



Fruchtsaftanalyse

Alicyclobacillus spp. Nachweis mit real-time PCR

- *Alicyclobacillus* spp.
- Multiplex für *Alicyclobacillus* spp./
A. acidoterrestris/*A. acidocaldarius*
- Optimierte DNA-Präparation
für Fruchtsaftkonzentrate



Alicyclobacillus spp. – eine fruchtsaftschädigende Speziesgruppe

Die Problematik für die Fruchtsaftindustrie: der Saft hat nicht mehr seinen typischen Geschmack und das Aroma des Saftes wird nachteilig verändert. Die Früherkennung von *Alicyclobacillus* ist deshalb sehr wichtig, da die Sporen des Bakteriums nicht durch gewöhnliche Pasteurisierungsverfahren deaktiviert werden. Eine Kontamination mit *Alicyclobacillus* kann zu erheblichen Qualitätsverlusten sowie in der Folge zu wirtschaftlichen Einbußen der Fruchtsafthersteller führen.

Fruchtsäfte werden üblicherweise nach Anbau und Verarbeitung vor Ort konzentriert, die Pulpe kurzzeiterhitzt (pasteurisiert) und das Konzentrat als Halbfertigerzeugnis verschickt. Die Pasteurisierung verhindert mikrobiologischen Befall bzw. Wachstum. Allerdings ist in der Fruchtsaftindustrie das seit 1982 als Genogruppe *Alicyclobacillus* spp. bekannte Bodenbakterium von zunehmendem Interesse. Dieses sowohl aerob, acidophil bei pH 2 - 6 als auch thermophil bei einer Temperatur zwischen ca. 40 - 60 °C wachsende Sporenbildende Bakterium findet ideale Bedingungen bei der Herstellung von Fruchtsaftkonzentraten und Fruchtsäften (Orangen, Apfel, Tomaten und andere Früchte) und Sporen können durch Kurzeiterhitzung aktiviert werden.

Diese Bakterium ist zwar nicht pathogen, einige der ca. 20 Arten insbesondere *A. acidoterristris* und *A. acidocaldarius* bilden die Substanz Guajacol und beeinträchtigen damit den Geruch und Geschmack des Safts oder Lebensmittels.

Anwendung

Fruchtsaftkonzentrate oder Fertigprodukte werden 1:10 in BAT für mindestens zwei - drei Tage vorinkubiert. Bei nachfolgendem negativem PCR-Ergebnis wird empfohlen die Vorinkubation gegeben falls auf bis zu 5 Tage zu verlängern, um geschädigte Sporen/Bakterien zu erfassen.

Die klassische Analytik basiert auf der Kultivierung in dem Medium BAT oder anderen Medien bei unterschiedlicher Temperatur und dauert bis zu 2 Wochen. Aufgrund der der langen Inkubationsdauer mit unterschiedlichen Verfahren, die in der IFU 12 Regel zu vereinheitlichen versucht wurden, ist einerseits eine teure Quarantänelagerung nötig bzw. unterschiedliche Ergebnisse können zu kommerziellen Konflikten z. B. zwischen den Lieferanten von Fruchtsaftkonzentrat und Importeuren/Abfüllern führen.

Die real-time PCR, mit einer schnellen Analytik nach einer ca. dreitägigen Inkubation in BAT ermöglicht sichere und spezifische Ergebnisse. Die DNA Präparation von Bakterien und Sporen aus der schwierigen Matrix faserreicher und farbstoffhaltiger Pulpe wurde optimiert, um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.

GEN-IAL® *Alicyclobacillus* multiplex Art. Nr. Q721 - Q724



Probennahme

- 1 ml der repräsentativen Probe im Medium
- Zentrifugation und Entfernung grober Bestandteile
- Thermische Lyse und Aufschluss mit Lysozym
- Bindung der DNA an Spin Filter und zweifaches Eluieren der gereinigten DNA

Der Kit **Q701** ermöglicht die Verwendung auch schwieriger Proben wie Fruchtsaftkonzentrat oder Pulpe durch Aufreinigung der DNA über Säulen.

Analytik

Screening von *Alicyclobacillus* spp. mit dem Kit **Q721 - Q724**. Dies kann im FAM Kanal auf allen handelsüblich erhältlichen qPCR Geräten durchgeführt werden.

Eine interne Amplifikationskontrolle im HEX oder ROX-Kanal schließt mögliche durch Inhibition verursachte falsch negative Ergebnisse aus.

Multiplex Screening und Identifizierung

Mittels des Kits **Q721 - Q724** können in einer Reaktion die Parameter

- *Alicyclobacillus* spp.
- *A. acidoterrestris*
- *A. acidocaldarius*
- Interne Amplifikationskontrolle

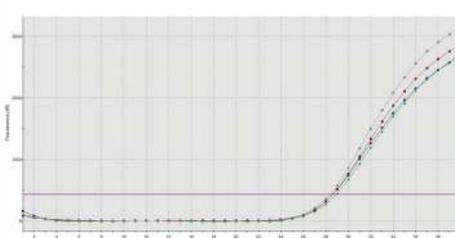
gemessen werden und somit gleichzeitig der gesamte Genus *Alicyclobacillus* gescreent werden. Somit werden die wichtigsten Guajacolbildner *A. acidoterrestris* und *A. acidocaldarius* identifiziert.

Ein qPCR Gerät mit kalibrierten Kanälen FAM, ROX, Cy5 und HEX wird hierfür benötigt. Die Analysedauer beträgt je nach Probenanzahl ca. 2 - 3 Stunden.

Real-time PCR

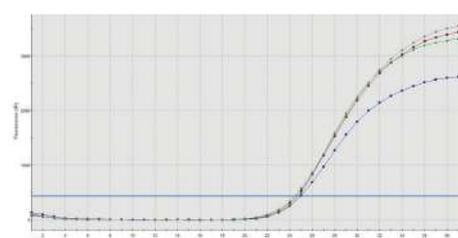
- Schnelle Ergebnisse
- Hochspezifisch
- Einfache Durchführung
- Effektive Zeitersparnis

GEN-IAL® First Alicyclobacillus Multiplex Lauf



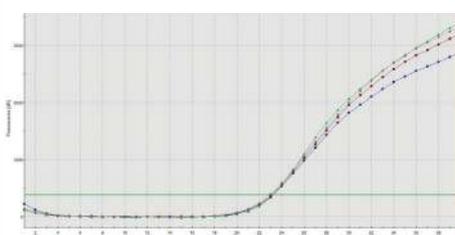
Alicyclobacillus acidocaldarius

CY5



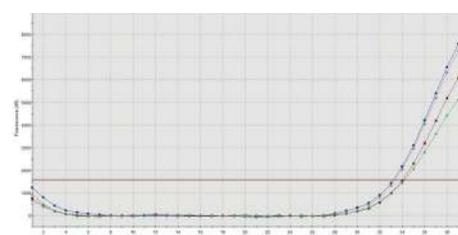
Alicyclobacillus acidoterrestris

FAM



Alicyclobacillus spp.

HEX



Internal Control (IC)

ROX

Sensitivität/Spezifität

Inklusivität – 17 *Alicyclobacillus* Spezies: 100 % positiv

Exklusivität – 50 Non-*Alicyclobacillus* Spezies: 100 % negativ

Beispiele getesteter Bakterienspezies	
Spezies	<i>Alicyclobacillus</i>
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus contaminans</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus fastidiosus</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus herbarius</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus macrosporangioides</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus pohliae</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus pomorum</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus sacchari</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i>	positiv
<i>Alicyclobacillus vulcanalis</i>	positiv
<i>Lactobacillus</i> spp.	negativ
Acetic acid bacteria	negativ
<i>Pediococcus</i> spp.	negativ
<i>Oenococcus oeni</i>	negativ
Enterobacteriaceae	negativ
<i>Leuconostoc</i> spp.	negativ
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	negativ

Beispiele getesteter Hefen	
Spezies	<i>Alicyclobacillus</i>
<i>Saccharomyces</i> spp.	negativ
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	negativ
<i>Dekkera</i> spp.	negativ
<i>Candida</i> spp.	negativ
<i>Debaromyces hansenii</i>	negativ
<i>Klyveromyces marxianus</i>	negativ
<i>Pichia anomala</i>	negativ
<i>Pichia membranaefaciens</i>	negativ

GEN-IAL® Produkte zur Fruchtsaftanalytik

Produkt	Beschreibung	Tests	Art. Nr.
GEN-IAL® DNA-Präparation			
Simplex® Easy DNA Kit	DNA Präparation von Getränkeproben	100 Präparationen	Q001
Simplex® Easy Spin DNA Kit	<i>Alicyclobacillus</i> DNA-Präparation aus z.B. Frucht- u. Gemüsesäften, Fruchtkonzentraten und Tomatenprodukten	50 Präparationen	Q701
GEN-IAL® Qualitative real-time PCR			
First <i>Alicyclobacillus</i> multiplex PCR Kit	Qualitative Bestimmung und Identifizierung von <i>Alicyclobacillus</i> spp., <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> und <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	48 Reaktionen	Q721 – high profile* Q722 – low profile*** Q723 – white strips** Q724 – low profile*** MyGo Pro



High*

- Agilent MX3005P
- Applied Bioscience ABI 7500 oder höher
- ThermoFisher QuantStudio®5 oder höher



White**

- Roche Lightcycler® 480 II und LC96
- BioRad CFX96™
- Analytik Jena qTOWER³
- ThermoFischer PikoReal 24



Low***

- IT-IS MyGo Pro
- ABI 7500 FAST oder höher
- BioRad CFX96™