

Aus dem Veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Zürich und der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung Karlsruhe

Mikrobiologische Verunreinigungen in Enzympräparaten für die Lebensmitteltechnologie

II. Bakterien und Schimmelpilze

G. Lott und H. K. Frank

Neben den in einer vorausgegangenen Veröffentlichung¹⁾ beschriebenen Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen (vergl. auch^{2, 3)}) muß auch mit dem Vorkommen vermehrungsfähiger Mikroorganismen in Enzympräparaten gerechnet werden. Dabei ist es gleichgültig, ob das Ausgangsmaterial für die Präparate tierischen oder pflanzlichen Ursprungs ist, oder ob es über Fermentationsprozesse von Mikroorganismen bzw. deren Kulturflüssigkeit gewonnen wurde.

Klaushofer⁴⁾ zeigte 1969 in einer Übersicht generelle Wege der Enzymgewinnung auf, woraus hervorgeht, daß Mikroorganismen diesen Prozeß mit ihren Dauerformen sicher, mit ihren vegetativen Stadien teilweise überleben. Es ist daher nicht verwunderlich, daß in den Präparaten des Handels meist vermehrungsfähige Bakterien und Pilze zu finden sind. Handelt es sich bei den Organismen um die zur Gewinnung des Enzymes benutzten Stämme, dann kann das nicht im Interesse des Herstellers liegen; für den Anwender des Präparates und für den Verbraucher des damit behandelten Lebensmittels ist es auf jeden Fall unerwünscht oder sogar schädlich.

Sind die Präparate aus tierischen oder pflanzlichen Produkten gewonnen worden, dann ist mit dem Überleben eines Teiles der natürlichen Kontaminationsflora der Produkte zu rechnen. Dabei können pathogene Organismen vorkommen, die unter keinen Umständen in das Endprodukt gelangen dürfen.

Sekundärinfektionen während des Herstellungsvorganges können ebenfalls an der Zusammensetzung der Flora im Fertigprodukt beteiligt sein und auch hierbei kann das Auftreten pathogener Keime nicht ausgeschlossen werden.

Wir haben daher eine größere Zahl Enzympräparate aus dem Handel oder direkt vom Hersteller auf Verunreinigungen mit Bakterien und Schimmelpilzen untersucht.

Material und Methode

Es standen insgesamt 92 Enzympräparate zur Verfügung. Davon waren 18 Amylasen, 32 Pektinasen, 5

Cellulasen, 3 Invertasen, 2 Lipasen, 1 Urease, 3 Lab-Enzyme und 28 Proteasen. Die Herkunft der Präparate ist in der 1. Mitteilung¹⁾ bereits beschrieben.

Von den meisten Präparaten war nur relativ wenig Material vorhanden. Die Stammsuspension für die Keimzahlbestimmung (1:10) diente daher gleichzeitig als Voranreicherung für den Nachweis von Salmonellen.

Zu diesem Zweck wurden 10 g Material in 90 ml eines gepufferten Peptonwassers homogenisiert (Zusammensetzung: Pepton 10 g, NaCl 5 g, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 9 g, KH₂PO₄ 1,5 g, Aqu. dest. 1000 ml).

Aus dieser Stammsuspension wurden dekadische Verdünnungen in physiologischer NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,1% Pepton hergestellt. Der verbleibende Rest der Stammsuspension wurde als Salmonellen-Voranreicherung 18 Std. bei 37 °C inkubiert, danach 10 ml in 100 ml Tetra-thionatbouillon als Hauptanreicherung verbracht und 24 Std. bei 43 °C bebrütet und danach auf Brillantgrün-Phenolrot-Agar umgezüchtet.

Für Gußkulturen wurde jeweils 1 ml gebraucht (untere Grenze der ermittelbaren Keime = 10/g), für Oberflächenkulturen wurde jeweils 0,1 ml ausgespatelt (untere Grenze der ermittelbaren Keime = 100/g). Zum Nachweis der Pseudomonaden wurde 1 g Material direkt in flüssigem GSP-Medium nach Kielwein angereichert und danach auf GSP-Agar umgezüchtet.

In Tabelle 1 sind die untersuchten Keimgruppen, die verwendeten Nährböden sowie Art der Kultivierung dargestellt.

Ergebnisse

57 Präparate wurden auf das Vorkommen von Salmonellen geprüft und erwiesen sich in allen Fällen als negativ in 10 g Probematerial. Auch Pseudomonas (76 Präparate) und Staphylokokken (74 Präparate) konnten nie nachgewiesen werden.

Bei 18 Amylasen schwankte die aerobe Gesamtkeimzahl zwischen 10 und $2,4 \times 10^7$; Enterobakteriaceen waren 12 mal nicht nachweisbar und erreichten in einem Fall einen Maximalwert von $9,5 \times 10^3$ /g; Clostridien fehlten gänzlich; 5 Präparate waren frei von Schimmelpilzen, bei den übrigen wurden bis zu $5,6 \times 10^4$ gefunden.

Tabelle 1

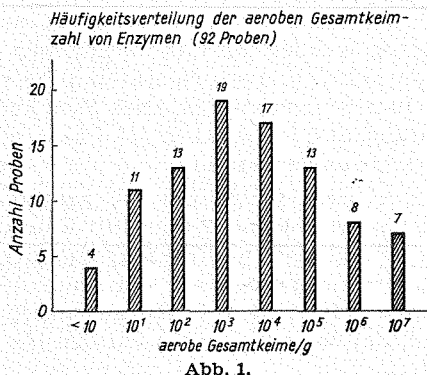
Keimgruppe	Nährmedium	Technik	Bebrütungs- temperatur	Bebrütungs- dauer	Literatur
aerobe Gesamtkeime	Trypton-Glukose-Hefeextrakt-Agar	Gußkultur	30° C	72 Std.	Schweiz. Lebensmittelbuch ⁵⁾
Enterobacteriaceen	Violet-Red-Bile-Agar + 1 % Glukose	Gußkultur	37° C	24 Std.	Mossel et al. ⁶⁾
Clostridien	Sulfit-Polymyxin-Sulfadiazin-Agar (SPS-Agar)	Gußkultur in Flachröhrchen Verschuß mit Wasser-Agar	30° C	24—48 Std.	Thatcher und Clark ⁷⁾
Staphylokokken	Baird-Parker-Agar	Oberflächenkultur	37° C	24—48 Std.	Baird-Parker ⁸⁾
Pseudomonaden	1. Glutamat-Stärke-Phenolrot-Medium (GSP-Medium)	Anreicherung in flüssigem Medium	22° C	72 Std.	Kielwein ⁹⁾
	2. GSP-Agar	Umzüchtung	22° C	72 Std.	
Salmonellen	1. gepuffertes Peptonwasser	Voranreicherung	37° C	18 Std.	Edel und Kampelmacher ¹⁰⁾
	2. Tetrathionatbouillon	Anreicherung	43° C	24 Std.	
	3. Brillantgrün-Phenolrot-Agar	Umzüchtung	37° C	24 Std.	
Schimmelpilze	Trypton-Glukose-Hefeextrakt-Agar + 10 mg Tetracyclin/L	Gußkultur	30° C	48 Std.	Frank ¹¹⁾

Von 32 Pektinasen waren 2 keimfrei — ein Flüssigpräparat und eine pulverförmige Zubereitung —. Die Zahl der aeroben Bakterien erreichte in 4 Fällen 10^5 ; Enterobacteriaceen fehlten, Clostridien konnten 25 mal nicht nachgewiesen werden und überschritten bei den übrigen 30/g nicht. Schimmelpilze fehlten nur in 3 Präparaten — außer den beiden keimfreien —, bei den restlichen stieg die Zahl bis zu 3×10^4 /g.

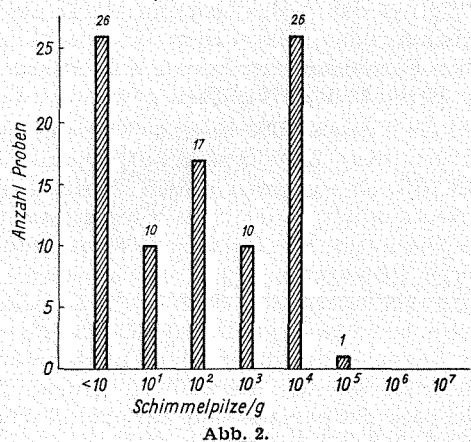
Von 27 Proteasen waren 2 keimfrei. 5mal waren mehr als 10^7 /g aerobe Bakterien vorhanden und 5 Präparate hatten bis zu $2,1 \times 10^3$ /g Enterobacteriaceen. Clostridien traten in dieser Gruppe gehäuft auf und zwar 11 mal mit $2,4 \times 10^3$ /g als Höchstwert; Schimmelpilze fehlten nur 7 mal und wurden in einem Falle bis zu 10^5 /g gefunden.

3 Invertasen, 5 Cellulasen, 2 Lipasen, 3 Lab-Proben und eine Urease lagen bezüglich der genannten Keimgruppen vollkommen im Rahmen der Enzyme, die in größerer Zahl geprüft worden waren.

Über die Häufigkeitsverteilung der aeroben Bakterien und der Schimmelpilze bei allen Proben informieren die Abbildungen 1 und 2. 26 pilzfreien Zubereitungen stehen 27 andere gegenüber, die mehr als 10^4 /g mitbrachten.



Häufigkeitsverteilung der Schimmelpilz-zahl von Enzymen (90 Proben)



Diskussion

Die Abwesenheit von Salmonellen, Staphylokokken und Pseudomonaden bei allen untersuchten Präparaten zeigt, daß bei der Herstellung und Konfektionierung ein guter Stand der innerbetrieblichen Hygiene gehalten wird. Da trotzdem mit dem Vorkommen dieser Keimgruppen zu rechnen ist, sollte man sie bei der Ausarbeitung von Standard-Empfehlungen weiterhin berücksichtigen. Ob für Salmonellen das Fehlen in 10 g, wie es hier geprüft worden war oder in 25 g gefordert werden sollte, wie es im Rahmen der „General Specifications for Enzyme Preparations for Food Processing“ bei der FAO/WHO ¹²⁾ im Gespräch ist, wäre zu diskutieren.

Die Prüfung auf Enterobacteriaceen ist der Suche nach Coliformen vorzuziehen. Die Aussagekraft über eine „gute Produktionspraxis“ ist hierbei größer.

Auf Clostridien sollte im Hinblick auf die Haltbarkeit der zu behandelnden Lebensmittel, aber auch mit Rücksicht auf echte Fragen der Hygiene untersucht

werden. Bei Enzymen für die Hartkäseherstellung wird der Anwender z. B. großen Wert auf das Fehlen dieser Gruppe legen.

Aus diesem Beispiel wird schon deutlich, daß die Anforderungen an die mikrobiologische „Belastung“ eines Enzympräparates — soweit es sich nicht um ausgesprochen pathogene Organismen handelt — in erheblichem Maße vom Anwendungszweck abhängen können. Für die aerobe Gesamtkeimzahl und auch für Pilze (einschließlich Hefen) gilt das in besonderem Maß. Hier sollte man auch unterscheiden, ob das Enzym mit dem Lebensmittel zum Verzehr gelangt oder trägegebunden angewendet wird, ob das behandelte Lebensmittel konserviert oder frisch verbraucht wird, oder ob der Enzymzusatz erst nach der Konservierung (z. B. manchmal bei Glucoseoxydase) erfolgt.

Schließlich wäre auch noch die Anwendungskonzentration der verschiedenen Enzyme zu berücksichtigen, die in manchen Fällen extrem niedrig sein kann. So werden z. B. für die Behandlung von Most von einem Hersteller 1 g eines Pektinasepräparates für 400 Liter empfohlen. Trotzdem sollte man bei der Produktion von Enzymen bemüht sein, die Keimzahl so niedrig wie möglich zu halten, um bei falscher oder mißbräuchlicher Anwendung Schadensfälle vorzubeugen. Mit der Entwicklung trägegebundener Enzyme für „Durchfluß-Reaktoren“ etwa zur Oxydation von Acetaldehyd zu Essigsäure oder bei der Vitamin-C-Synthese usw. wird man zwangsläufig zu keimfreien Präparaten gelangen müssen.

Zusammenfassung

92 handelsübliche Enzympräparate für die Behandlung von Lebensmitteln wurden auf das Vorhandensein von verschiedenen Keimgruppen untersucht.

Salmonellen (57 untersuchte Proben), Pseudomonaden (76 untersuchte Proben) und Staphylokokken (74 untersuchte Proben) konnten in keinem Falle nachgewiesen werden. Enterobacteriaceen (73 untersuchte Proben) fehlten in 63 Mustern (= 86,3 %) 10mal wurden sie bis zu $10^4/g$ gefunden. 19 von 73 untersuchten Präparaten (= 26,0 %) enthielten Clostridien bis zu $10^3/g$.

4 von 92 Zubereitungen waren keimfrei. Die Belastung mit aeroben Bakterien ging bis zu $10^7/g$, mit einem Schwerpunkt bei $10^3/g$.

26 von 90 untersuchten Enzymen waren frei von Schimmelpilzen (= 28,8 %), bei den übrigen wurden bis zu $10^5/g$ gefunden.

Summary

92 enzyme preparations presently in use in the food industry were examined for microbial content.

Salmonellae (57 samples), pseudomonads (76 samples) and staphylococci (74 samples) were not found.

63 of 73 samples were free from enterobacteriaceae (= 86,3 %), whereas 10 samples yielded these germs up to $10^4/g$.

19 of 73 investigated samples yielded clostridia (= 26,0 %) up to $10^3/g$. 4 of 92 enzyme samples were sterile. The aerobic mesophiles counts ranged up to $10^7/g$ with a mean average of $10^3/g$.

26 of 90 investigated enzyme samples were free from moulds (= 28,8 %), however the other samples yielded moulds up to $10^5/g$.

Résumé

On a recherché la présence de divers groupes de microbes dans 92 préparations d'enzymes employées couramment pour traiter les denrées alimentaires. Dans le nombre d'échantillons indiqué entre parenthèse, on n'a pu déceler ni salmonelles (57), ni pseudomonas (76) ni staphylocoques (74). Sur un total de 73 échantillons, 63 (= 86,3 %) furent exempts d'entérobactéries, tandis que dans les 10 restants on en trouva jusqu'à $10^4/g$. 19 préparations sur 73 (= 26,0 %) contenaient des clostridium jusqu'à $10^3/g$. Sur 92 préparations, seulement 4 furent stériles. Le nombre des mésophiles aérobies s'est situé en général autor de $10^3/g$ avec des valeurs maximales de $10^7/g$. Sur 90 enzymes analysés, 26 (= 28,8 %) furent exempts de moisissures, le reste des préparations en contenant jusqu'à $10^5/g$.

LITERATUR

- 1) Frank, H. K., Dtsch. Lebensmittel-Rundsch. 68, 252 (1972).
- 2) Pokrovskii, A. A. und M. F. Nesterin, Voprosy Pitaniya 28, 49 (1969).
- 3) Pripulina, L. S., I. D. Obbarius, N. E. Botsman, V. N. Gnatyuk und G. V. Svetlaya, Voprosy Pitaniya 30, 43 (1971).
- 4) Klaushofer, H., Z. Ernährungswiss., Suppl. 8, 72 (1969).
- 5) Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Mikrobiologie und Hygiene, (Bern 1969).
- 6) Mossel, D. A. A., W. H. J. Mengerink and H. H. Scholts., J. Bacteriol. 84, 381 (1962).
- 7) Thatcher, F. S. and D. S. Clark, Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration (University of Toronto Press, Toronto 1968).
- 8) Baird-Parker, A. C.; The use of Baird-Parkers medium for the isolation and enumeration of Staphylococcus aureus. In Shapton, D. A. and G. W. Gould ed.: Isolation methods for microbiologists. (London, New York, 1969), p. 1.
- 9) Kielwein, G., Arch. Lebensmittelhyg. 20, 131 (1969).
- 10) Edel, W. and E. H. Kampelmacher, Bull. World Hlth Org. 41, 297 (1969).
- 11) Frank, H. K.; bewährte Laborpraxis; nicht veröffentlicht.
- 12) WHO Food Additives Series, No. 2; World Health Organization, Geneva, 1972.

Anschrift der Verfasser:

Dr. G. Lott, Bactotox AG, CH 8712 Stäfa, Postfach 114
Prof. Dr. H. K. Frank, 75 Karlsruhe, Engesserstraße 20

Zentralinstitut für Ernährungsforschung TNO, Zeist/Niederlande

Eine schnelle Bestimmungsmethode für Benz-(a)-pyren in Raucharomen

M. A. H. Rijk und D. van Battum

Einleitung

Das Räuchern von Lebensmitteln ist ursprünglich als Konservierungsverfahren zur Verwendung gelangt, wird aber mehr und mehr durch andere ersetzt.

Das typische Aroma geräucherter Produkte wird aber geschätzt. Man geht daher zur Benutzung von Raucharoma über für die betreffende Ware^{1, 2)}.

Grundsätzlich erhält man ein Raucharoma durch Kondensation von Rauchbestandteilen. Wie normaler

Rauch kann also auch ein Aroma zahlreiche polyzyklische Kohlenwasserstoffe enthalten. Diese Verbindungsklasse enthält Vertreter, die als karzinogen zu Buche stehen. Nach Tilgner³⁾ und Shabad et al.⁴⁾ ist Benz-(a)-pyren sowohl der Häufigkeit als auch der krebserzeugenden Wirkung wegen als einer der wichtigsten dieser Gruppe zu betrachten. Bailey und Dungal⁵⁾ fanden bei ihrer Untersuchung isländischer Räucherfische auf polyzyklische Kohlenwasserstoffe aus-