

**Affinitätsanreicherung von Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrest-
ris*, *A. acidiphilus* und *A. herbarius* aus wirtschaftlich relevanten Säf-
ten und Saftkonzentraten für die Qualitätskontrolle im Routinebetrieb**

| | |
|-----------------------------|---|
| Koordinierung: | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn |
| Forschungsstelle I: | Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Markus Fischer/Dr. Carsten Möller |
| Forschungsstelle II: | Universität München Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch Prof. Dr. Erwin Märtlbauer/Dr. Richard Dietrich |
| Industriegruppe: | Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie (VdF) e.V., Bonn Projektkoordinator: Dr. Andrea Rödiger-Penman WeserGold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG, Rinteln |
| Laufzeit: | 2013 – 2016 |
| Zuwendungssumme: | € 374.250,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI) |

Ausgangssituation:

Der Verarbeitungsschritt der Pasteurisation bei der Fruchtsaftherstellung dient der Abtötung mikrobieller Kontaminanten. Zudem erschweren hohe Zuckerkonzentrationen, niedrige pH-Werte, die Anwesenheit organischer Säuren und eine niedrige Wasseraktivität das mikrobielle Wachstum in Fruchtsaftkonzentraten. Verderbniserreger, die in Form ihrer Sporen den Herstellungsprozess überleben und im fertigen Produkt zum Verderb führen können, sind die thermoacidophilen, sporenbildenden Alicyclobazillen (z. B. *A. acidoterrestris*). Dieses Bakterium ist nicht pathogen, führt aufgrund seines Stoffwechsels jedoch zu einem off-Flavour (rauchig oder nach Desinfektionsmittel riechend) im Fruchtsaftprodukt. Da Alicyclobazillen ubiquitär vorkommen, kann meist eine Einbringung des Mikroorganismus in den Herstellungsprozess nicht vermieden werden. Gründliches Waschen der Früchte vor und eine Kontrolle der Keim-/Sporenzahl während der Produktion und im fertigen Produkt sind daher bislang die Methoden der Wahl.

Derzeit steht der Fruchtsaftindustrie keine analytische Methode zur Verfügung, die einen zeitnahen Nachweis von *Alicyclobacillus*-Sporen schon während der Verarbeitung bzw. in der Produktion ermöglicht.

Ziel des Forschungsvorhabens war daher die Entwicklung einer Anreicherungsmethode von Sporen von *A. acidoterrestris*, *A. acidiphilus* und *A. herbarius* aus Orangensaft mit Hilfe von Aptamer- und Antikörper-basierten Methoden. Die entwickelte Methode soll in Kombination mit einer anschließenden spezifischen PCR eine Bestimmung der o.g. *Alicyclobacillus*-Arten in kurzer Zeit ermöglichen und die zeitintensive Kultivierung in der Analytik ersetzen.

Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden sowohl Antikörper als auch Aptamere (einzelnsträngige Oligonukleotide) mit einer hohen Affinität gegenüber *Alicyclobacillus*-Sporen gene-

riert und umfassend charakterisiert. Dabei wurden die Bindungsparameter sowie die Selektivität der generierten Biomoleküle mit verschiedensten Methoden analysiert. Es zeigte sich, dass die generierten Biomoleküle eine sehr hohe Affinität (Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich), jedoch keine absolute Selektivität aufweisen. Die Interaktionen wurden zudem teilweise durch den Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

Darüber hinaus wurde erfolgreich eine Gattungsspezifische Real-Time-PCR entwickelt und nach ENGL-Kriterien umfassend validiert. Der Nachweis beruht dabei auf der 16S rDNA der Sporen. Abschließend wurde eine Bioaffinitätsanreicherung in Orangensaft unter Verwendung von Antikörpern erfolgreich implementiert und mittels der entwickelten Real-Time-PCR überprüft. Dabei konnte eine ca. vierfache Anreicherung erzielt werden. Durch die Kombination der Affinitätsanreicherung mit dem Gattungsspezifischen Nachweis mittels Real-Time-PCR wird zudem ein hohes Maß an Selektivität gewährleistet.

Darüber hinaus wurden unter Verwendung der generierten poly- und monoklonalen Antikörper verschiedene Sandwich-Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (EIA) etabliert, die sich durch ihre niedrige Nachweisgrenze sowie ihre hohe Inklusivität sowie Exklusivität gegenüber anderen Mikroorganismen auszeichnen. Diese EIA wurden auch erfolgreich für den sensitiven Nachweis von *Alicyclobacillen* in verschiedenen Fruchtsäften eingesetzt.

Unabhängig davon ist es zudem gelungen, einen Aptamer-basierten Schnelltest für *Alicyclobacillus*-Sporen in Form eines Lateral-Flow-Devices (LFD) zu entwickeln und dessen Nachweisgrenze zu determinieren.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Durch das affinitätsbasierte Anreicherungsverfahren für *Alicyclobacillen* in Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten wird es den Unternehmen der deutschen Fruchtsaftindustrie ermöglicht, ihre Qualitätskontrolle zu optimieren. Dabei kann der zeitaufwendige Schritt der mikrobiologischen Kultivierung zum Nachweis durch die entwickelte Antikörper-basierte Anreicherung vermieden werden. Die Anreicherung samt folgendem real-time-spezifischen

Nachweis nehmen dabei ca. einen halben Arbeitstag in Anspruch, wodurch eine zeitnahe Analytik in Orangensaft ermöglicht wird.

Darüber hinaus bieten die entwickelten Schnelltests (LFD) vor allem für kleinere und mittelständische Unternehmen ein großes Anwendungspotential. Diese Tests sind mit geringem apparativen und personellen Aufwand durchzuführen und innerhalb von wenigen Minuten auswertbar. Sie bieten ein hohes Potential für den Einsatz in der Wareneingangs- und Rohstoffkontrolle. Im Falle eines negativen Schnelltestergebnisses kann zudem sehr wahrscheinlich auf eine weiterführende Analyse bezüglich einer *Alicyclobacillus*-Kontamination verzichtet werden. Im Falle eines positiven Nachweises können weiterführende Untersuchungen unter Zuhilfenahme der entwickelten Affinitätsanreicherung und der nachfolgenden Real-Time-PCR bzw. eines Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) durchgeführt werden.

Aus den erzielten Ergebnissen lassen sich weitere Nutzenanwendungen ableiten, die über den Einsatz in Orangensaft hinausgehen. Vorstellbar ist dabei die Adaption der entwickelten Methoden auf weitere relevante Lebensmittelmatrices.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2016.
2. Mast, S., Dietrich, R., Didier, A. und Märtlbauer, E.: Development of a polyclonal antibody-based sandwich enzyme-linked-immunosorbent-assay for the detection of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in various fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 64 (8), 497-504 (2016).
3. Hünninger, T., Felbinger, C., Wessels, H., Mast, S., Hoffmann, A., Schefer, A., Märtlbauer, E., Paschke-Kratzin, A. und Fischer, M.: Food Targeting: A Real-Time-PCR-Assay Targeting 16S rDNA for Direct Quantification of *Alicyclobacillus spp.* Spores after Aptamer-Based Enrichment. *J. Agric. Food Chem.* 63 (17), 4291-4296. Doi:10.1021/acs.jafc.5b00874 (2015).
4. Hünninger, T., Fischer, C., Wessels, H., Hoffmann, A., Paschke-Kratzin, A., Haase, I. und Fischer, M.: Food Sensing: Selection and Characterization of DNA Aptamers to *Alicyclobacillus* Spores for Trapping and Detec-

tion from Orange Juice. J. Agric. Food Chem. 63 (8), 2189-2197 (2015).

- Hünniger, T., Wessels, H., Fischer, C., Paschke-Kratzin, A. und Fischer, M.: Just in time-selection: A rapid semiautomated SELEX of DNA aptamers using magnetic separation and BEAMing. *Analyt. Chem.* 86, 10940-10947 (2014).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg
Hamburg School of Science
Institut für Lebensmittelchemie
Grindelallee 117, 20146 Hamburg
Tel.: +49 40 42838-4359
Fax: +49 40 42838-4342
E-Mail: markus.fischer@uni-hamburg.de

Universität München
Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
Schönleutner Str. 8, 85764 Oberschleißheim
Tel.: +49 89 2180-78601
Fax: +49 89 2180-78602
E-Mail: e.maertlbauer@mh.vetmed.uni-muenchen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.