

überwachung langfristig zu kontrollieren. Zweifellos wird die CCC die Isolierung größerer Mengen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe ermöglichen, die somit als Referenzsubstanzen für die Analytik und für in vitro und in vivo-Studien zur Verfügung stehen. Weiterführende Erkenntnisse sind durch eine enge Vernetzung von Lebensmittelchemie, Lebensmitteltechnologie, Ernährungswissenschaft und Toxikologie zu erwarten. Insbesondere gilt es, Stabilität und Bioverfügbarkeit sekundärer Pflanzenstoffe zu steigern und ihren vermuteten Zusatznutzen zu belegen.

Dietmar E. Breithaupt

*Institut für Lebensmittelchemie
Universität Hohenheim, Stuttgart
breithau@uni-hohenheim.de*

Andreas Schieber

*Institut für Lebensmitteltechnologie
Fachgebiet Lebensmittel pflanzlicher
Herkunft
Universität Hohenheim, Stuttgart
schieber@uni-hohenheim.de*

- 1) V. Böhm, *J. Food Sci.* 2002, 67, 1910–1913.
- 2) P. Fleischmann, K. Studer, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1677–1680.
- 3) H. Zorn, S. Langhoff, M. Scheibner, M. Nimtz, R. G. Berger, *Biol. Chem.* 2003, 384, 1049–1056.
- 4) D. E. Breithaupt, U. Wirt, A. Bamedi, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 66–70.
- 5) T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert, *Chromatographia* 2003, 57 (Suppl.), 195–255.
- 6) Perez-Galvez, H. D. Martin, H. Sies, W. Stahl, *Br. J. Nutr.* 2003, 89, 787–793.
- 7) P. E. Bowen, S. M. Herbst-Espinosa, E. A. Hussain, M. Stacewicz-Sapuntzakis, *J. Nutr.* 2002, 132, 3668–3673.
- 8) D. E. Breithaupt, P. Weller, M. Wolters, A. Hahn, *Br. J. Nutr.* 2003, 90, 795–801.
- 9) K. Robards, *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 657–691.
- 10) A. Schieber, P. Keller, P. Streker, I. Klaiber, R. Carle, *Phytochem. Anal.* 2002, 13, 87–94.
- 11) P. Hilt, A. Schieber, C. Yildirim, G. Arnold, J. Conrad, I. Klaiber, U. Beifuß, R. Carle, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2896–2899.
- 12) M. Papagiannopoulos, B. Zimmermann, A. Mellenthin, M. Krappe, G. Maio, R. Galensa, *J. Chromatogr. A* 2002, 958, 9–16.
- 13) M. Schwarz, S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt, P. Winterhalter, *Biochem. Eng. J.* 2003, 14, 179–189.
- 14) M. Schwarz, P. Quast, D. von Baer, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6261–6267.
- 15) M. Schwarz, T. C. Wabnitz, P. Winterhalter, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3682–3687.

Molekularbiologische Methoden der Lebensmittelanalytik

◆ Seit den letzten zwei Jahrzehnten versucht man, mit Hilfe der Gentechnik Selektionsvorgänge in der Pflanzenzüchtung zu beschleunigen. Die Einführung von Eigenschaften und deren Kombination mit bereits vorhandenen ist inzwischen in weiten Bereichen der menschlichen und tierischen Ernährung verbreitet. Als erste gentechnisch veränderte Pflanze erhielt in den USA im Jahr 1994 die FlavrSavr-Tomate eine Zulassung zum Anbau und zur Vermarktung als Lebensmittel.¹⁾

Zwischen 1996 und 2001 stieg die Anbaufläche für gentechnisch modifizierte Nutzpflanzen um das 30-fache. Der weltweite Anbau gentechnisch veränderter Kulturpflanzen umfasste im Jahr 1996 1,7 Mio. Hektar, im Jahr 2000 45 Mio. Hektar und 2002 bereits 58,7 Mio. Hektar. Die hauptsächlich verwendeten gentechnisch veränderten Nutzpflanzen sind Soja (63 % der weltweiten Fläche), Mais (19 %), Baumwolle (13 %) und Raps (5 %).²⁾

Die Europäische Union hat gezielt Vorschriften zum Schutz von Gesundheit und Umwelt erlassen mit dem Ziel, den Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) einheitlich zu regeln. Einen guten Überblick zur rechtlichen Situation sowie nützliche Internet-Links bietet die Internetseite von Transgen.³⁾

Zur Spezifizierung der Produkte und zur Überprüfung der gesetzlich vorgeschriebenen Kennzeichnung sind entsprechende Nachweisverfahren erforderlich. Gentechnische Veränderungen von Organismen lassen sich – beim Erzeuger aber auch bei Überwachungsbehörden – am effizientesten mit DNA-basierten Techniken nachweisen.

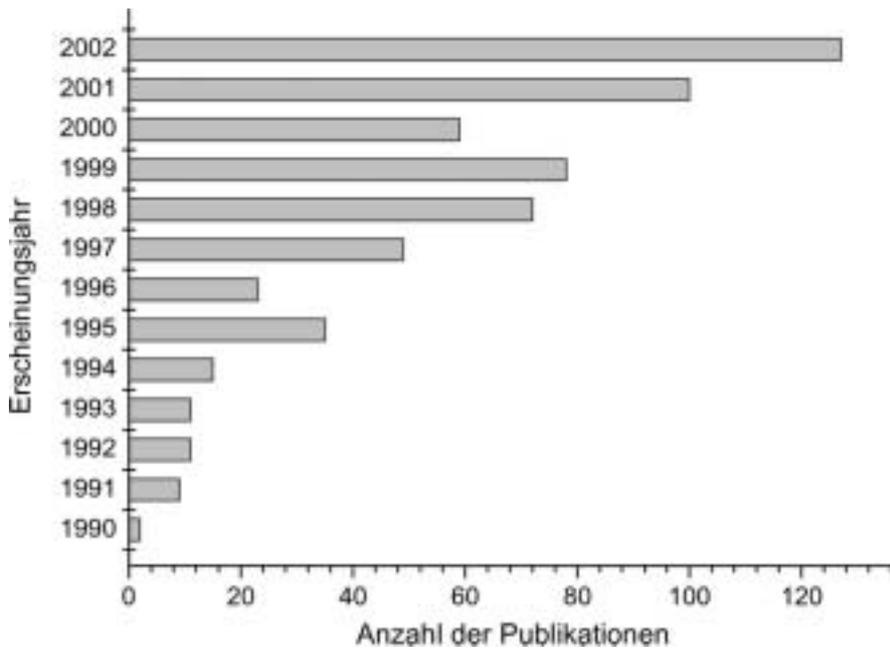
Ein weiteres Einsatzgebiet molekularbiologischer Methoden in der Lebensmittelanalytik ist die Identifizierung und Quantifizierung von

pflanzen-, tier- und humanpathogenen Mikroorganismen. Mikrobielle Infektionen, die durch Lebensmittel übertragen werden, sind ein weltweit ernst zu nehmendes Problem. So kann beispielsweise verschmutztes Wasser Obst und Gemüse bakteriell kontaminieren. Eine schnelle und sichere Identifizierung pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln ist sowohl für Qualität als auch für die Sicherheit unumgänglich. Damit hygienische Standards bei Herstellung, Behandlung und Inverkehrbringen von Lebensmitteln eingehalten werden, hat der Gesetzgeber Vorschriften erlassen, die auch den Einsatz molekularbiologischer Techniken vorsehen. Die Methoden zur DNA-basierten Analytik von Lebensmitteln, die bereits in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) aufgenommen sind, stehen in der Tabelle (S. 311).

Für die molekularbiologische Identifizierung von gentechnischen Veränderungen oder Fremd-DNA im Allgemeinen stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung: DNA lässt sich mit Gen-Sonden durch eine einfache Hybridisierungsreaktion nachweisen. Eine weitere Methode ist die PCR. Auch bei diesem Verfahren werden zunächst Hybridmoleküle zwischen jeweils einem Strang der Proben-DNA und dem zu diesem Strang passenden Oligonukleotid ausgebildet. Anders als bei Hybridisierungsverfahren wird bei der PCR die Proben-DNA vermehrt. Besondere Versuchsanordnungen erlauben bei dieser Methode auch eine Quantifizierung des Probenmaterials. Beide Verfahren lassen sich, je nach Fragestellung, miteinander und mit anderen molekularbiologischen Techniken kombinieren.

Der DNA-Nachweis mit Gen-Sonden

◆ Bei Hybridisierungsverfahren, sowohl beim Einzelnachweis als auch bei der simultanen Analyse von vielen Nukleinsäureproben mit DNA-Chips, werden Nukleinsäure-Ziel-



Literaturrecherche
in der Chemical
Abstracts-Daten-
bank (CAPLUS) zu
den Schlagwörtern
„PCR und Food und
Analysis“. Bis Ende
2003 wurden
insgesamt 688
Einträge zu diesem
Thema gefunden.

moleküle grundsätzlich über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären Nukleinsäure-Sonden (Gen-Sonden) detektiert.

Der Einzelnachweis von Nukleinsäure-Abschnitten

Beim Einzelnachweis werden als Gen-Sonden einzelne synthetische Oligonukleotide, isolierte DNA-Fragmente, *in vitro*-Ribonukleinsäure-(RNA)-Transkripte oder artifizielle, synthetische Peptid-Nukleinsäuren (PNA) eingesetzt. Um Hybridisierungen sichtbar zu machen, tragen diese Gen-Sonden Marker-Moleküle wie Radioisotope (z.B. ^{32}P), Farbstoffe (z.B. Fluorescein) oder Enzyme, die eine Farbreaktion katalysieren können (z.B. alkalische Phosphatase).

Die aus einem Lebensmittel isolierten Nukleinsäure-Zielmoleküle werden zunächst auf einem festen Trägermaterial (z.B. Oberfläche einer Mikrotiterplatte) fixiert. Anschließend wird eine spezifische, markierte Gen-Sonde zugegeben. Nach Inkubation werden nicht-hybridisierte oder unspezifisch angelagerte Sonden durch Waschen entfernt. Die gesuchte Zielsequenz lässt sich durch die spezifische Bindung der markierten Sonde identifizieren. Diese wird entweder durch Auto-

radiographie (z.B. bei ^{32}P -markierten Sonden) oder durch nicht-radioaktive Nachweismethoden (z.B. photometrisch bei alkalischer Phosphatase-Markierung) sichtbar gemacht.

Das kommerziell erhältliche Gen-Sonden-System (Gene-Trak) zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln arbeitet nach dem oben beschriebenen Prinzip. Nach selektiver Kultivierung der Bakterien in der Lebensmittelprobe wird aus dem zu untersuchenden Lebensmittel DNA isoliert, diese durch Denaturierung in Einzelstränge zerlegt und anschließend mit einer enzymmarkierten Sonde hybridisiert. Nach Zugabe einer Substratlösung erhält man das Ergebnis photometrisch. Den beschriebenen Salmonellen-Nachweis gibt es wie andere Hybridisierungs-Verfahren (z.B. Listerien-Nachweis) sowohl als Einzelnachweis als auch im Mikrotiterplatten-Format.

Alternativ zu diesem Verfahren wurde ein Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungsverfahren (FISH) für den Nachweis von Salmonellen entwickelt. Hierbei werden mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Gen-Sonden, die komplementär zur 23S rRNA sind, direkt auf permeabilisierte Bakterienzellen gegeben. Die markierte Sonde diffundiert in die Bakterienzellen, in denen anschlie-

ßend die Hybridisierungsreaktion stattfindet. Ausgewertet wird hier mit einem Fluoreszenzmikroskop.⁴⁾

Ein weiteres FISH-Verfahren verwendet markierte PNA-Sonden, um Bakterien und Hefen nachzuweisen.⁵⁾

DNA-Mikroarray-Technik

Bei einem DNA-Mikroarray (auch Bio- oder DNA-Chip genannt) handelt es sich um eine systematische Anordnung von DNA-Sonden auf planaren Oberflächen (z.B. Glasplättchen). Bei Exposition mit Nukleinsäure-Proben hybridisieren die komplementären Nukleinsäure-Abschnitte an die Festphasen-gebundenen Sonden. Ein einziger Chip kann mit Tausenden verschiedener Gen-Sonden bedruckt sein, die ebenso viele unterschiedliche komplementäre DNA-Sequenzen erkennen. Um Hybridisierungen sichtbar zu machen, muss dabei die Nukleinsäure-Probe markiert vorliegen. Nukleinsäure-Proben können beispielsweise fluoreszenzmarkierte cDNA-Stränge sein, die durch reverse Transkription von mRNA aus dem zu untersuchenden Lebensmittel gewonnen wurden, oder auch PCR-Fragmente, die unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTP) erzeugt wurden. Nicht-hybridisierte Nukleinsäure-Proben werden durch einen Waschschrift entfernt. Durch das Hybridisieren entsteht auf dem DNA-Chip ein charakteristisches Hybridisierungsmuster, welches fluorimetrisch ausgelesen werden kann.

Die DNA-Chiptechnologie ermöglicht es einerseits, eine sehr große Zahl von Hybridisierungen gleichzeitig durchzuführen – dies ist bedingt durch die Vielzahl verschiedener Sonden. Andererseits lässt sich durch die systematische Anordnung der Sonden die Analyse auch simultan auswerten. Dieser hohe Parallelisierungsgrad ist einer der wesentlichen Vorteile dieser Technik gegenüber klassischen molekularbiologischen Methoden, mit denen man nur einzelne oder wenige DNA-

Abschnitte gleichzeitig nachweisen kann. Einen Überblick zu Mikroarray-Methoden gibt Stears et al.⁶⁾

Der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit DNA-Mikroarrays ist in der Literatur mehrfach beschrieben.⁷⁻¹⁰⁾ Kommerziell erhältlich ist beispielsweise das NUTRI-Chip-Testverfahren, mit dem parallel *Salmonella ssp.*, *Listeria monocytogenes* und *Campylobacter jejuni* bzw. *C. coli* in einem Lebensmittel nachgewiesen werden können. Ebenso gibt es seit Kurzem eine Arbeit zum quantitativen Mikroarray-basierten Nachweis von transgenen Maislinien in Lebensmittel und Futtermitteln.¹¹⁾

PCR-Analyse

◆ Mittlerweile ist die PCR die gängigste Methode, gentechnisch veränderte Organismen und DNA mikrobiellen Ursprungs in Lebensmitteln nachzuweisen (Abbildung).¹²⁻¹⁸⁾

Für eine PCR-Analyse muss die DNA zunächst aus der zu untersuchenden Lebensmittelmatrix isoliert und gereinigt werden. Ziel ist es, Stoffe abzutrennen, die die PCR hemmen könnten, z.B. Proteine, phenolische Verbindungen oder Salze. Anschließend wird die isolierte, doppelsträngige DNA (Matrize)

durch Energiezufuhr, d.h. Temperaturerhöhung auf ca. 95 °C, in Einzelstränge zerlegt. Danach wird die Temperatur auf ca. 50 °C gesenkt, so dass sich im Überschuss vorhandene, synthetische Oligonukleotide (Primer) anlagern können (Annealing). Da diese Primer zu den 3'-Enden der zu kopierenden Einzelstränge der Matrizen-DNA komplementär sind, erfolgt hier eine Hybridisierung. Anschließend werden die Stränge durch eine DNA-Polymerase in Anwesenheit von freien dNTP matrizenabhängig verlängert (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation vermehrt sich Matrizen-DNA nahezu exponentiell. Mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (z. B. Taq-DNA-Polymerase) lassen sich die PCR-Zyklen in einem vollautomatischen PCR-Thermocycler ohne Unterbrechung, d. h. ohne ständige Zugabe von neuem Enzym, durchführen.

Nach der PCR wird das spezifisch amplifizierte DNA-Fragment entweder in einer Agarose- oder einer Polyacrylamid-Gelmatrix elektrophoretisch separiert und durch Interkalations-Farbstoffe, z. B. Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Amplifikate können auch durch Silberfärbung oder Kombination mit ELISA-

Verfahren (enzyme linked immunosorbent assay) detektiert werden. PCR-ELISA Verfahren wurden in der Literatur für den Nachweis von bakteriellen Kontaminationen in Lebensmitteln und zum Screening von gentechnisch veränderten Organismen, z. B. Bt176 Mais in Mehl und Stärke, beschrieben.¹⁹⁻²²⁾

Spezifität und Sensitivität der PCR-Methode beruhen auf selektiv bindenden Primer-Paaren, die sowohl den amplifizierten DNA-Abschnitt als auch die Länge des Amplifikats definieren. Das amplifizierte DNA-Fragment kann mit Methoden wie Verdau mit spezifischen Endonukleasen,²³⁾ DNA-Sequenzierung oder wiederum durch Hybridisierung mit spezifisch an das PCR-Fragment bindenden, markierten Sonden²⁴⁾ bestätigt werden. Spezifizierung ist auch durch Reamplifikation mit einem weiteren Primerpaar möglich, welches innerhalb der amplifizierten DNA-Sequenz bindet, mit einer so genannten verschachtelten PCR (Nested-PCR).²⁵⁾

Die „Real-Time-Quantitative-PCR (RT-PCR)“ ist eine Weiterentwicklung des qualitativen PCR-Verfahrens. Hierbei wird direkt während der Reaktion die Menge des gebildeten PCR-Produkts fluorimetrisch gemessen und anschließend die ursprüng-

Tabelle.
DNA-basierte Verfahren in der Lebensmittelanalytik nach § 35 LMBC.²⁶⁾

Methodenbezeichnung	Titel der Methode
L-00.00-31	Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Pflanzen durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen
L-00.00-45	Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln (nach DIN 10134)
L-00.00-52	Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (nach DIN 10135)
L-02.02-4	Nachweis einer gentechnischen Veränderung von <i>Streptococcus thermophilus</i> in Joghurt durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR und Hybridisierung des PCR-Produkts mit einer DNA-Sonde
L-07.18-1	Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin bildender <i>Escherichia coli</i> (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik
L-08.00-44	Nachweis einer gentechnischen Veränderung von <i>Lactobacillus curvatus</i> in Rohwurst durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR und Hybridisierung des PCR-Produkts mit einer DNA-Sonde
L-15.05-1	Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais (<i>Zea mays</i> L.) mit Hilfe der PCR und Restriktionsanalyse oder Hybridisierung des PCR-Produkts
L-23.01.22-1	Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Sojabohnen durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR und Hybridisierung des PCR-Produkts mit einer DNA-Sonde
L-24.01-1	Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Kartoffeln durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion) und Hybridisierung des PCR-Produkts mit einer DNA-Sonde
L-25.03.01-1	Nachweis einer gentechnischen Veränderung von Tomaten durch Amplifizierung der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR und Hybridisierung des PCR-Produkts mit einer DNA-Sonde oder Restriktionsanalyse des PCR-Produkts

lich in die Reaktion eingesetzte Matrizen-DNA-Menge berechnet.

Grenzen

◆ Wesentliche Grundlage der quantitativen DNA-Analyse bildet die Kenntnis der nachzuweisenden DNA-Sequenz, anhand derer die spezifischen Primer oder Sonden konstruiert werden. Ein Nachweis nicht-zugelassener GVO ist, da hier die Sequenzen nicht bekannt sind, folglich nicht ohne erheblichen molekularbiologischen Entwicklungsaufwand möglich. Auch eine genaue quantitative Bestimmung genetischer Veränderungen, z.B. an Plastiden, ist aufgrund variabler Kopienzahlen schwierig.

Daneben ist bei hochverarbeiteten GVO-Produkten wie Öl, Zucker, Stärke, Aromen, Zusatzstoffen oder fermentierten/stark sauren Produkten ein molekularbiologischer Nachweis nur schwer oder auch gar nicht mehr durchführbar, da im Laufe des Herstellungsprozesses DNA degradiert oder abgetrennt wird.

Wegen der hohen Stabilität von DNA kann ein konventioneller PCR-gestützter Nachweis von Mikroorganismen nicht zwischen DNA aus toten und lebenden Zellen unterscheiden. Diese Differenzierung ist aber wichtig, um die Quali-

tät eines Lebensmittels beurteilen zu können. In vielen Fällen hilft es hier, Mikroorganismen anzureichern, d.h. die Erreger in einem Selektivmedium zu vermehren. Eine andere Möglichkeit ist der molekularbiologische Nachweis von RNA, da diese in toten Zellen nur noch in Spuren nachweisbar ist.

Ausblick

◆ Molekularbiologische Verfahren bereichern die Methoden der Lebensmittelanalytik außerordentlich. Gerade mit Hilfe der PCR lassen sich biologische Fremdstoffe in Lebensmitteln leicht erkennen und auch einzelne Bestandteile eines Produkts identifizieren. DNA-Einzelnachweise, wie sie bereits für viele Anwendungen als Kits erhältlich sind, haben ihre Stärken in der einfachen Anwendung ohne komplizierte apparative Ausstattung.

Mikroarray-Verfahren, deren Vorteile in der Miniaturisierung und Parallelisierung liegen, werden an Bedeutung gewinnen. Der Einsatz von Robotern und die Bioinformatik werden die Anwendbarkeit dieser Technik weiter ausbauen.

Markus J. Fischer, Garching



Markus Fischer, Jahrgang 1965, studierte Lebensmittelchemie an der TU München und promovierte anschließend bei Adelbert Bacher am Lehrstuhl für organische Chemie und Biochemie. Nach dem zweiten Staatsexamen am Landesuntersuchungsamt Nordbayern habilitierte er sich 2003 über Biosynthesewege von Vitaminen an der TU München in Lebensmittelchemie und Biochemie. Seit 2002 beteiligt er sich an der Durchführung des Studiengangs Industrial Chemistry des German Institute of Science and Technology in Singapur. Zur Zeit arbeitet er als wissenschaftlicher Oberassistent in Garching und befasst sich mit den Biosynthesewegen von Folsäure und Riboflavin aus Mikroorganismen und Pflanzen.

- 1) *Anonym*, Food and Drug Administration 1994.
- 2) *J. Clive*, *International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications, ISAAA Briefs* 2002, No. 27, 19.
- 3) *Transgen*. www.transgen.de
- 4) *Q. Fang, S. Brockmann, K. Botzenhart, A. Wiedenmann*, *J. Food Prot.* 2003, 66, 723–731.
- 5) *H. Perry-O'Keefe, S. Rigby, K. Oliveira, D. Sorensen, H. Stender, J. Coull, J. J. Hyldig-Nielsen*, *J. Microbiol. Methods* 2001, 47, 281–292.
- 6) *R. L. Stears, T. Martinsky, M. Schena*, *Nat. Med.* 2003, 9, 140–145.
- 7) *U. Busch, M. Knoll-Sauer, B. Muehlbauer, R. Zucker, H. Beck, I. Huber*, *Fleischwirtschaft* 2003, 83, 111–114.
- 8) *S. F. Al-Khaldi, S. A. Martin, A. Rasooly, J. D. Evans*, *Journal of AOAC International* 2002, 85, 906–910.
- 9) *D. Volokhov, V. Chizhikov, K. Chumakov, A. Rasooly*, *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 4071–4080.
- 10) *D. R. Call, M. K. Borucki, F. J. Loge*, *Journal of Microbiological Methods* 2003, 53, 235–243.
- 11) *K. Rudi, I. Rud, A. Holck*, *Nucleic Acids Research* 2003, 31, e62/61-e62/68.
- 12) *H. J. M. Aarts, J.-P. F. van Rie, E. J. Kok*, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2002, 2, 69–76.
- 13) *F. E. Ahmed*, *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 215–223.
- 14) *E. Gachet, G. G. Martin, F. Vigneau, G. Meyer*, *Trends in Food Science & Technology* 1999, 9, 380–388.
- 15) *P. G. Lantz, W. Abu al-Soud, R. Knutsson, B. Hahn-Hagerdal, P. Radstrom*, *Biotechnology Annual Review* 2000, 5, 87–130.
- 16) *N. P. Rijpens, L. M. F. Herman*, *Journal of AOAC International* 2002, 85, 984–995.
- 17) *B. Malorny, T. Tassios Panayotis, P. Radstrom, N. Cook, M. Wagner, J. Hoofar*, *International Journal of Food Microbiology* 2003, 83, 39–48.
- 18) *J. M. B. M. van der Vossen, H. Rahaoui, M. W. C. M. de Nus, B. J. Hartog*, *Yeasts in Food* 2003, 123–138.
- 19) *Y. Hong, M. E. Berrang, T. Liu, C. L. Hofacre, S. Sanchez, L. Wang, J. J. Maurer*, *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 3492–3499.
- 20) *F. J. Bolton, A. D. Sails, A. J. Fox, D. R. Wareing, D. L. Greenway*, *J. Food Prot.* 2002, 65, 760–767.
- 21) *B. Ge, S. Zhao, R. Hall, J. Meng*, *Microbes Infect.* 2002, 4, 285–290.
- 22) *L. Petit, F. Baraige, A.-M. Balois, Y. Bertheau, P. Fach*, *European Food Research and Technology* 2003, 217, 83–89.
- 23) *J. L. Ram, M. L. Ram, F. F. Baidoun*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, 2460–2467.
- 24) *I. Feder, J. C. Nietfeld, J. Galland, T. Yearly, J. M. Sargeant, R. Oberst, M. L. Tamplin, J. B. Luchansky*, *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2477–2484.
- 25) *I. Rychlik, L. Van Kesteren, L. Cardova, A. Svestkova, R. Martinkova, F. Sisak*, *Letters in Applied Microbiology* 1999, 29, 269–272.
- 26) *BgVV. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen und bedarfsgegenständen*, Beuth Verlag, Berlin, Köln.