



Butter aus Rohmilch: Mikrobiologischer und chemischer Status, Identifizierung von Isolaten mittels MALDI-TOF

S. Helble¹, C. Knödl¹, G. Vogel², K. Pietsch¹, B. Gassenbauer¹
¹Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg
²Mabritec AG, Lörracherstrasse 50, CH-4125 Riehen 1, Switzerland



Einleitung

Nach den Vorgaben der Butterverordnung (§ 2 Abs. 2) darf Butter als Rohmilcherzeugnis nur hergestellt werden, wenn zur Säuerung ausschließlich spezifische Milchsäurebakterien verwendet werden. Durch den gezielten Einsatz von Starterkulturen kann u.a. die Säuerung des Rahmes, die Bildung von Aromastoffen (Milchsäure, Butteraroma), sowie die Unterdrückung von Fremdkeimen (Krankheitserreger/Hygieneindikatoren/Verderbsorganismen) erreicht werden. Häufig verwendete Kulturen sind Säurebildner wie *Lactococcus* (*Lc.*) *lactis* ssp. *lactis* und *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, Säure- und Aromabildner wie *Lc. lactis* ssp. *diacetylactis* oder Aromabildner wie *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*.

Am CVUA Freiburg wurde der mikrobiologische Status von Butter aus Rohmilch von lokalen Herstellern überprüft. Isolate von Milchsäurebildnern aus Rohmilchbutter und aus Starterkulturen wurden mittels MALDI-TOF identifiziert und verglichen. Chemisch-analytisch wurden zur Beurteilung der Säuerung der pH-Wert im Serum und der Milchsäuregehalt (D- und L-) bestimmt.

Material & Methoden

Von Juli 2009 bis August 2011 wurden 20 Rohmilchbutterproben untersucht.

Mikrobiologisch wurden dabei die Parameter *E. coli*, Enterobacteriaceae, koagulase-positive Staphylokokken (ggf. zusätzlich Staphylokokkenenterotoxin-Nachweis), Milchsäurebildner, Pseudomonaden, Hefen und Schimmelpilze, *Listeria monocytogenes* und verotoxinbildende *E. coli* berücksichtigt (Tabelle 1). Die Untersuchung von Isolaten von aeroben und anaeroben Milchsäurebildnern mittels MALDI-TOF wurde von der Firma Mabritec AG (Riehen, CH) durchgeführt.

Chemisch-analytisch wurde der pH-Wert im Serum nach dem Verfahren L04.00-13 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB ermittelt. Die Bestimmung des Milchsäuregehaltes (D- und L-) erfolgte nach dem Prinzip des Verfahrens L01.00-26 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB in Verbindung mit der Arbeitsanleitung (Aufarbeitung fetthaltige Proben) der Boehringer Testkombination D-Milchsäure/L-Milchsäure.

Ergebnisse

Von insgesamt 20 Proben wurden 14 unter Verwendung spezifischer Milchsäurebakterien hergestellt. Bei 6 Proben fand eine traditionelle Rahmreifung ohne Starterkulturen statt. 8 Proben (57 %) mit, sowie 3 Proben (50 %) ohne Säuerungskultur wiesen z.T. hohe Keimgehalte an Hygieneindikatoren und Verderbsorganismen auf. Es waren Gehalte an *E. coli*, Enterobacteriaceae, koagulase-positiven Staphylokokken oder Pseudomonaden sowie in Einzelfällen an Hefen auffällig. Aus einer Probe wurden *Listeria* spp. isoliert. Die pathogenen Keime *Listeria monocytogenes* und verotoxinbildende *E. coli* wurden in keiner der Proben nachgewiesen (Tabelle 1).

Die Untersuchungen mittels MALDI-TOF lieferten überwiegend vergleichbare Spektren zwischen Milchsäurebildnern aus Butterproben und den entsprechenden Starterkulturen. Bei einer Probe (Nr. 16) jedoch konnte keine Übereinstimmung der Resultate festgestellt werden (Abbildung 1).

Die pH-Werte im Serum der mit spezifischen Säuerungskulturen hergestellten Butterproben lagen zwischen 4,38 und 6,35 (Mittelwert pH = 5,10). Bei der 14 Proben lag der pH-Wert $\geq 5,10$ und der Milchsäuregehalt jeweils < 25 mg/100g; diese Proben waren mikrobiologisch auffällig. 8 Proben wiesen einen pH-Wert von < 5,10 und einen Milchsäuregehalt von > 40 mg/100g auf.

Bei den „traditionell“ hergestellten Proben variierten die pH-Werte im Serum zwischen 4,43 und 7,60 (Mittelwert pH = 5,72). Proben, bei denen der pH-Wert im Serum 5,10 nicht überschritt, wiesen einen Milchsäuregehalt von > 40 mg/100g auf (Abbildung 3 und 4).

Tabelle 1: Mikrobiologische und chemische Untersuchungsergebnisse der Rohmilchbuttern im Überblick

Landesnummer	Säuerungskultur	<i>E. coli</i> (TBX-Agar) [KBE/g]	Enterobacteriaceae (VB50-Agar) [KBE/g]	Koagulase-positive Staph. (Baird Parker-Agar) [KBE/g]	Anaerobe Milchsäurebildner (Sorbitol-Agar) [KBE/g]	Aerobe Milchsäurebildner (MRS-Agar) [KBE/g]	Aerobe mesophile Keime (PC-Agar) [KBE/g]	Pseudomonaden (GSP-Agar) [KBE/g]	Hefen (Bengalrose-Chloramphenicol-Agar) [KBE/g]	Schimmelpilze (Bengalrose-Chloramphenicol-Agar) [KBE/g]	<i>Listeria monocytogenes</i> (Qualitestar-Nachw.2/5) [g]	Verotoxinbildende <i>E. coli</i> (Qualitestar-Nachw.2/5) [g]	pH-Wert (Keine Dimension)	D-Milchsäure (mg/100 g)	L-Milchsäure (mg/100 g)
1	Ja	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	8,6 x 10 ²	2,1 x 10 ²	n.d.	<1,0 x 10 ³	2,0 x 10 ²	7,0 x 10 ²	n.d.	n.d.	4,97	1,0	72,0
2	Nein	1,5 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	9,6 x 10 ²	1,1 x 10 ²	n.d.	<1,0 x 10 ³	5,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	5,74	5,1	13,0
3	Nein	6,5 x 10 ⁴	7,4 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	2,1 x 10 ²	7,4 x 10 ²	n.d.	<1,0 x 10 ³	2,0 x 10 ²	1,4 x 10 ²	negativ	negativ	4,76	1,8	74,0
4	Ja	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	3,8 x 10 ²	1,4 x 10 ²	n.d.	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,38	2,2	40,0
5	Nein	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	2,9 x 10 ²	1,3 x 10 ²	n.d.	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	n.d.	n.d.	n.d.	4,43	5,1	62,0
6	Ja	<1,0 x 10 ³	8,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	1,6 x 10 ²	2,3 x 10 ²	9,1 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<4,0 x 10 ²	1,2 x 10 ²	negativ	negativ	5,27	0,0	5,8
7	Nein	<1,0 x 10 ³	1,2 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<8,0 x 10 ²	1,4 x 10 ²	n.d.	1,5 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	6,85	0,6	54,5
8	Ja	1,3 x 10 ⁴	1,1 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	1,3 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,7 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	9,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,74	9,1	58,8
9	Nein	1,1 x 10 ⁴	2,9 x 10 ²	2,7 x 10 ²	1,0 x 10 ²	8,0 x 10 ²	1,6 x 10 ²	>1,5 x 10 ³	2,0 x 10 ²	2,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,95	14,0	68,3
10	Ja	<3,0 x 10 ³	4,9 x 10 ²	n.d.	1,0 x 10 ²	9,9 x 10 ²	3,4 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	6,25	1,5	10,9
11	Ja	<3,0 x 10 ³	3,7 x 10 ²	1,7 x 10 ²	9,2 x 10 ²	8,8 x 10 ²	3,4 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	6,35	0,7	13,3
12	Ja	<1,0 x 10 ³	4,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	4,1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	7,7 x 10 ²	7,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,73	2,8	53,7
13	Ja	4,4 x 10 ²	1,5 x 10 ²	>1,5 x 10 ³ (Enterotoxin positiv)	1,7 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,9 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,60	1,8	42,2
14	Ja	>1,5 x 10 ³	5,9 x 10 ²	>1,5 x 10 ³ (Enterotoxin positiv)	9,3 x 10 ²	7,2 x 10 ²	8,6 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<4,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	(<i>Listeria</i> spp. positiv)	negativ	5,10	0,0	24,0
15	Nein	<1,0 x 10 ³	4,9 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	6,9 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,9 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<4,0 x 10 ²	<4,0 x 10 ²	negativ	negativ	7,60	0,0	0,0
16	Ja*	<1,5 x 10 ³	1,1 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	7,9 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,2 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	5,51	0,7	23,9
17	Ja	<1,0 x 10 ³	6,8 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	1,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²	7,9 x 10 ²	7,1 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	5,64	0,0	7,7
18	Ja	<1,0 x 10 ³	<4,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	<8,0 x 10 ²	3,4 x 10 ²	7,4 x 10 ²	<1,0 x 10 ³	<1,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,99	0,4	90,1
19	Ja	<1,0 x 10 ³	5,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	9,3 x 10 ²	2,7 x 10 ²	3,0 x 10 ²	<4,0 x 10 ²	2,9 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,42	1,6	49,9
20	Ja	<1,0 x 10 ³	<4,0 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	1,3 x 10 ²	1,9 x 10 ²	1,7 x 10 ²	4,0 x 10 ²	2,5 x 10 ²	<1,0 x 10 ²	negativ	negativ	4,42	1,6	49,1

* keine Übereinstimmung der MALDI-TOF-Spektren von Milchsäurebildnern aus Butterproben und dazugehörigen Säuerungskulturen (vgl. Abbildung 1) n.d. = nicht durchgeführt



Abbildung 2: Butter aus Rohmilch

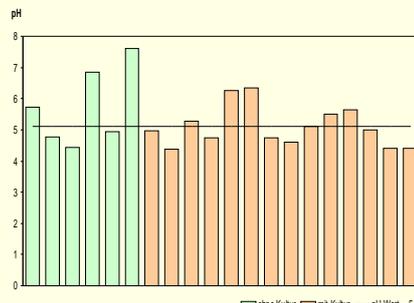


Abbildung 3: pH-Wert im Serum

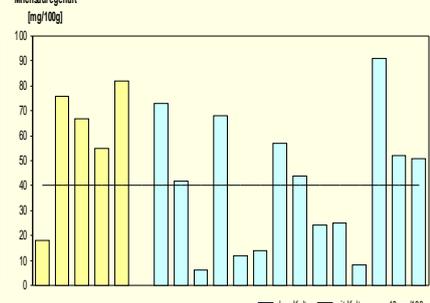


Abbildung 4: Milchsäuregehalt

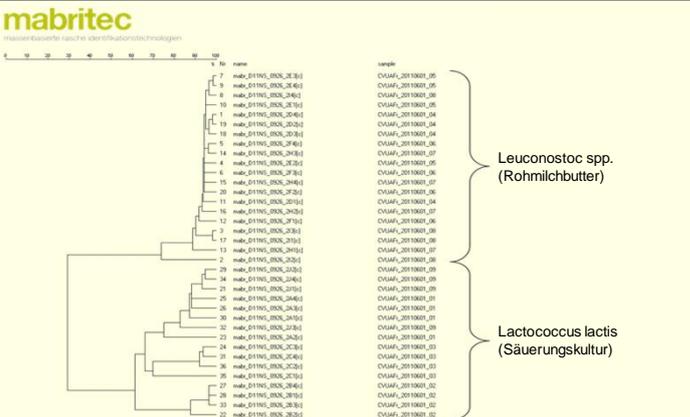


Abbildung 1: Dendrogramm der mittels MALDI-TOF identifizierten Isolate aus einer Säuerungskultur und der entsprechenden Rohmilchbutter (Probe Nr. 16)

Schlussfolgerungen

Es zeigte sich, dass insbesondere Direktvermarkter, die nur geringe Mengen Rohrahm verarbeiten, Butter als Rohmilcherzeugnis entgegen den Vorgaben der Butterverordnung ohne die vorgeschriebene Säuerung durch spezifische Milchsäurebakterien herstellen. Dass jedoch nicht nur in diesen „traditionellen“ Erzeugnissen, sondern auch in den aus spezifisch gesäuertem Rahm hergestellten Butterproben hohe Keimgehalte der o.g. Hygieneindikatoren und Verderbsorganismen nachgewiesen werden konnten, macht deutlich, dass allein die Verwendung spezifischer Mikroorganismen kein Garant für ein mikrobiologisch-hygienisch einwandfreies Lebensmittel ist.

Übereinstimmende MALDI-TOF-Spektren der Isolate aus den Proben und der jeweils zugehörigen Säuerungskulturen belegen eine Vermehrung der Kultur im Rahm. Bei teils geringen Milchsäuregehalten und pH-Werten im Serum $\geq 5,10$ stellt sich jedoch die Frage, ob in diesen Fällen der Säuerungsverlauf zu langsam bzw. ob überhaupt eine ausreichende Säuerungsaktivität der Butterkultur gegeben war, um die Begleitflora adäquat zu unterdrücken. Probe Nr. 16 zeigte keine Übereinstimmung der Spektren von Butterisolaten und Säuerungskultur, eine entsprechende Vermehrung hat hier nicht stattgefunden. In Betracht zu ziehen sind ursächlich eine fehlerhafte Dosierung/Handhabung oder die Verwendung einer ungeeigneten Kultur.

Bei der Herstellung von Rohmilchbutter müssen außerdem grundsätzlich auch die Verwendung von belastetem Ausgangsmaterial (Rohmilch) und/oder hygienische Schwachstellen, wie z.B. die Stapelung des Rahms über mehrere Tage, ungeeignete Temperaturen oder die unzureichende Reinigung/Desinfektion von Gerätschaften wie Butterfass und Zentrifuge, bei der Herstellung und/oder der Behandlung des Erzeugnisses als kritische Punkte berücksichtigt werden.

Zur Erzielung eines mikrobiologisch-hygienisch einwandfreien und gesundheitlich unbedenklichen Erzeugnisses sind somit neben der Einhaltung einer guten Hygienepraxis auch der Einsatz geeigneter Starterkulturen und das erforderliche technologische Wissen entscheidend.