

## Quantitative Erfassung von *Propionibacterium freudenreichii* im Lebensmittel Fleisch

Quantitation of *Propionibacterium freudenreichii* in meat

S. Lick und L. Kroeckel

### Zusammenfassung

Real-time PCR hat sich als zuverlässige und sensitive Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren in vielen Bereichen herausgestellt und gewinnt immer mehr an Bedeutung für die schnelle Quantifizierung lebensmittelassoziierter Mikroorganismen in Fermentations- und Verderbsszenarien. Für die Bewertung der Überlebens- und Konkurrenzfähigkeit gezielt eingesetzter Mikroorganismenkulturen in Lebensmittelmatrizes ist eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung essentiell. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vor kurzem entwickelte real-time PCR für *Propionibacterium freudenreichii* (HERVE *et al.*, 2007) erfolgreich auf das Lebensmittel Fleisch adaptiert. *Propionibacterium freudenreichii* kennt man vor allem aus der Käseproduktion, wo es für die Löcher im Schweizer Käse verantwortlich ist. Aber auch die Verwendung bei der Brot- und Gemüsefermentation ist untersucht worden, und der Einsatz als probiotische Bakterienkultur wurde diskutiert. Da für die Matrix Fleisch bisher keine Veröffentlichungen zum quantitativen Nachweis von *P. freudenreichii* mittels real-time PCR vorlagen, haben wir die von HERVE *et al.* (2007) beschriebene Methode im Fleischsystem getestet und etabliert.

Der speziesspezifische Nachweis beruht auf der kleinen Untereinheit der Transcarboxylase, die Teil des speziellen zentralen Stoffwechselweges ist, der die Propionsäurefermentation ermöglicht. Etwa 40 Kopien genomischer Äquivalente pro PCR-Ansatz sind für eine sichere Identifizierung ausreichend. Zudem kann Koloniematerial von Propionibakterien auch direkt von einer Agarplatte, d. h. ohne weitere Reinigungsschritte, in die PCR-Reaktion eingesetzt werden, um eine Bestätigung der Spezies z.B. in einer gemischten Kultur sicherstellen zu können. Die Etablierung dieser Methode ermöglicht eine erhebliche Zeitersparnis bei der Quantifizierung dieser Kulturen bei ihrer gezielten Verwendung im Lebensmittel.

### Summary

Real-time PCR has become a reliable and sensitive method for the detection and quantitation of nucleic acids in various fields of research as well as in microbial laboratory routine. *Propionibacterium freudenreichii* is well known from the manufacture of Swiss type cheeses, where it is responsible for the formation of the holes. The Gram-positive pleomorphic rods are also used in bread making and for the fermentation of vegetables and their role as probiotics is discussed (HERVE *et al.* 2007). We investigated and established the quantitative Taqman assay for *P. freudenreichii* developed by HERVE *et al.* (2007) in the food matrix meat. This species-specific detection relies on the small subunit of the transcarboxylase which is part of the central metabolic pathway enabling the propionic acid fermentation. About 40 copies DNA per PCR reaction are sufficient for a reliable detection. Moreover, this method was used to identify *P. freudenreichii* colonies directly from agar plates containing mixed cultures without further treatment. Establishing this technique should ease the use of *P. freudenreichii* and help to overcome the laborious and time consuming cultural microbial routine in the food matrix meat.

---

**Schlüsselwörter** quantitative real-time PCR – *Propionibacterium freudenreichii* – Fleisch

**Key Words** quantitative real-time PCR – *Propionibacterium freudenreichii* – meat

---

## Einleitung

Real-time PCR (Echtzeit-PCR) hat sich als extrem sensitive und schnelle Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Bakterien auch innerhalb komplexer Microbiota herausgestellt. Sie ist schneller als traditionelle Routinemethoden, ermöglicht auch die nachträgliche Analyse von eingefrorenem Probenmaterial und kann damit mögliche zeitliche Engpässe der Routine-mikrobiologie umgehen. Sie wird inzwischen in vielen Bereichen angewendet, unter anderem auch bei Untersuchungen zur Lebensmittelsicherheit bzw. in der Lebensmittelkontrolle. Wir haben eine quantitative real-time PCR-Methode für *Propionibacterium freudenreichii*, die spezies-spezifisch ist (HERVE *et al.*, 2007), für das Lebensmittel Fleisch getestet und adaptiert.

*P. freudenreichii* ist ein Gram-positives, pleomorphes, nicht bewegliches, heterofermentatives Stäbchen, das anaerob bis aerotolerant wächst. Es produziert eine Reihe von Stoffwechselprodukten wie Propionat, Acetat, Succinat und Kohlendioxid. Propionibakterien werden üblicherweise als sekundäre Starter in der Käseproduktion eingesetzt und sind auf Grund der CO<sub>2</sub> – Produktion für die Bildung der Löcher im Käse verantwortlich (Emmentaler, Jarlsberg, Maasdamer), die nach mehreren Wochen/Monaten der Reifung auftreten. Propionsäurebakterien nutzen hier das Stoffwechselprodukt der Primärkulturen, der Milchsäurebakterien, sind aber auch in der Lage, Glukose, aber nicht Sucrose oder Maltose, direkt zu verwerten (CUMMINS und JOHNSON, 1986). Propionibakterien können auch neben anderen *Actinomycetales* wie *Brevibacterium*, *Corynebakterien* und *Bifidobakterien* auf Fleisch auftreten (HOLZAPFEL, 1998). Die Propionsäuregärung wurde auch bei der Herstellung von Brot und fermentierten Gemüsen eingesetzt, um einem Verderb entgegenzuwirken (HERVE *et al.*, 2007, BABUCHOWSKI *et al.*, 1999, SUOMALAINEN und MAYRA-MAKINEN, 1999, HUGENHOLTZ *et al.*, 2002).

Neben *Lactobacillen* und *Bifidobakterien* wird auch der Einsatz von *Propionibacte-*

*rien* als probiotische Kulturen diskutiert. Diese sollen einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Gesundheit des Konsumenten ausüben, wenn sie in einer ausreichenden Menge verabreicht werden (FAO/WHO, 2002). HERVE *et al.* (2007) konnten mit Hilfe der Extraktion von mRNA aus Stuhlinhalt und der spezifischen real-time PCR-Methode nachweisen, dass *Propionibakterien* die Magen-Darm-Passage überleben und stoffwechselaktiv bleiben, was als wichtige Voraussetzung für mögliche positive Effekte gilt.

Wir waren hier ausschließlich an der Etablierung eines funktionsfähigen quantitativen Nachweissystems für diese Bakterien interessiert, um gegebenenfalls die zeitlich aufwendigen kulturellen Methoden ersetzen zu können. Auch die lebend/tot Problematik, d. h. ob Nukleinsäure aus inaktiven bzw. abgestorbenen Bakterien mitquantifiziert wird, spielte hierbei zunächst keine Rolle. *P. freudenreichii* wurde dazu in ein Fleisch injiziert. Anschließend wurde mit Hilfe von Kultivierung und spezies-spezifischer qPCR (quantitative real-time PCR) vergleichend untersucht, ob die Bakterien nach einem bestimmten Zeitraum in der zugegebenen Menge noch nachweisbar waren oder nicht.

## Material und Methoden

*Propionibacterium freudenreichii* PS 40 wurde von der Firma Christian Hansen, Hoersholm, Dänemark, bezogen. Die Anzucht erfolgte in St-I Medium (Merck, Nr. 1.07881.0500) unter anaeroben Bedingungen bei 30 °C (Anaerocult A, VWR, Darmstadt).

Der 5'-3'-Exonuklease Assay wurde von HERVE *et al.* (2007) entwickelt. Er beruht auf den Sequenzen der kleinen 5S-Untereinheit der multimeren Transcarboxylase (Methyl-Malonyl-CoA-Carboxyl-Transferase, EC 2.1.3.1), die für den reversiblen Transfer einer Carboxylgruppe von Methylmalonyl-CoA auf Pyruvat verantwortlich ist, dem vorletzten Schritt vor der Propionsäurebildung (DEBORDE 2002). Primer (vorw):

ATTCCATCGCCCTGAAGGA (0,3 µM), Primer (rev): TTGATCTGCGTCTTCTGGCC (0,3 µM), Taqman-Sonde: FAM-CGCAGCCGGCCTACGACA-BQ1 (0,2 µM). Die Produktlänge beträgt 103 bp. Die Überprüfung der Primer/Sonden erfolgte mit Hilfe der Freeware Fast PCR 6.1 (KALENDAR *et al.* 2009, 2011) und Sequenzen aus der NCBI-Datenbank. Das PCR-Protokoll wurde wie folgt modifiziert: Es wurde der SSo Fast Probes Supermix (BioRad, München) in einem 20 µl Ansatz verwendet. Zeit-Temperaturzyklen waren: initiale Denaturierung 2 min bei 95 °C, 40 Zyklen bei je 92 °C für 10 sec und für 15 sec bei 55 °C. Das real-time Gerät war ein ICycler IQ (BioRad, München).

Für die Herstellung des quantitativen DNA-Vergleichsstandards für *P. freudenreichii* wurden zwei Tage alte Kulturen (stationäre Phase) verwendet, die Keimzahlen bestimmt und Aliquots zu je 1 ml für die DNA-Extraktion geerntet und eingefroren.

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Phenol-/Chloroform nach LEENHOUTS *et al.* (1991). Die Quantifizierung der Nukleinsäure erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Bildanalyse mit einem BioRad Dokumentationssystem und der firmeneigenen Software.

Die Fleischproben wurden 1:10 in 0,9 % NaCl + 0,1 % Pepton für 2 Minuten im Stomacher gemischt, der Überstand ausplattiert und jeweils 1 ml Aliquots für spätere DNA-Extraktion eingefroren.

## Ergebnisse und Diskussion

Um eine Beziehung zwischen den Keimzahlen und der Nukleinsäuremenge für eine Quantifizierung herstellen zu können, ist ein Nukleinsäurestandard Voraussetzung. Von einer 48-Stunden-Reinkultur wurden zunächst die Keimzahlen ermittelt (dreifach), dann wurde DNA aus jeweils 1 ml Aliquots parallel (dreifach) extrahiert. Im Mittel konnten  $8,4 \times 10^8$  genomische Äquivalente ( $10,7 \times 10^8$ ;  $6,6 \times 10^8$ ;  $7,8 \times 10^8$ ) aus  $5,4 \times 10^8$  ( $4,5 \times 10^8$ ;  $6,9 \times 10^8$ ;  $4,9 \times 10^8$ ) KBE /ml extrahiert werden.

Die Genomgröße von *P. freudenreichii* (2,62 Mbp) wurde der NCBI-Datenbank entnommen. Ein Genom entspricht 3,045 fg, umgerechnet beinhaltet 1 ng DNA dann  $3,284 \times 10^5$  genomische Äquivalente.

Zur Erstellung einer Standardkurve wurden 1:10 Verdünnungen der extrahierten DNA hergestellt und doppelt eingesetzt. Die ermittelte PCR-Effizienz der Reinkultur betrug zwischen 85 % und 90 % und fiel damit etwas geringer aus als in der Literatur angegeben (103 %). Die Standardkurve war über 4 Log-Stufen linear und der Korrelationskoeffizient lag bei 0,99 (Abb.1 und 2). Die Nachweisgrenze waren 8 Kopien bzw. genomische Äquivalente pro PCR-Ansatz. Ein sicherer positiver Nachweis war aber mit 40 Kopien zu erhalten.

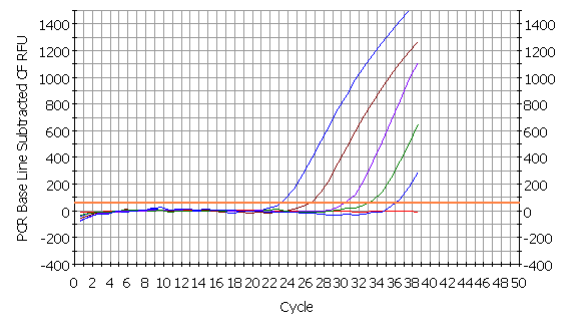


Abb. 1: qPCR – Beispiel einer DNA-Verdünnungsreihe von *P. freudenreichii* (1:10 Verdünnungen von 0,25 ng bis 0,000025 ng). Aufgetragen sind relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen den PCR-Zyklus (Cq-Wert)

Die Keimzahl der Propionibakterien betrug unmittelbar nach Beimpfen des Fleisches bei jeweils zwei unabhängigen Parallelansätzen  $3,2 \times 10^7$  und  $1,2 \times 10^7$  KBE/g, aus den entsprechenden Aliquots wurden  $1,7 \times 10^7$  und  $3,9 \times 10^7$  genomische Äquivalente /g gewonnen. Nach 4 Stunden Inkubation bei 20 °C waren die Keimzahlen unverändert bei  $3,8 \times 10^7$  und  $1,7 \times 10^7$  KBE/g und es konnten  $1,9 \times 10^7$  und  $1,9 \times 10^7$  genomische Äquivalente /g extrahiert werden; nach weiteren 20 Stunden bei 15 °C lagen die Keimzahlen bei  $2,3 \times 10^7$  und  $2,5 \times 10^7$  KBE/g, die genomische Äquivalente bei  $1,3 \times 10^7$  und  $1,9 \times 10^7$  /g. Keimzahlen sowie genomische Äquivalente entsprachen sich demnach relativ gut.

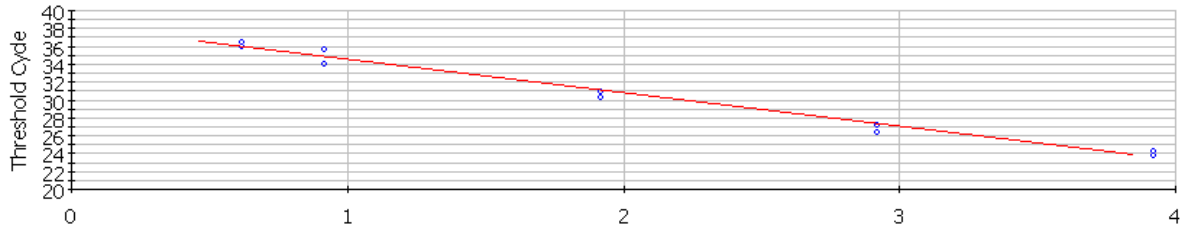


Abb. 2: Beispiel einer quantitativen PCR-Standardkurve für *P. freudenreichii*. Auf der Y-Achse sind die PCR-Zyklen (Cq-Werte) aufgetragen, auf der X-Achse die eingesetzte DNA-Menge (ng). DNA wurde aus einer Reinkultur von *P. freudenreichii* mit bekannter Keimzahl erstellt und 1:10 Verdünnungen der DNA wurden analysiert. Die Kurve ist über 4 Log-Stufen linear. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,99, die PCR-Effizienz 85 %.

Für eine schnelle Identifizierung bakterieller Kolonien wurde nach der Kultivierung auf Agarplatten Zellmaterial von ca. 50 einzelnen Kolonien der Propionibakterien jeweils direkt in den PCR Ansatz eingebracht (direkte Kolonie-PCR). Eine kurzzeitige Erhitzung mit nachfolgender Zentrifugation und Abnahme des wässrigen Überstandes bzw. eine andere vorhergehende DNA-Extraktion war nicht nötig, obwohl es sich um Gram-positive Mikroorganismen handelt (Abb. 3). Dies wurde schon früher demonstriert (LICK *et al.* 1999). Die Identifizierung dauerte ca. 50 Minuten.

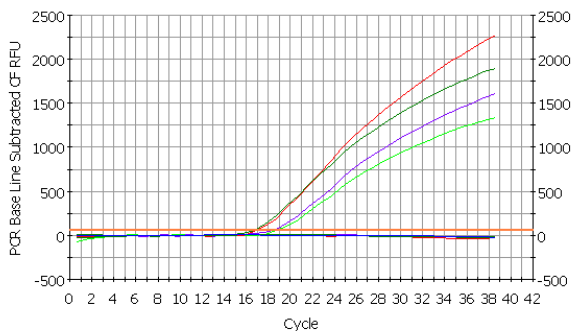


Abb. 3: Qualitative real-time PCR zur Identifizierung von *Propionibacterium freudenreichii*. Koloniematerial von 4 Kolonien wurde direkt ohne weitere Reinigung eingesetzt. Negativkontrollen waren Pseudomonaden und Enterobacterien, sowie eine Wasserkontrolle. (Y-Achse: RFU = relative Fluoreszenz Einheiten, X-Achse: Cq-Werte)

Fleischproben werden üblicherweise 1:10 z. B. in physiologischer Kochsalzlösung zum Stomachern für eine spätere Ausplattierung verdünnt. Rein rechnerisch sollten in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung

nach der Stomacherbehandlung etwa 8000 Kopien der Ziel-Nukleinsäure enthalten sein, wenn 5 µl DNA-Lösung (40 genomische Äquivalente) pro PCR-Ansatz nötig sind, um einen sicheren Nachweis führen zu können. Das bedeutet, dass pro Gramm Probenmaterial  $8 \times 10^4$  Kopien nachweisbar wären. Normalerweise treten noch Verluste bei der Nukleinsäurepräparation auf, die bei dieser Abschätzung noch nicht berücksichtigt sind. Eine Keimbelastung von  $1-2 \times 10^5$  KBE/g Propionibakterien auf Fleisch lag daher in unserem Fall an der Nachweisgrenze oder darunter. Falls während der DNA-Präparation eine Ankonzentration um den Faktor 10 erfolgen kann, was aber wiederum von der Hintergrund- bzw. Begleitflora und damit von der Gesamt-Nukleinsäurekonzentration abhängt, ließe sich auch die Nachweisgrenze pro Gramm Fleisch um den Faktor 10 steigern. HERVE *et al.* (2007) fanden eine Nachweisgrenze von  $10^6$  KBE/g in Faecesproben, was etwa 80 KBE pro PCR-Ansatz entsprach. Bei Darminhalt liegt die Begleitmicrobiota aber bei mindestens  $10^8$  bis  $10^9$  KBE/g, bei unseren Fleischproben lagen die Keimzahlen der normalen Begleitflora (z. B. Pseudomonaden) sehr viel niedriger, in diesem Fall nur bei  $10^3-10^4$  KBE/g.

Außerdem wurde die DNA-Extraktion hier mit Phenol-Chloroform durchgeführt, was eine sehr reine DNA ergibt. Kommerzielle Kits ermöglichen in der Regel eine schnellere Extraktion und eine weitere Zeiterparnis, eventuell aber auch eine etwas schlechtere Qualität der Nukleinsäure bzw. größere Verluste in der Nukleinsäu-

reusbeute und damit eine Verschlechterung der Sensitivität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es eine deutliche Zeitersparnis mit sich bringt, spezifische qPCR-Techniken in der Routine der Mikrobiologie vorzuhalten. Während eine Keimzahlermittlung von beispielsweise Propionibakterien etwa 2 Tage benötigt, bevor die Ergebnisse vorliegen, dauert die Ermittlung genomischer Äquivalente aus einer gemischten bakteriellen Kultur unmittelbar nach dem Stomachern dagegen nur etwa einen halben Tag, vorausgesetzt, dass quantitative DNA-Standards bereits vorhanden sind.

Ebenso ist es hilfreich, auf festen Nährmedien, die z. B. gemischte bakterielle Kulturen enthalten, schnell die Identität einzelner Kolonien zu überprüfen, um zu erkennen, ob eine gesuchte oder ausgeübte Bakterienspezies tatsächlich vorhanden ist und in welcher Größenordnung, d. h. auf welcher Verdünnungsstufe, sie vorliegt.

## Dank

Frau Popp für die sorgfältige Züchtung der Propionibakterien und die Keimzahlermittlung.

## Literatur

Babuchowski, A., Laniewska-Moroz, L., Warminska-Radyko I. (1999): Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait* 79: 113-124

Cummins, C. S., Johnson, J. L. (1986): The Genus *Propionibacterium*. In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt (eds.), J. G., *Bergeys Manual of Systematic Microbiology* Vol. 2, London, UK, 1346-1353

FAO/WHO (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Geneva, Switz: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. [http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood\\_probioen.stm](http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probioen.stm). Available from, Accessed 2004 Juni 28

Herve, C., Fondrevez, M., Cheron, A., Barloy-Hubler, F., Jan, G. (2007): Transcarboxylase mRNA: a marker which evidences *P. freudenreichii* survival and metabolic activity during its transit in the human gut. *Int. J. Food Microbio.* 113:303-314

Holzappel, W. H. (1998): The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products, p. 35-84. In: R. G. Board and A. R. Davies (ed.), *the microbiology of Meat and Poultry*, Blackie Academic and Professional, London, UK

Hugenholtz, J., Hunik, J., Santos, H., Smid, E. (2002): Nutraceutical production by propionibacteria. *Lait* 82:103-112

Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A. H. (2011): Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* 98:137-144

Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A. H. (2009): Fast PCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1):1-14

Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G., Seegers, J. F. (1991): Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid* 26: 55-66

Lick, S., Schneede, K., Wittke, A., Heller, K. J. (1999): Detection without sample processing of yoghurt starters and DNA in milk products by PCR. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 51:15-25

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Suomalainen, T. H., Mayra-Makinen, A. M. (1999): Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait* 79:165-174