



Abb. 1: Gärkräftige Hefen und heterofermentative Milchsäurebakterien in Fruchtsäften sind besonders gefürchtet, da sie aufgrund ihrer starken Gasbildung Bombagen verursachen können. © andi-h/pixelio.de

Wenn der Saft zur Bombe wird ...

Keime sicher und preiswert erkennen mit MALDI-TOF-MS

Mikroorganismen wie Hefen und Laktobazillen zählen zu den Problemkeimen in der Getränkeindustrie. Bei Fruchtsäften sind gärkräftige Hefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces* sowie heterofermentative Milchsäurebakterien besonders gefürchtet, da sie aufgrund ihrer Fähigkeit zur Gasbildung gefährliche Bombagen verursachen können. Liegt ein Befall vor, können nur eine genaue Identifikation der Keime und eine möglichst zügige Eruiierung des Kontaminationsursprungs durch aufwändige Stufenkontrollen die konstante Qualität der Säfte erhalten.

Das zuverlässigste Identifizierungsverfahren stellte bisher die klassische aber kostenintensive DNA-Sequenzierung dar. Eine Alternative, die seit kurzem Einzug in die Labore hält, ist die sogenannte MALDI-TOF-MS-Analyse. Diese ist ähnlich zuverlässig wie die Sequenzierung, kann pro Durchgang aber bis zu 50 % weniger Kosten verursachen. Ein weiterer Vorteil der Methode ist vor allem bei isolierten Proben das taggleiche Ergebnis.

Trotz regelmäßiger Herstellerkontrollen kommt es im Handel und beim Verbraucher immer wieder zu Bombagen von Flaschen oder Kunststoffverpackungen. Verantwortlich dafür ist ein Befall mit Verderbnis erregenden Mikroorganismen. Fruchtsäfte und -konzentrate gehören im Allgemeinen zwar zu den mikrobiologisch unproblematischen Lebensmitteln, da sie einen niedrigen pH-Wert von

2,5 bis 4,5 haben, der das Wachstum der meisten Keime unterdrückt. Neben verschiedenen Bazillusarten sind jedoch insbesondere Hefen und Milchsäurebakterien sehr säuretolerant. Hefen können einen sauren pH-Bereich bis 3 sowie ein breites Temperaturspektrum von 0 bis 45 °C tolerieren. Gärkräftige Gattungen wie *Saccharomyces* und *Zygosaccharomyces* sind besonders gefährlich, da sie deutliche sensorische Veränderungen hervorrufen können, bspw. einen gäricen Geruch und einen unangenehmen Fremdgeschmack. Darüber hinaus können sie in einer sauerstofffreien Umgebung durch Gärung große Mengen an Kohlenstoffdioxid und Alkohol produzieren, sodass die Getränke nicht mehr vertrieben werden können. Durch das gebildete Kohlenstoffdioxid besteht die Gefahr einer Bombage der Behältnisse. Ähnlich

verhält es sich bei einem Befall durch heterofermentative Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus buchneri* und Arten des Genus *Leuconostoc*, die ebenfalls starke Kohlenstoffdioxidbildner sind. Bei Laktobazillen erfolgt der Verderb der Säfte außerdem durch die Produktion von Milch- und Essigsäure, die Produkte fallen durch Schleimbildung und käsigen Geruch auf.

Die Infektion von Getränken – neben Fruchtsäften sind auch Limonaden und Schorlen betroffen – hat ihren Ursprung häufig in verkeimten Rohstoffen. Die Erreger setzen sich über Staub auf den Früchten ab und gelangen bei der Verarbeitung auch in die Endprodukte. Trotz Pasteurisation kann es auch bei späteren Produktionsschritten zum Befall mit *Saccharomyces*- und *Zygosaccharomyces*-Arten sowie



► Dr. Burkhard Schütze,
Laborleiter Bereich
Lebensmittelanalytik, LADR

Laktobazillen kommen. Oft sind für die Kontamination der Säfte unzureichend gereinigte Produktionsanlagen verantwortlich.

DNA-Sequenzierung im Labor

Die Betriebe müssen in diesen Fällen eine genaue Ursachenforschung betreiben, um die Keimquelle schnellstens zu identifizieren – sowohl um den finanziellen Schaden durch Rückrufaktionen und die Vernichtung in den Handel gelangter, befallener Chargen zu begrenzen, als auch die Gefährdung für Personal und Verbraucher durch die Bombage möglichst schnell auszuschalten. Dazu muss der Hersteller umgehend feststellen, wie die Keime in den Produktionsprozess gelangt sind. Als erstes werden Proben des befallenen Saftes sowie aus den verschiedenen Stufen des Prozesses entnommen und im Lebensmittellabor genau auf die vorhandenen Verderbniserreger untersucht. Auf diese Weise grenzt man die Keimquelle ein, um sie schließlich eindeutig bestimmen und beseitigen zu können.

Hefen und Milchsäurebakterien können im Labor durch verschiedene kulturelle, biochemische und molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden. Goldstandard der Identifizierung sei dabei das klassische Sequenzierungsverfahren, erklärt Dr. Burkhard Schütze, Laborleiter des Bereichs Lebensmittelanalytik bei LADR. Dazu wird vorab durch Anzucht in verschiedenen Nährmedien bestimmt, ob es sich beim vorliegenden Erreger um eine Hefe oder einen Laktobazillus handelt. Mit Hilfe des PCR-Verfahrens kann das Erbgut schnell vervielfältigt werden. Die anschließende Sequenzierung gibt Aufschluss über den Erregerstamm. Die ermittelte ITS- oder 16S-rDNA-Sequenz wird mit Sequenzen, die in Datenbanken liegen, verglichen. So können Gattung und Spezies meist eindeutig ermittelt werden.

MALDI-TOF-MS-Analyse als Alternative

Nur bei wenigen Lebensmittel Laboren, darunter LADR, kommt eine neue Technologie zum Einsatz: die MALDI-TOF-MS (matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry). Auch bei diesem Verfahren wird als erstes aus der Lebensmittelprobe ein Keimisolat gewonnen. Diese Reinkultur der Mikroorganismen ist für die MALDI-TOF-Analyse unbedingt notwendig. Sie wird mit einer Pipettenspitze direkt auf die Analyseposition der MALDI-Probenplatte aufgebracht und sofort mit einer organischen Kristallisationsmatrix überschichtet.

Nach dem Eintrocknen der Probe wird diese im MALDI-TOF-MS-Gerät massenspektrometrisch analysiert. Dabei erfolgt mittels Lasertechnologie die Ionisierung der Proteine, die im elektrischen Feld zunächst gebündelt und durch ein Flugrohr geleitet werden, um anschließend auf einen Detektor zu treffen. Im Bereich von 2.000 bis 20.000 Dalton wird so die Molekülmasse der gebildeten primären Ionen und Zerfallsprodukte im Hochvakuum exakt bestimmt. Das resultierende Probespektrum werde mit



Abb. 2: Die MALDI-TOF-MS-Analyse ist genauso zuverlässig wie die DNA-Sequenzierung, jedoch günstiger. Erster Schritt des Verfahrens ist die Gewinnung eines Keimisolats aus Fruchtsaftproben. Im MALDI-TOF-MS-Gerät erfolgt die massenspektrometrische Analyse des Isolats. Deren Ergebnis wird mit den in der MALDI-Biotyper-Datenbank hinterlegten Referenzspektren abgeglichen und die Keime dadurch identifiziert. © Bruker Daltonik

den in der MALDI-Biotyper-Datenbank hinterlegten Referenzspektren abgeglichen und führe dann ebenfalls zur eindeutigen Identifikation der Keime so Schütze. Das Ergebnis liegt bereits nach wenigen Minuten vor.

Halbierte Kosten

Eine Validierungsstudie am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) zeigte bereits 2009, dass die MALDI-TOF-MS-Analyse bei 84% von mehr als 300 untersuchten bakteriellen Isolaten mit der biochemischen Identifizierung übereinstimmte. Im Rahmen dieser Studie stellte sich heraus, dass das Verfahren sogar präziser ist als die bisherigen Methoden: Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS ließen bei den dort untersuchten Isolaten eine Differenzierung auf der Subspeziesebene zu.

Neben ihrer Schnelligkeit liegt der wesentliche Vorteil der bisher wenig verbreiteten Analyseverfahren vor allem in ihrer Kosteneffizienz: Bei allen Isolaten, also sowohl bei Pilzen als auch Bakterien, könne dasselbe Analyseprotokoll angewandt werden. Das ermögliche einen hohen Probendurchsatz, erläutert Schütze. Dadurch seien auch die verbrauchsabhängigen Kosten sehr gering. Pro Analysedurchgang kann es etwa gegenüber der klassischen Sequenzierung zu einer Ersparnis von bis zu

50% kommen – trotz der hohen Investitionskosten für das Analysegerät. Gerade wenn eine Stufenkontrolle durchgeführt werde, die erst nach mehreren Untersuchungsschritten zur Identifikation der Keimquelle im Betrieb führe, reduziere die neue Methode den finanziellen Aufwand des betroffenen Betriebs deutlich, so Schütze.

Autorin

Iris Gehard, Pressebüro Gebhardt-Seele

► KONTAKT

LADR GmbH MVZ
Dr. Kramer & Kollegen
Geesthacht
Tel.: 04152/8030
lebensmittel@ladr.de
www.ladr.de