

Arch Lebensmittelhyg 64,
24–30 (2013)
DOI 10.2376/0003-925X-64-XXX

© M. & H. Schaper GmbH & Co.
ISSN 0003-925X

Korrespondenzadresse:
kuehnast@vetmed.uni-leipzig.de

Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

Evaluierung der antimikrobiellen Wirkung von Pflanzenextrakten auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen in In-vitro-Kultur – Teil A: Rooibos

Evaluation of antimicrobial activities of plant extracts of in vitro cultures of selected microorganisms relevant to food – part A: rooibos

Karin Kühnast, Peggy G. Braun

Zusammenfassung

Die antimikrobielle Wirkung eines Extraktes aus fermentiertem Rooibos (*Aspalathus linearis*) auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen in In-vitro-Kultur wurde evaluiert. Es wurden Milchsäurebildner (*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc carnosum*), Verderbniserreger (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Pseudomonas fluorescens*) und pathogene Mikroorganismen (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis) in Nährbouillon untersucht. Die Ausgangskeimzahl betrug 10^2 – 10^3 KbE/ml. Der Rooibosextrakt wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml zugesetzt.

Die Proben wurden anschließend bei Temperaturen von 10 °C und 25 °C insgesamt 28 Tage gelagert. Die Probennahme erfolgte vor Zugabe des Extraktes sowie am Tag 1, 7, 14, 21 und 28 nach dessen Zugabe. Eine statistisch abgesicherte bakteriostatische Wirkung des Rooibosextraktes auf *Listeria monocytogenes* war bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C in den ersten 14 Tagen nachweisbar, bei 25 °C konnte kein Effekt auf *Listeria monocytogenes* gezeigt werden. Die untersuchten Milchsäurebildner erwiesen sich bei 10 °C ab der ersten Lagerungswoche als sensibel auf den Extrakt, da die Wachstumskurve bis Versuchsende eine log-Stufe Differenz zur Kontrollbouillon aufwies. Die teilweise beobachtete verstärkte Reduzierung der Verderbniserreger in den ersten 24 Stunden nach Zugabe des Rooibosextraktes bei beiden Lagerungstemperaturen bzw. der Milchsäurebildner bei 25 °C war statistisch nicht abzusichern und bei den weiteren Probenahmen nicht mehr darstellbar. Der Rooibosextrakt hatte keine nachweisbare antibakterielle Wirkung auf *Salmonella* Enteritidis.

Schlüsselwörter: Rooibos, Lebensmittel, *Listeria monocytogenes*, Lagerung, antibakterieller Pflanzenextrakt

Summary

Antimicrobial effects of an extract out of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) on lactic acid bacteria (*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc carnosum*), food spoilage organisms (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Pseudomonas fluorescens*) and foodborne pathogens (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis) were evaluated. The microorganisms were inoculated in nutrient broth to reach an initial contamination dose of 2–3 log cfu/ml. 5 mg/ml rooibos extract was added.

During storage at 10 °C and 25 °C for 28 days the growth of bacteria was monitored directly before adding the rooibos and on day 1, 7, 14, 21 und 28 after adding. Rooibos extract had a statistically verified antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes* at 10 °C within the first 14 days. There was no antilisterial effect at 25 °C. A sensitivity of the extract against lactic acid bacteria (reduction by one log unit) after one week of storage at 10 °C persisted to the end of the investigation. The partly detected inhibited growth of food spoilage organisms within the first 24 hours at both temperatures and lactic acid bacteria at 25 °C respectively was not statistically significant. There was no antibacterial activity on *Salmonella* Enteritidis detectable.

Keywords: rooibos, food, *Listeria monocytogenes*, storage, antibacterial plant extract

Einleitung

Lebensmittel müssen derzeit vielen Ansprüchen genügen. Sie sollen appetitlich aussehen, schmackhaft und gesund sein aber dabei kostengünstig bleiben. Zugleich erfordern die Industrialisierung und Globalisierung des Lebensmittelmarktes und die damit verbundenen weiten Transportwege eine lange Haltbarkeit und mikrobiologische Sicherheit, welche durch eine Bearbeitung der Lebensmittel mit technischen Verfahren zur Keimreduktion und Keimabtötung bzw. dem Zusatz von bspw. Konservierungsstoffen realisiert wird. Dem gegenüber steht seit Jahren ein Trend zu möglichst unbehandelten oder ökologisch angebauten Lebensmitteln (Bautista-Banos et al., 2006; Brand, 2006) bzw. zu Verzicht oder Einschränkungen von künstlichen Zusatzstoffen. Dieser Interessenkonflikt führt verstärkt zu Forschungen und Entwicklungen zur Verlängerung der Haltbarkeit mit natürlichen Zusätzen. Ein möglicher Ansatzpunkt für die Haltbarmachung von Lebensmitteln ist die Zugabe von Pflanzenextrakten mit bakterizider bzw. bakteriostatischer Wirkung.

Rooibos (*Aspalathus linearis*, *Fabaceae*) wurde erstmals 1772 vom Botaniker C. Thunberg als Heilpflanze der Khoikhoi beschrieben. Er wurde und wird bis heute aufgrund der klimatischen Bedingungen vorrangig in den Zederbergen nordwestlich von Kapstadt in Südafrika kultiviert (Morton, 1983; Nel et al., 2007). Aufgrund der gesundheitsfördernden Eigenschaften wird die Pflanze als koffeinfreier und tanninarmer Kräutertee weltweit exportiert und geschätzt. Das C–C-verbundene Dihydrochalconglycosid Aspalathin ist das Hauptflavonoid im unfermentierten Rooibos (Joubert, 1996) und wurde bisher nur aus dieser Pflanze identifiziert (Koeppen und Roux, 1966). Weitere aus Rooibos isolierte Flavonoide sind Orientin, Isoorientin (Koeppen und Roux, 1965), Rutin, Isoquercetin (Koeppen und Smit, 1962), Vitexin, Luteolin, Quercetin (Rabe et al., 1994) und Nothofagin (Ferreira et al., 1995). Ursprünglich schützen diese sekundären Stoffe die Pflanze vor der UV-Strahlung der Sonne und dienen zur Abwehr von Schädlingen durch ihre antivirale, antibakterielle und fungizide Wirkungsweise (Gould und Lister, 2006). In-vitro-Versuche bestätigen, dass pflanzliche Flavonoide Komplexe mit der Bakterienzellwand eingehen und somit zu einer Lyse der Zellwand führen können (Tsuchiya et al., 1996). Kritisch ist anzumerken, dass sich die Inhaltsstoffe der Extrakte und damit die Wirkung je nach Pflanzenbestandteil, Herkunft, Erntezeitpunkt und Bearbeitung des Extraktes unterscheiden (Joubert und de Beer, 2011; van Heerden et al., 2003). Vor allem durch Licht und Sauerstoff werden Inhaltsstoffe (Aspalathin, Nothofagin) oxidiert und gehen als antioxidativ wirksame Verbindungen verloren (Joubert, 1996). In 1 g löslicher Trockensubstanz des unfermentierten Rooibostees sind 49,9 mg Aspalathin und circa 9 mg Flavonoide enthalten (Bramati et al., 2003), in der gleichen Menge fermentierten Rooibostee nur noch 1,2 mg Aspalathin und ungefähr 4,3 mg flavonoide Bestandteile (Bramati et al., 2002). Die antioxidative Wirkung des unfermentierten Aspalathins ist vergleichbar mit der von Vitamin E und synthetischer Konservierungsmittel (BHT=Butylhydroxytoluol=E320, BHA=Butylhydroxyanisol=E321) und beruht auf dessen molekularer Struktur (von Gadow et al., 1997). In humanmedizinischen Studien wurden mögliche protektive Effekte bei kardiovaskulären Erkrankungen bestätigt sowie ein hemmender Einfluss auf das Wachstum von Krebszellen (Wang und Mazza, 2002;

Joubert und de Beer, 2011). Konsumiert wird Rooibostee daher nicht nur wegen des besonderen Geschmacks, sondern auch zur Linderung von Allergien und bei Magen-Darm-Problemen (Morton, 1983). Außerhalb des Lebensmittelbereichs findet Rooibostee z. B. in Form eines mit Aspalathin-angereicherten Extraktes auch Anwendung im Kosmetikmarkt (Grüner-Richter et al., 2008). Derzeitige Patentmeldungen (z. B. WO/2010/000580, WO/2010/000564) belegen das große Interesse an den bioaktiven Inhaltsstoffen von Rooibos.

Antimikrobielle Effekte pflanzlicher Wirkstoffe und natürlicher ätherischer Öle auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen wurden in In-vitro-Testsystemen durch unterschiedliche Diffusions- und Dilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nur spärlich untersucht und teilweise bestätigt (Smith-Palmer et al., 1998; Cowan, 1999; Brul und Coote, 1999; Burt, 2004; Holley und Patel, 2005).

Rooibos zeigte in Untersuchungen von Schepers (2001) eine bakteriostatische Wirkung auf lebensmittelassoziierte Keime. In ihren Untersuchungen erwies sich der wasserextrahierte Extrakt aus fermentiertem Rooibos in einer Konzentration von 5 g/l am effektivsten. Mit Hilfe der Spektrophotometrie konnte in den ersten 12–18 Stunden bei 37 °C und einer Ausgangskeimzahl von $6,0 \times 10^8$ KBE/ml eine Verringerung des Wachstums bei *E. coli* von 69 %, bei *Staphylococcus aureus* um 90,8 %, *Listeria monocytogenes* um 89,2 %, *Streptococcus mutans* um 84,1 % und *Bacillus cereus* um 80,3 % nachgewiesen werden, während das Wachstum von *Zygosaccharomyces rouxii* zunahm. Im Zuge der Patentanmeldung wurde eine antimikrobielle Wirkung eines mit Aspalathin-angereicherten Extraktes aus unfermentiertem Rooibos auf *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie eine fungizide Wirkung gegen *Aspergillus niger* dokumentiert, aber nicht näher ausgeführt (Grüner-Richter et al., 2008). Almajano et al. (2008) konnten in Agardiffusionstests, ausgehend von einer Mikroorganismendosis von 10^2 – 10^3 KBE/ml bei 30 °C, eine schwache antimikrobielle Wirkung des wasserextrahierten Rooibos (Konzentration 75 mg/ml) gegenüber *Bacillus cereus* innerhalb von 48 Stunden aufzeigen. Es war keine Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* und *Lactobacillus acidophilus* darstellbar. Sandasi et al. (2010) zeigten, dass der fermentierte $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ -extrahierte Rooibos mit einer Konzentration von 1 mg/ml eine initiale Zellanheftung von *Listeria monocytogenes* an PVC bei 37 °C um mehr als 50 % hemmen konnte, während die Wachstumshemmung eines *Listeria monocytogenes*-Biofilmes deutlich unter 50 % lag (*Listeria monocytogenes*-Ausgangsdosis: 10^6 KBE/ml). Einen potenziellen bakteriostatischen Effekt des unfermentierten Rooibos, extrahiert mit Ethanol in einer Konzentration von 10 mg/ml, von 60–85 % in den ersten 48 Stunden wiesen Coetzee et al. (2008) auf *E. coli*, mit einer Ausgangskonzentration von 10^5 – 10^6 KBE/ml, im Nährmedium bei 37 °C nach.

Die einzelnen Studien zu Rooibus-Extrakten, ob in fermentierter oder unfermentierter Form, konnten teilweise eine hemmende Wirkung auf Mikroorganismen belegen, jedoch bezogen sich die Untersuchungen oft auf kurze Zeiträume und dokumentieren den weiteren Forschungsbedarf.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Evaluierung der Wirksamkeit eines Pflanzenextraktes aus fermentiertem Rooibos auf lebensmittelhygienisch relevante Mikroorganismen (Milchsäurebildner, Arten von *Bacillus*, *Brochothrix*,

Pseudomonas, *Listeria* und *Salmonella*) in In-vitro-Kultur in Lagerungsversuchen bei unterschiedlichen Temperaturen. Es sollen Daten generiert werden, die eine mögliche Anwendbarkeit des Rooibosextraktes im Lebensmittel, zur Reduktion pathogener Mikroorganismen oder Verlängerung der Haltbarkeit, ermöglichen sollen.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Mikroorganismenstämme herangezogen.

Die aus Lebensmitteln isolierten Bakterienstämme wurden bis zur Untersuchung bei –86 °C gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Mikroorganismen jeweils in Nährbouillon (SIFIN TN 1172) überführt und bei dargestellter Temperatur-Zeit-Kombination (Tab. 1) bebrütet, auf entsprechende Nähragarplatten überimpft und wiederum inkubiert, um ausreichend Koloniematerial zu erhalten. Für die weitere Verwendung wurde alle vier Wochen von jedem Stamm eine gut entwickelte Einzelkolonie passagiert.

Pflanzenextrakt

Der Extrakt aus fermentiertem Rooibos (RE), der sich in Voruntersuchungen als steril erwies, wurde von der Adalbert-Raps Lebensmittelforschung gem. GmbH Kulmbach zur Verfügung gestellt und in einer Konzentration von 5 mg/ml Nährbouillon eingesetzt. Der fermentierte und getrocknete Extrakt aus Rooibos wurde mittels eines ethanolisch-wässrigen Extraktionsverfahrens (80:20) bei Raumtemperatur für 1,5 bis 3 Stunden mit einem nachgeschalteten Ethylacetat-Waschschritt zur Entfernung des Chlorophyll gewonnen. Der Aspalathingehalt beträgt 15–20 % und der Anteil der Gesamtphenole mindestens 40 %.

Versuchsablauf

Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde jeder Versuch für jeden Mikroorganismenpool bzw. Einzelkeim fünfmal wiederholt.

Eine gut entwickelte Kolonie der vorbereiteten Testkeime wurde in die entsprechende Nährlösung ((MSB in MRS-Bouillon (SIFIN TN 1205), *Bac.*, *B.*, *P.*, *L.* und *S.* in Nährbouillon (SIFIN TN 1172)) eingebracht und bei der jeweiligen Optimaltemperatur (Tab. 1) 24 Stunden bebrütet. Um den Einfluss des Rooibos-Extraktes auf möglichst viele Mikroorganismen untersuchen zu können, wurden aus den Flüssigkulturen (Entnahme von jeweils 1 ml) der Milchsäurebildner, der *Bacillus*- und *Brochothrix*-Spezies Pools mit bis zu fünf Stämmen gebildet (s. Tab. 1). Durch Vorversuche zum Wachstumsverhalten der Einzelkeime konnte eine Überwucherung durch einen Bakterienstamm ausgeschlossen werden. *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Enteritidis wurden als Einzelspezies beprobt.

Um die Ausgangskeimzahl von circa 10^2 – 10^3 KbE/ml Bouillon zu erreichen, wurden von den ungepoolten bzw. gepoolten 24-h-Bakterienkulturen Dezimalverdünnungsreihen in NaCl-Pepton (8,5 g NaCl, 1 g Pepton aus Casein gelöst in 1 l Aqua dest.) bis zu einer Konzentration von 10^3 KbE/ml hergestellt. Aus dieser Stufe wurde viermal 1 ml Probe entnommen und damit jeweils 4 Röhrchen à 9 ml MRS (MSB) oder Nährbouillon (*Bac.*, *B.*, *P.*, *L.*, *S.*) beimpft. Zwei der so hergestellten Bouillon-Röhrchen wurden mit RE in einer Dosis von 5 mg/ml versetzt, die beiden anderen Röhrchen ohne RE dienten als Kontrollbouillon. Von den so präparierten Ansätzen wurden je Mikroorganismus jeweils eins mit RE und ein Kontrollröhrchen für 28 Tage bei 10 °C (Kühlschrank Liebherr) sowie 25 °C (Brutschrank Binder BD 53) gelagert. Die entstandene Ausgangskeimzahl wurde noch vor Zugabe des PE bestimmt. Die weiteren Probennahmen erfolgten nach 24 Stunden und am Tag 7, 14, 21 und 28. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde jeder Ansatz gut durchmischt. Die erreichten Keimzahlen wurden mit Hilfe des Oberflächenverfahrens (Spatelverfahren) nach dem amtlichen Untersuchungsverfahren § 64 LFGB bestimmt.

Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm PASW Statistics 18 (SPSS Software GmbH, München) durchgeführt. Es erfolgte eine Prüfung auf Normalverteilung der logarithmierten Gesamtkeimzahlen mit dem Shapiro-Wilk-Test. Mittelwerte und Standardfehler der logarithmierten Gesamtkeimzahlen wurden durch die deskriptive Statistik ermittelt. Das Wachstum der Mikroorganismen in Bouillon mit und ohne RE wurde gegeneinander durch die one-way analysis of variance (ANOVA) mit Mehrfachvergleichen nach Scheffé ausgewertet ($p < 0,05$).

TABELLE 1: Untersuchte Bakterienstämme.

Stamm	Spezies	Herkunft	Anzuchtbedingungen			O ₂ -Milieu
			Nähragar	Temperatur (°C)	Zeit (Stunden)	
Milchsäurebildner (MSB)	<i>Lac. sakei</i>	CCILL	MRS	37	72	microaerophil
	<i>Lac. brevis</i>	CCILL				
	<i>Leuc. carnosum</i>	CCILL				
	<i>C. piscicula</i>	CCILL				
	<i>C. divergens</i>	CCILL				
<i>Bacillus</i> (Bac.)	<i>Bac. subtilis</i>	CCILL	PC	37	72	aerob
	<i>Bac. megaterium</i>	CCILL				
<i>Brochothrix</i> (B.)	<i>B. thermosphacta</i> 1	CCILL	TSA	30	48	aerob
	<i>B. thermosphacta</i> 2	CCILL				
	<i>B. thermosphacta</i> 3	CCILL				
<i>Pseudomonas</i> (P.)	<i>P. fluorescens</i> 6	CCILL	PC	30	48	aerob
<i>Listeria</i> (L.)	<i>L. monocytogenes</i>	MRI	Blut	37	24	aerob
	589, Serovar 2c	Kulmbach				
<i>Salmonella</i> (S.)	<i>S. Enteritidis</i>	CCILL	PC	30	72	aerob

Erläuterung: *Lac.* = *Lactobacillus*, *Leuc.* = *Leuconostoc*, *C.* = *Carnobacterium*, CCILL: Culture Collection-Institut für Lebensmittelhygiene Leipzig; MRI: Max-Rubner-Institut, Kulmbach; MRS = Nähragar für *Lactobacillus* nach de Man, Rogosa, Sharpe (SIFIN TN 1201+TWEEN 80, TN 1422); PC = Plate-Count-Agar (SIFIN TN 1189); TSA = Soja-pepton-Casein-pepton-Agar nach EP (SIFIN TN 1185); Blut = Columbia-Agar mit Schafblut[®] (5 %) (Oxoid Art.-Nr.: PB5039A)

Ergebnisse

Zur besseren Übersicht werden die Milchsäurebildner (*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc carnosum*) und Verderbniserreger (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Pseudomonas fluorescens*) zusammengefasst sowie pathogene Mikroorganismen (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis) einzeln dargestellt.

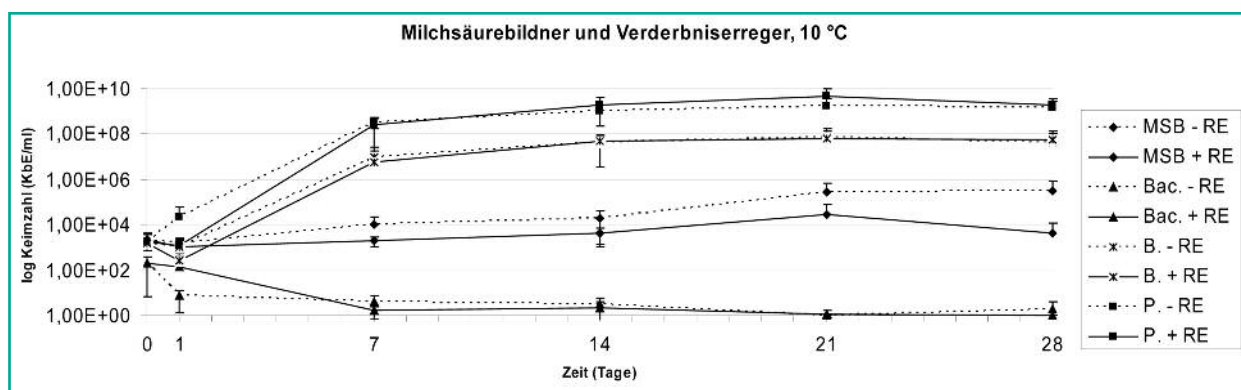


ABBILDUNG 1: Verlauf Keimzahl in Nährbouillon bei 10 °C mit (+ RE) und ohne (– RE) Rooibosextrakt, MSB = Milchsäurebildner, Bac. = *Bacillus* spp., B. = *Brochothrix* spp., P. = *Pseudomonas fluorescens*, RE = Rooibosextrakt

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der In-vitro-Versuche erfolgt separat für jede Lagerungstemperatur.

Milchsäurebildner und Verderbniserreger

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe von RE die vorhandenen **Milchsäurebildner** bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C leicht beeinflussen könnte. Nach 24 Stunden ist noch keine Wirkung des RE darstellbar, aber nach einer Woche verläuft das Wachstum der MSB nach RE-Zugabe circa eine Zehnerpotenz niedriger als in der Kontrolle. Am Ende der Lagerung erreichen die MSB-Werte in der Bouillon mit RE $4,5 \times 10^3$ KbE/ml, in der Negativkontrolle konnten $3,0 \times 10^5$ KbE/ml detektiert werden (Abb. 1). Eine statistisch signifikante Differenz ist jedoch nicht darstellbar.

Bei einer Lagerungstemperatur von 25 °C kommt es in der Bouillon mit RE innerhalb des ersten Tages zu einer Wachstumshemmung der MSB von einer log-Stufe. Danach erhöhen sich die MSB-Zahlen innerhalb einer Woche exponentiell auf Werte von $1,8 \times 10^8$ KbE/ml, unabhängig von der Zugabe des RE. Bis zum Ende des Lagerungsversuchs bleibt dieser Wert erhalten (Abb. 2). Beide Kurvenverläufe sind nahezu parallel und statistisch daher keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Die *Bacillus* spp. zeigen bei 10 °C sowohl mit als auch ohne PE kein Wachstum. Die Ausgangskeimzahl von $1,9 \times 10^2$ KbE/ml sinkt mit und ohne RE nahezu zeitgleich auf < 10 KbE/ml ab. In einzelnen Ansätzen waren auch nach Anreicherung keine Spezies mehr nachweisbar (Abb. 1).

Bei einer Lagerungstemperatur von 25 °C kommt es mit RE in den ersten 24 Stunden zu einer Wachstumshemmung von zwei log-Stufen im Vergleich zur Kontrolle. In den nachfolgenden Probenahmetagen ist ein exponentieller Anstieg der Bac.-Zahl auf Werte von über 10^8 KbE/ml darstellbar (Abb. 2). Statistisch ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Bac.-Wachstumskurven mit und ohne RE.

Die exponentiellen Kurvenverläufe der *Brochothrix* spp. in Bouillon mit und ohne RE sind über den gesamten Zeitraum sowohl bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C als auch von 25 °C als nahezu identisch zu bezeichnen. Bei beiden Lagerungstemperaturen sind innerhalb der ersten 24 Stunden Wachstumsunterschiede der B. spp. von circa einer log-Stufe zwischen der Bouillon mit und ohne RE-Zusatz zu beobachten. Diese Unterschiede können nach einer Woche nicht mehr nachgewiesen werden. Es werden Werte von etwa $5,0 \times 10^7$ KbE/ml erreicht. Diese hohen Keimzahlen bleiben bis Tag 28 erhalten (Abb. 1 und 2). Statistische Unterschiede sind nicht zu verzeichnen.

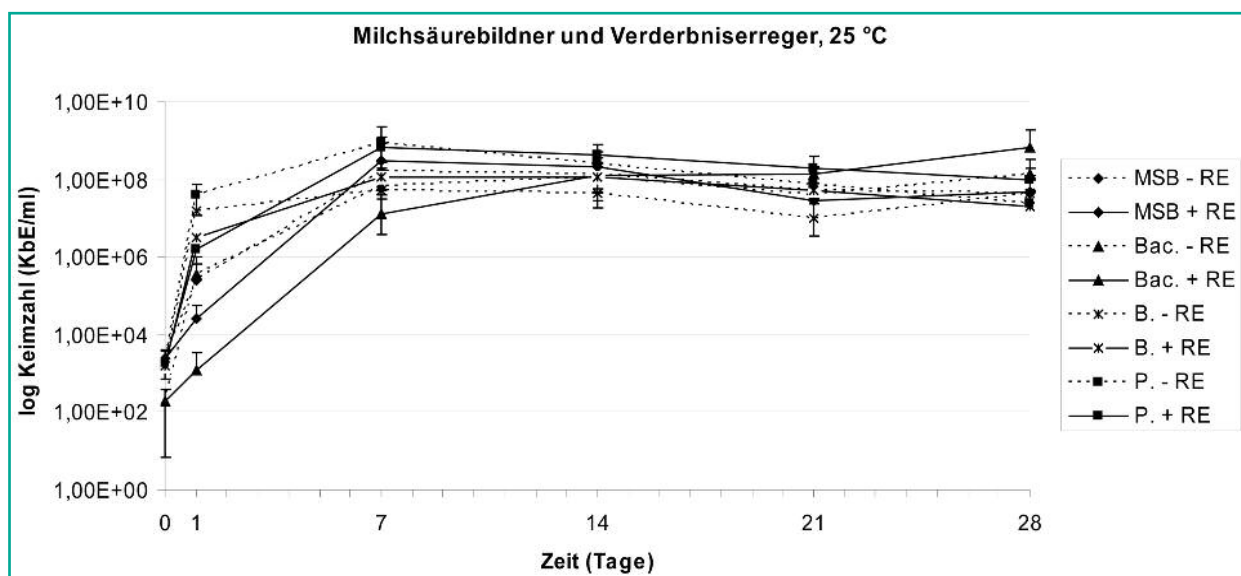


ABBILDUNG 2: Verlauf Keimzahl in Nährbouillon bei 25 °C mit (+ RE) und ohne (– RE) Rooibosextrakt, MSB = Milchsäurebildner, Bac. = *Bacillus* spp., B. = *Brochothrix* spp., P. = *Pseudomonas fluorescens*, RE = Rooibosextrakt.

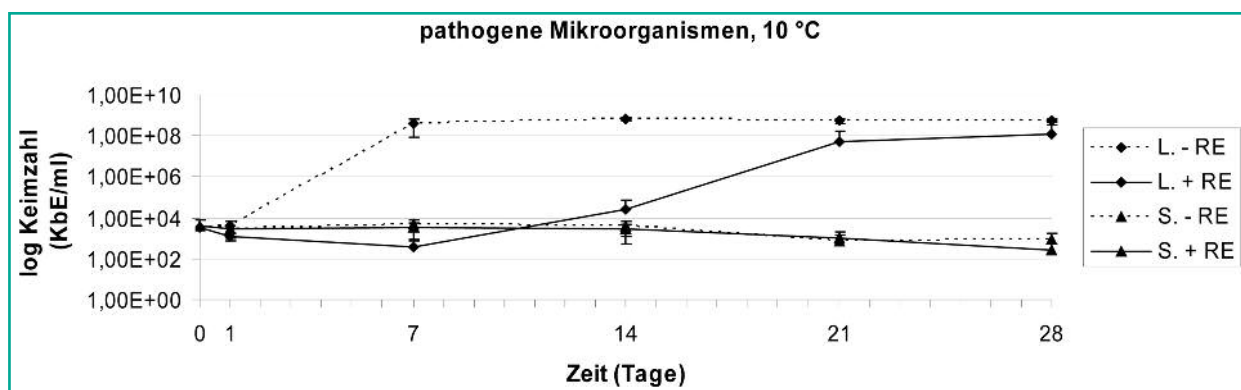


ABBILDUNG 3: Verlauf Keimzahl in Nährbouillon bei 10 °C mit (+ RE) und ohne (– RE) Rooibosextrakt, L. = *Listeria monocytogenes*, S. = *Salmonella Enteritidis*, RE = Rooibosextrakt.

Bei beiden Lagerungstemperaturen ist am ersten Tag nach Zugabe des RE das Wachstum von *Pseudomonas* im Vergleich zur Kontrolle um mehr als eine log-Stufe verringert. Innerhalb einer Woche vermehrt sich der Stamm bei 10 °C und 25 °C auf circa 10⁹ KbE/ml und bleibt bis zum Ende der Lagerungsversuche am Tag 28 auf diesem Niveau. Im Kurvenverlauf ist kein statistischer Unterschied durch die Zugabe von RE im Vergleich zur Kontrollbouillon darstellbar (Abb. 1 und 2).

Pathogene Organismen

Die Zugabe des RE bewirkt in der Nährbouillon mit *Listeria monocytogenes* einen deutlichen Hemmeffekt des Mikroorganismenwachstums bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C, der sich bis Tag 14 auch statistisch belegen lässt ($p < 0,05$). Die L. in der Kontrollbouillon vermehren sich ausgehend von der Ausgangskeimzahl von $3,5 \times 10^3$ KbE/ml zunächst verzögert (Tag 1: $4,0 \times 10^3$ KbE/ml). Danach erhöht sich die L.-Zahl in der Kontrollbouillon exponentiell auf $4,0 \times 10^8$ KbE/ml und verbleibt in dieser hohen Konzentration bis zum Ende der Lagerung. In der Bouillon mit RE sinkt die L.-Zahl von $3,5 \times 10^3$ KbE/ml auf $1,3 \times 10^3$ KbE/ml nach 24 Stunden und weiter auf $3,7 \times 10^2$ KbE/ml nach einer Woche. Erst danach tritt ein gesteigertes Wachstum der L.-Population ein. Am Tag 14 ist eine L.-Zahl von $2,5 \times 10^4$ KbE/ml nachweisbar. Bis zum Ende der Lagerung ist ein ähnlich hoher Wert wie in der Kontrollbouillon ($1,3 \times 10^8$ KbE/ml) zu verzeichnen (Abb. 3).

Bei der Lagerungstemperatur von 25 °C ist kein statistischer Unterschied im L.-Wachstum in der Bouillon mit

RE und der Kontrollbouillon nachweisbar. Innerhalb eines Tages kommt es bei beiden zu einem starken exponentiellen Anstieg auf circa 10⁸ KbE/ml. Dieser hohe Wert bleibt bis zum Ende der Lagerung erhalten (Abb. 4).

Das Wachstumsverhalten von *Salmonella Enteritidis* in der Nährbouillon mit und ohne RE zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied. Bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C kommt es ausgehend von der Ausgangsdosis zu einem gleich bleibenden Level der Mikroorganismenzahl von circa 10³ KbE/ml (Abb. 3). Bei einer Lagerung von 25 °C erhöht sich die S.-Zahl unabhängig von der RE-Zugabe innerhalb von 24 Stunden exponentiell auf über 10⁸ KbE/ml. Dieser Wert bleibt bis zum Ende des Lagerungszeitraumes nahezu erhalten (Abb. 4).

Diskussion

Brochothrix spp., *Pseudomonas fluorescens* und *Listeria monocytogenes* reagierten innerhalb der ersten 24 Stunden der Lagerung bei 10 °C mit einer Wachstumsverzögerung und erwiesen sich somit als sensitiv auf den fermentierten RE. Bei den weiteren Probenahmen war eine statistisch signifikante Wirkung nur noch bei *Listeria monocytogenes* darstellbar, mit Keimzahlunterschieden zur Kontrolle von 4 bis 5 log-Stufen. Die antilisterielle Wirkung des RE innerhalb der ersten 24 Stunden bestätigen auch Schepers (2001) und Sandasi et al. (2010). *Bacillus* spp. und *Salmonella Enteritidis* ließen sich durch den RE bei 10 °C nicht beeinflussen. Die untersuchten Milchsäurebildner zeigten nach 24 h zwar noch keine nachweisbare Wachstums-

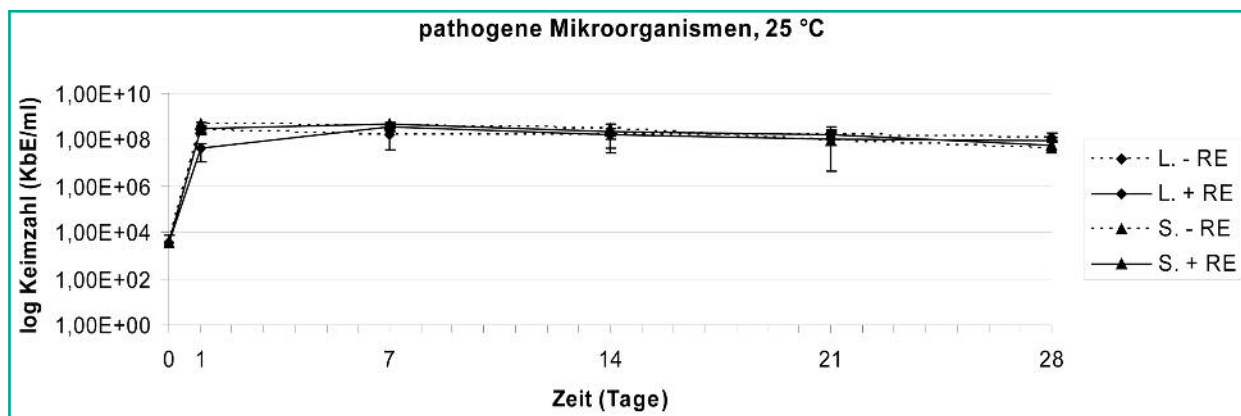


ABBILDUNG 4: Verlauf Keimzahl in Nährbouillon bei 25 °C mit (+ RE) und ohne (– RE) Rooibosextrakt, L. = *Listeria monocytogenes*, S. = *Salmonella Enteritidis*, RE = Rooibosextrakt.

hemmung, aber im weiteren Lagerungsverlauf war in der Bouillon mit RE die Keimzahl eine log-Stufe niedriger. Da die optimale Wachstumstemperatur der Milchsäurebildner/Bacillen/Salmonellen bei 37 °C liegt, spielt evt. auch die Lagerungstemperatur von 10 °C eine Rolle, die die Teilungsintensität verlangsamt hat, wodurch generell nur geringe Keimzahlen erreicht wurden. Almajano et al. (2008) konnten trotz einer hohen eingesetzten Konzentration des Rooibos von 75 mg/ml keine antibakterielle Wirkung des Rooibos auf *Lactobacillus acidophilus* aufzeigen. Da Milchsäurebildner in der Lebensmittelherstellung auch als Starterkulturen genutzt werden, wäre eine individuelle Evaluierung der Wirkung des REs auf jede entsprechende Kultur vor dem Einsatz im Lebensmittel zwingend, um die Produktqualität zu sichern.

Bei 25 °C Lagerungstemperatur vermag der RE das Wachstum der Milchsäurebildner, *Bacillus* spp., *Brochothrix* spp. und *Pseudomonas fluorescens* in den ersten 24 Stunden zu verzögern. Für einen *Bacillus cereus*-Stamm konnten auch Almajano et al. (2008) innerhalb von 48 h eine schwache antimikrobielle Wirkung konstatieren. Im weiteren Verlauf der Lagerung war keine antibakterielle Wirkung mehr zu verifizieren. *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Enteritidis zeigten bei 25 °C keine Reaktion auf den eingesetzten RE.

Insgesamt konnte in den Versuchen das Absinken der Mikroorganismenzahl verschiedener Testkeime (s. Tab. 2) in den ersten 24 Stunden nach Zusatz des RE beobachtet

TABELLE 2: Wirkungsweise des Extraktes aus fermentiertem Rooibos.

	Rooibosextrakt			
	10 °C 24 h	10 °C 28 d	25 °C 24 h	25 °C 28 d
Milchsäurebildner	-	+/-	+/-	-
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	+/-	-
<i>Brochothrix</i> spp.	+/-	-	+/-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+/-	-	+/-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	-	-	-

Erläuterung: - keine Wirkung, +/- Wirkung nicht statistisch nachweisbar, + Wirkung statistisch nachweisbar

werden. Allerdings war bei keinem der getesteten Mikroorganismen ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle darstellbar. Im weiteren Verlauf der Lagerung hob sich diese Wirkung auf. Da dieses Ergebnis nicht bei allen Mikroorganismen gleichermaßen auftritt, kann ein möglicher Verdünnungseffekt durch Zugabe des pulverförmigen PE ausgeschlossen werden. Zu vermuten ist ein Einfluss der Temperatur sowie der Teilungsintensität der Mikroorganismen in Zusammenhang mit den wirksamen Bestandteilen des RE. Die Komplexbildung der Flavonoide mit der Bakterienzellwand ist wahrscheinlich besonders effektiv bei höheren Temperaturen. Diese führen zum einen zu einer beschleunigten Teilungsrate der Mikroorganismen. Zum anderen konnten Tommasini et. al. (2004) darstellen, dass die Löslichkeit der Flavonoide und damit die Wirkstoffkonzentration bei höheren Temperaturen zunimmt. Eine damit verbundene mögliche Schädigung könnte das verzögerte Wachstum der Testkeime und verlängerten lag-Phasen zu Versuchsbeginn erklären. Der darauffolgende Anstieg der Mikroorganismen zeigt, dass die Wirkung des RE als bakteriostatisch einzuordnen ist (Schepers, 2001).

Da ein fermentierter Extrakt getestet wurde, kann der Gehalt an Aspalathin nicht allein die Ursache für diese Wirkung darstellen. Vermutlich ist der Grund ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten des Pflanzenextraktes. So konnten Krafczyk und Glomb (2008) in ihrer Arbeit eine Charakterisierung der phenolischen Inhaltsstoffe in Extrakten aus unfermentierten und fermentierten Rooibos zeigen. Eine Datenbank über die Inhaltsstoffe des Rooibos und deren Wirkung befindet sich derzeit im Aufbau (Joubert und de Beer, 2011). Der Abbau der instabilen Inhaltsstoffe wird als möglicher Grund für den Wirkungsverlust des Rooibos während der Lagerung thematisiert (Coetzee et al., 2008), gleichzeitig könnten die, durch die Oxidation des Aspalathin entstehenden, phenolischen Zwischen- und Endprodukte ebenfalls eine mögliche antimikrobielle Wirkung entfalten. Die Zusammensetzung des Pflanzenextraktes und die Gewinnung in immer gleichbleibender Qualität stellt auch gleichzeitig die größte Herausforderung dar (van Heerden et al., 2003). Trotz aller Bestrebungen standardisierte Studien mit vergleichbaren Ergebnissen zu erhalten, handelt es sich um ein Naturprodukt, dessen Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen während der Vegetationsphase sowie Weiterverarbeitung und Lagerung variieren. Der Phenol- und Aspalathingehalt muss bei jeder Charge neu bestimmt werden, wobei die Bestimmung der Einzelkomponenten erst der Anfang ist. Das Zusammenspiel der phenolischen Wirkstoffe ist im Moment noch zu wenig verstanden.

Als alleinige antimikrobielle Komponente ist die Zugabe von Rooibosextrakt keine ausreichende Maßnahme, um eine Reduktion bzw. Inaktivierung pathogener oder verderbniserregender Mikroorganismen zu erreichen. Trotz allem bieten die Ergebnisse bei 10 °C Lagerungstemperatur einen vielversprechenden Ansatz zur Anwendung im Lebensmittel, da ein deutlicher bakteriostatischer Effekt des REs auf *Listeria monocytogenes* nachweisbar war. Um diese Wirkung länger aufrecht zu erhalten, müsste ein wiederholter Zusatz des RE in Betracht gezogen und geprüft werden. Die Ergebnisse unterstreichen, dass der Einfluss von Pflanzenextrakten generell über eine längere Lagerungszeit getestet werden muss, da nach 24 oder 48 h oft nur kurzzeitige Effekte beobachtet wurden, die meisten Lebensmittel aber eine längere Haltbarkeit aufweisen. Der Einfluss der Lebensmittelkomponenten auf den RE bzw. die Mikroorganismen sowie mögliche synergistische oder antagonistische Einflüsse können aber ohnehin nur direkt im Lebensmittel erprobt werden, da die Aussagen von In-vitro-Studien nicht ohne weiteres übertragbar sind (Schirmer und Langsrud, 2010). Insgesamt konnte mit diesen Versuchen das Potential von RE für ein breiteres Spektrum an Mikroorganismen bewertet werden. So liegen erstmals auch Erkenntnisse zur Wirksamkeitsprüfung auf *Salmonella* Enteritidis und *Pseudomonas fluorescens* vor.

References

Almajano MP, Carbo R, Jimenez JAL, Gordon MH (2008): Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry 108: 55–63.

Bautista-Banos S, Hernandez-Lauzardo AN, Velazquez-del Valle MG, Hernandez-Lopez M, Barka EA, Bosquez-Molina E, Wilson CL (2006): Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 25: 108–118.

- Bramati L, Aquilano F, Pietta P (2003):** Unfermented rooibos tea: Quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7472–7474.
- Bramati L, Minoggio M, Gardana C, Simonetti P, Mauri P, Pietta P (2002):** Quantitative characterization of flavonoid compounds in Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5513–5519.
- Brand KW (2006):** From a turnaround in agrarian policy to a turnaround in consumption patterns? A study along the food supply chain from stable to table. *Ernährungs-Umschau* 53: 267–271.
- Brul S und Coote P (1999):** Preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50: 1–17.
- Burt S (2004):** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Coetzee G, Marx IJ, Pengilly M, Bushula VS, Joubert E, Bloom M (2008):** Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea*. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29: 33–38.
- Cowan MM (1999):** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564–582.
- Ferreira D, Marais C, Steenkamp JA (1995):** Rooibos Tea as a likely health food supplement. *Proceedings of Recent Development of Technologies on Fundamental Foods for Health* 73–88.
- Gould KS und Lister C (2006):** Flavonoids functions in plants. In: Andersen OM und Markham KR (ed.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor and Francis, Boca Raton, 397–441.
- Grüner-Richter S, Otto E, und Weinreich B. (2008):** Rooibos extract with increased aspalathin content, process for the preparation of such a rooibos extract, and cosmetic agent containing such a rooibos extract. US2008/0247974 A1, USA
- Holley RA und Patel D (2005):** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273–292.
- Joubert E (1996):** HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chemistry* 55: 403–411.
- Joubert E und de Beer D (2011):** Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. *South African Journal of Botany* 77: 869–886.
- Koeppen BH und Roux DG (1965):** C-Glycosylflavonoids – Chemistry of Orientin and Iso-Orientin. *Biochemical Journal* 97: 444–448.
- Koeppen BH und Roux DG (1966):** C-Glycosylflavonoids . Chemistry of Aspalathin. *Biochemical Journal* 99: 604–609.
- Koeppen BH und Smit CJB (1962):** Flavone C-Glycosides and Flavonol O-Glycosides of *Aspalathus Acuminatus* (Rooibos Tea). *Biochemical Journal* 83: 507–511.
- Krafczyk N und Glomb MA (2008):** Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 3368–3376.
- Morton JF (1983):** Rooibos Tea, *Aspalathus-Linearis*, A Caffeineless, Low-Tannin Beverage. *Economic Botany* 37: 164–173.
- Nel E, Binns T, Bek D (2007):** 'Alternative foods' and community-based development: Rooibos tea production in South Africa's West Coast Mountains. *Applied Geography* 27: 112–129.
- Rabe C, Steenkamp JA, Joubert E, Burger JFW, Ferreira D (1994):** Phenolic Metabolites from Rooibos Tea (*Aspalathus-Linearis*). *Phytochemistry* 35: 1559–1565.
- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM (2010):** The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 50: 30–35.
- Schepers S (2001):** Anti-microbial activity of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on food spoilage organism and potential pathogens. Department of Food Science, Faculty of Agriculture and Forestry Science, Universität of Stellenbosch, Diss.
- Schirmer BC und Langsrud S (2010):** Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria In Vitro and in Vacuum-Packed Pork Meat. *Journal of Food Science* 75: M98–M102.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998):** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26: 118–122.
- Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabro ML, Stancanelli R, Ficarra P (2004):** Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35: 379–387.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M (1996):** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50: 27–34.
- van Heerden FR, van Wyk BE, Viljoen AM, Steenkamp PA (2003):** Phenolic variation in wild populations of *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 885–895.
- von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF (1997):** Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 632–638.
- Wang J und Mazza G (2002):** Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4183–4189.

Korrespondenzadresse:

Karin Kühnast
Institut für Lebensmittelhygiene
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig
Germany
kuehnast@vetmed.uni-leipzig.de