation als auch ein anschließendes downstream processing untersucht.

Im Wesentlichen konnten die im Arbeitsplan dargelegten Ziele des Teilprojektes 2 erfolgreich und im Rahmen der Zeitplanung erreicht werden.

## **Teil 2: Darstellung der durchgeführten Arbeiten und erzielten Ergebnisse**

### **2.1 Arbeitsplan**

Im durchgeführten Projekt sollte eine integrierte Pipeline zur Identifikation, Charakterisierung und ökonomischen und nachhaltigen Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) entwickelt werden. Mithilfe aktueller, molekulargenetischer Methoden werden AMP-Sensorstämme relevanter humanpathogener und nicht-pathogener Ersatzstämme, die pH-sensitive Proteine exprimieren, generiert. Über die ratiometrischen Fluoreszenz-Eigenschaften dieser Proteine liefern die hergestellten Sensorbakterien sofortige Information über eine Schädigung von Membran und pH-Homöostase durch AMPs. Mithilfe dieser Sensorbakterien werden Verfahren zum Hochdurchsatz-Screening für die Identifikation neuer AMP-produzierender Bakterien etabliert (Teilprojekt 1, Universität Ulm). Mit diesen Hochdurchsatzverfahren werden Stammbanken von Frutarom-IFF (jetzt NovaTaste) auf neue AMP-produzierende Kandidaten durchsucht und die identifizierten Kandidaten charakterisiert (Teilprojekt 2, Frutarom). Parallel dazu werden rekombinante Zellfabriken des biotechnologischen Plattform-Organismus *Corynebacterium glutamicum* für die großtechnische, wirtschaftliche und nachhaltige Produktion von Garvicin Q und anderen, neuartigen AMPs generiert (Teilprojekt 3, Universität Ulm). Die Prozesse zur Produktion von AMPs mit natürlichen und rekombinanten Produktionsstämmen werden mittels Multiomics-Profilings analysiert und optimiert (Teilprojekt 4, Forschungszentrum Jülich). Gleichzeitig erlaubt der Einsatz der oben beschriebenen Sensorbakterien die Titer der AMPs online während der fermentativen Produktion sowie die Qualität und Aktivität der Produkte nach Aufreinigung zu messen. In neu entwickelten Microfluidic-Systemen können diese Sensorbakterien verwendet werden, um die Effekte der produzierten AMPs auf Produktions- und Zielorganismen zu untersuchen (Teilprojekt 5, Universität Bielefeld).

### **2.2 wissenschaftlich-technische Ergebnisse**

Im vorliegenden Abschlussbericht werden hauptsächlich die Ergebnisse des Teilprojekts 2 dargelegt. Allerdings erforderte das Projekt über die gesamte Laufzeit ein hohes Maß an Kooperation zwischen den Partnern. Daher wird im Bericht, soweit aufgrund der durchgeführten Arbeiten angebracht und für das Verständnis der Ergebnisse des Teilprojekts 2 nötig, auch auf Ergebnisse anderer Teilprojekte eingegangen.

#### **2.2.1: Produktion von Überständen für das HTS**

Um Überstände von Bakterienstämmen produzieren zu können, mussten die Stämme zuvor von der Stammsammlung zum Forschungsstandort nach Holdorf überführt werden. Die für das AMPLIFY Projekt wichtigen potenziellen AMP Produzenten wurden in einer neuen AMPLIFY Stammsammlung neu organisiert. Jedem Stamm der AMPLIFY Stammsammlung wurde eine AMPLIFY Stammnummer zugeordnet. Die Tubes wurden mit Cryo-stabilen Labels gekennzeichnet, sodass im weiteren Verlauf des Projekts alle Projektpartner über die AMPLIFY Stammnummer kommunizieren können. Um einen Überblick über die Vielfalt der Stammsammlung zu bekommen, wurde diese in Punkt 2.2.4. näher analysiert.

Um zu gewährleisten, dass sich die antimikrobielle Aktivität von Überständen nicht im Laufe der Lagerdauer und vor allem in Folge von mehrfachem Auftauen und Einfrieren verändert, wurden Stabilitätstests mit dem Überstand des Pediocin PA-1 Produzenten *Pediococcus acidilactici* durchgeführt. Hierfür wurde der Überstand über einen Zeitraum von 8 Wochen

mehrmals aufgetaut und eingefroren, mit Druckluft behandelt und die antimikrobielle Aktivität des Pediocins gegenüber *Listeria innocua* im Well-Diffusion Test untersucht. Es konnte keine Reduktion der antimikrobiellen Aktivität beobachtet werden, sodass im weiteren Verlauf keine Aliquots erstellt werden mussten.

Für die Produktion der Überstände wurde das bisher eingesetzte kommerzielle MRS Medium optimiert. Mit Hilfe von Titrationsversuchen wurde untersucht, wie viel Phosphatpuffer benötigt wird, um eine optimale Pufferkapazität bei pH 6,2 zu erlangen. Schließlich wurden dem MRS Medium 88 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zugesetzt, um den pH der Überstände im Nachhinein optimal mit 6M NaOH einstellen zu können, ohne das Volumen stark zu verändern.

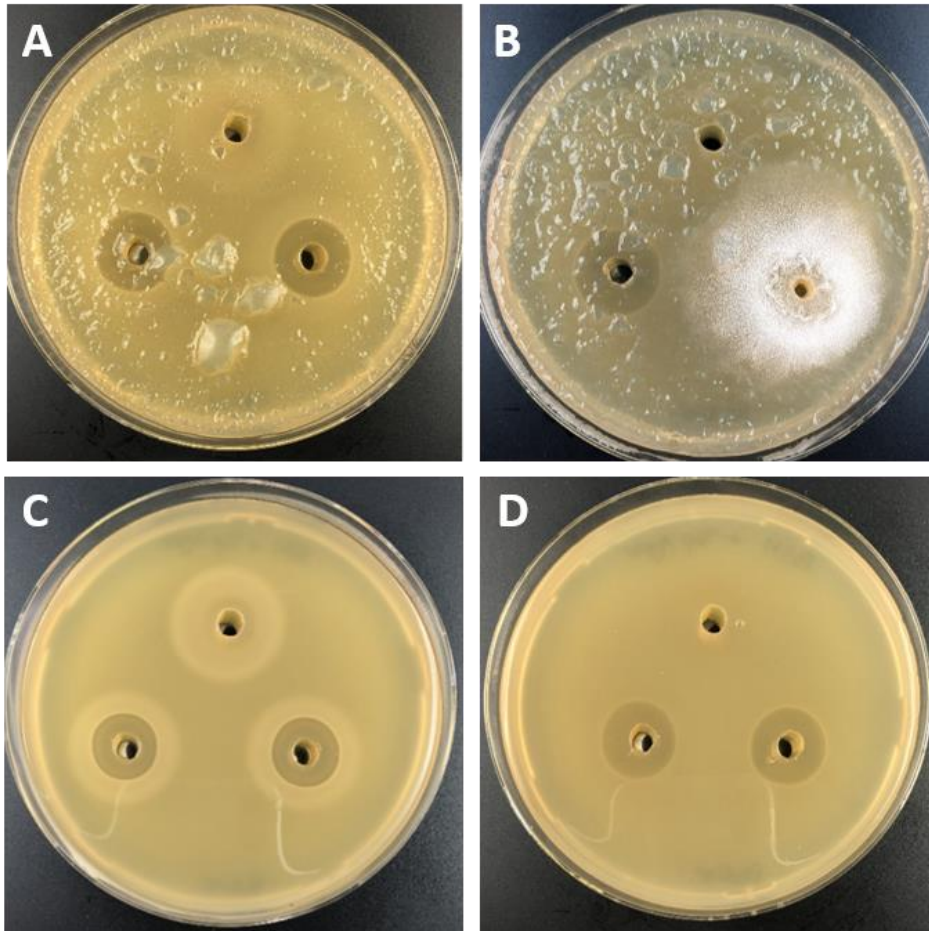
Die potenziellen Produzenten wurden in 30 ml MRS bei 30°C für 48h inkubiert, die  $\text{OD}_{600}$  gemessen, abzentrifugiert und anschließend der Überstand auf pH 6,2 eingestellt und hitzeinaktiviert. Die Überstände wurden dann in 2 x 15 ml Falcons überführt und in ein Pappboxensystem geordnet, sodass Teilprojekt 1 (Universität Ulm) und Teilprojekt 2 jeweils den gleichen Satz Proben lagern können. Die Überstände wurden dem Partner in Teilprojekt 1 auf Trockeneis zur Verfügung gestellt.

Im Laufe des Projekts konnten alle 395 Überstände produziert werden. Die Zugabe von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zum MRS Medium schien im weiteren Verlauf keinen Vorteil zu haben, weshalb nur die ersten 72 Produzentenstämme mit diesem Medium produziert wurden. Alle weiteren Stämme wurden standardmäßig zunächst mit MRS Medium für 24h kultiviert. Konnte kein Wachstum beobachtet werden, wurde die Inkubationszeit verlängert, die Inkubationstemperatur auf 37°C erhöht oder auf MRSSH Flüssigmedium gewechselt.

Die pH Neutralisierung wurde vereinfacht, um dem Hochdurchsatz Screening gerecht zu werden. Hierbei wurde anhand der  $\text{OD}_{600}$  eine angepasste Menge NaOH zugegeben. Dies wurde zuvor mit Hilfe einer Testreihe bestimmt und optimiert. Nach der pH Neutralisierung wurde der pH-Wert mithilfe von pH Teststreifen überprüft und der abgelesene Wert ebenfalls notiert. Lag der pH-Wert nicht zwischen 5,5 und 7,5 wurde dieser korrigiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung (15 Min, 80°C) und die Überführung in 2 x 15ml Falcontubes, um die Überstände lagern und auf Trockeneis dem Projektpartner in Teilprojekt 1 zusenden zu können.

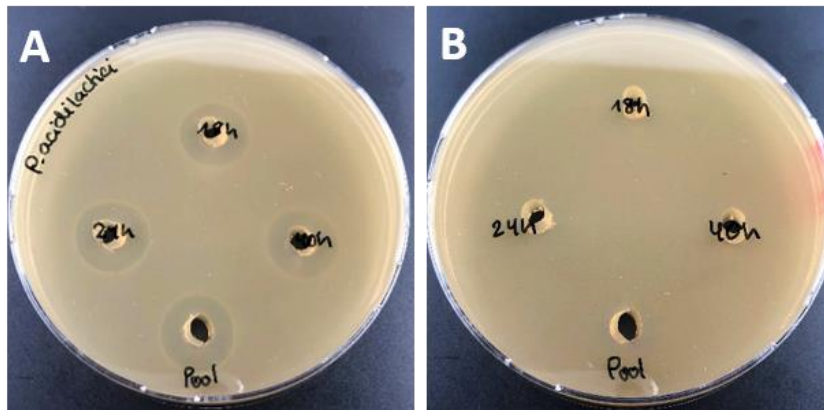
### **2.2.2: Klassisches Screening der Überstände**

Um die Überstände, die in 2.2.1 produziert wurden, auf die Aktivität von antimikrobiellen Peptiden zu untersuchen, sollten die Überstände in einem Well-Diffusion Test eingesetzt werden. Die Methode wurde zunächst in Hinblick auf die verwendeten Medien optimiert. Es konnte beobachtet werden, dass sich BSM Agar (Tichaczek *et al.* 1992) als Screeningmedium für antimikrobielle Aktivität besser eignet als üblicherweise verwendeter BHI-Agar (Abbildung 1). Es wurde zudem festgestellt, dass für das Überschichten der Listerien das Handling mit 7 ml Top Agar (0,2% Glucose, 0,7% Agar) einfacher ist als mit BHI-Top Agar (Abbildung 1). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Hemmhof am deutlichsten zu erkennen ist, wenn 100 µl einer *Listeria innocua* Übernachtkultur (16h) für die Inokulation des Top Agars verwendet werden. Eine stärker verdünnte *L. innocua* Kultur führte nicht zu deutlicheren oder größeren Hemmhöfen. Die Optimierung der Methode wurde mit dem aktiven Überstand des Pediocin PA-1 Produzenten *P. acidilactici* durchgeführt.



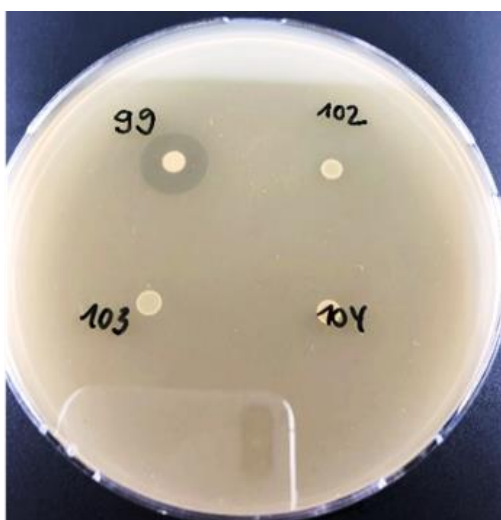
**Abbildung 1: Medienoptimierung des Well-Diffusion Tests.** BHI Agar plus BHI Softagar (A), BSM plus BHI Softagar (B), BHI Agar plus Top Agar (C), BSM plus Top Agar (D). In das obere Well wurde als Kontrolle jeweils MRS Medium gegeben. In die beiden unteren Wells wurde Überstand des Pediocin PA-1 Produzenten *P. acidilactici* gegeben.

Leider konnte im Well-Diffusion Test zunächst nur antimikrobielle Aktivität mit Pediocin dargestellt werden. Für andere Bakteriocine wie Sakazin konnten kein Hemmhof gezeigt werden. Es wurde getestet, ob verschiedene Erntezeitpunkte zu antimikrobiell aktivem Überstand führen. Hierbei sollten möglichst verschiedene Wachstumsphasen eines Sakazinproduzenten abgedeckt werden, um zu überprüfen, ob Sakazin möglicherweise nur in der exponentiellen oder nur in der stationären Phase gebildet wird. Hiermit kann auch gezeigt werden, ob Sakazin in einer späten exponentiellen Phase wieder abgebaut oder inaktiviert wird. Dies führte allerdings zunächst nicht zum Erfolg (Abbildung 2). Ob die Zugabe von 88 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  die antimikrobielle Aktivität des Sakazins beeinträchtigt oder gar die Bildung des AMP beeinflusst, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss weiterer Medien auf die AMP Produzenten und die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden getestet werden.



**Abbildung 2: Aktivität von Pediocin und Sakazin im Well-Diffusion Test.** Es wurden Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten (18h, 24h, 40h) zum Einen von einem Pediocin Produzenten (A) und zum Anderen von einem Sakazin Produzenten (B) genommen. Außerdem wurden die Proben der verschiedenen Zeitpunkte als Probenpool aufgetragen.

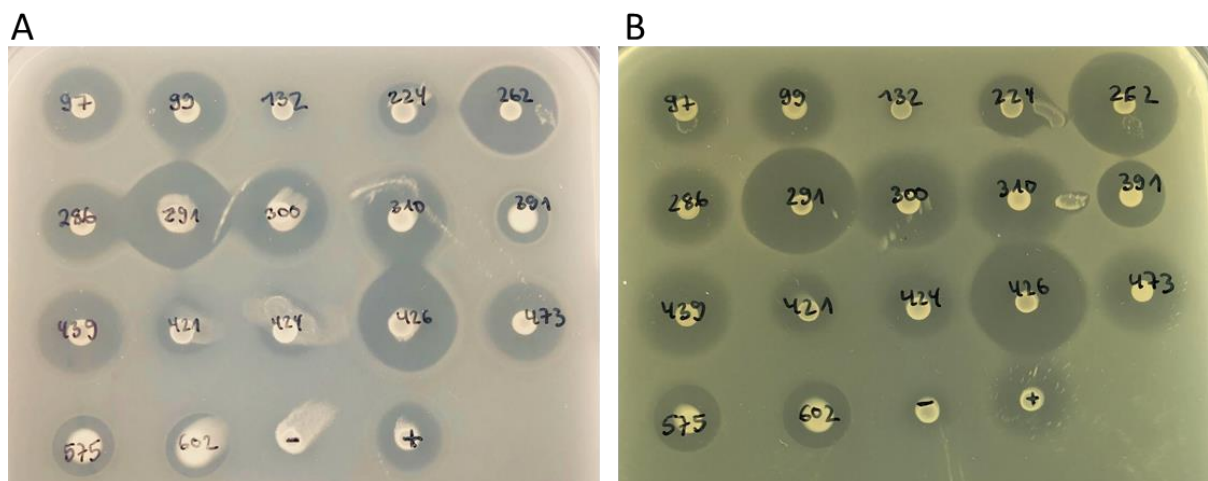
Als Alternative zum Well-Diffusion Test konnte allerdings eine weitere Screeningmethode entwickelt werden. Beim Agar-Drop Screening kann die antimikrobielle Aktivität einer wachsenden Kultur durch einen Hemmhof sichtbar gemacht werden (Abbildung 3). Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass der Produzent auf der BSM Agarplatte alle Wachstumsphasen durchläuft und das antimikrobielle Peptid ungehindert gebildet werden kann, ohne dass die Kultur zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt und geerntet werden muss. Dieses Screening ist methodisch schneller und einfacher im Handling und sollte genutzt werden, um erste AMP Produzenten in der Stammsammlung zu finden. Zuerst wurde diese Methode mit *L. innocua* als Sensorstamm durchgeführt. Mithilfe dieses Hochdurchsatzscreenings konnten in einem ersten Ansatz 56% der AMPLIFY Stammsammlung gescreent werden. Von diesen wurden 4% als AMP Produzenten identifiziert, das entspricht zunächst etwa 2% AMP Produzenten in der ganzen AMPLIFY Stammsammlung.



**Abbildung 3: Agar Drop Screening von 4 verschiedenen Stämmen.** Die Probe 99 zeigt einen klaren Hemmhof.

Wenn mithilfe des Well-Diffusion Tests sichergestellt werden konnte, dass antimikrobielle Substanzen im Überstand technisch nachgewiesen werden können, sollte außerdem ein Hochdurchsatzscreening mithilfe eines Mikrotiterplatten Lesegerätes durchgeführt werden. Hierbei kann nicht nur eine totale Inhibition des Zielorganismus dargestellt werden, sondern bereits eine Wachstumsverzögerung sichtbar gemacht werden.

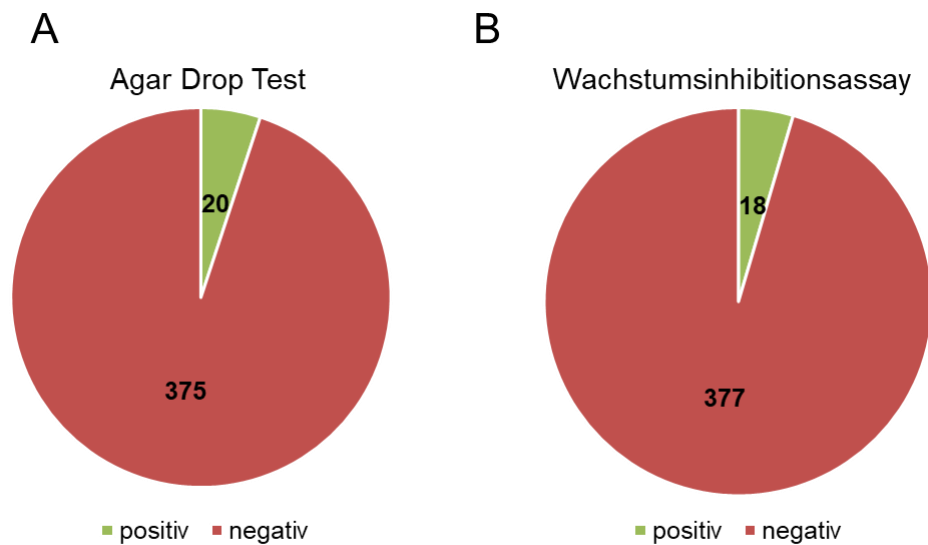
Um die Frutarom Stammsammlung mithilfe einer Hochdurchsatz Methode nach AMP Produzenten gegen *Listeria* zu screenen, wurde schließlich der Agar-Drop Test ausgewählt. Der Vorteil bei dieser Methode gegenüber dem Well-Diffusion Test ist, dass der AMP Produzent auf der BSM Agarplatte (Tichaczek *et al.* 1992) alle Wachstumsphasen durchläuft und das antimikrobielle Peptid ungehindert gebildet werden kann, ohne dass die Kultur zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt und geerntet werden muss. Die Methode wurde dahingegen optimiert, dass ein wenig Material aus der -80°C Glycerin-Kultur direkt auf das Screening Medium (Tichaczek *et al.* 1992) gegeben wurde. Hierbei konnte eine zusätzliche Vorkultur umgangen werden, sodass am nächsten Tag der entsprechende *Listeria* Stamm mit dem Top-Agar (0,2% Glucose, 0,7% Agar) überschichtet werden konnte. Eine quantitative Auswertung der Hemmwirkung kann mit dieser Methode nicht erzielt werden, da die Menge und Wachstumsphase des AMP-Produzenten nicht eindeutig festgelegt und messbar ist (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Auswahl einiger Bakterienstämme, welche einen Hemmhof gegen *Listeria innocua* (A) und *Listeria monocytogenes* (B) bildeten. Der Stamm 132 stellte sich im weiteren Verlauf als ein Bakterienstamm heraus, bei welchem der Hemmhof nicht konsistent reproduziert werden konnte. Als Positivkontrolle (+) und Negativkontrolle (-) dienten interne Laborstämme.

Mithilfe dieses Hochdurchsatzscreenings konnten 20 Stämme identifiziert werden, welche einen Hemmhof gegen *Listeria innocua* bildeten, dies entspricht 5% der untersuchten Stammsammlung (Abbildung 5A). War dieser Test positiv wurde der Agar-Drop Test ebenfalls mit dem pathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Alle 20 untersuchten Stämme zeigten gegenüber *L. monocytogenes* ebenfalls einen Hemmeffekt (Abbildung 4B). Zusätzlich wurden alle produzierten Überstände der möglichen AMP Produzenten auf ihre Wirkung gegen *L. innocua* in einer Flüssigkultur getestet ohne den ursprünglich geplanten Well-Diffusion Assay durchzuführen. Hierfür wurden Wachstumskurven in An- und Abwesenheit der Überstände im Mikrotiterplatten Lesegerät aufgenommen und die Hemmung ausgewertet. Bei 18 der 395 Stämme konnte im Primärscreening eine Hemmung gezeigt werden (Abbildung 5B). Möglicherweise wurde bei zwei der 20 positiven Hits aus dem Agar-

Drop Screening nicht der korrekte Erntezeitpunkt für den Überstand gewählt, sodass diese im Wachstumsinhibitionsassay keinen Hemmeffekt gezeigt haben.

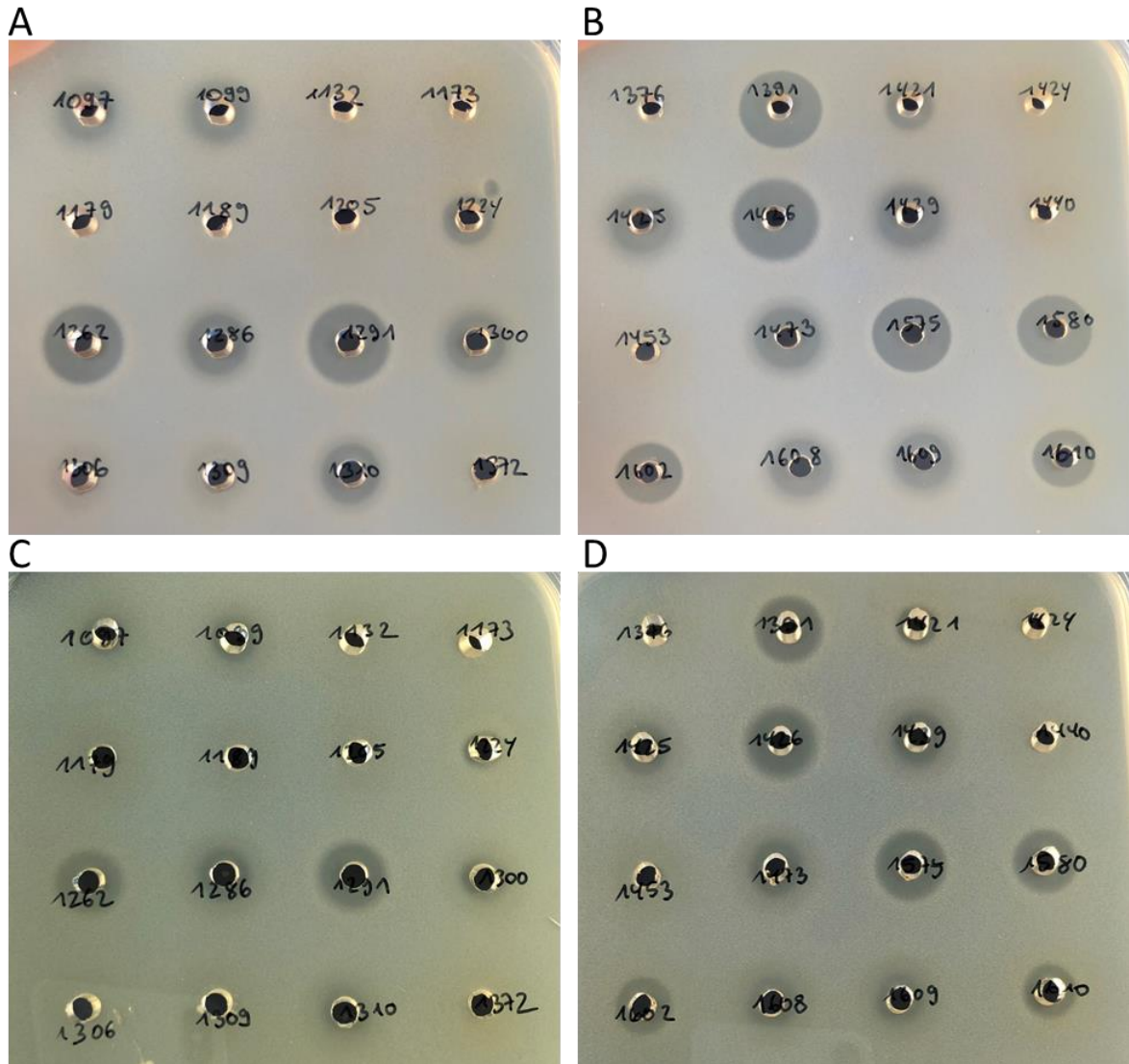


Σ 395 untersuchte Stämme

**Abbildung 5:** Im Primärscreening wurden 395 Bakterienstämme auf einen Hemmeffekt gegen *L. innocua* untersucht. Im Agar-Drop Test wurde der Stamm als wachsende Kultur auf die Hemmwirkung getestet (A), während im Wachstumsinhibitionsassay der entsprechende Überstand auf die Hemmwirkung getestet wird (B).

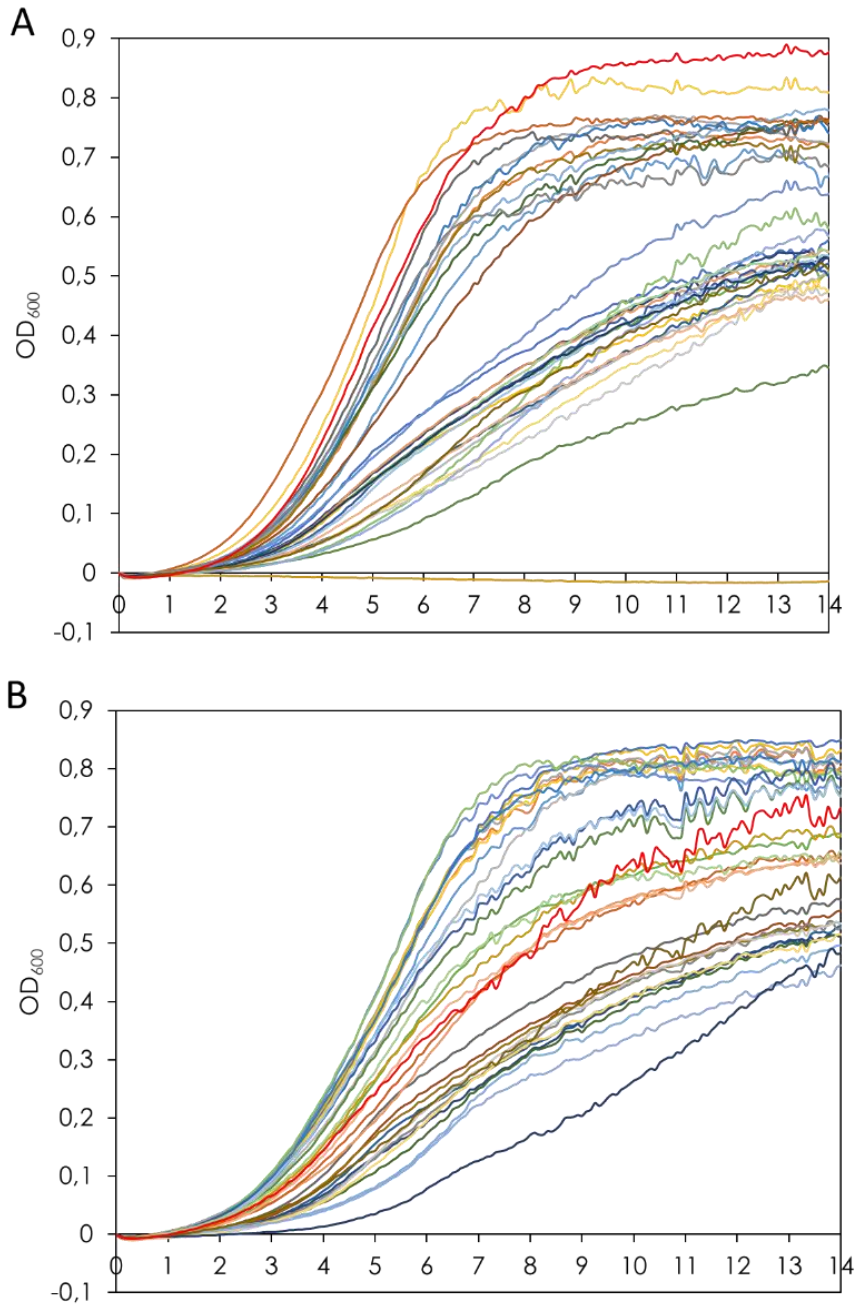
Nachdem auch die Ergebnisse des pHluorin Screenings aus Teilprojekt 1 zusammengetragen wurden, wurde zusammen mit dem Partner der Universität Ulm aus Teilprojekt 1 ein Set aus 32 Stämmen für weitere Untersuchungen zusammengestellt. Bei allen 32 Stämmen war mindestens eine der verschiedenen Primärscreeningmethoden positiv ausgefallen, sodass diese Ergebnisse verifiziert werden sollten. Hierfür wurden diese Stämme nochmals in biologisch unabhängigen Triplikaten kultiviert und Überstände, wie in 2.2.1 beschrieben, produziert. Die pH-Werte der Überstände wurden nun exakt auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellt, um mögliche pH Effekte im Sekundärscreening ausschließen zu können. Mit diesen Überständen wurde nun erneut die Hemmung gegen *L. innocua* und *L. monocytogenes* untersucht. Hierfür wurden zum einen der Well-Diffusion Test genutzt, um den Einfluss des Überstandes auf die Listerien in einer Agar-Platte deutlich sichtbar zu machen und zum anderen erneut Wachstumskurven von Listeria in An- und Abwesenheit der Überstände aufgenommen, um auch eine Wachstumsverzögerung sichtbar machen zu können.

Im Well-Diffusion Test konnte gezeigt werden, dass 20 der 32 Überstände aktiv gegen *L. innocua* und *L. monocytogenes* wirkten (Abbildung 6). Auffällig hierbei ist, dass es sich jeweils um die gleichen Stämme handelt, allerdings der Hemmhof gegen *L. monocytogenes* kleiner ausfällt. Ob die Aktivität im Überstand gegen *L. monocytogenes* aber auch schwächer ist, kann mit diesem Test nicht gezeigt werden, da es sich hierbei nicht um eine quantitative Methode handelt und die Menge an antimikrobiellem Peptid im Überstand nicht gemessen wurde.



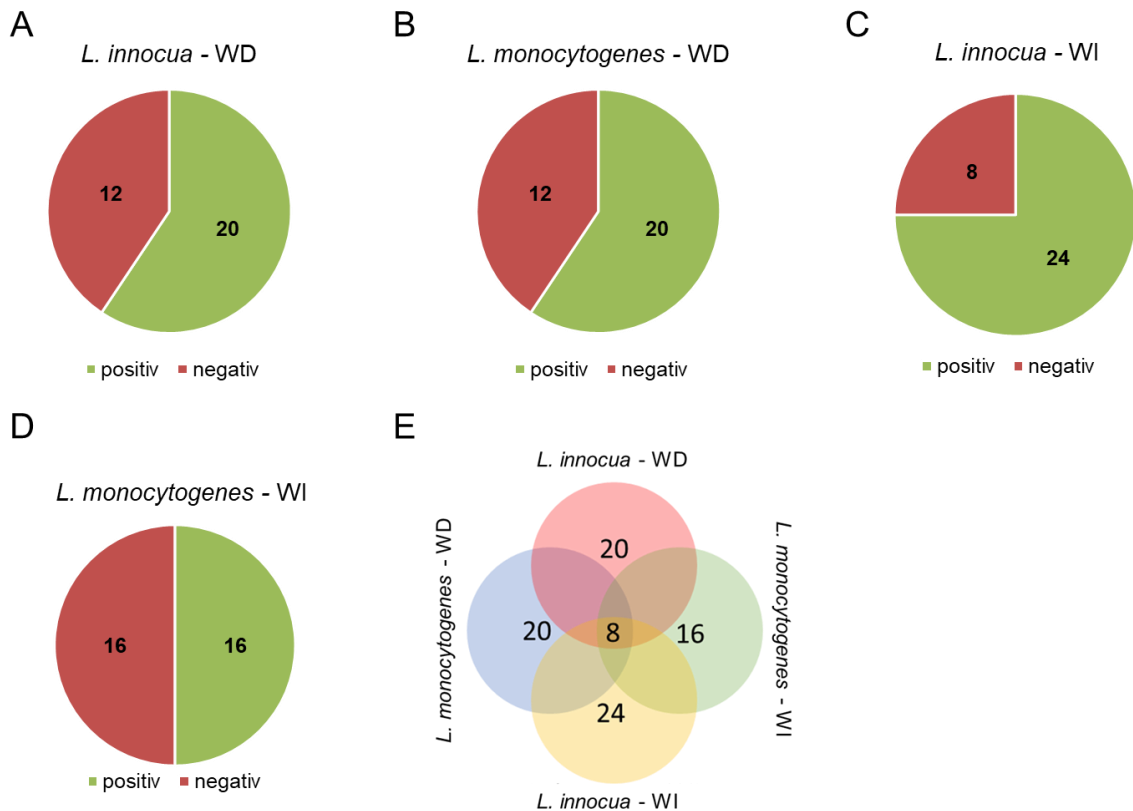
**Abbildung 6:** Well-Diffusion Test mit Überständen der 32 Bakterienstämme, welche für das Sekundärscreening ausgewählt wurden. Gezeigt ist beispielhaft eins der drei Triplikate. Es wurde die Aktivität gegen *L. innocua* (A+B), sowie die Aktivität gegen *L. monocytogenes* (C+D) untersucht.

Im Wachstumsinhibitionsassay kann nicht nur die vollständige Inhibition des Zielorganismus dargestellt werden, sondern bereits eine Wachstumsverzögerung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde *L. innocua* oder *L. monocytogenes* im gleichen Volumenverhältnis mit dem unverdünnten Überstand für 14 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Als Kontrolle diente eine Probe, welche anstelle eines Überstandes die gleiche Menge MRS enthält. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Ergebnisse von Triplikat C. Es wird deutlich, dass es Unterschiede in der Hemmung zwischen *L. innocua* (Abbildung 7A) und *L. monocytogenes* (Abbildung 7B) gibt.



**Abbildung 7:** Wachstumsinhibitionsassay beispielhaft bei einem der Triplikate. Die 32 Überstände wurden zum einen in Anwesenheit von *L. innocua* (A) und zum anderen in Anwesenheit von *L. monocytogenes* (B) untersucht. Die Kontrolle ist rot markiert.

Alle 20 Überstände, welche gegen *L. innocua* eine Hemmung im Well-Diffusion Test angezeigt haben, zeigten auch im Wachstumsinhibitionsassay eine Hemmung. Für *L. monocytogenes* konnten nur 10 dieser 20 Überstände eine Wachstumsinhibition zeigen. Allerdings wurden auch 6 weitere Überstände gefunden, welche eine Hemmung gegen *L. monocytogenes* und 4 weitere, welche eine Hemmung gegen *L. innocua* aufwiesen, welche im Well-Diffusion Test keinen Hemmhof bildeten (Abbildung 8).



Σ 32 untersuchte Stämme

**Abbildung 8:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Sekundärscreening. Es wurden 32 Überstände im Well-Diffusion Test (WD) und im Wachstumsinhibitionsassay (WI) auf ihre Hemmwirkung gegen *L. innocua* (A, C) und *L. monocytogenes* (B, D) getestet.

Betrachtet man nun die Gesamtauswertung aller Methoden aus Primär- sowie Sekundärscreening in Hinblick auf antilisterielle Wirkung gegen den apathogenen Stamm *L. innocua* sowie gegen den pathogenen Stamm *L. monocytogenes* konnten 8 von 395 Stämme gefunden werden, welche in allen Methoden einen Hemmeffekt bei beiden getesteten Listerienstämmen gezeigt haben (Abbildung 8E). Dies entspricht 2% der getesteten Stammsammlung.

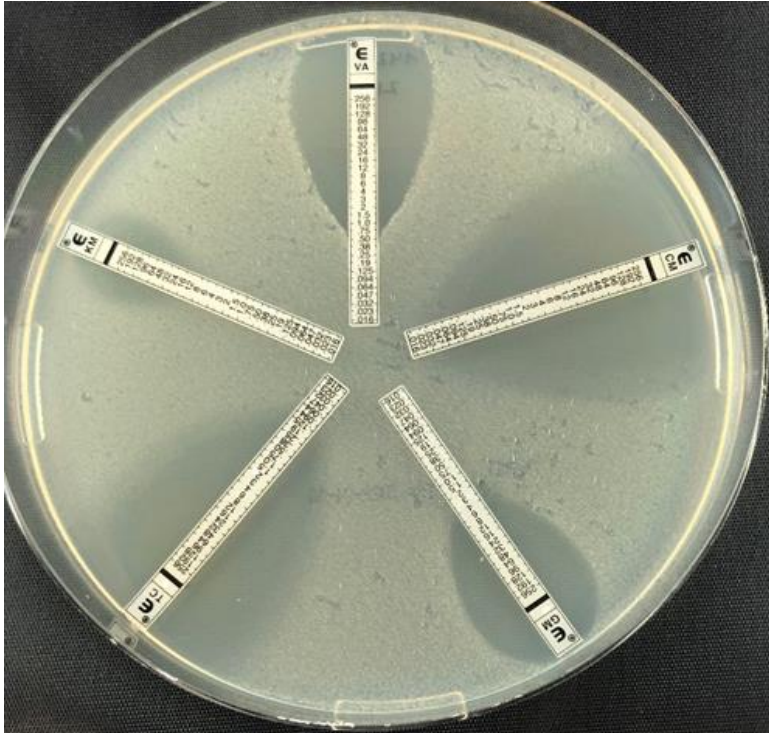
### 2.2.3: Charakterisierung der positiven Stämme

Sobald ein aktiver Überstand gefunden wurde, war es folgend von Interesse den Stamm zu charakterisieren, der zur Produktion der Überstände genutzt wurde. Dadurch können erste Eigenschaften überprüft werden, die wichtig sind, wenn der Stamm in der Lebensmittelindustrie verwendet werden soll, wie zum Beispiel Stammidentität, Physiologie und Wachstumsmerkmale. Auch einige industrierelevante Parameter wie Antibiotikaresistenzen oder Produktion unerwünschter Substanzen, wie biogene Amine, werden berücksichtigt. Ebenfalls wird eine Sicherheitsbewertung gemäß der qualifizierten Sicherheitsannahme (QPS) der EFSA geprüft.

In Arbeitspaket 2.2.2 konnten 20 interessante Bakterienstämme identifiziert werden, welche potenziell gegen Listerien wirken können. Die Auswahl dieser Stämme wurde in 2.2.2 detailliert erläutert. Es handelt sich um 11 *Lactobacillus sakei* Stämme, 2 *L. curvatus* Stämme, 3 *L. plantarum*, 1 *L. brevis* und 3 *Pediococcus* Stämme. Diese Vielfalt versprach auch unterschiedliche physiologische Merkmale.

### Antibiotikaresistenzen

Bei 18 von 20 Stämmen konnten Antibiotikaresistenzen mittels Mindesthemmstoffkonzentrationsbestimmung über ETEST® (bioMérieux) überprüft werden (Abbildung 9). Mit Hilfe von Cut-Off Values konnte gezeigt werden, dass keiner der untersuchten Stämme Antibiotikaresistenzen besitzt. Die zwei fehlenden Stämme konnten auf dem zu nutzenden Nährmedium (Müller-Hinton Agar) nicht anwachsen und wurden im weiteren Verlauf auf einem anderen Nährmedium untersucht.



**Abbildung 9:** ETEST® (bioMérieux) des Stammes 1424.

### Bildung von biogenen Aminen

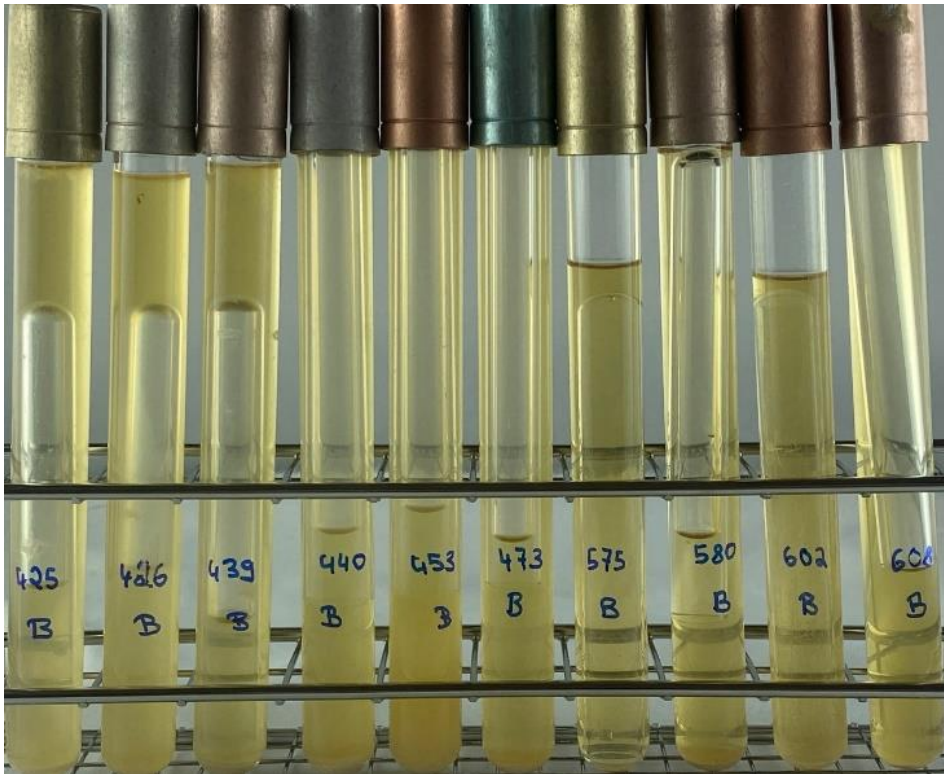
Um auszuschließen, dass Bakterienstämme unerwünschte Substanzen, wie biogene Amine, bilden, wurde die Bildung der biogenen Amine Tyramin, Cadaverin, Putrescin, Histamin, Phenylethylamin und Agmatin mithilfe eines Screening Mediums untersucht (Bover-Cid et al., 1999). Hierbei wird ein Aminosäure-Decarboxylase Nachweis genutzt, wobei der Agar sich entweder durch einen pH Indikator violett verfärbt oder im Falle der Aminosäure Tyrosin der Agar aufklärt (Abbildung 10). Nur der *L. brevis* Stamm 1580 wurde positiv auf Putrescinbildung durch die Spaltung von Ornithin getestet.



**Abbildung 10:** Aminosäure-Decarboxylase Nachweis zur Überprüfung der Bildung biogener Amine. Der Stamm unten links verstoffwechselt die in gesättigter Konzentration vorhandene Aminosäure Tyrosin und der Stamm unten rechts decarboxyliert ebenfalls eine in dem Agar vorhandene Aminosäure, was durch den pH Indikator sichtbar gemacht wurde.

#### Gasbildung

Zusätzlich gilt es als unerwünscht, wenn Mikroorganismen in der Lage sind Gase (vor allem  $\text{CO}_2$ ) zu bilden, da es in der Endverpackung von Lebensmitteln zu Bombagen kommen kann. Die Fähigkeit zur Gasbildung aus verschiedenen Zuckern kann mithilfe von Durham-Röhrchen untersucht werden. Hierbei wird ein Reagenzglas mit Medium und einem Durham Röhrchen beimpft und untersucht, ob sich parallel zum Wachstum eine Gasblase gebildet hat. Dem Standard-Inokulationsmedium wurden verschiedene Substrate wie Glucose, Ribose, Fructose, Glucono-delta-Lacton (GdL) und Gluconsäure zugesetzt und das Wachstum der 20 Stämme verfolgt. Als Kontrolle diente ein interner Bakterienstamm, bei dem die Bildung von Gas aus den Substraten bekannt ist. Wachstum war bei allen Stämmen möglich, keiner der untersuchten Stämme bildete eine Gasblase nach 24, 72 und 144 Stunden aus den Substraten Glucose, Ribose, Fructose und Glucono-delta-Lacton. Aus dem Substrat Gluconsäure wurde ebenso keine Gasbildung bei den Stämmen 1391, 1575 und 1602 beobachtet. Bei diesen Stämmen handelt es sich um *Pediococcon*. Alle untersuchten *Lactobacillen* bildeten dagegen Gas aus Gluconsäure (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Test auf Gasbildung aus Gluconsäure der Stämme 1425-1608

Weitere physiologische Merkmale

Es wurden außerdem Untersuchungen zu weiteren physiologischen Merkmalen wie Hämolyse, Amylase Aktivität, Peroxidbildung und die Verwertung von zahlreichen Kohlenhydraten mittels API® ID-Teststreifen (bioMérieux) durchgeführt. In Abbildung 12 ist zu sehen, wie der Kontrollstamm *Bacillus subtilis* die Stärke in dem Agar mittels Amylase spaltet.



**Abbildung 12:** Stärkeabbau über die Amylaseaktivität von *B. subtilis*.

Dieser Nachweisagar wurde ebenfalls für die 20 zu untersuchenden interessanten AMP-Produzenten verwendet. 9 der 20 Stämme sind in der Lage Stärke abzubauen, hierunter fallen *L. sakei*, *L. plantarum* und *Pediococcus* Stämme. Stärkeabbau könnte zum Beispiel interessant sein bei der Verwendung von Starterkulturen in pflanzlichen Lebensmitteln.

#### Verwertung von Kohlenhydraten

Mit Hilfe von API® ID-Teststreifen (bioMérieux) kann die Fähigkeit eines Bakterienstammes zur Verwertung von 50 verschiedenen Kohlenhydraten einfach und effizient untersucht werden. Hierbei werden verschiedene Medien in kleinen sterilen Kammern beimpft und nach 24 und 48 Stunden mit Hilfe eines Farbumschlagtes die Verstoffwechslung abgelesen (Abbildung 13).

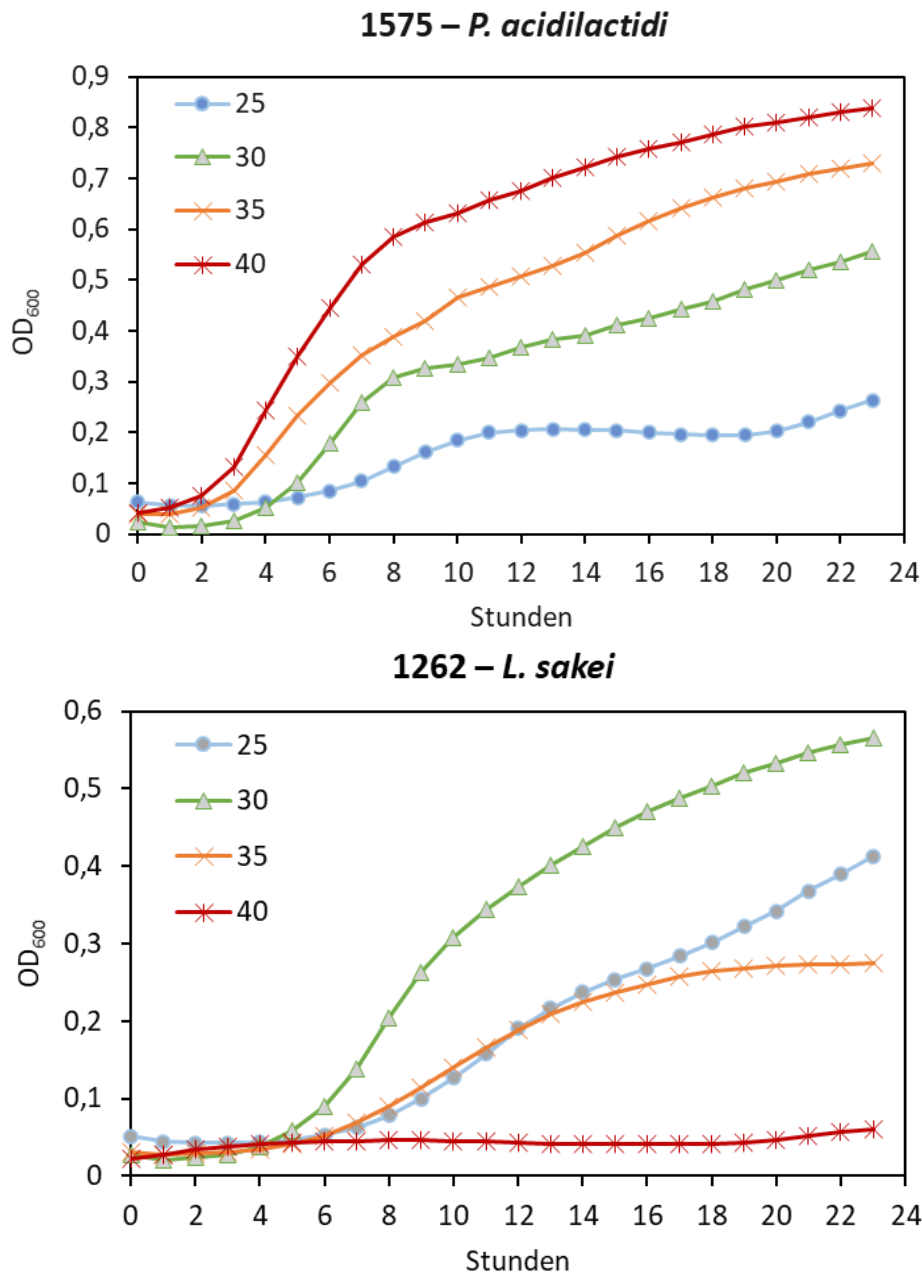


**Abbildung 13:** API® ID-Teststreifen (bioMérieux) nach 48 stündiger Inokulation mit einem Teststamm.

#### Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen

Um das Wachstumsverhalten der interessanten AMP-Produzentenstämme bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen, wurden Wachstumskurven bei den Temperaturen 25, 30, 35 und 40°C im Mikrotiterplatten Lesegerät aufgenommen. Auffällig war, dass Stämme der Spezies *Lactobacillus plantarum* eine deutlich höhere OD<sub>600</sub> erreichten, als z.B. *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* oder *Pediococcus* Stämme.

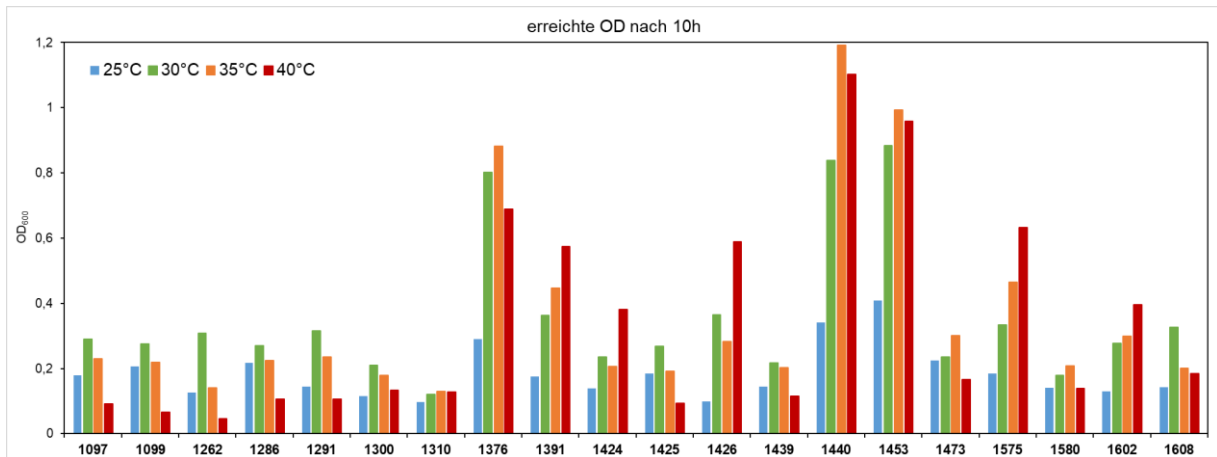
Es konnte deutlich gezeigt werden, dass alle *Pediococcus* Stämme mit zunehmender Temperatur besser wuchsen. Bei 40°C sind die Stämme schneller gewachsen als bei niedrigeren Temperaturen (Abbildung 14 oben). Bei den meisten *Lactobacillus sakei* Stämmen konnte 30°C als Optimaltemperatur identifiziert werden, da hier am schnellsten eine hohe OD<sub>600</sub> erreicht wurde, im Vergleich zu den anderen Temperaturen (Abbildung 14 unten).



**Abbildung 14:** Wachstum bei 25°C (blau), 30°C (grün), 35°C (orange) und 40°C (rot) der Stämme 1575 (*P. acidilactici*, oben) und 1262 (*L. sakei*, unten).

Der Stamm 1424 fiel hierbei besonders auf. Dieser Stamm wurde in der IFF-Stammsammlung als *Lactobacillus sakei* beschrieben, verhielt sich aber in den Wachstumsversuchen eher wie ein *Pediococcus* Stamm. Im weiteren Verlauf des Projekts konnte durch Sequenzierung beim Projektpartner Universität Ulm in Teilprojekt 1 die Species mit *Enterococcus faecium* bestimmt werden.

Betrachtet man die  $OD_{600}$ , die nach 10 Stunden erreicht wurde, fällt wie bereits erwähnt auf, dass die verschiedenen Stämme unterschiedliche optische Dichten erreichen. Nach 10 Stunden befinden sich alle untersuchten Stämme noch in einer exponentiellen Wachstumsphase. Vergleicht man nun die verschiedenen Temperaturen innerhalb eines Bakterienstammes miteinander, kann abgeleitet werden, bei welcher Temperatur das Wachstum am besten war (Abbildung 15).

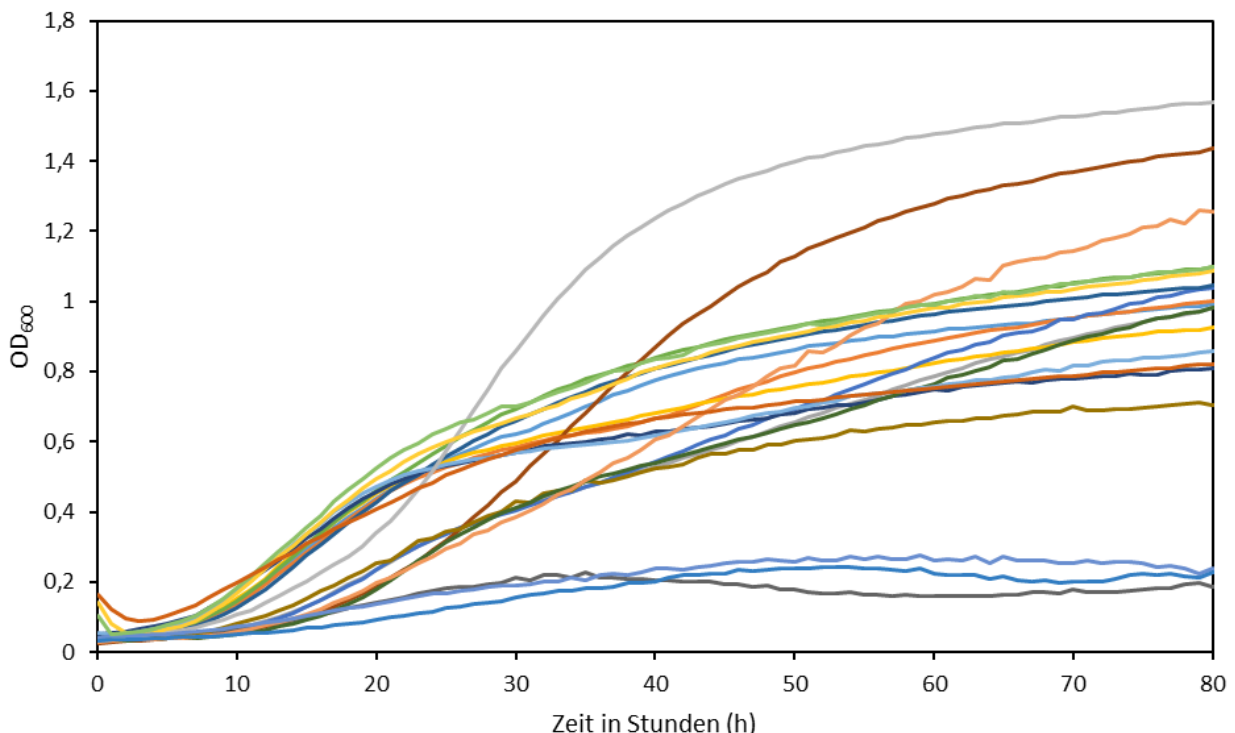


**Abbildung 15:** Erreichte OD<sub>600</sub> nach 10 Stunden bei verschiedenen Temperaturen.

### Wachstumsverhalten bei kalten Temperaturen

Um zu überprüfen, ob die AMP-Produzentenstämme auch bei kalten Temperaturen wachsen können, wurden Wachstumskurven bei 4, 7 und 15 °C aufgenommen.

Hierbei sind deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Stämme erkennbar. Es fiel auf, dass der Stamm A1453 bei 7 und 15 °C die höchste OD<sub>600</sub> erreichte, während bei 4 °C andere Stämme besser wuchsen. Bei 15 °C sind insgesamt 17 Stämme gewachsen (alle Lactobacillen) und drei Stämme nicht gewachsen (Pediococcen) (Abbildung 16). Bei den Temperaturen 4 und 7 °C konnte bei zehn Lactobacillen-Stämmen noch ein Wachstum beobachtet werden.



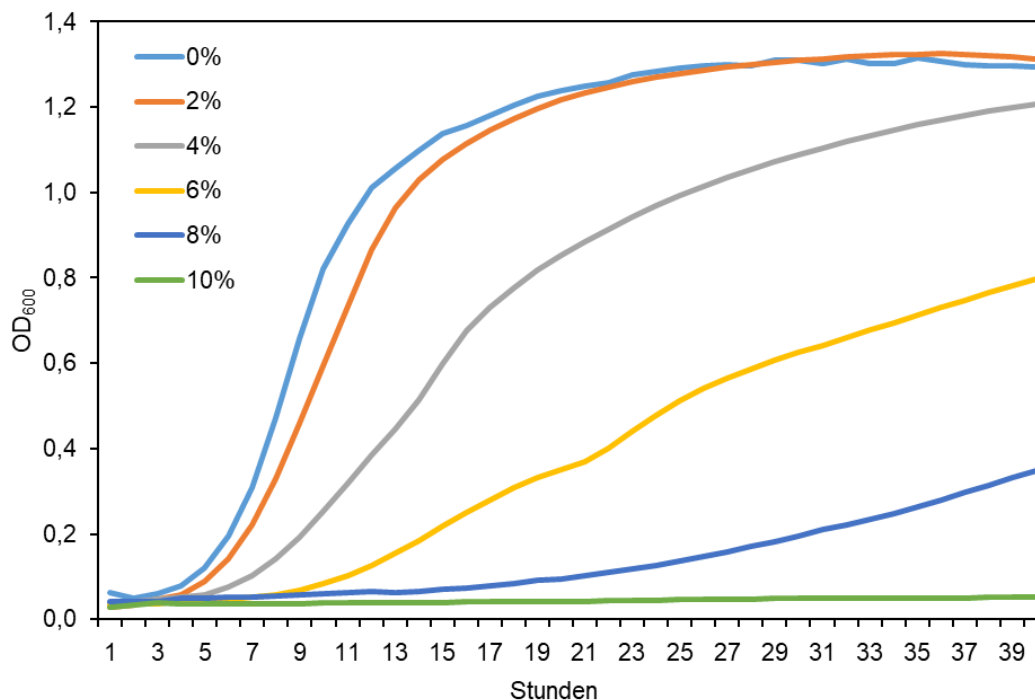
**Abbildung 16:** Wachstumskurven der AMP-Produzenten bei 15 °C.

### Wachstumstoleranz Kochsalz (NaCl) und Nitritpökelsalz (NPS)

Da Kochsalz und Nitritpökelsalz in Lebensmitteln sehr häufig zur Konservierung verwendet werden, wurde die NaCl- und NPS-Toleranz der 20 Stämme untersucht. Hierbei wurden Wachstumskurven in MRS Medium mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10% NaCl bzw. NPS erstellt und die

erreichte  $OD_{600}$  verglichen. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass die Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmender NaCl Konzentration sinkt. Der Stamm 1376 ist nicht mehr in der Lage mit 10% NaCl zu wachsen. Ein Stamm gilt als tolerant, wenn nach 40 Stunden mindestens 20% der  $OD_{600}$  erreicht wurde, die der Stamm ohne NaCl erreicht hat.

Insgesamt besitzen alle AMP-Produzenten eine Salz-Toleranz von 4 % oder höher. Die Stämme 1291 und 1310 weisen eine Salztoleranz von 4 % auf. Die NPS-Toleranz liegt bei allen Stämmen zwischen 6 und 10%. Die Stämme 1391 und 1575 wachsen auch noch bei 10 % Salz und NPS.



**Abbildung 17:** Wachstum des Stammes 1376 bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

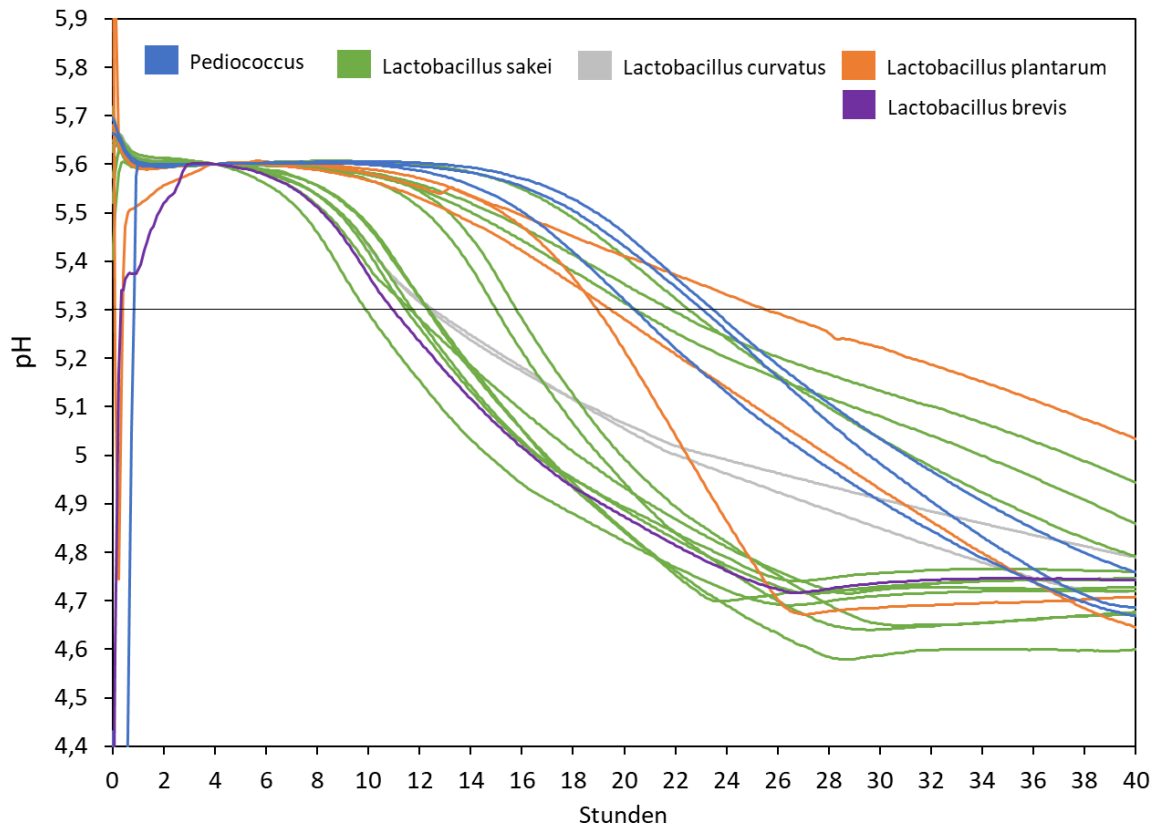
### Säuerungsverhalten in Fleischmatrix

Als erste Untersuchung in der Fleischmatrix wurde das Säuerungsverhalten der Stämme untersucht. Die pH Absenkung gehört in einer Salami zum Hürdenprinzip und trägt zur Produktsicherheit bei. Zusätzliche Hürden bilden z.B. eine  $a_w$ -Wert Senkung oder eine Starterkultur als Verdrängungsflora. Die Säuerung in einer Salami trägt nicht nur zur Produktsicherheit bei, sondern sorgt auch für die Festigkeit, die Farbstabilität und auch für die Aromabildung und den Geschmack. Es gibt verschiedene Anwendungen in der Industrie, in denen schnelle, aber auch langsame Reifungen von Interesse sind.

Zunächst wurde die Methode evaluiert, da es wichtig ist, dass von jedem Stamm  $5,0 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten pro g Hackfleisch eingesetzt werden, um die Stämme miteinander vergleichen zu können. Dies konnte mittels einer OD-Keimzahl-Korrelation durch Ausplattieren und einem Zellszählergerät (Cellometer, Cenibra GmbH) ermittelt werden. Die Stämme wurden dann zusammen mit dem Hackfleisch und einigen weiteren Zutaten vermengt und die Fleischproben in Bechern bei 24°C im Wasserbad inkubiert. Jede Probe wurde mit einer pH Elektrode (Mettler Toledo, KPM Analytics) versehen und die Säuerung des Fleischbräts über 40 Stunden verfolgt.

Es konnte beobachtet werden, dass sich das Säuerungsverhalten der getesteten 20 Stämme stark unterscheidet (Abbildung 18). Die schnellsten Stämme erreichten einen pH-Wert von 5,3 bereits nach ca. 10 Stunden, während die langsamsten Stämme diesen pH-Wert erst nach ca.

26 Stunden erreichten. Ebenfalls konnte in dieser Analyse verdeutlicht werden, dass die *Pediococcus* Stämme zu den langsam säuernden Stämmen gehören, vermutlich da eine Temperatur von 24°C für diese Stämme nicht optimal ist. Unter den *Lactobacillus sakei* Stämmen konnten sowohl langsam als auch schnell säuernde Stämme beobachtet werden.

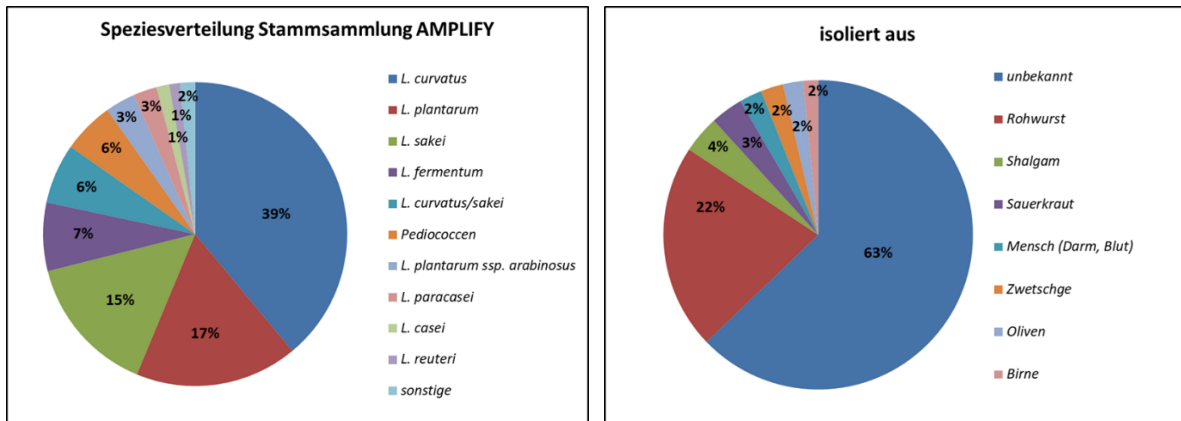


**Abbildung 18:** Säuerungsverhalten der AMP-Produzenten bei 24 °C.

#### 2.2.4: Datenmanagement

Die AMPLIFY Stammsammlung wurde in Excel eingepflegt. Jedem Stamm wurde eine AMPLIFY Stammnummer zugeordnet. Die Tabelle wurde so gestaltet, dass jeder Projektpartner Daten stammsspezifisch zufügen kann, sodass alle wichtigen Daten, wie zum Beispiel Wachstumsparameter, Herkunft, Erntebedingungen in einer Tabelle gespeichert werden können und für alle zugänglich sind.

Die Diversität der AMPLIFY Stammsammlung wird in Abbildung 19 deutlich. Die Stammsammlung besteht aus 395 Stämmen und beinhaltet über 10 verschiedene Spezies. Die Stämme wurden zu etwas mehr als der Hälfte aus Rohwurst isoliert, weitere 40% der Stämme, deren Herkunft bekannt ist, stammen aus verschiedenen Gemüse- und Obstsorten (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Vielfalt der Amplify Stammsammlung.** Die linke Abbildung zeigt welche Spezies wie häufig in der genutzten Stammsammlung vertreten ist. Die rechte Abbildung zeigt woraus diese Stämme isoliert wurden.

Das Datenmanagement in Excel wurde im Projektverlauf immer weiter vervollständigt. Zu jedem Stamm wurden alle relevanten Informationen zu den Überständen im Reiter Stammsammlung Primärscreening festgehalten. Hierzu zählen die Wachstumsbedingungen, die erreichte OD<sub>600</sub>, der Erntezeitpunkt, der nachträglich eingestellte pH-Wert des Überstandes und die Menge an NaOH, welche benötigt wurde, um den pH-Wert einzustellen.

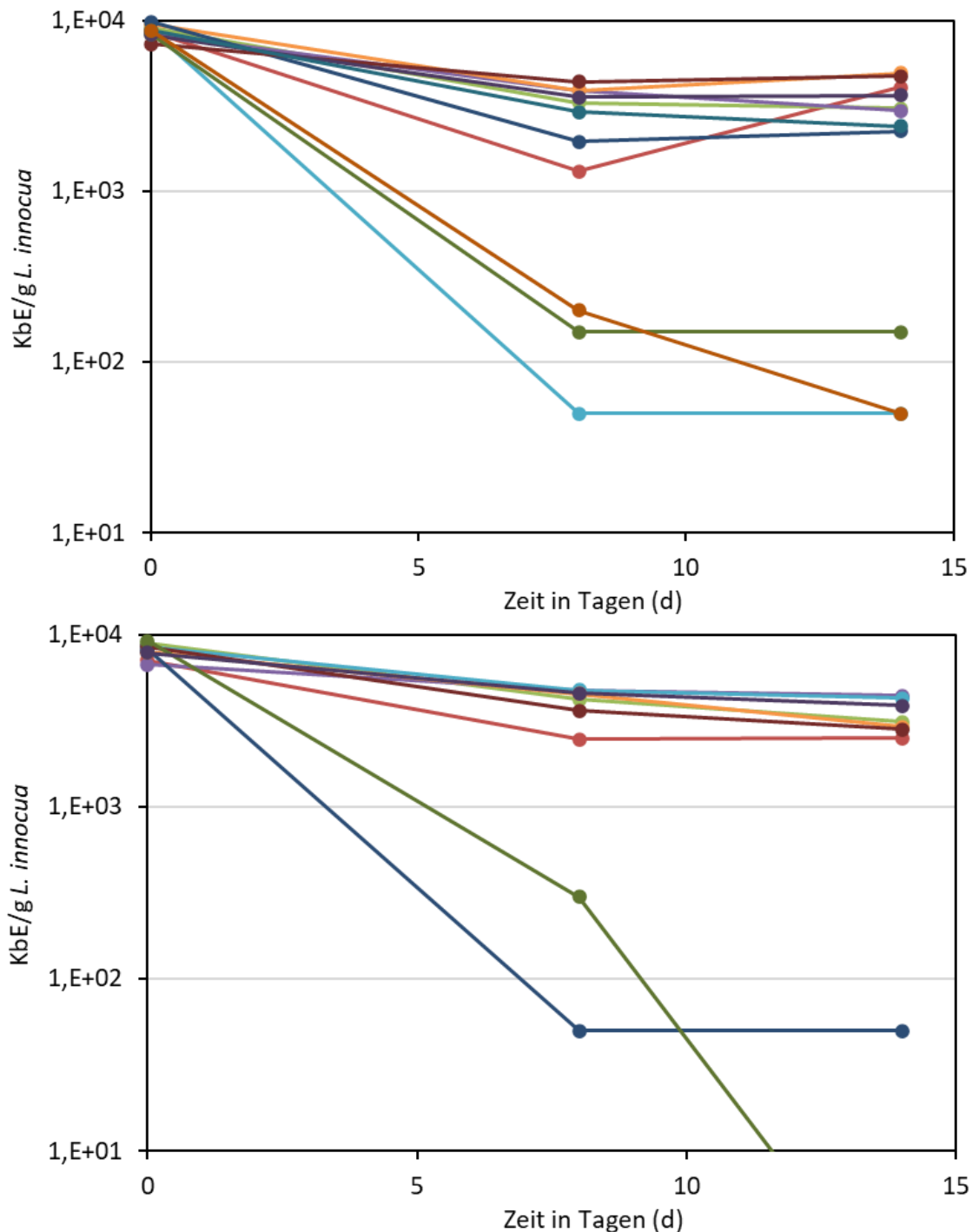
Zusätzlich wurden die Ergebnisse des Primärscreenings notiert. Hierbei wurde bei IFF ein Agar-Drop Test mit *L. innocua* durchgeführt. War dieser positiv (Hemmhof sichtbar), wurde anschließend ein Agar-Drop Test mit *L. monocytogenes* durchgeführt und die Daten in der Tabelle (Reiter Stammsammlung Primärscreening) festgehalten. Alle produzierten Überstände wurden, wie in 2.2.2 beschrieben, auf eine Hemmung von *L. innocua* in einer Flüssigkultur untersucht. Auch diese Ergebnisse wurden in der Tabelle dokumentiert. Auch die Ergebnisse des Primärscreenings des Projektpartners aus Teilprojekt 1 aus Ulm wurden in diesem Reiter implementiert und dokumentiert. Im Sekundärscreening wurden 32 relevante Stämme aus dem Primärscreening, wie in 2.2.2 beschrieben, nochmals untersucht und alle Ergebnisse im Reiter „Sekundärscreening Listeria Details“ festgehalten. Im Reiter „Sekundärscreening Listeria Übersicht“ wurden nun alle gesammelten Ergebnisse des Primär- und Sekundärscreening der 32 interessanten Stämme übersichtlich dargestellt. Der Reiter „AMP-Produzenten“ fasst die 20 Stämme zusammen, die im weiteren Verlauf näher untersucht und charakterisiert wurden.

Zu jedem Stamm wurden alle relevanten Informationen der Stammcharakterisierung in einer weiteren Tabelle zusammengetragen. Dort wurden die untersuchten Eigenschaften wie Antibiotikaresistenzen, Bildung unerwünschter Stoffe, physiologische Merkmale wie Stärkeabbau, Peroxidbildung oder Hämolyse, Wachstumstoleranzen, Wachstumstemperaturen und eine mögliche Gasbildung aus verschiedenen Zuckern festgehalten.

### 2.2.5: Testen der AMP-Produzenten in Lebensmittelmatrix

Als Bestandteil des Arbeitspaketes 2.2.5 sollte die Hemmwirkung der Stämme in der Fleischmatrix analysiert werden. Dies wurde mit Hilfe eines Rohwurst Testsystems (RWS) durchgeführt. Bei dieser Methode ist das Ziel, die Hürden (Salzkonzentration, pH, Abtrocknung) für das Wachstum von Listerien im Vergleich zu einer Standardsalamireifung zu erniedrigen, um den Unterschied zwischen dem Wachstum der Listerien in der Kontrolle und der Hemmung der Listerien mit einem AMP-Produzenten eindeutig sichtbar zu machen.

Die Abbildung 20 zeigt einen Versuch in der Fleischmatrix mit *Listeria innocua* mit allen zuvor gefundenen Kandidatenstämmen. Hier zeigen fünf Stämme (A1286, A1391, A1426, A1575, A1602) eine sehr deutliche Reduktion der Listerienkeimzahl über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die übrigen Stämme zeigen jeweils eine Hemmung bzw. leichte Reduktion der Listerien.



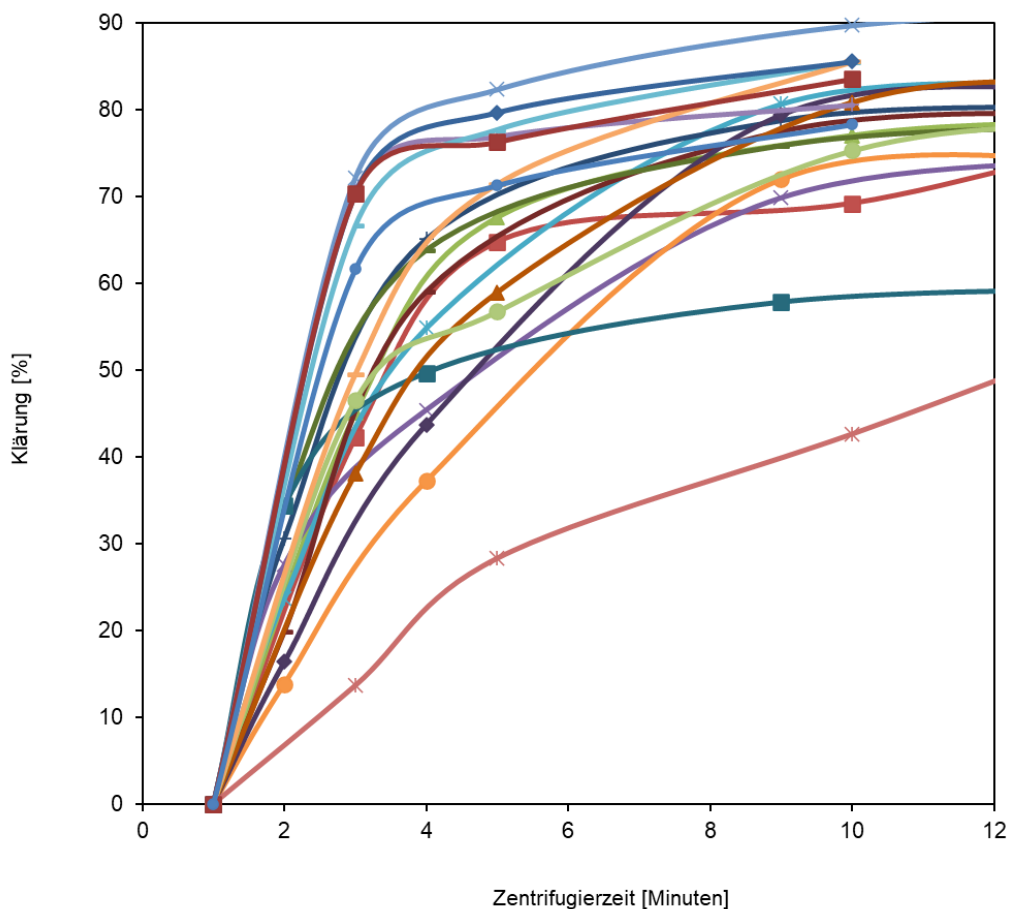
**Abbildung 20:** Listerienkeimzahl von Salamis im Rohwurst Testsystem mit AMP-Produzenten über einen Zeitraum von 14 Tagen (Batch 1, oben; Batch 2, unten).

## 2.2.6: Upscaling

In Arbeitspaket 2.2.6 werden die AMP-Produzenten, auf ihre Eignung im Bioreaktor produziert werden zu können, untersucht. Dabei werden industriell relevante Parameter wie die Substratausnutzung, die Prozesszeit, die Endausbeute und die Fähigkeit Biomasse und Überstand mit industriellen Anlagen zu trennen analysiert. Abschließend wird untersucht ob und unter welchen Bedingungen durch Gefriertrocknung ein Produkt im Trockenformat herzustellen ist. Das erfolgreiche Upscaling in einen 2L Bioreaktor eines AMP-Produzenten kann erstes Material für weitere Versuche mit einem kontrolliert hergestellten Produkt liefern. Zunächst wurden in diesem Arbeitspaket erste Versuche zur Abtrennbarkeit von Biomasse und Überstand durchgeführt.

### Abtrennbarkeit

Um einen Eindruck über die Abtrennbarkeit während der Ernte nach der Fermentation der Bakterienstämme zu bekommen, wurde ein Vortest im kleinen Maßstab (10 ml Kulturvolumen) durchgeführt. Hierbei wurden die zuvor ausgewählten 20 Bakterienstämme in 10 ml Flüssigmedium für 20 Stunden inkubiert und anschließend die Abtrennbarkeit über mehrere Zentrifugationsschritte bei 2000 rpm analysiert. Dazu wurde die optische Dichte des Überstandes gemessen und darüber die Klärung des Überstandes bestimmt. In Abbildung 21 ist zu sehen, dass sich die Aufklärung des Überstandes für die verschiedenen Stämme sehr unterschiedlich verhält.



**Abbildung 21:** Aufklärung der Überstände über die Zentrifugierzeit.

Viele Stämme erreichen bereits nach 6 Minuten eine Sättigung der Aufklärung, während beispielsweise Stamm 1453 sich innerhalb von 12 Minuten nicht eindeutig abtrennen lässt.

Dies konnte man auch eindeutig mit dem Auge sehen, da dieses Pellet im Vergleich zu den anderen Proben nicht fest und deutlich abgetrennt war, sondern eine schleimige Konsistenz hatte. Für erste Test im 2L Bioreaktor wurden die Stämme A1286 und A1426 (beide *L. sakei*) und A1575 und A1602 (beide *P. acidilactici*) ausgewählt.

### Fermentation im 2L Maßstab

Um die industrielle Produzierbarkeit einschätzen zu können wurden Versuche im 2L Laborbioreaktor durchgeführt und somit ein erstes Upscaling vom Reagenzglas hin zu kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden zunächst Prozessbedingungen gewählt, die denen entsprechen in Arbeitspaket 2.2.1 um darauf aufbauen zu können. Es wurde ein einfaches zweistufiges Vorkulturschema vor der Hauptfermentation genutzt und ein anschließendes downstream processing mit Separation und Lyophilisation durchgeführt, um alle typischen Verfahrensschritte zu beleuchten.

Der Fermentationsverlauf wurde anhand der OD900 für die ausgewählten *L. sakei* und *P. acidilactici* Stämme beobachtet. End-ODs von 1,0 - 1,25 konnten nach 15-18 Stunden erreicht werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede sowohl im Wachstumsverlauf für die beiden getesteten Species als auch innerhalb der Species zwischen den Stämmen. Das anschließende downstream processing zeigte ebenfalls starke Abweichungen zwischen den untersuchten Stämmen. So ließen sich die *L. sakei* Stämme praktisch nicht effektiv separieren, was zu großen Biomasse-Verlusten führt. Die *P. acidilactici* Stämme hingegen zeigten ein gutes Separationsverhalten.

Die danach durchgeführte Lyophilisation verlief entsprechend der Ergebnisse der Separation. Die Stämme, die starke Biomasse-Verluste verzeichneten ließen sich nicht ausreichend stabilisieren und konnten in Folge nicht zu einem stabilen Pulver getrocknet und zerkleinert werden. Die *P. acidilactici* Biomassen konnten getrocknet und zerkleinert werden und zeigten akzeptable Überlebensraten. Leider konnten die gewonnenen Lyophilisate nicht für weitere Versuche genutzt werden da eine anschließende Hygieneuntersuchung auf Fremdkeime Kontaminationen anzeigte. Für eine weitere Charakterisierung müssen die Versuche entsprechend optimiert und wiederholt werden.

## **2.5 Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Das Projekt diene prinzipiell der Grundlagenforschung und der Fokus der Verwertung der Ergebnisse lag auf dem Erkenntnisgewinn und der Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse in wissenschaftlichen Fachzeitschriften. Trotzdem könnten einzelne Ergebnisse möglicherweise wirtschaftlich verwertet werden. Für das Verfahren, mit Hilfe von Sensorbakterien antimikrobielle Substanzen mit membranschädigender Aktivität zu detektieren, wurde vor Projektbeginn eine Erfindungsmeldung durch die Partner der Universität Ulm eingereicht. In der Zwischenzeit hat die Verwertungsstelle der Universität die Erfindung zur Verwertung an die Erfinder freigegeben. Es ist geplant gemeinsam mit interessierten Firmen über Möglichkeiten der kommerziellen Verwertung dieser Erfindung zu verhandeln.

## **2.6 relevante Ergebnisse/Publicationen von dritter Seite**

Auf dem Gebiet der heterologen/rekombinanten Expression von Bacteriocinen mit dem Ziel der biotechnologischen Produktion wurden in den letzten Jahren einige wenige Arbeiten veröffentlicht. Die überwiegende Mehrzahl der Arbeiten befasst sich allerdings mit Systemen zur Generierung von synthetischen Varianten, um über Screening-Verfahren neue Peptide, die in der Natur nicht vorkommen, zu identifizieren (Guo et al 2022). Ein anderer Aspekt, der

eher im Fokus aktueller Arbeiten liegt, ist die Herstellung von gentechnisch veränderten Bakterien, die Gene für mehrere Bacteriocine unterschiedlicher Herkunftsorganismen tragen (Feito et al 2023). Zum Ende des Projektes wurden jedoch zwei interessante Artikel unterschiedlicher Arbeitsgruppen publiziert, die sich mit der heterologen Expression von Microcinen in *Bacillus subtilis* (Zhang et al 2023) bzw. Plantaricin und Mundtacin in *Saccharomyces cerevisiae* (Rossouw et al 2023) in Richtung einer biotechnologischen Produktion beschäftigen. Weitere Ergebnisse von dritter Seite auf diesem Gebiet sind nicht bekannt.

## 2.7 Veröffentlichungen mit Ergebnissen des Teilprojekt 2

Manuskript akzeptiert zur Veröffentlichung:

**Reich SJ, Teichmann L, Fante N, Crauwels P, Grünberger A, Neddermann T, Riedel CU.** An integrated pipeline for high-throughput identification of bacteriocin producers and their biosynthetic gene clusters. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.

Bereits veröffentlicht:

**Valentin Steier, Lisa Prigolovkin, Alexander Reiter, Tobias Neddermann, Wolfgang Wiechert, Sebastian J. Reich, Christian U. Riedel & Marco Oldiges.**

Automated workflow for characterization of bacteriocin production in natural producers *Lactococcus lactis* and *Lactilactobacillus sakei*. *METHODOLOGY*. Volume 23, 74, 2024.

Autoren, die aus Mitteln des AMPLIFY-Projektes gefördert werden, sind **fett** markiert.

## Referenzen

Tichaczek PS, Nissen-Meyer J, Nes IF, Vogel RF, Hammes WP (1992). Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and Sakacin P from *L. sakei* LTH673. *Systematic and Applied Microbiol* 15(3): 460-468.

Bover-Cid S and Holzapfel WH (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 53(1): 33-41.

Guo E, Fu L, Fang X, Xie W, Li K, Zhang Z *et al* (2022). Robotic Construction and Screening of Lanthipeptide Variant Libraries in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 11: 3900-3911.

Feito J, Araújo C, Arbulu S, Contente D, Gómez-Sala B, Díaz-Formoso L *et al* (2023). Design of *Lactococcus lactis* Strains Producing Garvicin A and/or Garvicin Q, Either Alone or Together with Nisin A or Nisin Z and High Antimicrobial Activity against *Lactococcus garvieae*. *Foods* 12.

Zhang G, Lin M, Qin M, Xie Q, Liang M, Jiang J *et al* (2023). Establishing Heterologous Production of Microcins J25 and Y in *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* 71: 5600-5613.

Rossouw M, Cripwell RA, Vermeulen RR, van Staden AD, van Zyl WH, Dicks LMT *et al* (2023). Heterologous Expression of Plantaricin 423 and Mundtacin ST4SA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Probiotics Antimicrob Proteins*.