

Saftverderber

Nachweis acidophiler Getränkeschädlinge

Annette Rau, Matthias Mailänder und Burkhard Schütze

Wenn der Saft schlecht schmeckt und riecht, sind häufig bakterielle Saftverderber am Werke. Vor allem acidophile Sporenbildner können Fruchtsaftgetränke verderben. Im Sommer 1982 ereignete sich ein Schadensfall in der deutschen Fruchtsaftindustrie. Apfelnektar mit einem pH-Wert von 3,15 verdarb nach einigen Wochen Lagerung trotz Pasteurisation (92 °C für 10 s) und aseptischer Abfüllung. Die Säfte waren nach einigen Wochen Lagerung leicht getrübt und wiesen einen deutlichen Fehlgeschmack auf.



Annette Rau
(geb. Ellenberger)

» Zur Person

Dipl.-Oecotrophologin,
LADR GmbH «

Mikroskopisch ließen sich stäbchenförmige Sporenbildner nachweisen. Die mikrobiologische Anzucht gelang mit den Standardnährböden der Branche zunächst nicht. Erst nach der Entwicklung neuer Nährmedien für den optimalen Wachstumsbereich von pH 3,5 bis 4,0 klappte die Kultivierung. Im nur schwach sauren bis neutralen pH-Bereich stellte der ungewöhnliche Verderbniserreger sein Wachstum ein. Der Getränkeschädling wurde als der Spezies *Bacillus acidocaldarius* zugehörig identifiziert. Später konnte der Glucose-Sirup als Eintragsquelle identifiziert werden [1].

Die zunächst nur in Umweltproben isolierten Bodenbakterien wurden in den folgenden Jahren in eine eigene Gattung *Alicyclobacillus* klassifiziert. Mittlerweile sind zahlreiche Spezies der Gattung *Alicyclobacillus* bekannt, von denen jedoch nicht alle Fehlgerüche ausbilden. Bekannte getränkeschädliche Spezies sind *Alicyclobacillus acidoterrestris* und *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Problematisch für die Fruchtsaftindustrie ist, dass bereits geringe Keimzahlen ausreichen können, um eine Charge zu kontaminieren. *Ali-*

cyclobacillus bildet kein Gas und keine Säure, sodass eine Kontamination nicht einfach erkennbar ist. Erst die Pasteurisation kann dazu führen, dass die Sporen durch den Hitzeshock auskeimen. Zudem kann es zu Phänomenen kommen, bei denen der Off-Flavor erst nach Verdünnungen – etwa beim Einsatz des Fruchtsaftes als Zutat in einem Softdrink – zum Tragen kommt. Weder von dem Organismus noch von den Stoffwechselprodukten geht eine gesundheitliche Gefahr für den Verbraucher aus. Das phenolische, „nach Desinfektionsmittel“ riechende Fehlgeruch wird jedoch von den Konsumenten nicht akzeptiert und führt zu Reklamationen [2].

Somit begann 2001 die Internationale Fruchtsaftunion (IFU) mit Standardisierungen der Methode, die im September 2004 in einer kulturellen Methode zur Bestimmung von *Alicyclobacillus* spp. in Fruchtsaft mündete [3].

Kulturelle Methode

Die Kultivierung ist sehr langwierig. Die Nährmedien müssen mindestens 120 h inkubiert, jeweils täglich von einem erfahrenen Mitarbeiter abgelesen und ver-

dächtige Kolonien auf zwei verschiedene Medien isoliert werden. Einerseits auf BAT („*Bacillus acidoterrestris*“)-Medium mit sehr niedrigem pH-Wert und andererseits auf einem gängigen Medium für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl wie PC(Plate Count)-Agar. Gelingt eine Anzucht aus einer Anreicherung von nicht filtrierbaren Produkten nur auf BAT und nicht auf PC-Agar, gilt der geführte Nachweis als *Alicyclobacillus*-positiv. Wachsen die Mikroorganismen hingegen sowohl auf BAT als auch auf PC-Agar, wurde Begleitflora isoliert. Meist sind dies ebenfalls Sporenbildner, die aber keine Bedeutung als Verderbsorganismen haben. Das kulturelle Nachweisverfahren nutzt elegant die physiologischen Besonderheiten von *Alicyclobacillus*-Spezies und unterdrückt die Begleitflora durch den niedrigen pH-Wert. Für erfahrene Mikrobiologen ist die Analytik durch die charakteristische Morphologie problemlos durchführbar. Der Arbeitsaufwand im



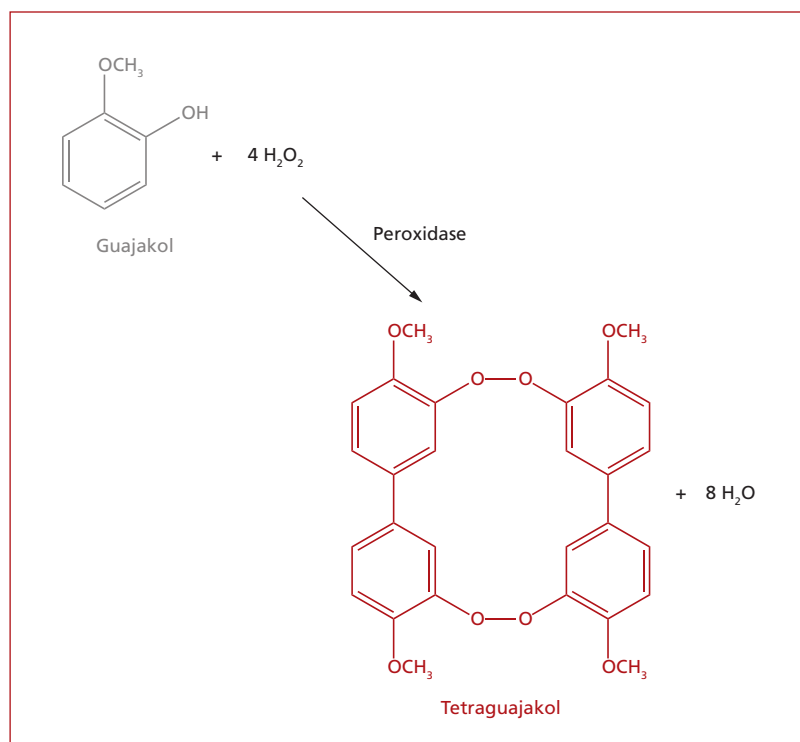
Abb. 1
Kolonien von *Alicyclobacillus* auf BAT-Agar aus einer filtrierbaren Saftprobe

Labor ist jedoch sehr hoch. Insbesondere bei starker Begleitflora durch *Paenibacillus*-Spezies oder säuretolerante Sporenbildner wie *Bacillus coagulans*, da diese laut IFU-Vorschrift jeweils kulturell ausgeschlossen werden müssen.

Methode	Anzahl Arbeitstage	Woche 1							Woche 2							Woche 3						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
 filtrierbar quantitativ Inkubation Bestätigung	10																					
	5	< 1 KBE/10 g																				
	5	Verdacht: n KBE/10 g																				
 nicht-filtrierbar quantitativ Inkubation Bestätigung	10																					
	5																					
	5	Verdacht: n KBE/10 g																				
 nicht-filtrierbar qualitativ Anreicherung Inkubation Bestätigung	15																					
	5																					
	5	negativ/10 g																				
	5	Verdacht: positiv/10 g																				

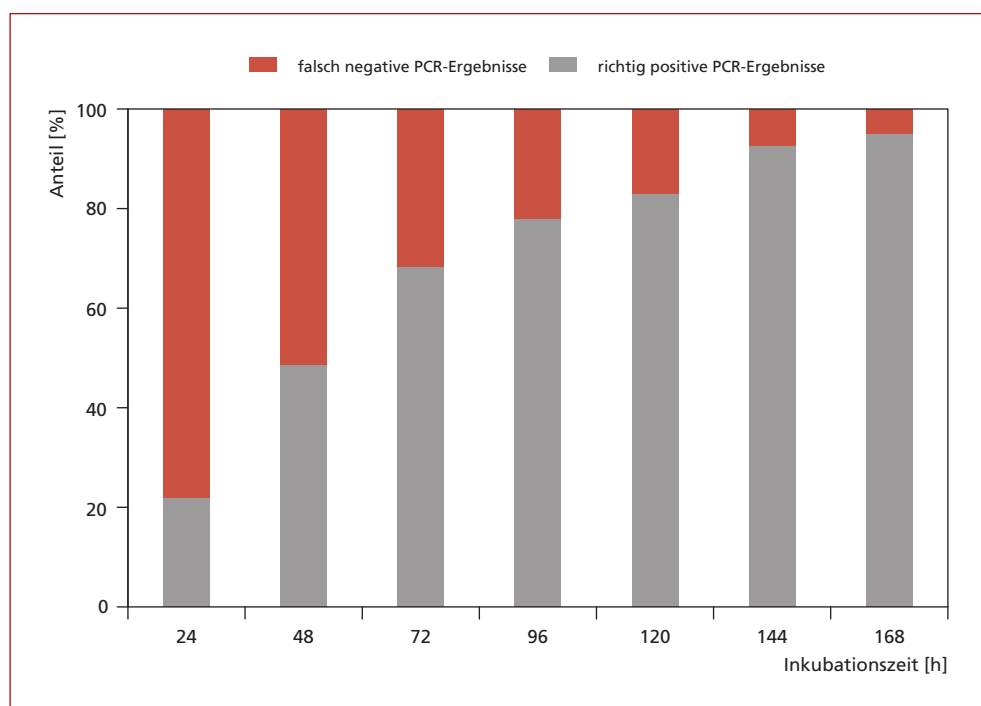
Verdacht: MALDI-TOF-MS-Biotypisierung, Schnellanalytik möglich
 aus Anreicherungskultur, PCR-Schnellanalytik möglich

Abb. 2 IFU-Methode Nr. 12: Die Zeit bis zum sicheren negativen Ergebnis beträgt hier bis zu 15 Tage. Bei Vorliegen von Einzelkolonien bietet es sich an, die Analysendauer mittels MALDI-TOF-MS zu verkürzen. Aus Anreicherungskulturen ist eine PCR-Schnellanalytik möglich.

**Abb. 3**

Bei dem biochemischen Nachweis wird das farblose Guajakol enzymatisch in einen farbigen Komplex umgewandelt.

Dem kulturellen Nachweis folgt, wie meist üblich, eine Identifizierung und Bestätigung der Isolate. Im LADR-Labor Dr. Kramer in Geesthacht auf Kundenwunsch

**Abb. 4** Natürlich kontaminierte Säfte benötigen bis zu 7 Tage Inkubationszeit, damit der PCR-Nachweis gelang.

durch Biotypisierung mittels MALDI-TOF-MS, 16S rRNA-Gensequenzierung oder biochemisch durch Nachweis der Haupt-Fehlaromakomponente Guajakol selbst.

Der Standardisierung der kulturellen Analytik folgte zudem bald eine molekularbiologische Detektionsmethode [4].

Alternative Nachweisverfahren

Der Wunsch, die Analytik zu beschleunigen, ist sowohl vonseiten der Analysenlabore als auch der Fruchtsaftindustrie sehr groß. Üblicherweise erlaubt die Polymerasekettenreaktion (PCR) eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu kulturellen Methoden, sodass es naheliegt, aus Anreicherungsbouillons, früher als von der IFU-Methode empfohlen, einen molekularbiologischen Test durchzuführen. Bei schnell vermehrungsfähigen Erregern wie beispielsweise *Salmonella* spp. ist die 24-h-Schnell-Analytik aus Lebensmitteln zum Branchenstandard geworden.

Die IFU-Methode Nr. 12 gilt als Referenzverfahren. Abweichungen vom Referenzverfahren oder Alternativverfahren müssen entsprechend der DIN EN ISO 16140 validiert werden. In einer Validierungsstudie mit natürlich kontaminierten Apfelsäften wurde dies in der Abteilung für Lebensmittelanalytik des LADR-Labors in Geesthacht überprüft.

Hierbei stellte sich heraus, dass eine 5-tägige, am besten 7-tägige Anreicherung in BAT-Bouillon unerlässlich ist. Verkürzungen etwa auf 3 Tage, wie häufig von Anbietern kommerzieller PCR-Kits vorgegeben wird, sind nicht empfehlenswert, da hier mit falsch negativen Ergebnissen in fast einem Drittel der Fälle zu rechnen ist. Künstlich kontaminierte Proben, wie sie häufig für die Methoden-Entwicklung eingesetzt werden, verhalten sich deutlich anders als

„natürlich“ kontaminierte Proben. Daraus abgeleitete Werbeversprechen sind stets kritisch zu hinterfragen und durch wissenschaftliche Studien zu belegen.

Fazit

Wie zu erwarten, konnte gezeigt werden, dass „wilde“ *Alicyclobacillus*-Spezies in Fruchtsäften unterschiedliche Generationszeiten aufweisen. Dies ist durch stammspezifische Unterschiede, aber auch Zellschäden durch Umwelteinflüsse und Stressbedingungen (etwa Kühlung, intensive UV-Lichteinstrahlung und vor allem die Wirkung des Pasteurierungs-

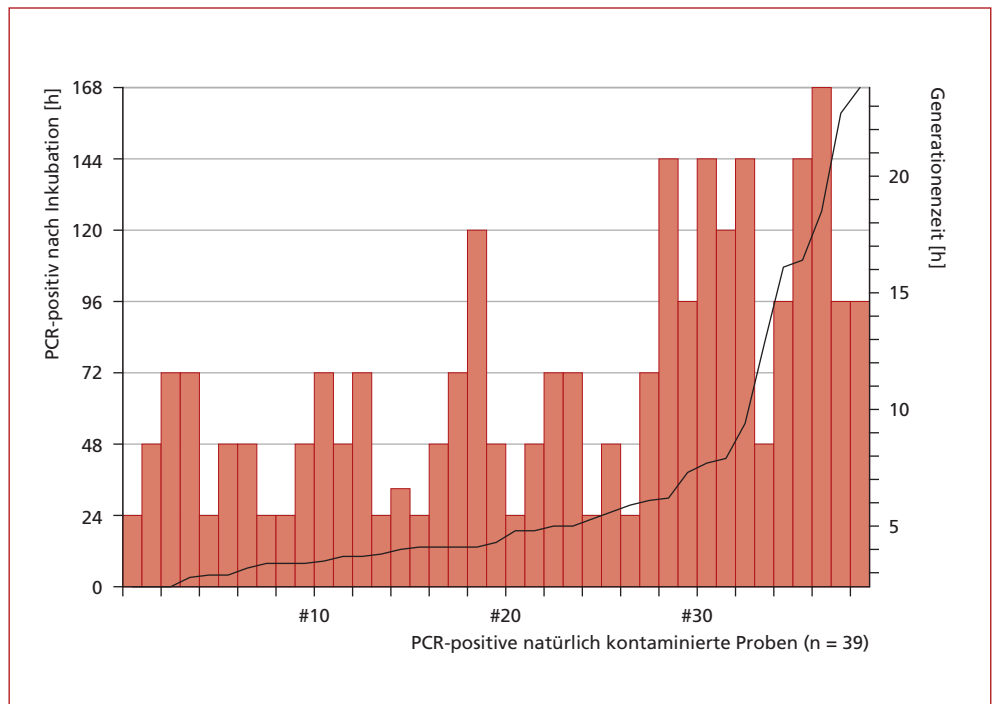


Abb. 5 Generationszeiten (schwarze Kurve) von 60 *Alicyclobacillus*-Stämmen in Apfelsaft wurden aufgezeichnet und jeweils täglich geprüft, ob bereits ein PCR-Nachweis möglich ist.

Professionelles Beratungstraining

Von Dr. Georg Keller und Prof. Dr. Michael Thiele
 2. Auflage 2016. X, 174 Seiten.
 18 Abbildungen. 10 Cartoons. Kartoniert.
 € 32,80 [D]
 ISBN 978-3-8047-3502-6

Das wichtigste Werkzeug der Ernährungsberatung ist das Gespräch. Die Technik einer professionellen Gesprächsführung lässt sich erlernen. Wie? Das erfahren Sie in diesem kurzweiligen Arbeitsbuch anhand geschickt ausgewählter Redeübungen, die Sie mit Mitarbeitern, Freunden oder Bekannten trainieren können.

- Darüber hinaus geben die Autoren
- Praxistipps zu Motivation und Compliance
 - Hinweise für eine erfolgreiche Gruppenberatung
 - Infos zur Sicherung der Beratungsqualität

Jetzt haben Sie das Wort!



Alle Preise inklusive MwSt. (D), sofern nicht anders angegeben. Lieferung erfolgt versandkostenfrei innerhalb Deutschlands. Lieferung ins Ausland zuzüglich Versandkostenpauschale von € 8,90 pro Versandstück. E-Books sind als PDF online zum Download erhältlich unter www.buchoffizin.de.

WVG
 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
 Birkenwaldstraße 44 | 70191 Stuttgart
 Telefon 0711 2582 - 341 | Telefax 0711 2582 - 390
www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de



Matthias Mailänder
Dipl.-Lebensmittelchemiker, LADR GmbH

vorganges) zu erklären. Das Auskeimen dieser subletal geschädigten *Alicyclobacillus*-Sporen ist dann sowohl im Produkt als auch in den Nährlösungen im Labor verzögert. Insgesamt konnten grob zwei Gruppen ausgemacht werden. Jene *Alicyclobacillus* spp. mit einer kurzen lag-Phase von 1–3 Tagen und einer Generationszeit von nur 4 h sowie denjenigen *Alicyclobacillus*, die das exponentielle Wachstum erst nach 3 Tagen erreichen, eine Generationszeit von 12 h besitzen und daher erst nach bis zu 7 Tagen nachweisbar sind [5].

Nach unseren Erfahrungen sind molekularbiologische Nachweismethoden grundsätzlich auch für die Analytik von *Alicyclobacillus* spp. in der Praxis geeignet. Wir empfehlen jedoch, die Inkubationszeit der Anreicherungskulturen beim Einsatz der PCR nicht unter die Empfehlungen der IFU für den kulturellen Nachweis herabzusetzen.

Spielt Zeit eine Rolle, um Alicyclobazillen nachzuweisen, ist der molekularbiologische Nachweis aus der spezifischen Anreicherung mittels PCR die Methode der Wahl. Dies gilt jedoch nur für nicht-filtrierbare Produkte.

Werden quantitative Ergebnisse gewünscht, können die vorliegenden verdächtigen Kolonien biochemisch oder mittels MALDI-TOF-MS zeitnah bestätigt werden.

Literatur

- [1] Cerny G et al.: Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. **179**, S. 224–227 (1984).
- [2] Walker M, Phillips CA: *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? Int J Food Sci Technol **43**, S. 250–260 (2008).
- [3] IFU: Method on the detection of taint producing *Alicyclobacillus* in fruit juices. IFU Handbook Microbiological Methods **3** (2004).
- [4] Connor CJ et al.: Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products. Int J Food Microbiol **99**, 229–235 (2005).
- [5] Ellenberger A: Validierung des mikrobiologischen Nachweises von *Alicyclobacillus* spp. IFU-Methode Nr. 12 versus real time PCR. Diplomarbeit HAW Hamburg (2009). ■



Dr. Burkhard Schütze
Dipl.-Biologie, amtlich zugelassener Sachverständiger für Lebensmittel, Laborleiter Lebensmittelanalytik der LADR GmbH in Geesthacht

Anschrift der Autoren

Anette Rau
Matthias Mailänder
Dr. Burkhard Schütze
LADR GmbH
MVZ Dr. Kramer & Kollegen
Lebensmittelanalytik
Lauenburger Straße 67
21502 Geesthacht

Der Autor dieses kompakten Fachbuchs schildert Bedeutung, Vorkommen und Klinik der häufigsten Nahrungsmittelunverträglichkeiten sowie deren Diagnostik und Therapie. Praxistipps, Fallbeispiele, Differenzialdiagnosen und weitere Zusatzinformationen liefern dem Leser das Rüstzeug für die kompetente Beratung seiner Patienten.

Gratis-Download
des Anamnesefragebogens für alle Interessierten unter:
www.Online-PlusBase.de



Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
Birkenwaldstraße 44 | 70191 Stuttgart
Telefon 0711 2582 -341 | Telefax 0711 2582 -390
www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de



Von Axel Vogelreuter.

2012. XII, 230 Seiten. 41 farbige Abbildungen. 34 farbige Tabellen. Mit Anamnesefragebogen. Gebunden. € 42,- [D]. ISBN 978-3-8047-2938-4

E-Book PDF. € 42,- [D]. ISBN 978-3-8047-3102-8
E-Book E-PUB. € 42,- [D]. ISBN 978-3-8047-3116-5

(E-Books sind online zum Download erhältlich unter www.buchoffizin.de)

Alle Preise inklusive MwSt. (D), sofern nicht anders angegeben. Lieferung erfolgt versandkostenfrei innerhalb Deutschlands. Lieferung ins Ausland zuzüglich Versandkostenpauschale von € 8,90 pro Versandstück.