



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und

Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie

Prüfung verschiedener Anreicherungsverfahren zum Nachweis von Hefen- und Schimmelkontaminationen in Milchprodukten

Diplomarbeit

vorgelegt von

Karin Focke

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2008-0277-4

Erstprüfer: Prof. Dr. Karl Steffens

Zweitprüfer: Dipl.-Ing. Stefan Zänker

Neubrandenburg, 12. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
DANKSAGUNG	4
ABSTRACT	5
ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS	6
 1 EINLEITUNG	 7
 2 ZIEL	 11
 3 STAND DES WISSENS	 12
3.1 Hefen.....	12
3.1.1 Aufbau der Hefezelle	12
3.1.2 Hefevermehrung.....	14
3.1.3 <i>Saccharomyces</i>	21
3.1.4 <i>Rhodotorula</i>	21
3.1.5 <i>Candida</i>	22
3.1.6 <i>Geotrichum</i>	23
3.2 Schimmelpilze	24
3.2.1 Vermehrung und Wachstum.....	25
3.2.2 <i>Alternaria</i>	26
3.2.3 <i>Aspergillus</i>	27
3.2.4 <i>Fusarium</i>	28
3.2.5 <i>Mucor</i>	28
3.2.6 <i>Rhizopus</i>	29
3.2.7 <i>Penicillium</i>	30
 4 MATERIAL UND METHODEN	 31
4.1 Materialien und Nährmedien	31
4.2 Arbeitsgeräte	33
4.3 Probenmaterial und Probenahme.....	34
4.4 Keimzahlbestimmung der Hefesuspension <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4.4.1 Oberflächenausstrichverfahren	35

4.4.2 Thoma-Zählkammer	36
4.5 Anreicherung von Mikroorganismen	38
4.5.1 Anreicherungs-methode 50.50 zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milchprodukten	39
4.5.2 Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode.....	40
4.5.3 Vitalisierungsmethode	42
4.5.4 Ermitteln der Auswirkung der unterschiedlichen Lagerung der Halbfertig- und Endprodukte auf das Untersuchungsergebnis	43
4.5.5 Vergleich verschiedener Anreicherungs- und Bebrütungszeiten	43
4.5.6 Vergleich verschiedener Anreicherungs- und Bebrütungstemperaturen	44
4.5.7 Schnellnachweis von Hefen	45
5 ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG	47
5.1 Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Hefesuspension <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
5.2 Ergebnisse der Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode	48
5.3 Ergebnisse der Vitalisierungsmethode	50
5.4 Auswirkung der Lagerunterschiede von Halbfertig- und Endprodukten.....	52
5.5 Ergebnisse unterschiedlicher Anreicherungs- und Bebrütungszeiten	54
5.6 Ergebnisse unterschiedlicher Anreicherungs- und Bebrütungstemperaturen....	57
5.7 Ergebnisse des Schnellnachweises	61
6 DISKUSSION	63
7 ZUSAMMENFASSUNG	74
8 LITERATURVERZEICHNIS	75
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
TABELLENVERZEICHNIS	79
ANHANG	80
ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGE ANFERTIGUNG DER ARBEIT	101

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Professor Dr. Karl Steffens bedanken, der mich während meiner Diplomarbeit betreut und umfangreich unterstützt hat.

Bei Herrn Dipl.-Ing. Jörg Henkel bedanke ich mich für die Vergabe und Betreuung der Diplomarbeit. Dank schulde ich auch Herrn Dipl.-Ing. Stefan Zänker, der mich während meiner gesamten Diplomarbeit betreute.

Besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Biol. Brigitte Bartel der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg, die mich durch ihre stetige Diskussionsbereitschaft mit vielseitigen Denkanstößen bereicherte und bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich Karin Falk und Silke Arndt für ihre vielen Hinweise und Hilfen während meiner Arbeit im mikrobiologischen Labor.

Ich danke meinem Freund Alexander Mieß und seinen Eltern für ihre große Geduld und ihrem Interesse beim Entstehen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme verfolgt haben.

Karin Focke

Abstract

The objective of this diploma study was to check the „50.50“ method, which shall show the proof of yeasts and moulds in milk products. Furthermore it had to be checked, if alternative methods exist and how they can be used in the company.

The results showed that it is not required to do an additional incubation for half readymade products at room temperature. A reducing of time from 48 to 24 hours for the intervalincubation is justifiable, because the sensitivity of his method is not really being restricted. After first findings an incubation of petri dishes can be already completed after three or four days instead of after five days. A qualitative interpretation of the 50.50 method is more useful, because methods of enrichment only allow a partly conclusion of the original load of the samples. Generally the established results lead to a time saving of three till four days. It is more useful to carry out the changed method parallel to the 50.50 method over a period of four months to get a statistical certainty.

The microscopically “fast detection method” (Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik, 1985) could be an alternative in the proof of yeasts to the 50.50 method. In order to have a better statistical certainty, further analyses are required to take place. In addition to that it is required to check, how moulds can be proved with this method.

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

AH	Albert Heijn
a_w	Wasseraktivität
<i>C.</i>	<i>Candidum</i>
CJ	Cremiger Joghurt
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DIN	Deutsche Industrie-Norm des Deutschen Instituts für Normung
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>
<i>G.</i>	<i>Geotrichum</i>
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
KbE	Kolonie bildende Einheit
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
<i>M.</i>	<i>Mucor</i>
MB	Mark Brandenburg
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
min	Minuten
Mio	Millionen
mL	Milliliter
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>
<i>R.</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Rh.</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
sp.	Spezies
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
WHO	World Health Organisation
\bar{x}	Gewichteter Mittelwert
YGC-Agar	Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar

1 Einleitung

Die Milch enthält viele essentielle Nährstoffe, die für den Aufbau und die Funktion des Organismus notwendig sind. Für die menschliche Ernährung hat die Milch besonders durch die sich weiterentwickelnde Molkereitechnologie einen herausragenden Platz eingenommen. Die zunehmende Bedeutung der Milch liegt neben den guten ernährungsphysiologischen Eigenschaften vorwiegend in der Vielfalt der aus Milch hergestellten Produkte. (Ternes, 1994)

Ergebnisse der aktuellen Nationalen Verzehrsstudie II (2008) zeigen, dass die mittlere Zufuhr von Milch, Milcherzeugnissen und Käse (ohne Gerichte auf Basis von Milch und Milcherzeugnissen) bei Männern bei 248 g/Tag und bei Frauen bei 227 g/Tag liegt. Der Anteil von Käse und Quark beträgt bei beiden Geschlechtern 17-18 %.

Um den Erwartungen und Ansprüchen der Verbraucher gerecht zu werden, ist es für ein Unternehmen wichtig, stets eine konstante Produktqualität sicherzustellen. Zur Qualitätssicherung halten die Deutsche Gesellschaft für Qualität (DGQ) sowie einzelne Teile der DIN 55350 folgende Maßnahmen für erforderlich:

- Qualitätsplanung
- Qualitätslenkung und
- Qualitätsprüfung.

Diese Punkte sollen sicherstellen, dass die Produkte den vorgegebenen Qualitätskriterien entsprechen. Als richtungsweisend gilt ganz allgemein ein Satz der WHO: „Qualität kann nicht in ein Produkt hinein geprüft, sie muss von Anfang an hinein geplant werden“ (Wallhäußer, 1990).

Die Qualitätsplanung soll die Festlegung von Qualitätszielen und die Festlegung der Mittel, die das Erreichen der angestrebten Ziele ermöglichen, beinhalten (Pichardt, 1997). Die Qualitätslenkung erfolgt durch regelmäßige Qualitätsprüfungen. Die Ergebnisse dieser Prüfungen und die Analyse anderer Qualitätsdaten führen dazu, dass erforderliche Maßnahmen (z. B. Hygienemaßnahmen) so gesteuert werden, dass die festgelegten Qualitätskriterien gehalten werden können (Wallhäußer, 1990). Die Qualitätsprüfung dient zur Überwachung der Qualität eines Produktes. Hierzu

werden neben chemischen und physikalischen Prüfmethoden auch mikrobiologische Kontrollverfahren herangezogen. Die mikrobiologische Qualitätsprüfung hat zur Aufgabe, eingehende Rohstoffe und Halbfertigwaren auf ihre mikrobiologisch-hygienische Eignung zu untersuchen, die Produktion im Sinne einer einwandfreien Prozesshygiene unterstützend zu steuern und somit positiv zu beeinflussen. Es soll verhindert werden, dass Fertigwaren mit geringerer hygienischer Qualität in den Handel gelangen. Außerdem sollen Konsumenten vor potentiellen Risikokeimen geschützt werden.

Der Verderb von Lebensmitteln durch Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen) ist ein sehr komplexer Prozess. Letztlich sind die Zusammensetzung des Lebensmittels und die gegebenen Umweltbedingungen ausschlaggebend dafür, welche Mikroorganismenart sich innerhalb einer Mischinfektion durchsetzen kann. Sind die Milieubedingungen für alle drei Mikroorganismengruppen günstig, dann wachsen Bakterien gewöhnlich schneller als Hefen und diese wiederum schneller als Schimmelpilze. (Reiß, 1997)

Die häufigsten Verderbniserreger von Speisequark sind Hefen und Schimmelpilze, da sie die Fähigkeit besitzen, sich auch im sauren Milieu zu vermehren (Engel, 1992). Laut Reiß (1997) können sich Pilze gegenüber Bakterien bei einem pH-Wert von weniger als 5,5 durchsetzen. Speisequark ist aufgrund des hohen Wasser- und Nährstoffgehaltes sowie seiner Kontaminationsanfälligkeit ein leicht verderbliches Produkt. Neben dem sensorischen Verderb ist die Mykotoxinbildung einiger Pilze ein wichtiger Aspekt. Mykotoxine sind natürliche Stoffwechselprodukte, die beim Wachstum von Schimmelpilzen auf Lebens- und Futtermitteln gebildet werden können und toxisch für Mensch und Tier sind. Gattungen von *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* gehören zu den wichtigsten Mykotoxinbildnern. *Aspergillus flavus* bildet Aflatoxine. Nehmen Kühe Aflatoxin-B₁-haltiges Futter auf, wird das Aflatoxin B₁ in der Leber zu Aflatoxin M₁ hydroxyliert. Der größte Teil dieses Toxins wird über den Urin ausgeschieden. Ein geringer Teil kann aber auch in die Milch übergehen. Für Aflatoxin M₁ ist in Milch ein Grenzwert von 0,05 µg/kg (Mykotoxin-Höchstmengen-Verordnung und EU-Kontaminanten-Verordnung) festgelegt. (Krämer, 2002; Riemelt et al., 2003)

Laut Auskunft des Betriebes „Campina“ mit Standort in Prenzlau wurden von September 2007 bis einschließlich August 2008 ca. 14 Mio. kg Speisequark produziert. Neben Speisequark, in verschiedenen Fettstufen, werden diverse Fruchtquarks und Kräuterquarks hergestellt. Die Abfüllung der Produkte erfolgt in Becher oder Eimer. Für in Eimer abgefüllten Quark gewährt der Hersteller eine Mindesthaltbarkeit von 24 Tagen. Bei der Becherabfüllung beträgt die Mindesthaltbarkeit 30 Tage.

Um die Produktqualität garantieren zu können, sind hygienische Maßnahmen während der Herstellung und Verpackung zu treffen. Kontaminationen müssen vermieden werden, weil eine Vermehrung von Hefen bei den empfohlenen Lagertemperaturen von 8 °C noch möglich ist. Da während der Quarkherstellung vor allem die Hefen durch die vorausgehende Hitzebehandlung der Milch abgetötet werden, ist ihr Vorkommen im Quark auf Rekontaminationen nach der Erhitzung zurückzuführen. (Engel, 1992)

Aus mikrobiologischer Sicht sind unter dem Aspekt der Haltbarkeit für Speisequark drei Schwerpunkte ausschlaggebend:

- Speisequark sollte möglichst rekontaminationsarm und in der Perspektive weitgehend rekontaminationsfrei hergestellt werden. In allen Produktionsstufen gilt es Kontaminationen zu vermeiden. Besonders Zusätze wie Gewürze, Kräuter und Zucker stellen eine Kontaminationsgefahr dar. Sie sollten angemessen vorbehandelt und mikrobiologisch untersucht werden, um sicher zu stellen, dass durch sie keine Qualitätseinbußen hervorgerufen werden.
- Da Speisequark ein Frischerzeugnis mit einer lebenden Milchsäurebakterienflora ist, darf die Kühlkette von der Herstellung bis zum Verbrauch nicht unterbrochen werden.
- Der fast ausschließlich in hermetisch verschlossenen Verbraucherpackungen abgefüllte Quark sollte mit keiner Säuerungskultur hergestellt werden, die unter den gegebenen Lagerbedingungen CO₂ bilden kann. Dadurch könnten leicht Bombagen entstehen, die eine Blähung durch Kontaminanten (Hefen oder coliforme Keime) vortäuschen. (Weber, 1996)

Bei Reinfektionen, z. B. durch unsachgemäße Arbeitsweise oder durch mikrobiologisch nicht einwandfreie Gerätschaften oder Verpackungsmaterialien sind unmittelbar nach der Herstellung und Verpackung nur sehr geringe Anfangskeimzahlen im Quark zu erwarten, so dass für deren Nachweis eine zusätzliche Voranreicherung durchgeführt werden muss (Engel, 1992).

Campina nutzt die eigens entwickelte Untersuchungsmethode 50.50 zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milchprodukten. Sie wird zusätzlich zur Referenzmethode nach § 64 LFGB durchgeführt. Bei der Untersuchungsmethode 50.50 handelt sich um ein Anreicherungsverfahren, bei dem die Probe in einer Malzextrakt-Bouillon homogenisiert und vorinkubiert wird. Anschließend wird die Probe mittels Plattengussverfahren in eine Petrischale überführt und nochmals bebrütet. Die 50.50 Methode hat sich mittlerweile im Unternehmen etabliert. Sie wird genutzt, um frühzeitig eventuelle negative Tendenzen der Produktqualität bezüglich einer Hefen- und Schimmelkontamination zu erkennen. Entsprechende Maßnahmen müssen ergriffen werden, um eine Verschlechterung der Produktqualität zu verhindern. Mit der 50.50 Methode werden sowohl die Halbfertigprodukte (Sahnejoghurt, Cremiger Joghurt, Albert Heijn Joghurt, Magermilchkonzentrat) als auch die Endprodukte (Fruchtquark, Speisequark, Albert Heijn Quark, Kräuter- und Hausmacherquark) untersucht.

2 Ziel

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, die Aussagekraft und statistische Auswertbarkeit der Untersuchungsmethode 50.50 zu überprüfen. Außerdem werden verschiedene Anreicherungsverfahren getestet, mit dem Ziel, die Untersuchungszeit zu verkürzen, um schneller Ergebnisse verfügbar zu haben und gegebenenfalls entsprechende Maßnahmen einleiten zu können. Die Untersuchungsmethode muss aber sensitiv genug sein, dass die Funktion der Früherkennbarkeit erhalten bleibt. Ein weiterer Punkt dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob es bereits validierte Untersuchungsmethoden gibt, die im Unternehmen zur Anwendung kommen können.

3 Stand des Wissens

3.1 Hefen

In der Systematik des Pflanzenreichs stellen die Pilze (Mycota) nach Spaltpflanzen und Algen die dritte Abteilung des Taxons der Kryptogamen (blütenlose Pflanzen) dar. Bei Hefen handelt es sich grundsätzlich um einzellige eukaryontische Pilze. Sie zählen entweder zu den Ascomyceten (Schlauchpilze) oder Basidiomyceten (Ständerpilze). Es sind ca. 60 Gattungen mit mehr als 700 Species anerkannt. Die Taxonomie der Hefen ist jedoch noch nicht beendet. Es werden immer wieder neue Stämme isoliert und bekannte Stämme werden infolge der sich erweiternden Kriterien und neuerer Daten reklassifiziert. (Jährig, 2007)

Hefen sind etwa zehnmal so groß wie Bakterien und leben als Einzelorganismen oder in Sprossverbänden (z. B. Kahlhefen). Sie vermehren sich meist vegetativ, können aber auch Sporen bilden. Diese sind im Gegensatz zu Bakteriensporen nicht hitzeresistent. (Unterholzner, 1998) Das Wachstumsoptimum von Hefen liegt zwischen 20 und 30 °C. Hefen sind aerob, einige auch anaerob lebende Mikroorganismen. Die Energiegewinnung erfolgt durch Atmung oder Assimilation. Bei Anwesenheit von freiem Sauerstoff werden aus Kohlenhydraten Wasser und CO₂ gebildet. Ist kein Sauerstoff vorhanden, wachsen Hefen zwar kaum, können aber sehr intensiv Kohlenhydrate zu Ethanol (ggf. auch zu anderen Alkoholen) und CO₂ vergären oder assimilieren. Die Fähigkeiten zur Vergärung verschiedener Kohlenhydrate und Kohlenhydratassimilation sind artspezifisch und werden zur Hefencharakterisierung genutzt. (Riemelt et al., 2003)

3.1.1 Aufbau der Hefezelle

Laut Riemelt et al. (2003) gehören Hefen zu den Eukaryonten. Sie besitzen eine Zellwand, die meist Chitin enthält, und Vakuolen (Abbildung 1). Im Gegensatz zu den Pflanzenzellen kommen jedoch keine Plastiden vor. Hefezellen haben ebenso wie tierische Zellen Organellen mit Doppelmembran wie Zellkern, Endoplasmatisches

Reticulum und Mitochondrien. Allerdings verfügen Hefezellen im Gegensatz zu tierischen Zellen neben der Zellmembran noch über eine ca. 200 nm dicke Zellwand. Diese macht zwischen 15 % und 25 % der gesamten Trockenmasse aus und nimmt nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu urteilen zwischen 25 % und 50 % des Gesamtvolumens ein. (Jährg, 2007)

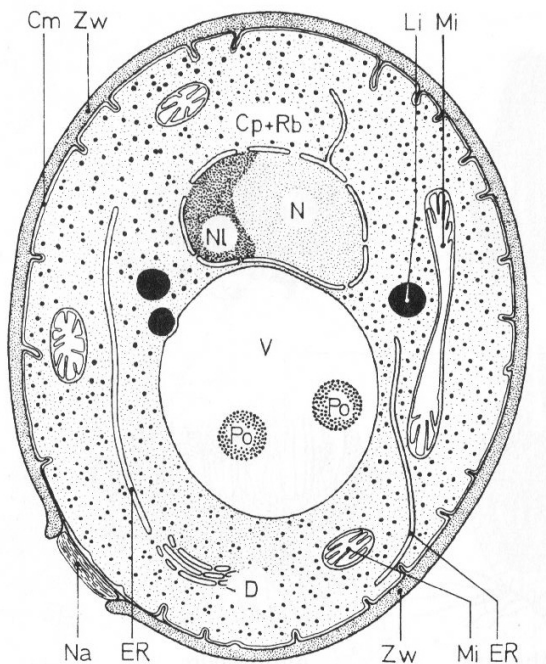


Abb. 1: Schematisches Querschnittsbild einer Hefezelle (Schlegel, 1992)

Cm = Cytoplasmamembran
 Cp = Cytoplasma
 D = Dictyosom
 ER = Endoplasmatisches Reticulum
 Li = Lipidtropfen
 Mi = Mitochondrien
 N = Nucleus

Na = Narbe
 NI = Nucleolus
 Po = Polyphosphat
 Rb = Ribosomen
 V = Vakuole
 Zw = Zellwand

3.1.2 Hefevermehrung

Hefen können sich ungeschlechtlich oder geschlechtlich vermehren. Die meisten Hefen, die in der Milchwirtschaft bedeutend sind, vermehren sich jedoch ungeschlechtlich durch Sprossung. Hierzu zählen die Gattungen *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* und *Pullaria*. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist neben der ungeschlechtlichen Vermehrung auch in der Lage, sich geschlechtlich fortzupflanzen. (Jährig, 2007; Müller et al., 1996)

Vegetative (asexuelle) Fortpflanzung:

Die vegetative Fortpflanzung ist eine ungeschlechtliche Fortpflanzung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass an der Bildung des neuen Individuums nur eine Zelle beteiligt ist und keine Vereinigung von Zellkernen, Geschlechtszellen oder Geschlechtsorganen erfolgt (Müller et al., 1996).

Hefen sind durchschnittlich zehn µm groß und vermehren sich, bis auf wenige Ausnahmen, vegetativ durch Sprossung. Bei Hefevermehrung durch Sprossung bildet sich ein Auswuchs an der Zellwand der Mutterzelle, in den der Kern einwandert. Dieser Auswuchs wird als Knospe (Tochterzelle) bezeichnet. Diese kann sich entweder von der Mutterzelle trennen, wenn sie noch klein ist oder als Sprossverband zusammen bleiben, bis beide Zellen annähernd die gleiche Größe haben. Manchmal hängen auch mehrere Sprossen aneinander und bilden einen Klumpen oder eine Zellkette. Schnürt sich eine Tochterzelle von der Mutterzelle ab, bleibt eine Narbe zurück, die im elektronenmikroskopischen Bild sichtbar wird (Abbildung 2).

Man unterscheidet drei Arten der Sprossung. Bei der multilateralen Sprossung werden die Knospen an beliebigen Stellen der Mutterzelle gebildet. Wenn sich Tochterzellen an beiden Polen der Zelle bilden, spricht man von einer bipolaren Sprossung. Bei einer monopolen Sprossung werden alle Sprossen nur an einer Stelle der Mutterzelle gebildet. (Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003; Schlegel, 1992)

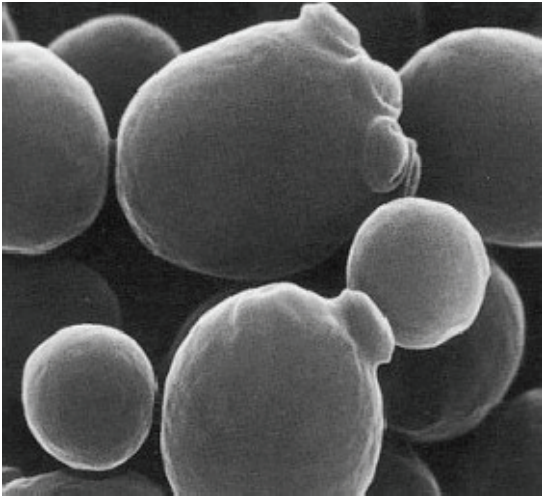


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* (Jährg, 2007) Die Größenordnung der Hefezellen reicht von 5 bis 13 μm .

Eine weitere Art der asexuellen Fortpflanzung ist die Vermehrung durch Spaltung. Die für Bakterien typische Vermehrung kommt auch bei den Spalthefen vor (Abbildung 3). Durch die Bildung von Querwänden geht dabei eine Mutterzelle direkt in zwei oder mehrere Tochterzellen auf (Müller et al., 1996).

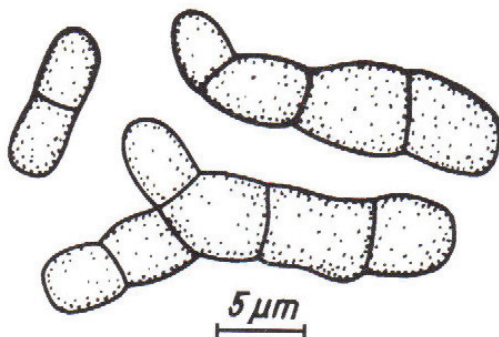


Abb. 3: Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* (Müller et al., 1996)

Sexuelle Fortpflanzung:

Bei der geschlechtlichen oder sexuellen Fortpflanzung erfolgt die Erzeugung von Nachkommen durch die Verschmelzung von Geschlechtszellen (Gameten) durch die Vereinigung (Kopulation) von geschlechtlich funktionierenden Hyphenzweigen (Gametangien) oder durch die Kopulation von nicht spezifisch differenzierten Geschlechtszellen. Wesentlich für die sexuelle Fortpflanzung ist der Kernphasenwech-

sel. Durch den Wechsel von Kernverschmelzung (Karyogamie) und Reduktionsteilung (Meiose) kommt es zur Neukombination der in den Zellkernen enthaltenen Erbsubstanz und zur genetischen Stabilisierung der Arten.

Die geschlechtliche Fortpflanzung lässt sich in drei Phasen unterteilen: Plasmogamie, Karyogamie und Meiose. In der ersten Phase, der Plasmogamie (Plasmaverschmelzung), vereinigen sich zwei Protoplasten miteinander (Abbildung 4). Die beiden geschlechtlich unterschiedlichen Kerne lagern sich in einer Zelle nebeneinander. Anschließend kommt es zur Kernverschmelzung (Karyogamie), hierbei vereinigen sich die während der Plasmogamie zusammengebrachten Zellkerne. Es entsteht der Zygotenkern, der einen doppelten (diploiden) Chromosomensatz enthält. In der sich früher oder später anschließenden Meiose (Reduktionsteilung) entstehen wieder Kerne mit einem einfachen (haploiden) Chromosomensatz. (Müller, 1996)

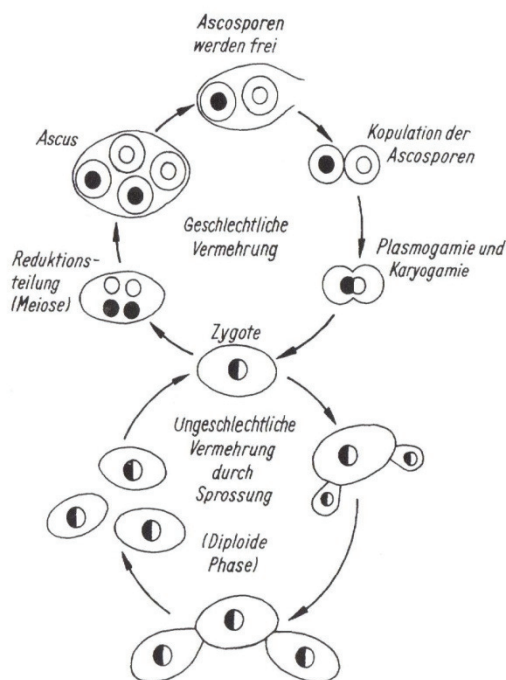


Abb. 4: Schema des Lebenszyklus der Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Müller, 1996)

Die haploiden Sprosszellen von *Saccharomyces cerevisiae* können verschmelzen und an die Karyogamie kann sich sofort eine Meiose und die Bildung von vier Ascosporen anschließen. Die diploide Zelle kann sich aber auch durch Sprossung vermehren. Sie ist größer und physiologisch aktiver als die haploide. (Schlegel, 1992)

3.1.2.1 Wachstum und Generationszeit

Laut Madigan et al. (1997) wird Wachstum als eine irreversible Zunahme von mikrobiologischen Zellen einer Population definiert. Folglich nehmen die Zellmasse und die Zellzahl zu (Schlegel, 1992). Zur Differenzierung zwischen Zellzahl und Zellmasse dienen die in Tabelle 1 aufgeführten Parameter.

Tab. 1: Begriffliche Abgrenzung von Zellzahl und Zellmasse (Müller et al., 1996)

	Zellzahl	Zellmasse
Menge je Volumeneinheit	Zellkonzentration (N) [Zellzahl cm ⁻³]	Zelldichte [Trockenmasse in mg cm ⁻³]
Verdopplung je Zeiteinheit	Teilungsrate (ν) [h ⁻¹]	Wachstumsrate (μ) [h ⁻¹]
Zeitintervall der Verdopplung	Generationszeit (g) [h]	Verdopplungszeit (t_d) [h]

Bestimmt man den zeitlichen Verlauf von Zellzahl und Zellmasse in einer wachsenden Kultur, so lassen sich daraus die Teilungsraten sowie die Wachstumsraten und Generationszeiten berechnen (Müller et al., 1996). Madigan et al. (1997) beschreiben die Generationszeit von Mikroorganismen als ein Zeitintervall, welches benötigt wird, bis sich aus einer Zelle zwei Zellen gebildet haben.

Die Berechnung der Generationszeiten für Bakterien ist einfach, da aus einer Mutterzelle durch Querteilung oder Spaltung zwei Tochterzellen entstehen. Man spricht von exponentiellem Wachstum, da die Zellzahl während jeden Zeitabschnitts um einen konstanten Faktor zunimmt. (Engel, 1988) Bakterien haben eine niedrige Generationszeit von 15-20 min (Unterholzer, 1998).

Bei Hefen erfolgt die Vermehrung überwiegend durch multilaterale Sprossung, das bedeutet, dass sich an einer oder mehreren Stellen der Zelloberfläche Ausstülpungen bilden (Abbildung 2), die sich allmählich vergrößern, so dass aus einer Hefezelle mehrere Hefen gleichzeitig gebildet werden können, die sich entweder von der Mutterzelle abtrennen oder als Sprossverband zusammen bleiben. (Engel, 1988)

Die Generationszeit der Hefen liegt im mittleren Bereich. Man geht etwa alle 120 min von der Vermehrung einer Hefezelle aus. (Unterholzer, 1998) Laut Schlegel (1992) beträgt die Generationszeit für die Gattung *S. cerevisiae* 90 min.

Auf hyphenbildende Pilze sind die vorher beschriebenen Erkenntnisse nur begrenzt übertragbar (Müller et al., 1996). Unterholzer (1998) gibt für Schimmelpilze bei optimalen Wachstumstemperaturen eine Generationszeit von einigen Tagen an.

3.1.2.2 Wachstumskurve und Wachstumsphasen

Werden ruhende einzellige Mikroorganismen in eine Nährlösung eingimpft, in dem sie alle lebensnotwendigen Voraussetzungen vorfinden, so beginnen sie zu wachsen. Wenn während dieses Prozesses keine Nährstoffe zu- oder Stoffwechselprodukte abgeführt werden, wird das Wachstum in diesem vorgegebenen Lebensraum als statische Kultur bezeichnet. Das Wachstum in diesem „geschlossenen System“ erfolgt jedoch nicht mit konstanter Geschwindigkeit, sondern wird in einzelne Phasen unterschieden (Abbildung 5). (Müller et al., 1996; Schlegel, 1992)

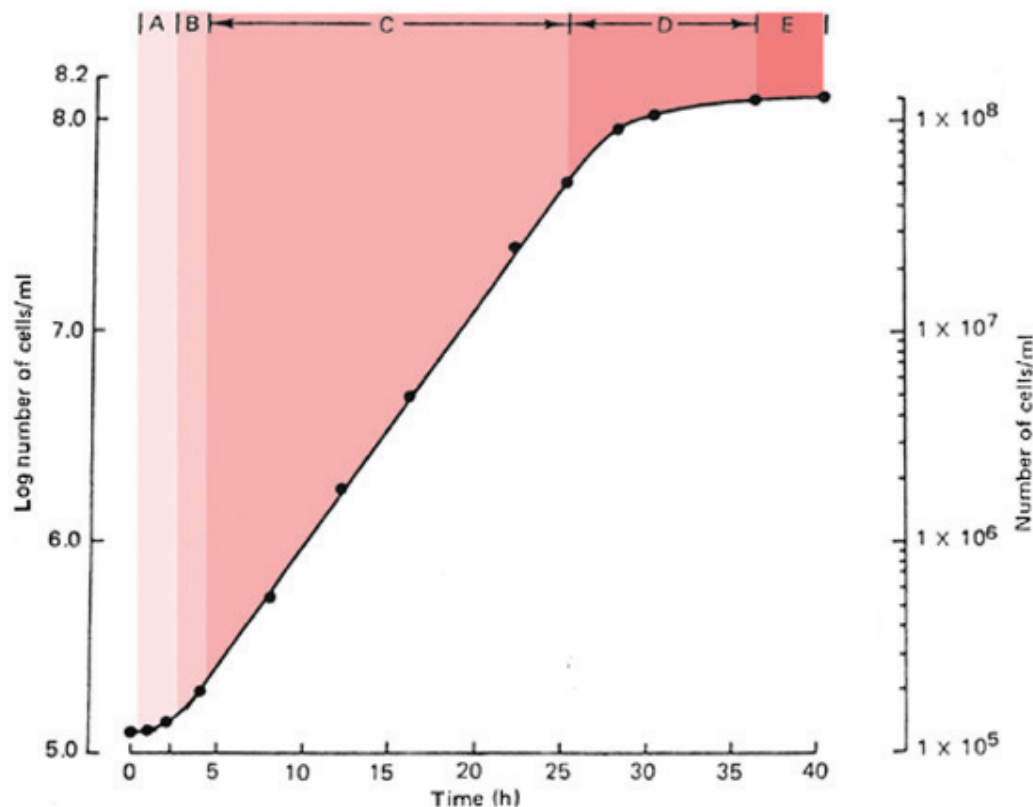


Abb. 5: Wachstumskurve einer Hefepopulation (Walker, 1998)

Die Zeit ist arithmetisch, das Wachstum logarithmisch aufgetragen.

Eine Wachstumskurve wird erstellt, indem man die Keimzahlen einer Kultur zu bestimmten Zeiten ermittelt und die Logarithmen der Keimzahlen gegen die Zeit graphisch darstellt (Riemelt et al., 2003).

A) Lag-Phase:

In der lag-Phase, die auch Anlaufphase bezeichnet wird, erfolgt die Aktivierung des Stoffwechsels der Zelle. Wie lange die Anlaufphase andauert, ist von der Vorkultur und vom Alter des Impfmateri als sowie von der Eignung der Nährlösung abhängig. Verwendet man eine alte Vorkultur, so muss sich die Zelle erst durch RNA-, Ribosomen- und Enzymsynthese auf die neuen Wachstumsbedingungen einstellen. Unterscheidet sich die Zusammensetzung der Nährbouillon von der der Vorkultur, müssen häufig neue Enzyme synthetisiert werden, um sich an die neuen Bedingungen anzupassen. (Schlegel, 1992)

- B) Beschleunigungsphase: In der Beschleunigungsphase nimmt die Teilungsgeschwindigkeit laufend zu (Müller et al., 1996)
- C) Exponentielle Phase: Die exponentielle oder logarithmische Wachstumsphase (log-Phase) ist durch eine konstante maximale Vermehrungsgeschwindigkeit gekennzeichnet, was bedeutet, dass die Generationszeit in dieser Phase ihr Minimum erreicht hat. Zur Bestimmung der Wachstumsrate ist die log-Phase am besten geeignet, da die Generationszeit relativ konstant ist. (Schlegel, 1992) Laut Müller et al. (1996) errechnet sich die Wachstumsrate μ aus den zu den Zeitpunkten t_0 und t gemessenen Zelldichten D_0 und D_t nach:
- $$\mu = \frac{\ln D_t - \ln D_0}{(t - t_0)}.$$
- Die Verdopplungszeit t_d lässt sich berechnen durch:
- $$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}.$$
- D) Verzögerungsphase: Die exponentielle Phase wird durch die Verzögerungsphase abgeschlossen. Die Vermehrungsgeschwindigkeit nimmt aufgrund abnehmender Nährstoffverfügung ab. Außer der Substratbegrenzung können auch die hohe Populationsdichte, niedriger O_2 -Partialdruck und die Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte die Wachstumsrate herabsetzen und die stationäre Phase einleiten. (Müller et al., 1996; Schlegel, 1992)
- E) Stationäre Phase: Charakteristisch für die stationäre Phase ist eine konstante Keimzahl, da sich die Zellteilung und das beginnende Absterben der Zellen im Gleichgewicht befinden. Auf Grund der immer weiter sinkenden Nährstoffkonzentration und der gleichzeitigen Zunahme toxischer

Stoffwechselprodukte geht die stationäre Phase in die Absterbephase über, in der die Lebendzellzahl wieder abnimmt. (Riemelt et al., 2003)

3.1.3 *Saccharomyces*

Zur Gattung *Saccharomyces*, deren Gattungsname aus dem Jahre 1839 stammt, gehören sieben Arten, die für ihre Fermentationsleistung in der Industrie bekannt sind (Hauss, 2008).

Die Vertreter der Gattung *Saccharomyces* weisen kugelförmige, elliptische oder zylindrische Zellen auf (Riemelt et al., 2003). Die Vermehrung erfolgt vegetativ durch multilaterale Sprossung oder geschlechtlich durch Bildung kugelförmiger Ascosporen (James, 2000).

Saccharomyces-Arten fermentieren und assimilieren Glucose, jedoch nicht Lactose. Das Verhalten gegenüber Galactose ist artspezifisch. Nitrat wird nicht assimiliert. (Riemelt et al., 2003)

Zu den wichtigsten Vertretern der Gattung *Saccharomyces* gehören *S. cerevisiae* und *S. unisporus*. Beide *Saccharomyces*-Arten zählen zur Kontaminationsflora von Käsen und Sauermilcherzeugnissen. Sie können aber auch über Zusatzstoffe wie Konfitüren, Obst und Nüsse in Milchprodukte gelangen. (Riemelt et al., 2003)

Saccharomyces cerevisiae wächst bei pH-Werten zwischen 4,5 und 6,5. Das pH-Optimum liegt zwischen 4,0 und 5,0. (Hänsel et al., 1994)

3.1.4 *Rhodotorula*

Der Hefepilz *Rhodotorula* wurde 1928 von Harrison zum ersten Mal beschrieben. Die Gattung besteht aus neun Arten, die durch die Bildung eines carotinoiden Pigments gekennzeichnet ist. (Hauss, 2008)

Laut James (2000) sind die beiden am meisten verbreiteten Species in Lebensmitteln *R. glutinis* und *R. rubra*. Letzterer wird heute in der Terminologie als *Rhodotorula mucilaginosa* geführt.

Die Vermehrung der kugelförmigen, ovalen bis länglichen Zellen der Gattung *Rhodotorula* erfolgt überwiegend durch multilaterale Sprossung. Es entstehen glatte und wachsartige Kolonien, welche rosa, lachsfarbig oder rot pigmentiert sind. Sie werden auch als „Rosa Hefen“ bezeichnet. (Riemelt et al., 2003)

Die Gattung *Rhodotorula* besitzt nicht die Fähigkeit Kohlenhydrate zu fermentieren. Das Assimilationsverhalten gegenüber Kohlenhydraten variiert. Nitrat wird nicht assimiliert. (Riemelt et al., 2003)

R. minuta und *R. rubra* gehören zur Kontaminationsflora von Sauermilcherzeugnissen und Käsen. Bei Butter können diese Mikroorganismen Stockfleckigkeit verursachen. Durch starkes Wachstum verursachen sie infolge ihrer proteolytischen und lipolytischen Aktivität Verderb. Die *Rhodotorula*-Hefe stammt häufig als Infektion aus der Luft. (Riemelt et al., 2003; Kellermann, 1972)

3.1.5 *Candida*

Mit 155 Species ist *Candida* die artenreichste Hefegattung (Riemelt et al., 2003; Hauss, 2008). Sie wurde 1923 von Berkhout beschrieben, danach aber neu definiert (James, 2000). Die Gattung hieß früher *Monilia* und wurde den Schimmelpilzen zugeordnet (Kellermann, 1972).

Candida-Hefen weisen meist kugelförmige, ovale, zylindrische bis längliche Zellen auf. Die Vermehrung dieser Gattung erfolgt ausschließlich durch multilaterale Sprossung; eine geschlechtliche Vermehrung erfolgt nicht. *Candida*-Arten sind in der Lage Chlamydosporen zu bilden. Die Sporen dienen der Arterhaltung, die ein Überleben bei ungünstigen Umweltbedingungen ermöglicht. (Riemelt et al., 2003)

Die Arten *C. kefyr*, *C. lipolytica* und *C. valida* sind häufig auftretende Verderbniserreger in Frischkäse. Diese Arten assimilieren Glucose, ansonsten differiert die Art der Kohlenhydratverwertung sehr stark. Die Fähigkeit der Nitratassimilation ist ebenfalls unterschiedlich. Eine besondere Eigenschaft aller *Candida*-Arten ist die Bildung von intensiv fett- und eiweißspaltenden Enzymen. (Riemelt et al., 2003)

3.1.6 *Geotrichum*

Die Gattung *Geotrichum* ist ein gemischtes Taxon. Sie besteht aus den Species *Geotrichum candidum*, *G. capitatum* und *G. clavatum*. Die Gattung gehört nach neuesten Erkenntnissen nicht zu den Schimmelpilzen sondern zu den Hefen. Die Bezeichnung "Milchsimmel" wurde aufgrund des schimmelähnlichen Wachstums vergeben. Inzwischen konnte die Gattung aufgrund des Feinbaus der Myzelsepten sicher den Hefen zugeordnet werden. (Hauss, 2008)

Die Gattung *Geotrichum* bildet graue oder weiße Kolonien aus flachem, filzigem Luftmycel oder liegenden, feuchten Substrathyphen (Müller et al., 1996). Die Hyphen sind septiert und brechen bei der Vermehrung in Einzelzellen (Arthrosporen) auf (James, 2000). Sprossung und geschlechtliche Vermehrung finden nicht statt. (Riemelt et al., 2003)

Im milchwirtschaftlichen Bereich ist der bedeutenste Vertreter dieser Gattung *G. candidum*, auch als „weißer Milchsimmel“ bekannt. *G. candidum* ist an der Oberflächenreifung und Aromabildung von Käsen beteiligt. Er wirkt sich negativ bei fermentierten Produkten aus, da *G. candidum* in der Lage ist, Milchsäure abzubauen. Folglich kommt es zu einer pH-Werterhöhung, die das Wachstum anderer unerwünschter Mikroorganismen begünstigt. Eine starke *G. candidum*-Entwicklung führt zu proteolytischem und lipolytischem Verderb. (Riemelt et al., 2003)

3.2 Schimmelpilze

Morphologisch werden Pilze in drei Klassen unterteilt: *Zygomycetes* (Jochpilze), *Ascomycetes* (Schlauchpilze) und *Deuteromycetes* (Fungi Imperfecti).

Das Mycel der *Zygomycetes* ist unseptiert und es gibt nur selten Querwände, d. h. der Pilzthallus besteht aus einer sehr großen, vielfach verzweigten Zelle. Die Vermehrung erfolgt überwiegend ungeschlechtlich durch Sporangiosporen, seltener geschlechtlich durch Zygosporen. Die Zygospore entsteht durch das Aufeinanderzuwachsen zweier sexuell differenzierter Hyphenzweige und dem Verschmelzen der Gametangien (Sporangien mit sexueller Funktion), die von den Enden der Elternhyphen wachsen. (Reiß, 1997)

Charakteristisch für *Ascomycetes* sind ein septiertes Mycel und die Bildung von Konidiosporen. Die Fortpflanzung erfolgt überwiegend asexuell durch Konidienbildung. Aber auch eine geschlechtliche Vermehrung durch Ascosporen ist möglich. Das Mycel von *Deuteromycetes* ist ebenfalls durch Querwände septiert. Zur Klasse Fungi imperfecti zählen Pilze bei denen das sexuelle Stadium fehlt oder bei denen es noch nicht nachgewiesen worden ist. Eine Fortpflanzung und Vermehrung erfolgt nur über Konidien. Die meisten Schimmelpilze gehören zu dieser Klasse. (Reiß, 1997; Schlegel, 1992)

Unter Schimmelpilzen versteht man weiße oder farbige Kolonien mit samtartiger, wollicher, flockiger bis drahtartig aussehender Oberfläche. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 20 und 30 °C (Rimelt et al., 2003). Laut Unterholzner ist das Temperaturoptimum bei 25 °C. Die meisten Schimmelpilze leben aerob einige auch fakultativ anaerob. Schimmelpilze sind relativ anspruchslos. Sie benötigen keine besonderen Nährsubstrate und können auch bei geringeren a_w -Werten als Bakterien und Hefen wachsen. Schimmelpilze bevorzugen ein leicht saures Milieu. Sie können sich aber auch in einem Spektrum von pH 1,5-11,5 entwickeln. (Riemelt et al., 2003)

3.2.1 Vermehrung und Wachstum

Die Vermehrungszellen der Schimmelpilze werden als Sporen bezeichnet. Sie werden in geschlechtliche und ungeschlechtliche Sporen unterteilt (Reiß, 1997).

Ungeschlechtliche Sporen:

Schimmelpilze bilden farblose Zellfäden (Hyphen), die in ihrer Gesamtheit das Mycel bilden. Dieses ist mit dem bloßen Auge oft nicht zu erkennen. Wenn das Mycel ein bestimmtes Alter erreicht hat, bilden sich in die Luft wachsende Trägerhyphen, an deren oberen Teil Sporen ungeschlechtlich produziert werden. Sie sind oftmals gefärbt, wodurch der Schimmelpilz erkennbar wird. Schimmelpilzsporen werden nach der Art ihrer Entstehung eingeteilt.

- *Konidiosporen* (Abbildung 6a) werden an den Enden von Hyphen, typischerweise in Ketten, abgeschnürt (*Penicillium*, *Aspergillus*).
- *Sporangiosporen* (Abbildung 6b) werden in spezialisierten Hyphenabschnitten, die sich am Ende von Trägerhyphen befinden, gebildet (*Mucor*, *Rhizopus*). (Reiß, 1997; Schlegel, 1992)

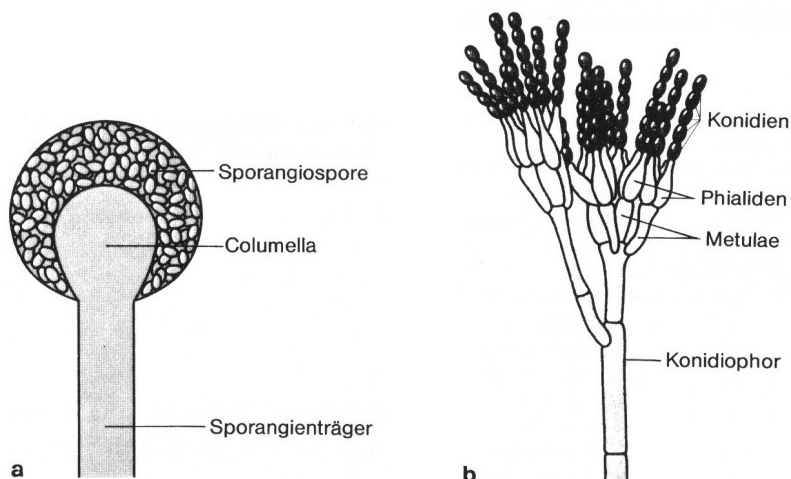


Abb. 6: Sporenbildung bei a *Mucor* sp., b *Penicillium* sp. (Reiß, 1997)

Geschlechtliche Sporen:

Laut Reiß (1997) werden bei den Schimmelpilzen zwei Formen unterschieden:

- *Zygosporen*: Die diploiden Sporen entstehen beim Verschmelzen von Gametangien (Kapitel. 3.2).
- *Ascosporen*: Sie werden im Ascus, einer schlauchartigen Zelle, gebildet (Abbildung 4).

Häufig isolierte Kontaminanten in Milch und Milchprodukten sind u. a. *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Penicillium* (Iron, 2008; Weber, 1996).

3.2.2 *Alternaria*

Die Arten der Gattung *Alternaria* bilden ein septiertes Mycel. Die Konidienträger können leicht verzweigt sein. An ihnen befinden sich einzellige Konidien, die sich im Laufe der Zeit zu mehrzelligen, längs- und querseptierten, keulenförmigen Konidien entwickeln (Abbildung 7). Aus dem etwas zugespitzten Konidienende entsteht eine neue Konidie, so dass sich eine Kette bildet. Charakteristisch für *Alternaria*-Arten ist deren olivgrünes bis schwarzes Erscheinungsbild, wodurch die Gattung zu den Schwärzepilzen zählt. (James, 2000; Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003) Nach Riemelt et al. (2003) wurde *Alternaria* auch aus Sauermilcherzeugnissen isoliert.

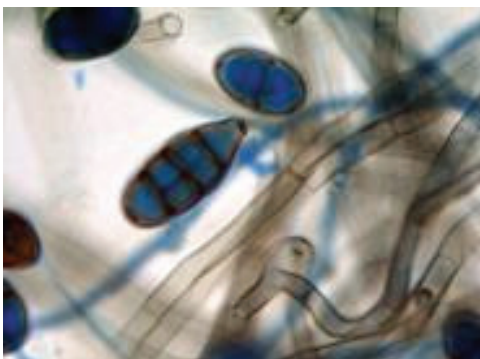


Abb. 7: *Alternaria alternata* im Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung (Paatsch, 2008)

3.2.3 *Aspergillus*

Das Mycel der *Aspergillus*-Arten ist septiert. Die aufrechten, kräftigen, unverzweigten Konidienträger entstehen aus einer sich in den vegetativen Hyphen befindlicher Fußzelle, die sich am Ende zu einer kugelförmigen oder ovalen Blase (Versikel) erweitert (Abbildung 8). Vom Versikel gehen entweder nur oben oder allseitig radial angeordnete Sterigmen hervor. Sie werden als primäre Sterigmen bezeichnet. Von ihnen können mehrere kegelförmige Sterigmen ausgehen (sekundäre Sterigmen), die an der Spitze je eine lange Kette Konidien abschnüren. Die Konidien sind meist kugelförmig und besitzen eine stachelige Oberfläche. Sie sind oft gelb, ältere kräftig schwarz, braun oder grün gefärbt. *Aspergillus* ist auch als Gießkannenschimmel bekannt. Einige *Aspergillus*-Arten sind in der Lage, sich geschlechtlich zu vermehren. (Weber, 1996)

Laut Riemelt et al. (2003) gehören *Aspergillus*-Vertreter zu den wichtigsten Verderbniserregern von Lebensmitteln und sind nicht zuletzt infolge mykotoxinbildender Arten unerwünscht. In der Milchwirtschaft wurden *Aspergillen* vorwiegend aus stockfleckiger Butter, Käse und Sauermilcherzeugnissen isoliert.

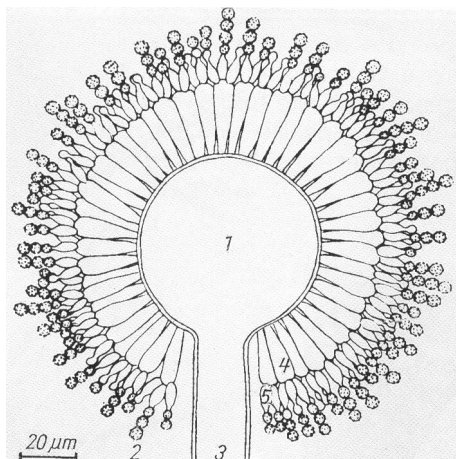


Abb. 8: *Aspergillus niger*; Längsschnitt eines Konidienträgers (Weber, 1996)

- | | | | |
|---|------------------|---|-----------------------|
| 1 | = Versikel | 4 | = primäre Sterigmen |
| 2 | = Konidien | 5 | = sekundäre Sterigmen |
| 3 | = Konidienträger | | |

3.2.4 *Fusarium*

Vertreter der Gattung *Fusarium* sind durch ein septiertes, ausgeprägtes Substratmycel und unregelmäßiges Luftmycel charakterisiert. Das Substratmycel ist gelb, rot oder violett gefärbt. (Doyle et al., 2001) Laut Riemelt et al. (2003) kann das Luftmycel grau oder lebhaft gefärbt sein. Fusarien können als kugel-, ei- oder birnenförmige Mikrokonidien oder sichelförmige, mehrfach septierte Makrokonidien in Erscheinung treten (Abbildung 9). Es können auch Chlamydosporen vorkommen, die teilweise ebenso wie das Mycel gefärbt sind. Species wie *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* und *F. culmorum* sind in der Lage Toxine zu bilden. (Weber, 1996)

In der Milchwirtschaft wurde Fusariumschimmel vorwiegend aus stockfleckiger Butter und Sauermilcherzeugnissen isoliert (Riemelt et al., 2003).

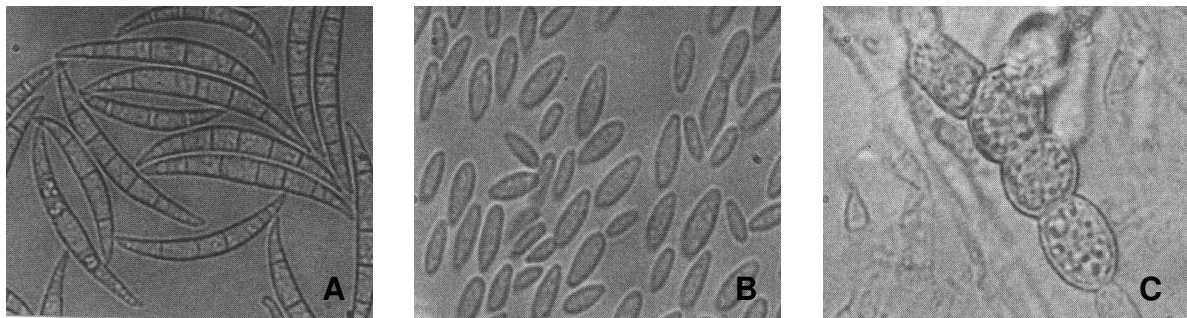


Abb. 9: Mikroskopische Strukturen von *Fusarium* spp. (1000fache Vergrößerung): A) Makrokonidien; B) Mikrokonidien; C) Chlamydosporen (Doyle et al., 2001; verändert)

3.2.5 *Mucor*

Bei der Gattung *Mucor* handelt es sich um Pilze mit gewöhnlich unseptierten Hyphen. Das Luftmycel ist durchsichtig, locker und grau oder gelbbraun gefärbt. Die Sporangienträger können unverzweigt oder verzweigt sein. An den Enden befindet sich jeweils ein kugelförmiges Sporangium, in dem sich zahlreiche einzellige, kugelförmige oder elliptische, dünnwandige, farblose oder grau bis braun gefärbte Sporen befinden. Sie sind rund um die kugelförmige oder zylindrische Columella angeordnet

(Abbildung 5 a). Der Schimmelpilz *Mucor* wird, auf Grund der mit bloßem Auge sichtbaren Sporangien, auch als Köpfchenschimmel bezeichnet. Bei ungünstigen Umweltbedingungen bilden einige *Mucor*-Arten Chlamydosporen in den Hyphen, um zu überleben. Die geschlechtliche Vermehrung durch Bildung von Zygosporien erfolgt eher selten. (Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003)

Die Vertreter der Gattung *Mucor* können proteolytisch und lipolytisch aktiv sein und können unter anaeroben Bedingungen auch Milchsäure und Ethanol bilden. Bei Sauermilcherzeugnissen sind vorwiegend *M. mucedo* und *M. racemosus* zu erwähnen. Sie verursachen Flavourfehler, Fäulniserscheinungen und Fleckenbildung. (Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003)

3.2.6 *Rhizopus*

Die Gattung *Rhizopus* hat große Ähnlichkeit mit *Mucor*, unterscheidet sich aber durch Bildung von Rhizoiden (Abbildung 10). Bei Rhizoiden handelt es sich um wurzelartige Gebilde, die als Substrathyphen anzusehen sind. Von ihnen gehen kräftige, unverzweigte, gewöhnlich bogenförmige Laufhyphen (Stolonen) aus, die innerhalb kurzer Zeit weite Substratflächen überziehen. An den Rhizoiden befinden sich Anheftungspunkte, an denen Sporangienträger einzeln oder büschelförmig angeordnet sind. (Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003)

Die Sporangienträger können verzweigt oder unverzweigt sein. Sie sind endständig zu einer trichterförmigen Apophyse erweitert und tragen ein kugelförmiges Sporangium. Dieses ist anfangs weiß und verfärbt sich im reifen Zustand bläulich-schwarz. Das Sporangium beinhaltet zahlreiche Sporen, die beim Zerplatzen der Sporangienhülle frei werden. Chlamydosporen können von einigen Arten end- oder zwischenständig in den Hyphen gebildet werden. Die geschlechtliche Fortpflanzung über Zygosporien erfolgt selten. (James, 2000; Müller et al., 1996; Riemelt et al., 2003)

Der Schimmelpilz *Rhizopus* kann als Verderbniserreger bei fermentierten Milcherzeugnissen auftreten. *Rh. nigrificans* (= *Rh. stolonifer*) ist hier als wichtigster Vertreter zu nennen. (Riemelt et al., 2003)

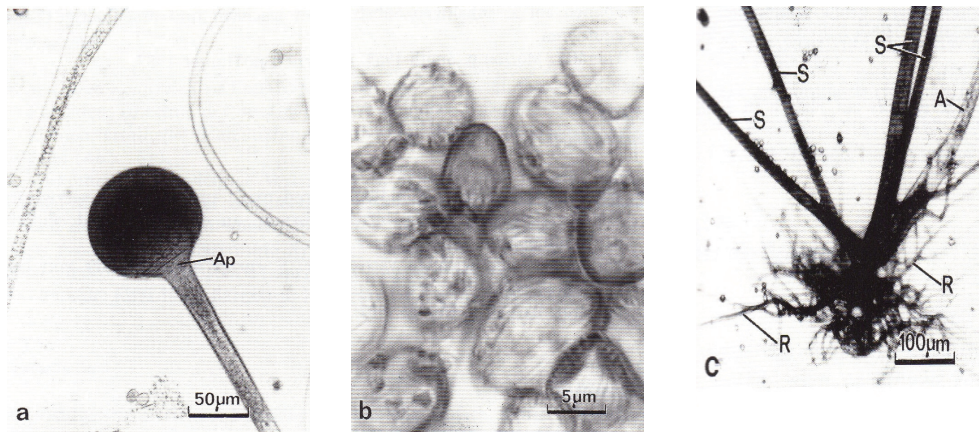


Abb. 10: *Rhizopus stolonifer*: a) junges Sporangium mit Apophyse (AP); b) Sporangiosporen c) Rhizoiden (R), Ausläufer (A) und Sporangiphoren (S) (Reiß, 1998 verändert)

3.2.7 *Penicillium*

Vertreter der Gattung *Penicillium* sind die am häufigsten vorkommenden Pilze. Ihr Mycel und die Konidienträger sind septiert. Die Konidienträger stehen einzeln oder zu Büscheln vereint. Sie können symmetrisch oder asymmetrisch, einfach oder mehrfach verzweigt sein. Am Ende eines jeden Sterigma bildet sich eine Kette von Konidien, die 50 Glieder und mehr umfassen kann. Die verzweigten Konidienträger und Konidienketten zeigen in eine Richtung, so dass ein pinselartiges Gebilde entsteht (Abbildung 6 b). Daher wird der *Penicillium*-Pilz auch Pinselschimmel genannt. Penicillien werden gewöhnlich als wattig-filzige, undurchsichtige flache Kolonien mit weißem Luftmycel sichtbar. Einige Arten können sich neben der ungeschlechtlichen Fortpflanzung auch geschlechtlich über Ascosporen vermehren. (Müller et al., 1996)

Laut Riemelt et al. (2003) werden in der Milchwirtschaft ausgewählte Stämme (*P. camemberti*, *P. roqueforti*) als Starterkulturen für die Käseherstellung eingesetzt. Andererseits gehört die Gattung *Penicillium* zu den wichtigsten Verderbniserregern. Anspruchslosigkeit, psychotrophes Verhalten, Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratspaltungsvermögen sowie die Fähigkeit einiger Arten zur Mykotoxinbildung sind charakteristisch für diese Gruppe. (Riemelt et al., 2003)

4 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die für die Versuche verwendeten Materialien und Arbeitsgeräte aufgeführt. Des Weiteren werden die Untersuchungsmethoden erläutert, die in dieser Diplomarbeit Anwendung fanden.

4.1 Materialien und Nährmedien

Es wurden die nachfolgend aufgeführten Materialien und Nährmedien verwendet:

Malzextrakt-Bouillon (pH 5,6 ± 0,2 bei 25 °C)	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (pH 6,6 ± 0,2 bei 25 °C)	Merck KGaA, Darmstadt
4 %-ige Weinsäure	Merck, KGaA, Darmstadt
Triphenyltetrazoliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs/Schweiz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg e. V.
Kochsalz-Peptonlösung	
Zusammensetzung:	
NaCl 8,5 g	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Trypton 1,0 g	OXOID, Hampshire
dest. Wasser 1000 mL	
Methylenblau	Feinchemie KG, Sebnitz

Die Malzextrakt-Bouillon stellt ein gutes Nährsubstrat für Hefen dar. Sie wird zum Nachweis, zur Isolierung und zur Bestimmung von Pilzen, insbesondere von Hefen und Schimmelpilzen eingesetzt (Merck, 1996).

Bei dem Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar) handelt es sich um einen selektiven Nährboden zur Keimzählung und Isolierung von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten. Der Nährboden enthält das Antibiotikum Chloramphenicol zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora. (MERCK, 1996;

Engel, 1982) Außerdem wird der YGC-Agar durch die Zugabe von 4 %-iger Weinsäure auf einen pH-Wert von $4,5 \pm 0,2$ eingestellt. Der niedrige pH-Wert hemmt zusätzlich das Bakterienwachstum. Die Nährbodenplatten sind klar und gelb (MERCK, 1996).

Die Herstellung des Nährbodens, der Malzextrakt-Bouillon und der Verdünnungslösung erfolgen ausschließlich mit destilliertem Wasser. Der Nährboden, die Malzextrakt-Bouillon und die Verdünnungslösung werden zur Sterilisation für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Bei allen in dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuchen wurde mit einer Stammkultur von *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet. Auf YGC-Agar wächst *S. cerevisiae* zu cremefarbenen Kolonien heran. Da sich diese Kolonien farblich nur geringfügig von den milchig trüben, mit Probenmaterial und Nährboden bestückten, Petrischalen abheben, wird dem YGC-Agar Triphenyltetrazoliumchlorid zugesetzt. Die Hefekolonien färben sich rosa und heben sich dadurch eindeutig vom Nährboden ab, was auch bei einer digitalen Bildaufnahme gut zu erkennen ist (Kapitel 5.6). Zur Herstellung der TTC-Lösung werden 2 g des sterilen TTC-Pulvers in 100 mL sterilen destilliertem Wasser gelöst. In einen 500 mL enthaltenen YGC-Agar Kolben werden 5 mL TTC-Lösung pipettiert und gleichmäßig verteilt. Es ist zu beachten, dass TTC licht- und hitzeempfindlich ist. Bei Temperaturen über 50 °C verfärbt sich die Lösung rot und ist unbrauchbar.

Bei Triphenyltetrazoliumchlorid oder 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) handelt es sich um eine quartäre Ammoniumverbindung und einen Redox-Farbstoff. Das fast farblose feinkristalline Pulver ist unempfindlich gegen Luftsauerstoff, wasserlöslich und fungiert als Indikator (Falbe, 1992). Der Farbumschlag tritt bei einer Redox-Reaktion ein:

- im oxidierten Zustand (Tetrazolium) ist der Indikator farblos.
- im reduzierten Zustand (Formazan) ist der Indikator rot. (www.chemie.de)

TTC wird unter Aufnahme von zwei Elektronen (e^-) und einem Proton (H^+) zu Triphenylformazan reduziert (Abbildung 11). Hierbei handelt es sich um einen wasserunlöslichen roten Farbstoff. Das Tetrazolium-Kation (T^+) wird über ein Tetrazolium-Radikal

(T) zum Formazan (F) reduziert. TTC wird genutzt, um eine intakte Atmungskette in Zellen nachzuweisen (mitochondriale Dehydrogenasen reduzieren das Tetrazolium-Kation zu Formazan). (www.chemie.de, 2008) In der Milchwirtschaft wird TTC als Indikator für den Bakteriengehalt von Milch verwendet (Falbe, 1992).

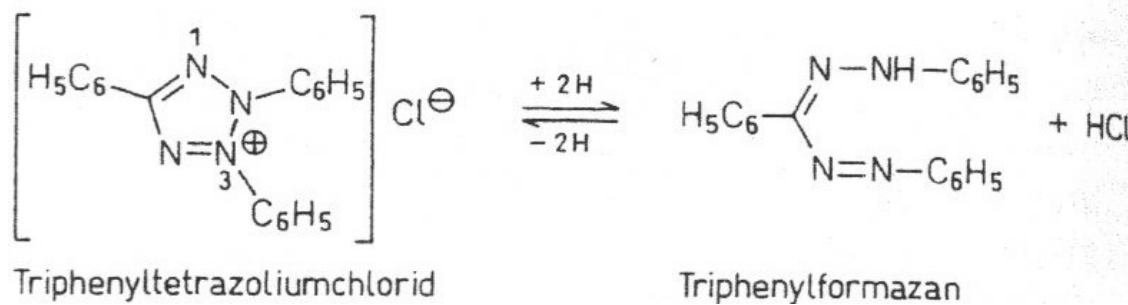


Abb. 11: Redoxreaktion von Triphenyltetrazoliumchlorid und Triphenylformazan (Falbe, 1992)

4.2 Arbeitsgeräte

Nachfolgend werden die in der Versuchsdurchführung verwendeten Arbeitsgeräte und Kleinmaterialien aufgeführt.

Arbeitsgeräte:

Schüttler	(JANKE & KUNKEL VF2)
Mikroskop	(Carl Zeiss)
Mikroskop	(Nikon ECLIPSE E 400)
Kamera	(Nikon DIGITAL SIGHT)
Software	(NIS-Elements D 3,0)
Analysenwaage	(sartorius ED 2201-CW)
Autoklav	(WEBECO)
Brutschrank	(Heraeus INSTRUMENTS Typ B 6120)
Brutschrank	(Mettler Modell 800)
Sterilisator	(Heraeus INSTRUMENTS Typ ST 6200)
Koloniezählgerät	(MASSI, KZG 01)

Kleinmaterialien:

Spritzen, Galle-Sekret-Beutel, Reagenzgläser, Petrischalen (Ø 9 cm und Ø 14 cm), Pipetten, Drigalskispatel, Thoma-Zählkammer, Glasflaschen, Bunsenbrenner, Okulare (zehnfache Vergrößerung, Carl Zeiss), Objektive (Ph 1; zehnfache Vergrößerung, Carl Zeiss), Immersionsölobjektiv (Ph 3; 100fache Vergrößerung, Carl Zeiss), Immersionsöl (Merck, KGaA, Darmstadt), Objektiv (Fluor 60fache Vergrößerung, Nikon) Objekträger, Pinzette, Reagenzglasständer, Bechergläser, Impfösen, Indikatorstäbchen

4.3 Probenmaterial und Probenahme

Als Probenmaterial für die Versuchsdurchführungen dieser Diplomarbeit dienen Cremiger Joghurt (Halbfertigprodukt) und die Speisequarkzubereitung Albert Heijn (Endprodukt). Die Probenahme des Cremigen Joghurts erfolgt nach dem Erhitzen, da Verderbniserreger wie Hefen nach diesem Erhitzungsschritt abgetötet sind. Die Probe wird über ein Janzventil entnommen. Dieses wird zuvor sorgfältig mit Alkohol eingesprüht und anschließend durch Abflammen keimfrei gemacht. Das Septum des Janzventils wird mit einer sterilen Kanüle durchstoßen, über welche das Probenmaterial in ebenso sterile Galle-Sekret-Beutel bzw. Probenspritzen fließt.

Die Speisequarkzubereitung Albert Heijn wird in 500 g Becher abgefüllt. Das Verpackungsmaterial wird während des Tiefziehens der Folie bei 130-135 °C keimfrei gemacht.

4.4 Keimzahlbestimmung der Hefesuspension *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Ermittlung der Konzentration der Keimzahl der Hefesuspension *S. cerevisiae* kommen zwei mikrobiologische Standardzählverfahren zum Einsatz.

4.4.1 Oberflächenausstrichverfahren

Durchführung:

- Zunächst wird eine Verdünnungsreihe der Hefesuspension hergestellt.
- Petrischalen werden mit selektivem Nährboden(YGC-Agar) ausgegossen.
- Von der Originalkultur und von jeder Verdünnungsstufe werden 0,1 mL etwas außerhalb der Mitte auf eine mit YGC-Agar fertig vergossene, getrocknete Nährbodenplatte aufgebracht (Abbildung 12).
- Der Tropfen wird mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig auf dem Nährboden ausgestrichen. Für jede Verdünnungsstufe ist ein neuer steriler Spatel zu verwenden.
- Nachdem der Ausstrich getrocknet ist, wird die Petrischale mit dem Deckel nach unten 4 d bei 25 °C bebrütet.
- Von jeder Verdünnungsstufe wird eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung gemacht.

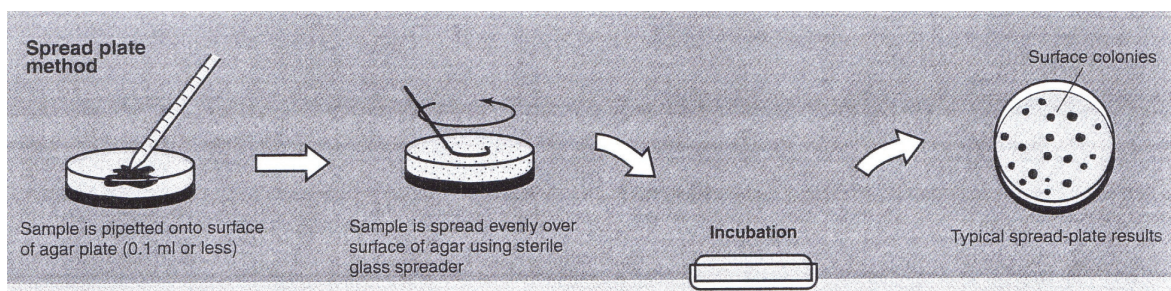


Abb. 12: Oberflächenausstrichverfahren (Madigan et al.,1997)

Ergebnisberechnung:

Die Einzelkolonien der Platten werden gezählt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufen und der Bildung eines gewichteten Mittelwertes wird auf die Konzentration der Lebendkeime in der Ursprungssuspension zurück gerechnet. Das ermittelte Ergebnis wird als KbE/mL angegeben, wobei davon ausgegangen wird, dass jede Kolonie aus einem einzelnen Lebendkeim hervorgegangen ist. (Steffens, 2005)

4.4.2 Thoma-Zählkammer

Unter dem Mikroskop wird die Konzentration der Hefesuspension mit Hilfe einer „Thoma-Kammer“ bestimmt.

Aufbau der Zählkammer und Durchführung:

Die Zählkammer ist eine dicke, exakt geschliffene Glasplatte von Objektträgergröße, die in der Mitte, quer zur Längsrichtung, drei parallele Stege eingeschliffen hat, die durch Rinnen getrennt und begrenzt werden (Abbildung 13). Die beiden seitlichen Stege liegen um einen geringen, genau definierten Betrag höher, als der mittlere, breitere Steg. Ein spezielles Deckglas wird mit vorsichtigem, aber kräftigem Druck auf die Thoma-Zählkammer aufgeschoben. Erscheinen die sogenannten „Newton-Farbringe“ auf den beiden äußeren Stegen, sitzt das Deckglas richtig. In den mittleren Steg sind feine quadratische Liniennetze mit einer festgelegten Fläche eingraviert. Unter dem Mikroskop unterscheidet man Groß- und Kleinquadrate. Da der mittlere Steg tiefer liegt, als die beiden äußeren, befindet sich über jedem Quadrat ein Raum mit definiertem Volumen. (Bast, 2001) Dieser Raum wird mit der zehnfach verdünnten Hefesuspension gefüllt und die Zellen bei 100facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Insgesamt werden sechs Großquadrate durchfokussiert und deren Zellzahlen bestimmt.

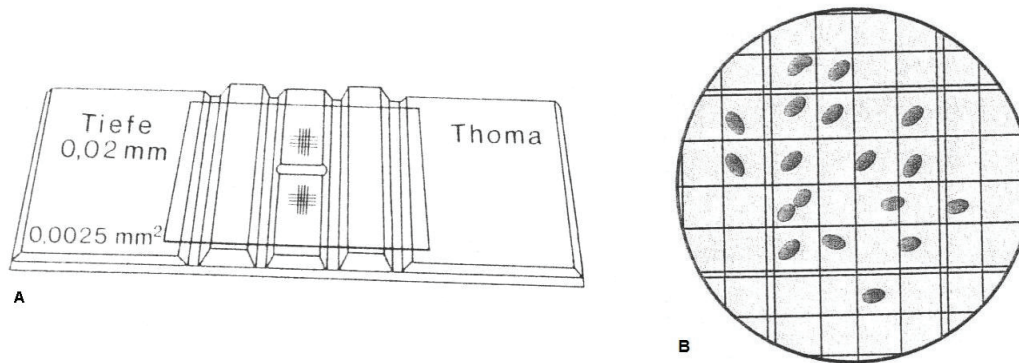


Abb. 13: Zählkammer nach Thoma mit zwei eingravierten Liniennetzen. A Gesamtansicht (Bast, 2001) B Ausschnitt aus dem Liniennetz mit einem Großquadrat, es werden alle Hefezellen innerhalb des Großquadrats gezählt: 12 Zellen (Madigan et al., 1997)

Ergebnisberechnung:

Die Anzahl der Hefezellen wird berechnet und als Hefen/mL angegeben. Es wird berücksichtigt, dass ein Großquadrat eine Seitenlänge von 0,2 mm und eine Tiefe von 0,1 mm hat (Steffens, 2005). Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$x = \frac{\bar{x} * 1000 \text{ mm}^3}{0,004 \text{ mm}^3} * 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

x	Hefen/mL
\bar{x}	Mittelwert der ausgezählten Zellen von sechs Großquadraten
$0,004 \text{ mm}^3$	Volumen eines Großquadrats
1000 mm^3	entsprechen 1 mL

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass sie nur wenig Zeit und einen geringen apparativen Aufwand erfordert. Andererseits hat die Bestimmung der Zellen mittels Zählkammer den Nachteil, dass auch tote mit erfasst werden. (Bast, 2001; Madigan et al., 1997)

4.5 Anreicherung von Mikroorganismen

Die Anreicherung von Mikroorganismen wird durchgeführt, um einen bestimmten Organismus einer natürlichen Mischpopulation zu isolieren. Anreicherungsverfahren finden aber auch dann Anwendung, wenn eine bestimmte Mikroorganismenart (z. B. Hefen) nachgewiesen werden soll, die nur in einer sehr geringen Konzentration in einem Produkt vorhanden ist. (Bast, 2001)

Laut Bast (2001), macht man sich bei der Anreicherung die Tatsache zunutze, dass die Ansprüche der einzelnen Mikroorganismen hinsichtlich der Nährstoffe und Wachstumsbedingungen teilweise sehr unterschiedlich sind. Bei einer Anreicherung werden also bestimmte selektive Umweltbedingungen festgelegt, die das Wachstum und einen optimalen Stoffwechsel der Zielorganismen begünstigen.

Zur Anreicherung und Kultivierung von Hefen werden, wie von Baumgart (1994) beschrieben, traditionell Malzextrakt-Agar bzw. -Bouillon, Sabouraud-Glucose-Agar, Trypton-Glucose-Hefeextrakt-Agar und Kartoffel-Dextrose-Agar verwendet. Durch Ansäuern des Mediums und/oder Zusatz von Antibiotika kann die Selektivität der Anreicherungsmedien erhöht werden. Hefen können bei pH-Werten und Wasseraktivitäten wachsen, bei denen die Vermehrung von Bakterien unterdrückt oder gehemmt wird. Das Ansäuern des Nährbodens sollte erst nach dem Autoklavieren erfolgen, um das Erstarren des agarhaltigen Mediums nicht zu beeinträchtigen. Der in den Versuchen verwendete YGC-Agar enthält das Antibiotikum Chloramphenicol in einer Konzentration von 100 mg/L. Die Konzentration ist ausreichend genug, das Bakterienwachstum zu hemmen ohne dabei die Vermehrung von Hefen einzuschränken. Der Einsatz von Chloramphenicol ist besonders geeignet, da es hitzestabil und somit autoklavierbar ist. Laut Baumgart (1994) scheint YGC-Agar das einfachste Universalmedium zu sein, das befriedigende Ergebnisse bei gleichzeitiger Anwesenheit von Hefen und Bakterien im Lebensmittel liefert.

4.5.1 Anreicherungsverfahren 50.50 zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milchprodukten

Die Untersuchungsmethode 50.50 wird bei Campina in Prenzlau als Früherkennungsmethode eingesetzt, um eine Verschlechterung der Produktqualität, hervorgerufen durch Hefen- und/oder Schimmelpilze, schnellstmöglich zu erkennen. Diese Methode wird zusätzlich zur Referenzmethode (§ 64 LFGB) durchgeführt. Neben den Halbfertigprodukten (Cremiger Joghurt, Sahnejoghurt, Albert Heijn Joghurt und Magermilchkonzentrat) werden auch die Endprodukte (Fruchtquark, Speisequark und Speisequarkzubereitung) mit der Anreicherungsverfahren 50.50 auf das Vorhandensein von Hefen und Schimmelpilzen untersucht. Die Anreicherungsverfahren 50.50 ist keine vom Gesetzgeber vorgeschriebene oder vom Kunden geforderte Untersuchungsmethode. Sie wird zusätzlich durchgeführt, fungiert als Indikator und hat sich über die Jahre im Unternehmen etabliert.

Durchführung:

Die Probenspritzen, in denen sich die Halbfertigprodukte befinden, lagern bis zur Probenaufbereitung etwa 24 h bei Raumtemperatur. Für die Endprodukte trifft das nicht zu. Sie werden bis zur Untersuchung im Kühlschrank bei 8 °C gelagert. Anschließend werden 50 g der Probe mit 50 mL steriler Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt und 48 h bei 25 °C bebrütet. Nach diesem Anreicherungs-schritt werden 10 mL des Proben-Bouillon-Gemisches in eine Petrischale (Ø 14 cm) pipettiert und mit YGC-Agar vermischt. Die Bebrütung erfolgt für 5 d bei 25 °C. Abbildung 14 zeigt das Fließschema zur Untersuchungsmethode.

Auswertung:

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden Hefekolonien und/oder Schimmelpilze gezählt. Die Auswertung erfolgt semiquantitativ, d. h. ein bis zwei Hefen/Schimmelpilze entsprechen einem Kreuz (+), drei bis zehn Hefen/Schimmelpilze entsprechen zwei Kreuzen (++) und mehr als zehn Hefen/Schimmelpilze entsprechen drei Kreuzen (+++).

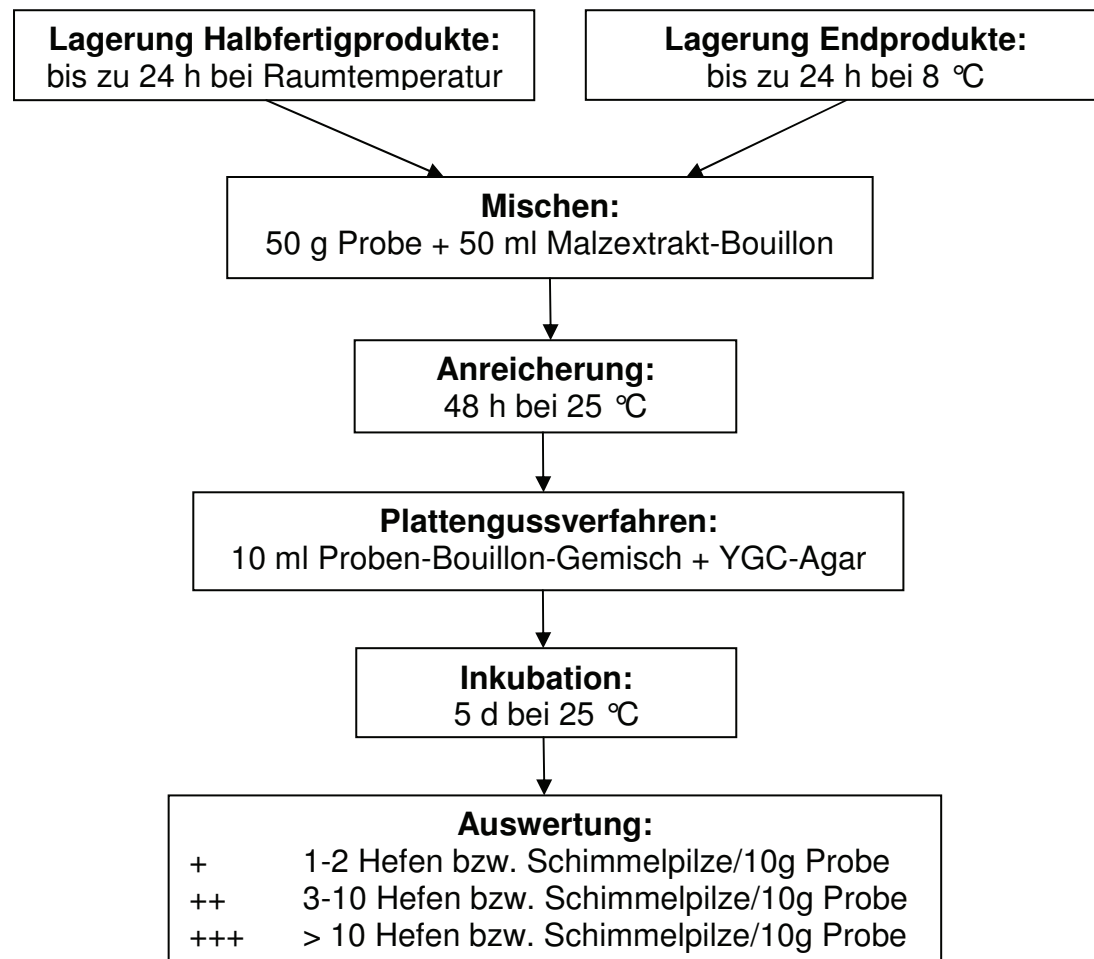


Abb. 14: Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milchprodukten

4.5.2 Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode

Es wird der Anreicherungsschritt der Untersuchungsmethode 50.50 überprüft. Hierzu werden Versuche durchgeführt, um zu beobachten, wie sich eine Inkubation (48 h bei 25 °C) der Proben in einer Malzextrakt-Bouillon auf das Hefewachstum auswirkt.

Durchführung:

Zunächst wird die Konzentration in einem mL Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Oberflächenausstrichverfahren und Thoma-Kammer bestimmt (siehe Kapitel 4.4).

Dafür werden von der Hefesuspension sechs zehnfach Verdünnungen hergestellt (1 mL zu 9 mL Kochsalz-Peptonlösung).

Es werden acht 50 g Proben mit 50 mL Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt (Proben 1-8).

I. Oberflächenausstrich der beimpften Proben ohne Anreicherungsschritt:

Jede Probe wird mit jeweils einem mL Flüssigkultur („Probe 1“) bzw. der folgenden zehnfach Verdünnungen (Verdünnungsreihe *S. cerevisiae*; „Probe 2“; „Probe 3“...) angeimpft. „Probe 8“ fungiert als Kontrolle und wird statt mit der Hefesuspension mit einem mL steriler Kochsalz-Peptonlösung angeimpft. Von den Proben 1-7 werden jeweils vier zehnfach Verdünnungen angelegt. Anschließend wird von allen Proben und von den Verdünnungen ein Oberflächenausstrich gemacht (Doppelbestimmung) und für fünf Tage bei 25 °C inkubiert.

II. Oberflächenausstrich der beimpften Proben mit Anreicherungsschritt:

Zur Anreicherung werden die beimpften Proben 1-7 (siehe I.) und die Kontrollprobe für 48 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird wie bei Verfahren I ohne Anreicherung weiter gearbeitet

III. 50.50 Methode (Campina-Verfahren):

Von den beimpften Proben 1-7 und der Kontrollprobe, die für 48 h bei 25 °C inkubiert wurden (siehe II.), werden jeweils zehn mL in eine Petrischale (Ø 14 cm) pipettiert und im Plattenguss mit YGC-Agar vermischt. Nach dem Erstarren des Mediums werden die Petrischalen, mit dem Deckel nach unten, fünf Tage bei 25 °C inkubiert.

Auswertung:

Bei dem Untersuchungsschritt I. und II. werden die KbE/0,1 mL berechnet und miteinander verglichen. Die Auswertung der 50.50 Methode erfolgt wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben.

4.5.3 Vitalisierungsmethode

Bei dieser Methode sollen die Hefen, die das Produkt belasten, lediglich belebt werden. Es erfolgt keine Anreicherung der Hefen. Ziel dieser Untersuchung ist es, Rückschlüsse auf die Ausgangsbelastung des Produktes schließen zu können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Zeiteinsparung, da statt 48 h Anreicherung ein Vitalisierungsschritt von 2 h erfolgt. Parallel wird die Untersuchungsmethode 50.50 durchgeführt (Abbildung 14 aus Kapitel 4.5.1). Die Lagerung der Produkte bis zur Probenaufbereitung erfolgt im Kühlschrank bei 8 °C.

Durchführung:

Es wird die Anzahl von Kolonien in einem mL Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Oberflächenausstrichverfahren und Thoma-Kammer bestimmt (Kapitel 4.4). Dafür werden von der Hefesuspension sieben zehnfach Verdünnungen hergestellt (1 mL zu 9 mL Peptonlösung).

Von jeder Produktprobe werden dreimal 50 g Probe mit 50 mL Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt. Die Proben werden mit 10^0 und 10^2 Hefen beimpft. Ein Proben-gemisch wird mit einem mL Peptonlösung beimpft und dient als Kontrolle. Die Proben werden für 2 h bei 30 °C bebrütet. Nach diesem Vitalisierungsschritt werden jeweils 10 mL des Proben-Bouillon-Gemisches in eine Petrischale pipettiert und im Platten-guss mit YGC-Agar vermischt. Die Inkubation erfolgt für drei Tage bei 30 °C.

Parallel zur Vitalisierungsmethode wird die Untersuchungsmethode 50.50, wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben, durchgeführt. Es werden auch Fruchtquark-Rückstellproben untersucht, bei denen mittels 50.50 Methode bereits Hefen nachgewiesen wurden. Die Zwischeninkubation erfolgt für 2 h, 24 h und 48 h.

Auswertung:

Die Auswertung der dotierten Proben erfolgt bei beiden Methoden quantitativ. Die Auswertung der Rückstellproben erfolgt bei beiden Untersuchungsmethoden semi-quantitativ, wie in Kapitel 4.5.1 erläutert.

4.5.4 Ermitteln der Auswirkung der unterschiedlichen Lagerung der Halbfertig- und Endprodukte auf das Untersuchungsergebnis

Die Probenspritzen der Halbfertigprodukte verweilen bis zur Probenaufbereitung, maximal 24 h, bei Raumtemperatur. Anders wird es bei den Endprodukten gehandhabt. Die Quarkbecher werden bis zur Untersuchung bei 8 °C im Kühlschrank gelagert. Es soll überprüft werden, welche Auswirkung so eine zusätzliche „Inkubation“ auf das Endergebnis der Halbfertigprodukte hat und ob es sinnvoll ist, Halbfertigprodukte und Endprodukte bis zur Probenaufbereitung unterschiedlich zu lagern.

Durchführung:

Die Versuchsdurchführung erfolgt wie im Kapitel 4.5.2 beschrieben. Abweichend wird die Anzahl Kolonie bildender Einheiten nach einer 24stündigen Lagerung bei Raumtemperatur (20 °C ± 2) und nach der Lagerung im Kühlschrank (8 °C) bestimmt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 4.5.2 erläutert. Die Ergebnisse der 50.50 Methode werden qualitativ ausgewertet.

4.5.5 Vergleich verschiedener Anreicherungs- und Bebrütungszeiten

Da die Untersuchungsmethode 50.50 als Früherkennungsmethode von Hefen- und Schimmelpilzkontaminationen dient, sollte ein Untersuchungsergebnis schnellstmöglich vorliegen. Deshalb wird geprüft, ob eine Verkürzung der Anreicherungs- und Bebrütungszeit vorgenommen werden kann ohne die Methode in ihrer Sensibilität zu beeinträchtigen. Es werden Anreicherungszeiten von 24 h, 36 h und 48 h und Inkubationszeiten von drei, vier und fünf Tagen miteinander verglichen.

Durchführung:

Die Versuchsdurchführung erfolgt wie im Kapitel 4.5.2 beschrieben. Von der Hefesuspension werden aber acht zehnfach Verdünnungen hergestellt und zehn 50 g Proben mit 50 mL Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt (Proben 1-10). Probe 1 wird mit einem mL der Originalsuspension *S. cerevisiae* beimpft. Probe 10 fungiert als Kontrolle. Es wird die Anzahl Kolonie bildender Einheiten nach unterschiedlichen Zwischeninkubationen (0 h, 24 h, 36 h und 48 h) bestimmt. Die Auswertung der bebrüteten Petrischalen erfolgt nach drei, vier und fünf Tagen.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 4.5.2 erläutert. Die Ergebnisse der 50.50 Methode werden qualitativ ausgewertet.

4.5.6 Vergleich verschiedener Anreicherungs- und Bebrütungstemperaturen

Die optimale Wachstumstemperatur von Hefen liegt zwischen 20 und 30 °C. Die Bebrütungstemperatur der 50.50 Methode beträgt 25 °C. Es soll untersucht werden, ob sich eine Temperaturerhöhung auf 30 °C, bezüglich der 50.50 Methode, besser auf das Hefewachstum auswirkt und ob durch diese Temperaturerhöhung Untersuchungszeit eingespart werden kann.

Durchführung:

Es wird die Konzentration in einem mL Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Oberflächenausstrichverfahren und Thoma-Kammer bestimmt (siehe Kapitel 4.4). Dafür werden von der Hefesuspension sieben zehnfach Verdünnungen hergestellt (1 mL zu 9 mL Kochsalz-Peptonlösung).

Von jedem Produkt werden vier 50 g Proben mit 50 mL Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt. Die Proben werden mit 10^0 , 10^1 und 10^2 Hefen beimpft. Eine Probe

fungiert als Kontrolle. Die Anreicherung der Hefen erfolgt für 24 h und 48 h bei 25 und 30 °C. Nach diesem Anreicherungs-schritt werden jeweils zehn mL des Proben-Bouillon-Gemisches in eine Petrischale (Ø 14 cm) pipettiert und im Plattengussverfahren mit YGC-Agar vermischt. Die Inkubation erfolgt für vier Tage bei 25 °C und 30 °C.

Es werden auch Fruchtquark-Rückstellproben untersucht, bei denen mittels 50.50 Methode bereits Hefen nachgewiesen wurden.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt qualitativ. Unterschiede im Hefewachstum, bei oben genannten Parametern, werden protokolliert und fotografisch festgehalten.

4.5.7 Schnellenachweis von Hefen

Diese Methode dient dem Schnellenachweis von Hefen in Joghurt und Quark. Die Durchführung der Untersuchung basiert auf der Untersuchungsmethode, die im Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (1985) beschrieben ist.

Durchführung:

Es wird die Anzahl von Kolonien in einem mL Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Oberflächenausstrichverfahren und Thoma-Kammer bestimmt (siehe Kapitel 4.4). Dafür werden von der Hefesuspension sieben zehnfach Verdünnungen hergestellt (1 mL zu 9 mL Peptonlösung).

Von der zu analysierenden Probe werden vier 50 g Proben mit 50 mL Malzextrakt-Bouillon homogen vermischt. Die Proben werden mit 10^0 , 10^1 und 10^2 Hefen beimpft. Eine Probe wird mit einem mL Peptonlösung beimpft und dient als Kontrolle. Die Anreicherung erfolgt für 48 h bei 25 °C. Anschließend wird ein Ausstrichpräparat hergestellt. Aus dem Proben-Bouillon-Gemisch wird mit einer sterilen Impföse Material

entnommen und auf einen gereinigten, fettfreien und mit Alkohol abgeflamten Objektträger ausgestrichen. Nachdem die Ausstriche an einem staubfreien Ort in waagerechter Lage getrocknet sind, werden sie in der Flamme fixiert (fünf-zehnmal durch die Oxidationsflamme des Bunsenbrenners ziehen) und mit Methylenblau gefärbt. Danach werden die Objektträger in drei aufeinanderfolgenden, mit Wasser gefüllten, Bechergläsern abgespült. Die blauen Ausstriche werden dann in senkrechter Lage getrocknet, bis die gefärbten Flächen matt erscheinen. Es folgt die mikroskopische Analyse des gefärbten Ausstrichpräparates, indem gleichmäßig gefärbte Gesichtsfelder ggf. mit einem Immersionsölobjektiv auf Hefen durchmustert werden. Zum Vergleich werden die gleichen Proben-Bouillon-Gemische nach der 50.50 Methode untersucht und ausgewertet (Kapitel 4.5.1).

Auswertung:

Sind bei der Durchmusterung von zehn Gesichtsfeldern Hefen zu finden, wird davon ausgegangen, dass die Probe Hefen enthält, unter der Voraussetzung, dass bei der Probenentnahme und während der Anreicherung keine nachträgliche Hefekontamination stattgefunden hat.

5 Ergebnisse und Auswertung

In diesem Abschnitt erfolgte die Zusammenfassung, Darstellung und Auswertung der in dieser Diplomarbeit erzielten Ergebnisse.

5.1 Ergebnisse der Keimzahlbestimmung der Hefesuspension *Saccharomyces cereviseae*

Die Produktproben wurden mit der Stammkultur *S. cereviseae* beimpft. Hierzu erfolgte zunächst die Bestimmung der Ausgangskonzentration der Hefesuspension mittels Oberflächenausstrichverfahren. Parallel zu dieser Methode wurden die Hefen pro mL mittels Thoma-Kammer ermittelt (Tabelle 2). Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.4 beschrieben. Detaillierte Ergebnisse sind dem Anhang A zu entnehmen. Das Überimpfen der Hefekultur in frisches Substrat erfolgte in regelmäßigen Abständen (ca. vier Wochen), da die Kultur über einen längeren Zeitraum verwendet wurde. Hierzu wurde ein mL der Suspension in 100 mL Malzextrakt-Bouillon überführt und für vier Tage bei 25 °C bebrütet. Die Aufbewahrung der Hefesuspension erfolgte im Kühlschrank bei 8 °C.

Tab. 2: Ermittelte Zellzahlen der Hefesuspension *S. cereviseae*

Bestimmung	Oberflächenausstrichverfahren [KbE/mL]	Thoma-Kammer [Hefen/mL]
1	$2,4 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^7$
2	$1,4 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^7$
3	$2,1 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
4	$3,0 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$
5	$2,3 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
6	$2,7 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
7	$2,7 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$
8	$2,0 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$
Mittelwert	$2,3 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$

Das Oberflächenausstrichverfahren ergab im Mittel $2,3 \cdot 10^7$ KbE/mL. Die Lebendzellzahlen streuten zwischen $1,4 \cdot 10^7$ und $3,0 \cdot 10^7$ KbE/mL. Mit der Thoma-Kammer wurden etwas höhere Zahlen bestimmt. Es ergab sich ein Mittelwert von $5,5 \cdot 10^7$ Hefen/mL, mit Schwankungen zwischen $3,7 \cdot 10^7$ und $9,0 \cdot 10^7$ Hefen/mL.

5.2 Ergebnisse der Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode

In Abbildung 15 und 16 sind die ermittelten Koloniezahlen der Speisequarkzubereitung Albert Heijn (AH) und des Cremigen Joghurts (CJ) dargestellt. Die Ermittlung der Koloniezahlen wurde bei beiden Proben vor und nach dem Anreicherungsschritt durchgeführt. Die Anreicherung erfolgte 48 h bei 25 °C. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Detaillierte Ergebnisse sind dem Anhang B zu entnehmen.

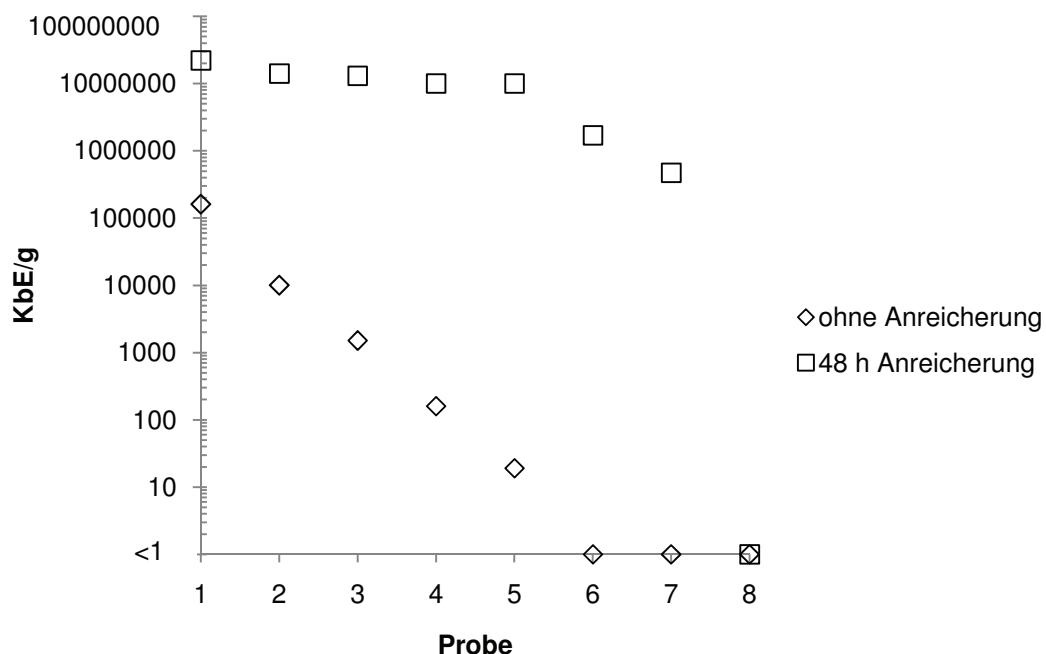


Abb. 15: Vergleich der ermittelten Koloniezahlen der Speisequarkzubereitung AH mit und ohne Anreicherungsschritt

In der Speisequarkzubereitung Albert Heijn wurden ohne einem Anreicherungs-schritt zwischen <1 und $1,6 \cdot 10^5$ KbE/g ermittelt (Abbildung 15). Eine 48stündige Zwischeninkubation bewirkte eine Anreicherung der Hefen um zwei bis sechs log-Stufen. Die Endzellzahlen aller beimpften Proben lagen zwischen $4,7 \cdot 10^5$ und $2,2 \cdot 10^7$ KbE/g.

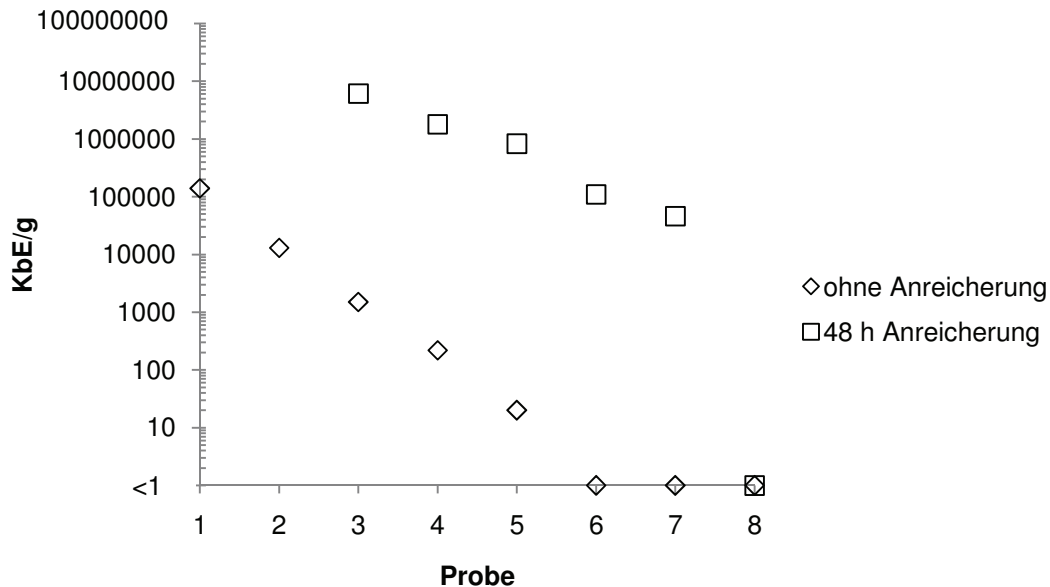


Abb. 16: Vergleich der ermittelten Koloniezahlen des Cremigen Joghurts mit und ohne Anreicherungs-schritt

Für die Proben des Cremigen Joghurts ergaben sich ohne Zwischeninkubation ähnliche Ergebnisse wie bei der Speisequarkzubereitung Albert Heijn. Es wurden zwischen <1 und $1,4 \cdot 10^5$ KbE/g festgestellt (Abbildung 16). Nach einem Anreicherungs-schritt von 48 h war das Auszählen von Hefekolonien in den Proben 1 und 2 nicht möglich. Für die Proben 3 bis 7 wurde eine Hefevermehrung um vier bis sechs Zehnerpotenzen ermittelt. Das Ergebnis nach 48stündiger Zwischeninkubation ergab Endzellzahlen von $4,6 \cdot 10^4$ bis $6,1 \cdot 10^6$ KbE/g.

In Tabelle 3 wurden die Ergebnisse der Untersuchungsmethode 50.50 (Kapitel 4.5.1) zusammengefasst. Bei allen beimpften Proben waren die Platten mit Hefen überwachsen, unabhängig von deren Ausgangsbelastung. Es konnten keine Kolonien ausgezählt werden.

Tab. 3: Ergebnisse der beimpften Proben nach der Untersuchungsmethode 50.50

	Cremiger Joghurt	Speisequark AH
Probe 1	+++	+++
Probe 2	+++	+++
Probe 3	+++	+++
Probe 4	+++	+++
Probe 5	+++	+++
Probe 6	+++	+++
Probe 7	+++	+++
Probe 8 (Kontrolle)	-	-

+ 1-2 Kolonien/10 mL
 ++ 3-10 Kolonien/10 mL
 +++ > 10 Kolonien/10 mL
 - kein Hefewachstum

5.3 Ergebnisse der Vitalisierungsmethode

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Vitalisierungsmethode denen der 50.50 Methode gegenübergestellt. Die Durchführung ist dem Kapitel 4.5.3 zu entnehmen. Es ergab sich die Fragestellung, ob die Vitalisierungsmethode eine sinnvolle Alternative zur Untersuchungsmethode 50.50 darstellt. Es wurden verschiedene Chargen des Joghurts und der Speisequarkzubereitung untersucht (Doppelbestimmung).

Tab. 4: Versuchsergebnisse der Vitalisierungsmethode und der 50.50 Methode

	Charge	Vitalisierungsmethode			50.50 Methode		
		Kontrolle	10 ⁰ Hefen	10 ² Hefen	Kontrolle	10 ⁰ Hefen	10 ² Hefen
CJ	1	0/0	0/0	27/34	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	2	0/0	0/0	22/26	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	3	0/0	0/2	28/34	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	4	0/0	0/0	27/29	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	5	0/0	0/0	27/25	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
AH	1	0/0	0/0	21/18	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	2	0/0	0/0	21/22	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	3	0/0	1/0	21/17	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	4	0/0	0/0	27/28	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.
	5	0/0	0/0	23/22	0/0	n. a./n. a.	n. a./n. a.

n. a. nicht auszählbar

Nach einer Inkubation von 2 h bei 30 °C wurde eine Hefekontamination nur bei einer Ausgangsbelastung der Proben von mindestens 100 Hefen sicher nachgewiesen (Tabelle 4). Dieses entsprach einer Ausgangsbelastung von mindestens einer Hefe/g Probe. Nach einer 48stündigen Zwischeninkubation vermehrte sich der Modellorganismus so stark, dass die Platten überwachsen waren und keine Kolonien ausgezählt werden konnten.

Neben den beimpften Proben wurden Fruchtquark-Rückstellproben untersucht, bei denen bereits eine Hefekontamination nachgewiesen wurde:

- AH Erdbeere Anfang (Probenahme: 29.09.08; MHD 31.10.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 08.10.08)
- MB Erdbeere Anfang (Probenahme: 29.09.08; MHD 01.11.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 08.10.08)
- Bordevoöl Pfirsich (Probenahme: 29.09.08; MHD 01.11.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 08.10.08)

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Vitalisierungsmethode denen der 50.50 Methode bei unterschiedlichen Anreicherungszeiten gegenübergestellt. Es wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt.

Tab. 5: Hefenachweis der Fruchtquark-Rückstellproben bei verschiedenen Anreicherungszeiten

	Anreicherung		
	2 h	24 h	48 h
AH Erdbeere A	-/-	+/+	+/+
MB Erdbeere A	-/-	+/+	+/+
Bordevool Pfirsich	-/-	+/+	+/+

- + Hefewachstum
- kein Hefewachstum
- A Produktionsanfang

Die Ergebnisse der Tabelle 5 zeigen, dass ein Vitalisierungsschritt von 2 h nicht ausreicht, um Hefen im Quark sicher nachzuweisen. Hingegen war eine deutliche Hefevermehrung nach einer Zwischeninkubation von 24h und 48 h feststellbar. Nach der Anreicherung von 24 h waren Einzelkolonien noch gut erkennbar. Eine deutliche Zunahme der Anzahl Kolonie bildender Einheiten ließ sich nach einem Anreicherungsschritt von 48 h verzeichnen.

5.4 Auswirkung der Lagerunterschiede von Halbfertig- und Endprodukten

In Abbildung 17 ist das Hefewachstum in Cremigen Joghurt bei unterschiedlichen Lagerbedingungen der Proben bis zur Probenaufbereitung dargestellt. Des Weiteren zeigt die Grafik wie sich eine Zwischeninkubation von 48 h auf die Vermehrung von *S. cerevisiae*, bei unterschiedlichen Lagertemperaturen der Produkte auswirkt. Die Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 4.5.4 zu entnehmen. Detaillierte Ergebnisse sind im Anhang C zusammengestellt.

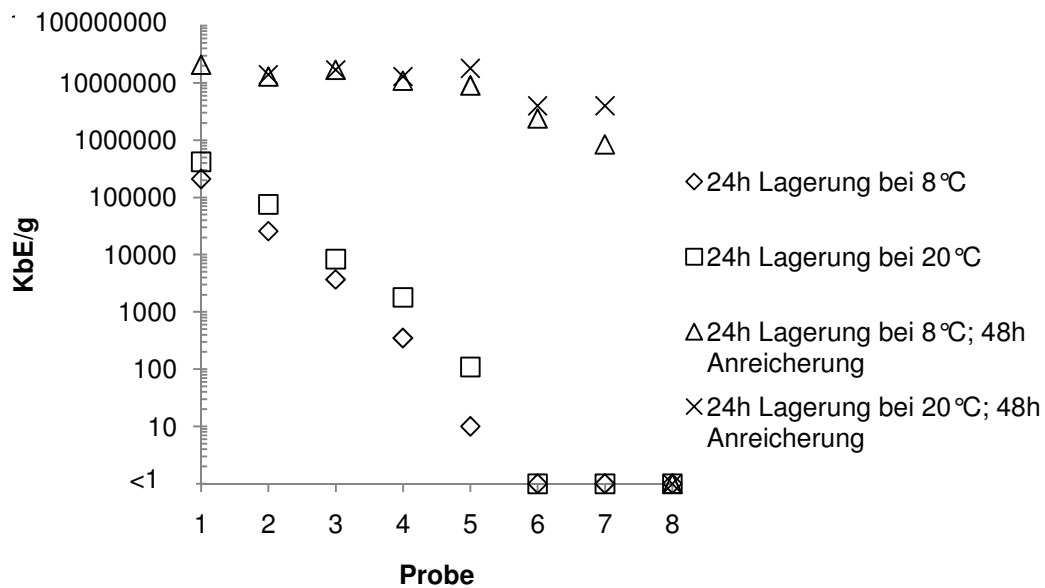


Abb. 17: Wachstum von *S. cerevisiae* bei unterschiedlichen Lagertemperaturen der Proben

Die Ergebnisse aus Abbildung 17 zeigen, dass sich die Hefen bei 20 °C nur geringfügig besser entwickeln, als bei Temperaturen von 8 °C. Nach der Zwischeninkubation von 48 h waren nahezu keine Unterschiede mehr erkennbar. Die ermittelten Endzellzahlen der Proben deckten sich trotz unterschiedlicher Lagertemperaturen. Das Ergebnis der Probe 1 (24 h Lagerung bei 20 °C; 48 h Anreicherung) ist in dieser Grafik nicht mit aufgeführt, da auf Grund der hohen Anzahl von Kolonien ein Auszählen nicht möglich war. Der Unterschied der nachgewiesenen Kolonien bei Probe 7 sollte nicht überbewertet werden, da $8,5 \cdot 10^5$ und $4,0 \cdot 10^6$ KbE/g aus mikrobiologischer Sicht nahe beieinander liegen.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit der Untersuchungsmethode 50.50 (Kapitel 4.5.1) erzielt wurden. Bei allen Proben waren die Platten mit Hefen überwachsen, so dass keine Einzelkolonien sichtbar waren und auch keine Rückschlüsse auf die unterschiedliche Ausgangsbelastung der Proben gezogen werden konnten.

Tab. 6: Ergebnisse der dotierten Joghurtproben nach der Untersuchungsmethode 50.50 bei unterschiedlichen Lagerbedingungen

	mit Vorinkubation 24 h bei Raumtemperatur	Kühlschranklagerung
Probe 1	+	+
Probe 2	+	+
Probe 3	+	+
Probe 4	+	+
Probe 5	+	+
Probe 6	+	+
Probe 7	+	+
Probe 8 (Kontrolle)	-	-

+ Hefewachstum

- kein Hefewachstum

5.5 Ergebnisse unterschiedlicher Anreicherungs- und Bebrütungszeiten

In den Abbildungen 18 und 19 ist das Hefewachstum in den Produkten Albert Heijn und Cremiger Joghurt nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten dargestellt. Die Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 4.5.5 zu entnehmen. Detaillierte Ergebnisse sind im Anhang D zusammengefasst.

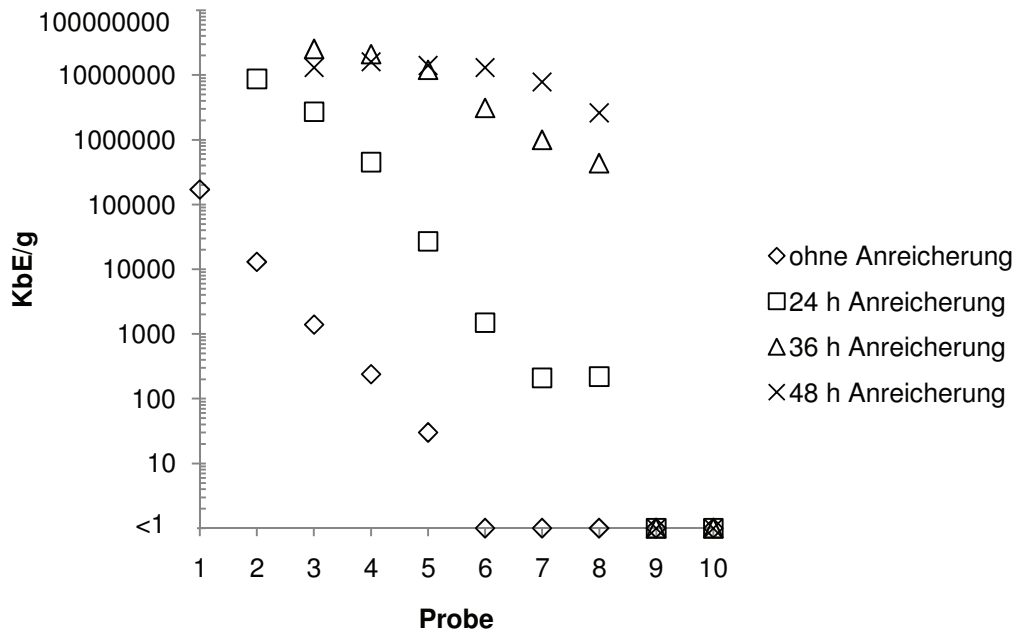


Abb. 18: Koloniezahlen in der Speisequarkzubereitung (AH) nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, bewirkte eine Anreicherung von 24 h eine Hefevermehrung um etwa zwei bis drei log-Stufen. In den Proben 2 bis 8 wurden zwischen $2,2 \cdot 10^2$ und $8,7 \cdot 10^6$ KbE/g ermittelt. Der Kurvenverlauf nach einer 24stündigen Zwischeninkubation ähnelt dem der Proben ohne Anreicherung. Für Probe 1 konnten keine Zahlen bestimmt werden, da die Kolonien nicht auszählbar waren. Bei der Probe 9 war kein Hefewachstum feststellbar, unabhängig von den variierenden Zwischeninkubationen. Nach den Anreicherungen von 36 und 48 h stieg die Anzahl Kolonie bildender Einheiten deutlich an. In den Proben 3 bis 8 wurden zwischen 10^5 und 10^7 KbE/g ermittelt. Es konnten kaum Differenzen zwischen den beiden unterschiedlichen Anreicherungszeiten beobachtet werden. Lediglich in den Proben 6 bis 8 war nach einer 36stündigen Zwischeninkubation die Anzahl Kolonie bildender Einheiten um eine Zehnerpotenz geringer als nach einer 48stündigen Anreicherung der Hefen. Bei den Proben 1 und 2 konnten auf Grund der ausgeprägten Hefevermehrung keine Kolonien ausgezählt werden.

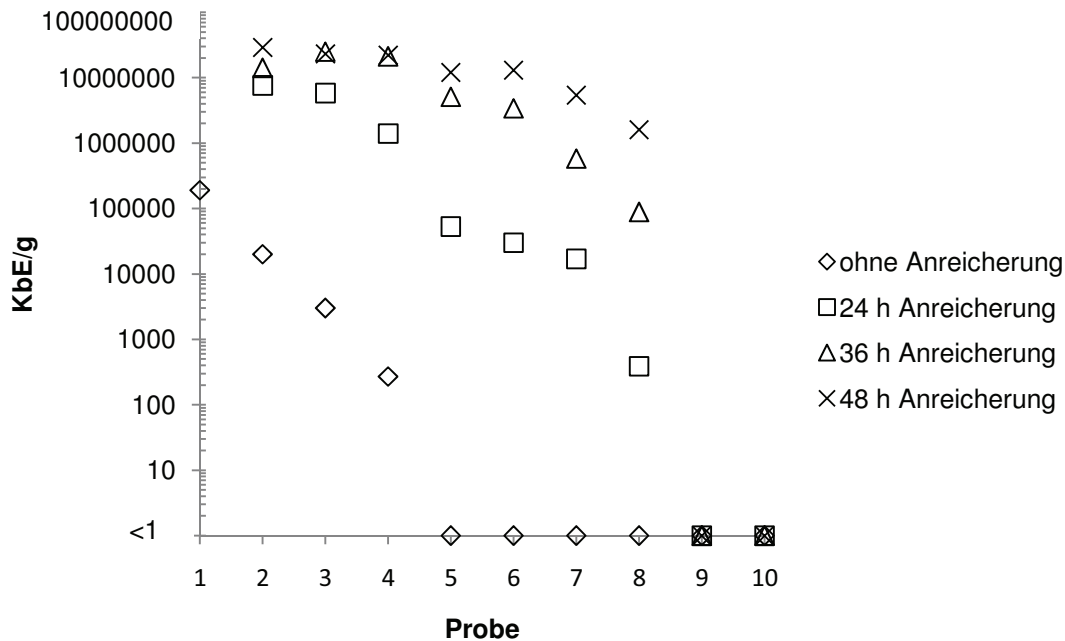


Abb. 19: Koloniezahlen im Cremigen Joghurt (CJ) nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten

Abbildung 19 zeigt, dass eine 24stündige Anreicherung eine Hefevermehrung um etwa 2 bis 4 Zehnerpotenzen im Cremigen Joghurt bewirkte. Für die Proben 2 bis 8 wurden zwischen $3,9 \cdot 10^2$ und $7,6 \cdot 10^6$ KbE/g ermittelt. Auch hier verläuft die „Kurve“ ähnlich wie die der Proben ohne Anreicherung. Für die Probe 1 konnten die Kolonie bildenden Einheiten nicht bestimmt werden, da die Kolonien nicht auszählbar waren. Bei der Probe 9 war kein Hefewachstum feststellbar, unabhängig von den variierenden Zwischeninkubationen. Nach den Inkubationen von 36 und 48 h stieg die Anzahl Kolonie bildender Einheiten der Proben 2 bis 8 nochmals an. Nach einer 36stündigen Anreicherung wurden zwischen $8,8 \cdot 10^4$ und $1,4 \cdot 10^7$ KbE/g ermittelt. Nach einer Inkubation von 48 h wurden zwischen $1,6 \cdot 10^6$ und $2,9 \cdot 10^7$ KbE/g bestimmt.

Bei beiden Produktproben waren Hefekolonien bereits nach drei Tagen auszählbar. Weitere Auswertungen nach vier und fünf Tagen führten zu keinem abweichenden Ergebnis.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit der Untersuchungsmethode 50.50 nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten erzielt wurden. Nach einer Inkubation von drei Tagen waren die Platten der Proben 1 bis 5 mit Hefen überwachsen. Ab Probe 6 waren Einzelkolonien erkennbar. Bei Probe 9 war auch nach fünf Tagen Inkubation kein Hefewachstum feststellbar.

Tab. 7: Ergebnisse der dotierten Proben bei Anwendung der Untersuchungsmethode 50.50 nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten

	24 h Anreicherung		36 h Anreicherung		48 h Anreicherung	
	CJ	AH	CJ	AH	CJ	AH
Probe 1	+	+	+	+	+	+
Probe 2	+	+	+	+	+	+
Probe 3	+	+	+	+	+	+
Probe 4	+	+	+	+	+	+
Probe 5	+	+	+	+	+	+
Probe 6	+	+	+	+	+	+
Probe 7	+	+	+	+	+	+
Probe 8	+	+	+	+	+	+
Probe 9	-	-	-	-	-	-
Probe 10 (Kontrolle)	-	-	-	-	-	-

+ Hefewachstum

- kein Hefewachstum

5.6 Ergebnisse unterschiedlicher Anreicherungs- und Bebrütungstemperaturen

Tabelle 8 gibt einen Überblick der Hefenachweise nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten und bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Die Proben wurden mit 10^0 , 10^1 , und 10^2 Hefen beimpft. Insgesamt wurden vier verschiedene Chargen des Cremigen Joghurts und des Speisequarks AH untersucht. Die Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 4.5.6 zu entnehmen.

Tab. 8: Hefenachweise nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten und Inkubationstemperaturen

		Anreicherung															
		24 h bei 25 °C				48 h bei 25 °C				24 h bei 30 °C				48 h bei 30 °C			
Charge		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CJ	Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	10 ⁰ Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ¹ Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ² Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AH	Kontrolle	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	10 ⁰ Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	10 ¹ Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ² Hefen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Hefewachstum

- kein Hefewachstum

Die Ergebnisse der Tabelle 8 zeigen, dass nach einer Zwischeninkubation von 24 h ebenso ein Hefenachweis zu verzeichnen ist, wie nach 48 h. Bei der Kontrollprobe der Charge 3 des Cremigen Joghurts (24 h bei 30 °C), sowie bei allen Kontrollproben der Charge 4 der Speisequarkzubereitung (AH) konnte ein Hefewachstum festgestellt werden. Auffällig ist, dass für die Charge 1 des Produkts AH, welches mit 10⁰ Hefen beimpft wurden bei 30 °C keine Hefen nachgewiesen werden konnten.

In den Abbildungen 20 und 21 ist die Entwicklung von *S. cerevisiae* in der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten und Inkubationstemperaturen dargestellt. Die Proben wurden mit 10⁰, 10¹, und 10² Hefen beimpft.

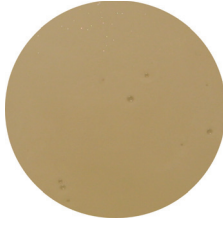
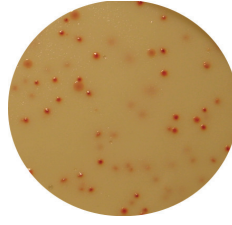
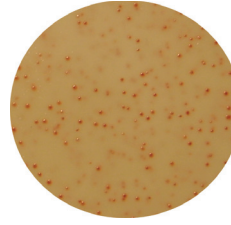





	Kontrolle	10 ⁰ Hefen	10 ¹ Hefen	10 ² Hefen
25 °C				
30 °C				

Abb. 20: Entwicklung von *S. cerevisiae* in der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach einer Anreicherung von 24 h bei 25 und 30 °C (Dem Nährboden wurde TTC beigemischt, um eine digitale Aufnahme der Hefekolonien zu verbessern. TTC bewirkt eine rosa Färbung der Hefekolonien, die sich besser vom Nährboden abheben.)

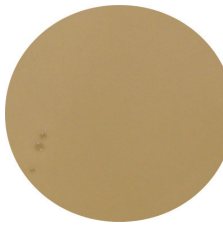
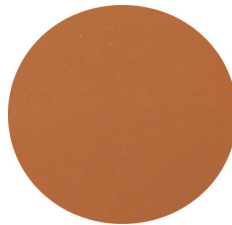
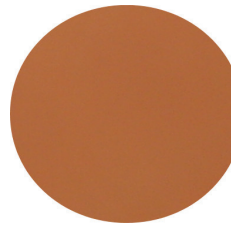



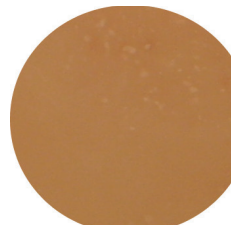

	Kontrolle	10 ⁰ Hefen	10 ¹ Hefen	10 ² Hefen
25 °C				
30 °C				

Abb. 21: Entwicklung von *S. cerevisiae* in der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach einer Anreicherung von 48 h bei 25 und 30 °C (Dem Nährboden wurde TTC beigemischt, um eine digitale Aufnahme der Hefekolonien zu verbessern. TTC bewirkt eine rosa Färbung der Hefekolonien, die sich besser vom Nährboden abheben.)

- MB Erdbeere Anfang (Probenahme: 30.09.08; MHD: 01.11.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 16.10.08)
- MB Aprikose Anfang (Probenahme: 06.10.08; MHD: 08.11.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 16.10.08)
- MB Aprikose Ende (Probenahme: 06.10.08; MHD: 08.11.08; Lagerung bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 16.10.08))
- Bordevoel Erdbeere Anfang (Probenahme: 06.10.08; MHD: 08.11.08, Lagertemperatur 8 °C, Untersuchungsdatum: 16.10.08)
- Bordevoel Erdbeere Ende (Probenahme: 06.10.08; MHD: 08.11.08, Lagertemperatur 8 °C, Untersuchungsdatum: 16.10.08)

	Anreicherung			
	24 h bei 25 °C	48 h bei 25 °C	24 h bei 30 °C	48 h bei 30 °C
MB Erdbeere A	+	+	+	+
MB Aprikose A	-	-	-	-
MB Aprikose E	+	-	-	+
Bordevool Erdbeere A	-	-	-	-
Bordevool Erdbeere E	+	+	-	-

60

Die Ergebnisse der Tabelle 9 zeigen, dass im Fruchtquark MB Erdbeere Hefen sicher nachweisbar waren, unabhängig von den variierenden Parametern. Bei den Chargen MB Aprikose und Bordevoool Erdbeere konnten in den Proben die am Produktionsanfang entnommen wurden keine Hefen nachgewiesen werden. Sporadisch konnte ein Hefewachstum bei den Proben ermittelt werden, die vom Produktionsende stammten.

5.7 Ergebnisse des Schnellnachweises

In Tabelle 10 sind die ermittelten Ergebnisse der Schnellnachweismethode denen der 50.50 Untersuchungsmethode gegenübergestellt. Neben Cremigen Joghurt und der Speisequarkzubereitung Albert Heijn, bei denen eine Hefekontamination beabsichtigt erzeugt wurde, ist eine Fruchtquark Rückstellprobe untersucht worden (Doppelbestimmung). Für diese Probe erfolgte bereits ein Hefenachweis mit der 50.50 Methode. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden von jeder Probe zehn Gesichtsfelder durchmustert. Die Anzahl der Hefen pro Gesichtsfeld ist als Durchschnitt angegeben. Die Versuchsdurchführung ist dem Kapitel 4.5.7 zu entnehmen. Die mikroskopischen Aufnahmen sind im Anhang E dargestellt.

Tab. 10: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Schnellnachweismethode und 50.50 Untersuchungsmethode

Probe	Ausgangsbelastung	Mikroskopie	50.50 Methode
CJ	Kontrolle	-	-
	10 ⁰ Hefen	Ø 1 He/GF	+
	10 ¹ Hefen	Ø 2 He/GF	+
	10 ² Hefen	Ø 3 He/GF	+
AH	Kontrolle	-	-
	10 ⁰ Hefen	Ø 1 He/GF	+
	10 ¹ Hefen	Ø 3 He/GF	+
	10 ² Hefen	Ø 3 He/GF	+
Bordevool Fruchtquark Erdbeere I		Ø 1 He/GF	+
Bordevool Fruchtquark Erdbeere II		-	-

+ Hefewachstum

- kein Hefewachstum

GF Gesichtsfeld

Untersuchte Rückstellprobe:

- Boordevool Fruchtquark Erdbeere Anfang (Probenahme am 03.11.08, MHD: 06.12.08; Lagerung in der Kühlzelle bei 8 °C; Untersuchungsdatum: 25.11.08)

Die Ergebnisse der Tabelle 10 zeigen, dass zwei unterschiedliche Methoden zum gleichen Ergebnis führten. Bei beiden Produktproben konnten Hefen nachgewiesen werden. Der Fruchtquark Bordevool Erdbeere wies nur in der ersten Probe Hefen auf. Bei der zweiten Probe konnte mit beiden Methoden keine Hefekontamination festgestellt werden.

6 Diskussion

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit ermittelten Ergebnisse zur Überprüfung der Untersuchungsmethode 50.50 werden im Folgenden diskutiert. Ausgewertet werden die Resultate verschiedener Anreicherungsverfahren und die Ergebnisse alternativer Untersuchungsmethoden.

Für die Versuchsdurchführungen wurden Cremiger Joghurt (CJ) und die Speisequarkzubereitung Albert Heijn (AH) mit *Saccharomyces cerevisiae* beimpft, um eine definierte mikrobiologische Ausgangsbelastung der Proben zu erzeugen. Hierzu wurde zunächst die Anzahl Kolonie bildender Einheiten in der Stammkultur bestimmt (Kapitel 4.4). Die mittels Oberflächenausstrichverfahren bestimmte Lebendkeimzahl schwankte zwischen $1,4 \cdot 10^7$ und $3,0 \cdot 10^7$ KbE/mL (Tabelle 2 aus Kapitel 5.1). Mit der Thoma-Kammer wurden zwischen $3,7 \cdot 10^7$ und $9,0 \cdot 10^7$ Hefen/mL ermittelt. Da zwei unterschiedliche Methoden zu ähnlichen Ergebnissen führten, können Fehler bei der Koloniezahlbestimmung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Vermutlich wurden mittels Thoma-Kammer etwas höhere Zahlen ermittelt, weil bei der mikroskopischen Keimzahlbestimmung auch tote Zellen mit erfasst worden sind.

Die Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode erfolgte wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Verdünnungen ohne einen Anreicherungsschritt gut in den Proben wiederfinden ließen (Abbildung 15 und 16 aus Kapitel 5.2). Probe 1 (100 ml Proben-Bouillon-Gemisch) wurde mit einem mL der Stammkultur (10^7 KbE/mL) beimpft. Theoretisch ging man von 10^5 KbE/g aus. Nach einer fünftägigen Inkubation des Oberflächenausstrichs bei 25 °C wurden im Produkt Albert Heijn $1,6 \cdot 10^5$ KbE/g nachgewiesen. Im Cremigen Joghurt ließen sich $1,4 \cdot 10^5$ KbE/g wiederfinden.

Nach einer Inkubation von 48 h waren die Verdünnungen nicht mehr nachvollziehbar. Die Hefezellen hatten sich nach dieser Inkubation so angereichert, dass die Proben 1 bis 5 der Speisequarkzubereitung Albert Heijn bis auf 10^7 KbE/g heranwuchsen. Bei den Proben 6 und 7 wurden 10^6 bzw. 10^5 KbE/g ermittelt.

Die Anzahl Kolonie bildender Einheiten konnte in den Proben 1 und 2 des Cremigen Joghurts nicht bestimmt werden, weil die Kolonien nicht auszählbar waren. In den

Proben 3 bis 7 lag die Zahl Kolonie bildender Einheiten um eine log-Stufe geringer als bei dem Produkt Albert Heijn.

Parallel zur Bestimmung der KbE mittels Oberflächenausstrichverfahren wurden die Produkte nach der 50.50 Methode untersucht. Die Ergebnisse dieser Methodik (Tabelle 3 aus Kapitel 5.2) bestätigten eine Hefekontamination der Proben 1-7. Alle Nährbodenplatten waren überwachsen. Einzelkolonien konnten nicht mehr erkannt werden. Im Untersuchungsbericht wurden demzufolge drei Kreuze protokolliert.

Die semiquantitative Auswertung der 50.50 Methode sollte kritisch betrachtet werden. Die Ergebnisse (Abbildung 15 aus Kapitel 5.2) zeigten, dass nach einer 48-stündigen Zwischeninkubation der beimpften Albert Heijn-Proben kaum noch Rückschlüsse auf die Ausgangsbelastungen der Proben zuließen. Für das Produkt Cremiger Joghurt (Abbildung 16 aus Kapitel 5.2) ergab sich nach einer Anreicherung über die Zeit von 48 h ein Kurvenverlauf, der mit abnehmender mikrobiologischer Belastung der Proben sank. Untersuchte man diese Proben jedoch mit der 50.50 Methode, konnte man keine Rückschlüsse mehr auf die unterschiedliche Ausgangsbelastung der Proben ziehen.

Aus den Untersuchungsergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Zwischeninkubation von 48 h eine erhebliche Anreicherung der Hefen bewirkt (bis zu sechs log-Stufen). Es wurde in diesem Versuch aber auch beobachtet, dass sich der Modellorganismus *S. cerevisiae* in der Speisequarkzubereitung besser vermehrt hat, als im Cremigen Joghurt. Der Cremige Joghurt (pH 4,20 – 4,45) und die Speisequarkzubereitung Albert Heijn (pH 4,30 – 4,45) haben optimale pH-Werte für das Wachstum von *S. cerevisiae* (Kapitel 3.1.3). Der pH-Wert kann demzufolge als Ursache ausgeschlossen werden. Eventuell befanden sich die Hefezellen, mit denen der Cremige Joghurt beimpft wurde, in einem schlechteren physiologischen Zustand. Weiterführende Versuche (Kapitel 5.4 und 5.5) zeigten, dass Cremiger Joghurt ein ebenso gutes Substrat darstellt, wie die Speisequarkzubereitung Albert Heijn.

Der Versuch hat in einem gewissen Grade bestätigt, dass Unterschiede der Ausgangsbelastungen durch eine Zwischeninkubation von 48 h verwischt werden. So kann man schlussfolgern, dass die 50.50 Methode eher für ja/nein-Fragestellungen in Betracht kommt und nur bedingt für quantitative Fragestellungen geeignet ist.

Die Durchführung der Vitalisierungsmethode erfolgte wie in Kapitel 4.5.3 beschrieben. Bei dieser Untersuchung wurde die Zwischeninkubation auf zwei Stunden verkürzt mit dem Ziel, die Hefen lediglich zu vitalisieren und nicht anzureichern. Somit können besser Rückschlüsse auf die Ausgangsbelastung der Proben gezogen werden.

Die Ergebnisse der Tabelle 4 aus Kapitel 5.3 zeigen, dass durch Beimpfen des Proben-Bouillon-Gemisches (100 g) mit einer Hefe nach einer Zwischeninkubation von zwei Stunden nur in zwei Chargen die Hefekontamination nachweisbar war. Allerdings fiel bei diesen Chargen immer nur eine Bestimmung positiv (Hefenachweis) aus. Der Versuch zeigte auch, dass bei einer höheren Ausgangsbelastung der Probe Hefen sicher nachgewiesen werden können.

Mit der 50.50 Methode konnten Hefen auch bei einer sehr geringen Anfangsbelastung der Proben so stark angereichert werden, dass die Kolonien nicht mehr auszählbar waren. Die Untersuchungen von drei Fruchtquark-Rückstellproben konnten die Ergebnisse, die mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae* erzielt wurden, bestätigen. Auch hier konnte nach einer Inkubation von zwei Stunden kein Hefewachstum detektiert werden.

Bei diesem Versuch wurde erstmals beobachtet, dass eine Hefekontamination schon nach einer 24stündigen Anreicherung feststellbar war. Es wurden, auf Grund der kürzeren Inkubationszeit gegenüber einer 48stündigen Anreicherung, weniger Hefen diagnostiziert. Das bedeutet, dass bei einer qualitativen Auswertung eine Verkürzung der Zwischeninkubation auf 24 h durchaus ausreicht, um eine Hefekontamination zu detektieren. Abschließend lässt sich sagen, dass die Sensibilität der Vitalisierungsmethode durch die nur zweistündige Zwischeninkubation zu stark herabgesetzt wurde. Sie stellt somit keine sinnvolle Alternative zur Untersuchungsmethode 50.50 dar.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der ermittelten KbE/g im Cremigen Joghurt bei unterschiedlichen Lagertemperaturen sowie nach einer Anreicherung von 48 h dargestellt.

Tab. 11: Kolonie bildende Einheiten im Cremigen Joghurt bei verschiedenen Lagertemperaturen und nach einer 48stündigen Anreicherung

Probe	24 h Lagerung bei 8 °C [KbE/g]	24 h Lagerung bei 20 °C [KbE/g]	24 h Lagerung bei 8 °C; 48 h Anreicherung [KbE/g]	24 h Lagerung bei 20 °C; 48 h Anreicherung [KbE/g]
1	$2,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^7$	n. a.
2	$2,6 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
3	$3,7 \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
4	$3,5 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$
5	10	$1,1 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$
6	<1	<1	$2,4 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
7	<1	<1	$8,5 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^6$
8	0	0	0	0

n. a. nicht auszählbar

Nach einer Lagerung der Proben bei 8 °C wurden zwischen $1,0 \cdot 10^1$ und $2,1 \cdot 10^5$ KbE/g ermittelt. Die Lagerung bei 20 °C ergaben zwischen $1,1 \cdot 10^2$ und $4,2 \cdot 10^5$ KbE/g. Unverständlich ist, dass bei 20 °C nur geringfügig mehr Kolonie bildende Einheiten ausgezählt wurden als bei 8 °C. Laut Engel (1988) nimmt die Generationszeit mit steigenden Temperaturen ab. Je niedriger die Temperaturen sind, desto später beginnt die logarithmische Wachstumsphase. In diesem Versuch konnten keine deutlichen Unterschiede bei den Lagertemperaturen von 8 bzw. 20 °C festgestellt werden (Abbildung 17 aus Kapitel 5.4). Da von einer konstanten Lagertemperatur (20 °C \pm 2) ausgegangen wurde, werden Temperaturschwankungen als Fehlerquelle ausgeschlossen. Es besteht die Möglichkeit, dass ein Fehler in der Versuchsdurchführung unterlaufen ist. Dieser ist jedoch in der Versuchsprotokollierung nicht mehr nachvollziehbar.

Trotzdem kann man den Versuchsergebnissen entnehmen, dass nach einer 48stündigen Zwischeninkubation in Malzextrakt-Bouillon die Kolonie bildenden Einheiten auf 10^5 bis 10^7 KbE/g anstiegen und somit nahezu keine Rückschlüsse auf die Ausgangsbelastung der Proben gezogen werden konnten.

Die Ergebnisse der 50.50 Methode (Tabelle 6 aus Kapitel 5.4) belegen ebenfalls, dass die Ausgangszellzahlen aller Proben nach einer 48stündigen Zwischeninkubation auf eine sicher nachzuweisende Anzahl Hefen heranwuchsen. Alle Platten waren mit Hefen überwachsen.

Es wird empfohlen, den Versuch zu wiederholen, um die Wachstumsrate der Hefen bei unterschiedlichen Lagertemperaturen zu überprüfen. Unabhängig vom Versuchsergebnis ist es ratsam, Halbfertig- und Endprodukte bis zur Probenaufbereitung gleichermaßen zu lagern, wenn sie nach der gleichen Methode untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Auch bei diesem Versuch bewirkte die Zwischeninkubation eine starke Anreicherung der Hefen, unabhängig vom Grad der Anfangsbelastung der Proben. Selbst bei Proben mit einer sehr geringen Ausgangsbelastung (Proben 6 und 7) wurden Hefen nach dem Anreicherungsschritt sicher nachgewiesen. Folglich kann man auf die Vorinkubation der Halbfertigprodukte bei Raumtemperatur verzichten. Stattdessen sollte man den Hefen sofort optimale Milieubedingungen schaffen, indem das Produkt umgehend mit Malzextrakt-Bouillon vermischt und bei 25 °C bebrütet wird. Laut Riemelt (2003) liegt das Wachstumsoptimum für Hefen zwischen 20 und 30 °C. Ein positiver Nebeneffekt der zuvor beschriebenen Vorgehensweise ist die Einsparung der Untersuchungszeit von bis zu einem Tag.

In Tabelle 12 ist das Vermehrungsverhalten von *S. cereviseae* nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten dargestellt.

Tab. 12: Ermittelte Anzahl KbE/g Probe der Produkte AH und CJ nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten

Probe	Anreicherung							
	AH 0 h	CJ 0 h	AH 24 h	CJ 24 h	AH 36 h	CJ 36 h	AH 48 h	CJ 48 h
1	$1,7 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
2	$1,3 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	n. a.	$1,4 \cdot 10^7$	n. a.	$2,9 \cdot 10^7$
3	$1,4 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$
4	$2,4 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$
5	30	<1	$2,7 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$
6	<1	<1	$1,5 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$
7	<1	<1	$2,8 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^4$	$9,9 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$
8	<1	<1	$2,1 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^5$	$8,8 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$
9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
10	0	0	0	0	0	0	0	0

Die Untersuchungsergebnisse ergaben, dass sich die Anzahl Kolonie bildender Einheiten bereits nach einem Zwischeninkubationsschritt von 24 h deutlich erhöhte (10^2 bis 10^6 KbE/g). Eine Verlängerung der Anreicherungszeiten auf 36 bzw. 48 h bewirkte nochmals einen deutlichen Anstieg der Hefekolonien. Bei beiden Zwischeninkubationen lagen die maximal ermittelten Werte bei 10^7 KbE/g. Der Kurvenverlauf nach unterschiedlichen Zwischeninkubationen (Abbildung 18 und 19 aus Kapitel 5.5) zeigte bei beiden Produkten, dass nach einer Verkürzung der Anreicherungszeit auf 24 h eine Hefevermehrung um mindestens zwei Zehnerpotenzen beobachtet wurde. Des Weiteren spiegelte sich nach einer 24stündigen Anreicherung die unterschiedliche Ausgangsbelastung der Proben deutlicher wieder, als nach 36 bzw. 48 h.

Die Versuchsergebnisse der 50.50 Methode (Tabelle 7 aus Kapitel 5.5) bestätigten das Vorhandensein von Hefen in den Proben 1 bis 8. In den Proben 5 bis 8 waren nach einer Anreicherung von 24 h und einer anschließenden Inkubation von drei Tagen Einzelkolonien noch gut erkennbar. Mit steigender Anreicherungszeit nahm die

Anzahl Kolonie bildender Einheiten zu. Es wurden keine Einzelkolonien beobachtet. In der Probe 9 konnten mit beiden Untersuchungsverfahren keine Hefen nachgewiesen werden. Grund dafür war die zu starke Verdünnung der Hefesuspension *S. cerevisiae*. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Petrischalen ergaben beim Oberflächenausstrichverfahren, dass bereits nach drei Tagen ein Hefewachstum zu erkennen war. Nach einer weiteren Bebrütung von vier bzw. fünf Tagen wuchsen die Kolonien zwar heran, die Anzahl Kolonie bildender Einheiten blieb jedoch die gleiche.

Aus den Ergebnissen dieses Versuchs wird geschlussfolgert, dass der Anreicherungsschritt der 50.50 Methode auf 24 h verkürzt werden kann. Der Modellorganismus *S. cerevisiae* konnte sicher nachgewiesen werden, da eine Vermehrung der Hefen um mindestens zwei log-Stufen beobachtet wurde. Des Weiteren zeigte der Versuchsverlauf, dass die Inkubation statt nach fünf Tagen evtl. schon nach drei Tagen abgeschlossen werden kann. Da die 50.50 Methode auch zum Nachweis von Schimmelpilzen dient, sollte die Inkubationsdauer vier Tage nicht unterschreiten. Laut Unterholzner (1998) haben Schimmelpilze hohe Generationszeiten von einigen Tagen. Das Referenzverfahren nach § 64 LFGB zur Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten schreibt ebenfalls eine Inkubation von vier Tagen vor.

Die Versuchsergebnisse der Tabelle 8 aus Kapitel 5.6 konnten die Beobachtungen des vorangegangenen Versuchs bestätigen. Eine 24stündige Zwischeninkubation war ausreichend, um eine Hefe anzureichern. Es konnten nach der 50.50 Methode Hefen qualitativ nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse aus Kapitel 5.2 belegten, dass eine qualitative Auswertung grundsätzlich besser für Anreicherungsverfahren geeignet ist. Wie zu erwarten war, ergaben sich nach verschiedenen Inkubationstemperaturen keine unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse, wenn die Auswertung lediglich qualitativ erfolgt. Ein Hefewachstum konnte bei 25 °C ebenso gut festgestellt werden wie bei 30 °C.

In der Kontrollprobe der Charge drei des Cremigen Joghurts wurde nach einer 24stündigen Inkubation bei 30 °C ein Hefewachstum festgestellt. Nach einer Anreicherung von 48 h bei 30 °C wurde jedoch keine Hefeentwicklung beobachtet. Bei

beiden Blindproben handelte es sich um den gleichen Probenbecher. Es wurden jeweils zehn mL nach einer Inkubation von 24 h und 48 h entnommen und im Platten-gussverfahren angesetzt. Es wird vermutet, dass es sich bei der kontaminierten Kontrollprobe um einen Luftkeim handelte. Da die Kontrollprobe nach 48 h Inkubation mikrobiologisch nicht zu beanstanden war, kann davon ausgegangen werden, dass die Kontamination erst nach der Anreicherung erfolgte.

Die Untersuchungsergebnisse der Charge vier der Speisequarkzubereitung AH wurden kritisch betrachtet, da alle Kontrollproben Hefen enthielten. Es wird davon ausgegangen, dass der 500 g Becher Albert Heijn mit Hefen kontaminiert war.

In der Charge eins der Speisequarkzubereitung Albert Heijn wurde in der Probe, die mit einer Hefe beimpft wurde, nach beiden Anreicherungen bei 30 °C kein Hefewachstum beobachtet. Entweder war der physiologische Zustand der Hefe so schlecht, dass es zu keiner Vermehrung kam oder es wurde beim Pipettieren keine Hefezelle aus der verdünnten Hefesuspension erfasst, so dass der Probenbecher gar keine Hefe enthielt, die angereichert werden konnte.

Abschließend ist zu bemerken, dass nach einer 24stündigen Inkubation Einzelkolonien besser erkennbar waren, als nach 48 h (Abbildung 20 und 21). Da die optimalen Wachstumstemperaturen zwischen 20 und 30 °C liegen, wurde bei 25 und 30 °C eine deutliche Hefevermehrung festgestellt. Die Temperaturerhöhung auf 30 °C bewirkte eine Zunahme der Wachstumsrate von *S. cerevisiae*. Dieses ist dadurch zu begründen, dass mit steigenden Temperaturen die Generationszeit der Mikroorganismen sinkt (Engel, 1988).

Von den Untersuchungsergebnissen lässt sich ableiten, dass eine Verkürzung der Zwischeninkubation auf 24 h ausreichend ist, um eine Hefekontamination nachzuweisen. Die Inkubationstemperatur von 25 °C sollte beibehalten werden, weil Einzelkolonien besser zu erkennen waren und dadurch die Auswertung erleichtert wird. Neben Hefen sollen mit der 50.50 Methode auch Schimmelpilzinfektionen detektiert werden. Laut Unterholzner (1998) bevorzugen die meisten Species Temperaturen um 25 °C. Die Referenzmethode nach § 64 LFGB zur Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten schreibt ebenfalls eine Temperatur von 25 °C vor.

Die Ergebnisse der Fruchtquark-Rückstellproben (Tabelle 9 aus Kapitel 5.6) fielen unterschiedlich aus. In der Probe Mark Brandenburg Erdbeere wurde eine Hefekontamination, unabhängig von den variierenden Parametern sicher nachgewiesen. Hingegen wurden in den Proben Mark Brandenburg Aprikose und Boordevoool Erdbeere, die vom Produktionsanfang stammten, kein Hefewachstum beobachtet. Da mit vier verschiedenen Untersuchungsvarianten keine Kontamination detektiert wurde, konnte man davon ausgehen, dass die untersuchten Rückstellproben aus mikrobiologischer Sicht nicht zu beanstanden waren. Allerdings konnten bei beiden Produkten, die zum Produktionsende entnommen wurden, sporadisch Hefen nachgewiesen werden. Von den Ergebnissen der Probe Mark Brandenburg Aprikose lässt sich auf den ersten Blick nicht direkt ableiten, welche Inkubationstemperatur bzw. Anreicherungszeit die günstigere ist.

Die Quarkbecher der Marke Mark Brandenburg beinhalten 200 g. Folglich wurde der gesamte Inhalt untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Rückstellprobe Mark Brandenburg Aprikose Hefen enthielt. Anscheinend war aber die Hefekonzentration in diesem Becher so gering, dass nicht in jeder Probe eine Mindestausgangsbelastung von einer Hefe gegeben war. Die Rückstellprobe Bordevoool Erdbeere beinhaltet 150 g. Hier wurde der gesamte Inhalt auf vier Probenbecher aufgeteilt und dementsprechend weniger Malzextrakt-Bouillon hinzugegeben, so dass das Verhältnis von Produkt und Bouillon das gleiche blieb. Es konnte lediglich ein Hefewachstum nach 24stündiger und 48stündiger Zwischeninkubation bei 25 °C beobachtet werden. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass es sich in dieser Rückstellprobe um eine Hefespecies handelte, die sich bei Temperaturen über 25 °C schlechter vermehrt. Man muss auch hier eher davon ausgegangen, dass die Ausgangsbelastung des Quarkbechers zu gering war, um in jeder Probe mindestens eine Hefe zu haben.

Auch die Versuchsergebnisse der (Tabelle 8 aus Kapitel 5.6) belegen, dass eine Verkürzung der Anreicherungszeit auf 24 h ausreichend und eine Erhöhung der Inkubationstemperatur nicht notwendig ist.

Die Versuchsergebnisse der mikroskopischen Schnellnachweismethode (Tabelle 10 aus Kapitel 5.7) stimmten mit den Ergebnissen der 50.50 Methode überein. Nach der

Durchmusterung von zehn Gesichtsfeldern wurden in allen beimpften Proben Hefen detektiert. In den Proben (Albert Heijn und Cremiger Joghurt), ausgenommen der Kontrollproben, wurden durchschnittlich zwischen einer und drei Hefen pro Gesichtsfeld beobachtet. Es zeigte sich auch in diesem Versuchsverlauf, dass anfängliche Unterschiede der Ausgangsbelastung der Probe nach einer Zwischeninkubation von 48 h nahezu verwischt werden. Laut Engel (1992) ist eine qualitative Auswertung der Schnellnachweismethode ausreichend. Das heißt, werden bei der Durchmusterung von zehn Gesichtsfeldern Hefen detektiert, kann man davon ausgehen, dass die Probe Hefen enthält.

Für die Fruchtquark-Rückstellprobe Bordevoor Erdbeere wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Ein Hefenachweis erfolgte jedoch nur in der ersten Probe. Vermutlich war die Hefekontamination der Rückstellprobe so gering, dass mit den 50 g Produkt (Probe 2) keine Hefe erfasst wurde, die dann im weiteren Untersuchungsverlauf hätte angereichert werden können. Da diese Rückstellprobe vom mikrobiologischen Labor bereits positiv auf Hefen getestet wurde, wird eine Fremdkontamination, verursacht durch einen Luftkeim, eher ausgeschlossen.

Letztlich führten beide Untersuchungsmethoden zum gleichen Ergebnis. Der Vorteil der Schnellnachweismethode gegenüber der 50.50 Methode liegt darin, dass das Untersuchungsergebnis statt nach acht Tagen schon nach zwei Tagen vorliegt. Ein Nachteil der mikroskopischen Methode ist, dass keine Differenzierung zwischen lebenden bzw. vermehrungsfähigen und nicht vermehrungsfähigen Hefen möglich ist. Da aber in der Regel von einer Rekontamination nach der Erhitzung ausgegangen wird, sollte man vermuten, dass es sich um lebende Zellen handelt. Die Kontaminationsquelle muss in jedem Fall schnellstmöglich lokalisiert werden.

Der größte Nachteil der Schnellnachweismethode gegenüber der 50.50 Methode besteht darin, dass eine Schimmelpilzkontamination schlechter detektiert werden kann. Schimmelpilze haben im Vergleich zu Hefen höhere Generationszeiten. Sie könnten mit der Schnellnachweismethode nur eindeutig identifiziert werden, wenn die Inkubationszeit ausreicht, um deutliche Schimmelpilzstrukturen (z. B. Hyphen) auszubilden. Abschließend ist anzumerken, dass die Methode sehr abhängig von der

individuellen Handhabung der Färbetechnik ist. Sie bedarf zudem Erfahrungen beim Mikroskopieren.

Als Fazit ergab sich, dass die Überprüfung der 50.50 Methode erfolgreich war. Die Lagerung der Halbfertigprodukte bei Raumtemperatur erwies sich als nicht notwendig. Eine Verkürzung der Zwischeninkubation auf 24 h ist vertretbar, da die Methode in ihrer Sensitivität nicht maßgebend eingeschränkt wird. Nach ersten Untersuchungsergebnissen kann eine Inkubation der Petrischalen statt nach fünf Tagen bereits nach drei bzw. vier Tagen abgeschlossen werden. Hier bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

Die qualitative Auswertung der 50.50 Methode ist sinnvoller, da Anreicherungsverfahren nur bedingt Rückschlüsse auf die ursprüngliche Ausgangsbelastung der Proben zulassen. Insgesamt führen die ermittelten Ergebnisse zu einer Zeiteinsparung von drei bzw. vier Tagen.

Es wird empfohlen, die veränderte Methode über einen Zeitraum von mindestens vier Monaten parallel zur 50.50 Methode durchzuführen. Dies ist erforderlich, da in diesen Versuchen lediglich mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae* gearbeitet wurde. Es muss beobachtet werden, welche Ergebnisse sich im Laboralltag ergeben.

Erste Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die mikroskopische Schnellnachweismethode eine mögliche Alternative zur 50.50 Methode ist. Hier bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen, um die Methode im Unternehmen zu etablieren. Zudem muss geprüft werden, inwieweit Schimmelpilze mit dieser Methode nachgewiesen werden können. Solche Untersuchungen könnten Inhalt einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit sein.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die Aussagekraft und statistische Auswertbarkeit der 50.50 Methode zu überprüfen. Es wurden verschiedene Anreicherungsverfahren getestet mit dem Ziel, die Untersuchungszeit zu verkürzen ohne die Sensibilität der Methodik maßgebend einzuschränken. Des Weiteren wurde geprüft, ob alternative Untersuchungsmethoden zur Anwendung kommen könnten.

Die Versuchsergebnisse zeigten, dass sich die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* während einer Zwischeninkubation in Malzextrakt-Bouillon gut anreichert. Es konnte in einem gewissen Grade bestätigt werden, dass eine 48stündige Zwischeninkubation anfängliche mikrobiologische Belastungsunterschiede der Proben verwischt. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse konnte keine erfolgreiche Überprüfung der statistischen Auswertbarkeit der 50.50 Methode durchgeführt werden.

Die Lagerung der Halbfertigprodukte bei Raumtemperatur erwies sich als unnötig. An dieser Stelle kann ein Tag Untersuchungszeit eingespart werden. Eine Verkürzung der Anreicherungszeit bewirkte eine deutlichere Widerspiegelung der Ausgangsbelastung der Proben. Auch bei einer Verkürzung der Zwischeninkubation auf 24 h wurde beim Modellorganismus *S. cerevisiae* eine Vermehrung um mindestens zwei Zehnerpotenzen festgestellt. Es wird empfohlen, den Anreicherungsschritt auf 24 h zu verkürzen. Die Untersuchungsmethode verfügt trotzdem noch über eine sehr hohe Sensitivität. Ein positiver Begleiteffekt ist die Einsparung der Untersuchungszeit von einem Tag. Die Bebrütungstemperatur von 25 °C kann beibehalten werden. Die Inkubation der Petrischalen kann statt nach 5 Tagen bereits nach 3 bzw. 4 Tagen abgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Methode wird empfohlen, Versuchsergebnisse über einen längeren Zeitraum (vier Monate) zu dokumentieren. Es liegen zu wenige Ergebnisse vor, um eine statistische Sicherheit zu haben.

Die Ergebnisse der Vitalisierungsmethode zeigten, dass eine Voranreicherung von zwei Stunden nicht ausreichte, um Hefen sicher nachzuweisen. Diese Untersuchungsmethode ist nicht sensitiv genug und stellt deshalb keine sinnvolle Alternative zur 50.50. Methode dar. Die mikroskopische Schnellnachweismethode ist prinzipiell geeignet, um eine Hefekontamination zu detektieren. Hier bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

8 Literaturverzeichnis

Fachbücher

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Dezember 1991.
Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten

Bast, E.: Mikrobiologische Methoden. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, 2001

Baumgart, J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 1. Aufl. Hamburg: Behr's, 1994

Falbe, J.; Regitz, M.: Römpp Chemie Lexikon. Band 6. 9. Auflage. Stuttgart: Thieme, 1992

Hänsel, R.; Keller, K.; Rimpler, H.; Schneider, G.: Hager Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5. Auflage. Band 6. Berlin: Springer, 1994

James, M. J.: Modern Food Microbiology. 6. Auflage. Aspen Publishers, 2000

Kellermann, R.: Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. 4. Auflage. Hildesheim: Heinrichs, 1972

Krämer, J.: Lebensmittelmikrobiologie. 4. Auflage. Stuttgart: Eugen Ulmer, 2002

Madigan, M. T. Martinko, J. M.; Parker, J.: Biology of Mikroorganisms. 8. Auflage. New Jersey: Simon & Schuster, 1997

Merck KGaA: Mikrobiologie Handbuch. Darmstadt: 1996

Müller, G.; Weber, H.: Mikrobiologie der Lebensmittel. 8. Auflage. Hamburg: Behr's, 1996

Pichardt, K.: Qualitätsmanagement Lebensmittel: Vom Rohstoff bis zum Fertigprodukt. 1. Auflage. Berlin: Springer, 1997

Reiß, J.: Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. 2. Auflage. Berlin: Springer, 1997

Riemelt, I.; Bartel, B.; Malczan, M.: Milchwirtschaftliche Mikrobiologie. 2. Auflage. Hamburg: Behr's, 2003

Schlegel, H. G.: Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme, 1992

Steffens, K.: Mikrobiologische Arbeitsmethoden. Praktikumsscript. Neubrandenburg: Hochschule Neubrandenburg, 2005

Ternes, W.: Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung. 2. Auflage. Hamburg: Behr's 1994

Unterholzner, O.: Herstellung und Anwendung von Fruchtzubereitungen für Molke-reiprodukte. 1. Auflage. Meran: 1998

Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten: Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik: Chemische, physikalische und mikrobiologische Untersuchungsverfahren für Milch, Milchprodukte und Molkereihilfsstoffe. Methodenbuch Band VI. Darmstadt: VDLUFA, 1985

Walker, G. M.: Yeast physiology and biotechnology. 1. Auflage. Cichester: 1998

Wallhäußer, K.-H.: Lebensmittel und Mikroorganismen. 1. Auflage. Darmstadt: Steinkopff, 1990

Weber, H.: Mikrobiologie der Lebensmittel: Milch und Milchprodukte. 1. Auflage. Hamburg: Behr's, 1996

Zeitschriftenartikel

Engel, G.: Vorkommen und Schnellnachweis von Hefen in Quark. Deutsche Milchwirtschaft 24 (1992), S.759-760

Engel, G.: Hefen in Quark. Deutsche Milchwirtschaft 16 (1988), S. 512-514

Engel, G.: Vergleich verschiedener Nährböden zum quantitativen Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten. *Milchwissenschaft* 37 (1982), Nr. 12, S. 727-730

Internet

Chemie-Lexikon: Triphenyltetrazoliumchlorid. <http://www.chemie.de/lexikon/d/Triphenyltetrazoliumchlorid/> Letzte Änderung am: 23.10.08; aufgerufen am: 25.10.08

Iron, R.: Schimmelpilze: Schimmelpilze als Auslöser von Nahrungsmittelallergien. <http://www.alles-zur-allergologie.de/Allergologie/Artikel/4265/Allergen.Alle.> aufgerufen am: 17.11.08

Jährig, S.: Bioaktivitäten von Wertstoffen aus *Saccharomyces* Hefen. 16.08.2007. http://opus.kobv.de/tuberlin/volltexte/2007/1633/pdf/jaehrig_silke.pdf. letzte Änderung am: 16.08.2007; aufgerufen am: 02.09.08

Max Rubner-Institut (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel): Nationale Verzehrsstudie II. <http://www.was-esse-ich.de/index.php?id=8>. aufgerufen am: 05.08.2008

Paatsch, T.: Alternaria. <http://schimmel-schimmelpilze.de/alternaria.html>. aufgerufen am: 17.11.08

Hauss, R.: Hefepilze/Blastomyceten. http://www.hauss.de/upload/pages/Neue_Seite_1610_12_7.asp. aufgerufen am: 24.07.08

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Schematisches Querschnittsbild einer Hefezelle (Schlegel, 1992)	13
Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S. cerevisiae</i> (Jählig, 2007)	15
Abb. 3: Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Müller et al., 1996)	15
Abb. 4: Schema des Lebenszyklus der Backhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ...	16
Abb. 5: Wachstumskurve einer Hefepopulation (Walker, 1998)	19
Abb. 6: Sporenbildung bei a <i>Mucor</i> sp., b <i>Penicillium</i> sp. (Reiß, 1997).....	25
Abb. 7: <i>Alternaria alternata</i> im Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung (www.schimmel-schimmelpilze.de)	26
Abb. 8: <i>Aspergillus niger</i> ; Längsschnitt eines Konidienträgers (Weber, 1996)	27
Abb. 9: Mikroskopische Strukturen von <i>Fusarium</i> spp. (Doyle et al., 2001; verändert)	28
Abb. 10: <i>Rhizopus stolonifer</i> (Reiß, 1998 verändert)	30
Abb. 11: Redoxreaktion von Triphenyltetrazoliumchlorid und Triphenylformazan (Falbe, 1992)	33
Abb. 12: Oberflächenausstrichverfahren (Madigan et al., 1997).....	35
Abb. 13: Zählkammer nach Thoma (Madigan et al., 1997)	37
Abb. 14: Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milchprodukten	40
Abb. 15: Vergleich der ermittelten Koloniezahlen der Speisequarkzubereitung AH mit und ohne Anreicherungsschritt	48
Abb. 16: Vergleich der ermittelten Koloniezahlen des Cremigen Joghurts mit und ohne Anreicherungsschritt	49
Abb. 17: Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> nach unterschiedlichen Lagertemperaturen der Proben	53
Abb. 18: Koloniezahlen in der Speisequarkzubereitung (AH) nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten	55
Abb. 19: Koloniezahlen im Cremigen Joghurt (CJ) nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten	56
Abb. 20: Entwicklung von <i>S. cerevisiae</i> in der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach einer Anreicherung von 24 h bei 25 und 30 °C	59
Abb. 21: Entwicklung von <i>S. cerevisiae</i> in der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach einer Anreicherung von 48 h bei 25 und 30 °C	59

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Begriffliche Abgrenzung von Zellzahl und Zellmasse (Müller et al., 1996).	17
Tab. 2: Ermittelte Zellzahlen der Hefesuspension <i>S. cerevisiae</i>	47
Tab. 3: Ergebnisse der beimpften Proben nach der Untersuchungsmethode 50.50.....	50
Tab. 4: Versuchsergebnisse der Vitalisierungsmethode und der 50.50 Methode ..	51
Tab. 5: Hefenachweis der Fruchtquark-Rückstellproben bei verschiedenen Anreicherungszeiten	52
Tab. 6: Ergebnisse der dotierten Joghurtproben nach der Untersuchungsme-.....	54
Tab. 7: Ergebnisse der dotierten Proben bei Anwendung der Untersuchungs- methode 50.50 nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten.....	57
Tab. 8: Hefenachweise nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten und Inkubationstemperaturen	58
Tab. 9: Hefenachweis in Fruchtquark-Rückstellproben nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten und Inkubationstemperaturen.....	60
Tab. 10: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Schnellnachweismethode und 50.50 Untersuchungsmethode.....	62
Tab. 11: Kolonie bildende Einheiten im Cremigen Joghurt bei verschiedenen Lagertemperaturen und nach einer 48stündigen Anreicherung.....	66
Tab. 12: Ermittelte Anzahl KbE/g Probe der Produkte AH und CJ nach unterschiedlichen Anreicherungszeiten	68

Anhang

Anhang A: Keimzahlbestimmung der Hefesuspension *Saccharomyces cerevisiae*

Tab. A1: Ermittelte Koloniezahlen der Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Oberflächenausstrichverfahren

	Verdünnungsstufe									Keimzahl [KbE/mL]
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
V1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	20	2	k. U.	k. U.	2,4*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	30	5	k. U.	k. U.	
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	19	4	k. U.	k. U.	
V2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	125	23	2	k. U.	k. U.	1,4*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	114	26	2	k. U.	k. U.	
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	144	20	2	k. U.	k. U.	
V3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	22	< 1	< 1	< 1	2,1*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	204	25	< 1	< 1	< 1	
V4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	35	3	< 1	k. U.	3,0*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	24	3	1	k. U.	
V5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	23	< 1	< 1	< 1	2,3*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	22	< 1	< 1	< 1	
V6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	22	3	< 1	k. U.	2,7*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	32	1	< 1	k. U.	
V7	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	25	3	1	k. U.	2,7*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	29	2	1	k. U.	
V8	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	19	6	< 1	k. U.	2,0*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	13	5	< 1	k. U.	

n. a. nicht auszählbar

k. U. keine Untersuchung

Von der Originalsuspension und jeder Verdünnungsstufe werden 0,1 mL auf YGC-Agar ausgestrichen und vier Tage bei 25 °C inkubiert. Es wird eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tab. A2: Ermittelte Keimzahlen der Hefesuspension *S. cerevisiae* mittels Thoma-Kammer

	Zählquadrat						Keimzahl [Hefen/mL]
	I	II	III	IV	V	VI	
Versuch 1	30	31	27	35	42	52	$9,0 \cdot 10^7$
Versuch 2	18	13	12	15	18	12	$3,7 \cdot 10^7$
Versuch 3	25	19	22	16	26	14	$5,1 \cdot 10^7$
Versuch 4	17	16	13	15	23	21	$4,4 \cdot 10^7$
Versuch 5	14	27	25	17	22	17	$5,1 \cdot 10^7$
Versuch 6	28	16	25	23	30	22	$6,0 \cdot 10^7$
Versuch 7	22	18	21	21	27	18	$5,3 \cdot 10^7$
Versuch 8	17	22	22	23	27	16	$5,3 \cdot 10^7$

Die Hefesuspension wurde mit steriler Kochsalz-Peptonlösung zehnfach verdünnt, bevor die Hefezellen in den Großquadraten ausgezählt wurden.

Anhang B: Überprüfung der semiquantitativen Auswertung der 50.50 Methode

Tab. B1: Ermittelte Koloniezahlen der Speisequarkzubereitung Albert Heijn ohne Anreicherungs-schritt

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	152	39	<1	$163,51 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	155	16	1		
Probe 2	n. a.	97	15	<1	<1	$103,17 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^4$
	n. a.	93	21	2	<1		
Probe 3	135	16	1	<1	<1	$151,13 \cdot 10^0$	$1,5 \cdot 10^3$
	169	13	<1	<1	<1		
Probe 4	17	1	<1	<1	<1	$15,84 \cdot 10^0$	$1,6 \cdot 10^2$
	12	4	1	<1	<1		
Probe 5	1	<1	<1	<1	<1	$1,90 \cdot 10^0$	19
	2	1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. B2: Ermittelte Koloniezahlen der Speisequarkzubereitung Albert Heijn nach 48stündiger Anreicherung

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	202	$219 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	236		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	152	$138 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	124		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	156	$126 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	96		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	104	$103 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	102		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	124	$101 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	78		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	184	28	$230,91 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^6$
	n. a.	n. a.	n. a.	268	28		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	45	5	$46,82 \cdot 10^3$	$4,7 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	n. a.	47	6		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. B3: Ermittelte Koloniezahlen des Cremigen Joghurts ohne Anreicherungs-schritt

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	136	21	2	$136,03 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	104	35	4		
Probe 2	n. a.	132	17	5	<1	$126,13 \cdot 10^1$	$1,3 \cdot 10^4$
	n. a.	110	10	6	<1		
Probe 3	150	15	3	1	<1	$151,28 \cdot 10^0$	$1,5 \cdot 10^3$
	154	12	1	<1	<1		
Probe 4	26	1	<1	<1	<1	$21,82 \cdot 10^0$	$2,2 \cdot 10^2$
	20	1	<1	<1	<1		
Probe 5	3	<1	<1	<1	<1	$2 \cdot 10^0$	20
	1	<1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. B4: Ermittelte Koloniezahlen des Cremigen Joghurts nach 48stündiger Anreicherung

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	56	$61 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^6$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	66		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	156	22	$179,09 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^6$
	n. a.	n. a.	n. a.	196	20		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	82	14	$82,73 \cdot 10^3$	$8,3 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	n. a.	75	11		
Probe 6	n. a.	n. a.	94	17	<1	$107,73 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	116	10	<1		
Probe 7	n. a.	n. a.	57	4	<1	$46,36 \cdot 10^2$	$4,6 \cdot 10^4$
	n. a.	n. a.	34	7	<1		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Anhang C: Auswirkung der Lagerunterschiede von Halbfertig- und Endprodukten

Tab. C1: Koloniezahlermittlung der beimpften Joghurt-Proben (CJ) ohne Anreicherungs-schritt

Die beimpften Proben wurden im Kühlschrank bei 8 °C gelagert.

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	208	27	4	$207,66 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	190	26	6		
Probe 2	n. a.	279	26	<1	<1	$262,90 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^4$
	n. a.	242	32	2	<1		
Probe 3	n. a.	30	8	<1	<1	$37,27 \cdot 10^1$	$3,7 \cdot 10^3$
	n. a.	39	5	<1	<1		
Probe 4	33	4	<1	<1	<1	$35 \cdot 10^0$	$3,5 \cdot 10^2$
	36	4	<1	<1	<1		
Probe 5	1	<1	<1	<1	<1	$1 \cdot 10^0$	10
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. C2: Koloniezahlermittlung der beimpften Joghurt-Proben (CJ) nach 24-stündiger Vorinkubation bei 20 °C

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	44	3	41,82*10 ³	4,2*10 ⁵
	n. a.	n. a.	n. a.	38	7		
Probe 2	n. a.	n. a.	88	7	<1	76,47*10 ²	7,6*10 ⁴
	n. a.	n. a.	63	9	2		
Probe 3	n. a.	98	11	1	<1	83,78*10 ¹	8,4*10 ³
	n. a.	68	7	1	<1		
Probe 4	182	10	<1	<1	<1	181,90*10 ⁰	1,8*10 ³
	192	14	4	<1	<1		
Probe 5	8	<1	<1	<1	<1	10,5*10 ⁰	1,1*10 ²
	13	<1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. C3: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurt-Proben (CJ)

Die Proben wurden im Kühlschrank bei 8 °C gelagert, anschließend 48 h bei 25 °C angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren weitere fünf Tage bei 25 °C inkubiert.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a	n. a	n. a	n. a	198	214*10 ⁴	2,1*10 ⁷
	n. a	n. a	n. a	n. a	230		
Probe 2	n. a	n. a	n. a	n. a	130	129,5*10 ⁴	1,3*10 ⁷
	n. a	n. a	n. a	n. a	129		
Probe 3	n. a	n. a	n. a	n. a	169	169,5*10 ⁴	1,7*10 ⁷
	n. a	n. a	n. a	n. a	170		
Probe 4	n. a	n. a	n. a	n. a	111	112*10 ⁴	1,1*10 ⁷
	n. a	n. a	n. a	n. a	113		
Probe 5	n. a	n. a	n. a	n. a	92	90*10 ⁴	9,0*10 ⁶
	n. a	n. a	n. a	n. a	88		
Probe 6	n. a	n. a	n. a	n. a	33	24*10 ⁴	2,4*10 ⁶
	n. a	n. a	n. a	n. a	15		
Probe 7	n. a	n. a	n. a	77	9	85*10 ³	8,5*10 ⁵
	n. a	n. a	n. a	97	4		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. C4: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurt-Proben (CJ)

Die Proben wurden 24 h bei 20 °C gelagert, anschließend 48 h bei 25 °C angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren weitere fünf Tage bei 25 °C inkubiert.

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1 g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	166	$144 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	122		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	179	$166,5 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	154		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	156	$134 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	112		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	186	$179,5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^7$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	173		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	36	$39,5 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^6$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	43		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	43	$40 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^6$
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	37		
Probe 8 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Anhang D: Vergleich unterschiedlicher Anreicherungs- und Inkubationszeiten

Tab. D1: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurtproben ohne Anreicherungs-schritt

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	196	30	2	192,34*10 ²	1,9*10 ⁵
	n. a.	n. a.	164	32	3		
Probe 2	n. a.	192	13	2	<1	201,81*10 ¹	2,0*10 ⁴
	n. a.	210	29	<1	<1		
Probe 3	316	26	1	<1	<1	299,55*10 ⁰	3,0*10 ³
	294	23	5	<1	<1		
Probe 4	25	2	<1	<1	<1	26,67 * 10 ⁰	2,7*10 ²
	29	<1	<1	<1	<1		
Probe 5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.	<1	<1
	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.		
Probe 9	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.	<1	<1
	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

k. U. keine Untersuchung

Tab. D2: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurtproben nach 24stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 24 h bei 25 °C angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	69	76*10 ⁴	7,6*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	83		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	48	57,5*10 ⁴	5,8*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	67		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	10	13,5*10 ⁴	1,4*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	17		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	17	3	53,28*10 ²	5,3*10 ⁴
	n. a.	n. a.	30	13	2		
Probe 6	n. a.	n. a.	32	2	<1	30,00*10 ²	3,0*10 ⁴
	n. a.	n. a.	29	3	<1		
Probe 7	n. a.	n. a.	18	<1	<1	17*10 ²	1,7*10 ⁴
	n. a.	n. a.	16	<1	<1		
Probe 8	41	2	<1	<1	<1	38,64*10 ⁰	3,9*10 ²
	38	4	<1	<1	<1		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. D3: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurtproben nach 36stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 36 h angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	140	140,5*10 ⁴	1,4*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	141		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	244	245*10 ⁴	2,5*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	246		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	206	207*10 ⁴	2,1*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	208		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	52	50,5*10 ⁴	5,1*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	49		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	45	34*10 ⁴	3,4*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	23		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	65	4	57,73*10 ³	5,8*10 ⁵
	n. a.	n. a.	n. a.	42	16		
Probe 8	n. a.	n. a.	74	11	<1	88,18*10 ²	8,8*10 ⁴
	n. a.	n. a.	98	11	<1		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. D4: Koloniezahlbestimmung der beimpften Joghurtproben nach 48stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 48 h angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	288	293*10 ⁴	2,9*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	298		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	240	232*10 ⁴	2,3*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	224		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	234	221*10 ⁴	2,2*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	208		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	115	117,5*10 ⁴	1,2*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	120		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	118	126*10 ⁴	1,3*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	134		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	53	53,5*10 ⁴	5,4*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	54		
Probe 8	n. a.	n. a.	n. a.	184	12	158,64*10 ³	1,6*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	148	5		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. D5: Koloniezahlbestimmung der beimpften Albert Heijn Proben ohne Anreicherungs-schritt

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	13	1	$17,27 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^5$
	n. a.	n. a.	n. a.	22	2		
Probe 2	n. a.	n. a.	11	1	<1	$13,18 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^4$
	n. a.	n. a.	15	2	<1		
Probe 3	n. a.	16	4	<1	<1	$14,29 \cdot 10^1$	$1,4 \cdot 10^3$
	n. a.	10	<1	<1	<1		
Probe 4	29	2	<1	<1	<1	$23,64 \cdot 10^0$	$2,4 \cdot 10^2$
	20	1	<1	<1	<1		
Probe 5	4	<1	<1	<1	<1	$3 \cdot 10^0$	30
	2	<1	<1	<1	<1		
Probe 6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 7	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 8	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.	<1	<1
	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.		
Probe 9	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.	<1	<1
	<1	k. U.	k. U.	k. U.	k. U.		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

k. U. keine Untersuchung

Tab. D6: Koloniezahlbestimmung der beimpften Albert Heijn Proben nach 24-stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 24 h bei 25 °C angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	80	86,5*10 ⁴	8,7*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	93		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	16	26,5*10 ⁴	2,7*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	37		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	38	6	45,45*10 ³	4,5*10 ⁵
	n. a.	n. a.	n. a.	51	5		
Probe 5	n. a.	n. a.	25	3	<1	26,82*10 ²	2,7*10 ⁴
	n. a.	n. a.	24	7	<1		
Probe 6	176	17	1	<1	<1	155,41*10 ⁰	1,5*10 ³
	122	25	4	<1	<1		
Probe 7	29	4	<1	<1	<1	27,73*10 ⁰	2,8*10 ²
	26	2	<1	<1	<1		
Probe 8	24	1	<1	<1	<1	20,91*10 ⁰	2,1*10 ²
	20	1	<1	<1	<1		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. D7: Koloniezahlbestimmung der beimpften Albert Heijn Proben nach 36-stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 36 h angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	260	246*10 ⁴	2,5*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	232		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	246	207*10 ⁴	2,1*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	168		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	94	122*10 ⁴	1,2*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	150		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	34	31*10 ⁴	3,1*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	28		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	112	10	98,64*10 ³	9,9*10 ⁵
	n. a.	n. a.	n. a.	88	7		
Probe 8	n. a.	n. a.	n. a.	44	5	42,73*10 ³	4,3*10 ⁵
	n. a.	n. a.	n. a.	37	8		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Tab. D8: Koloniezahlbestimmung der beimpften Albert Heijn Proben nach 48-stündiger Anreicherung

Die Proben wurden mit *S. cerevisiae* beimpft, 48 h angereichert und nach dem Oberflächenausstrichverfahren bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach drei, vier und fünf Tagen.

Verdünnungsstufe	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	\bar{x} [KbE/0,1g]	KbE/g
Probe 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.		
Probe 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	102	132*10 ⁴	1,3*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	162		
Probe 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	131	157*10 ⁴	1,6*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	183		
Probe 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	128	139*10 ⁴	1,4*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	150		
Probe 6	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	128	132*10 ⁴	1,3*10 ⁷
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	136		
Probe 7	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	82	78*10 ⁴	7,8*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	74		
Probe 8	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	36	25,5*10 ⁴	2,6*10 ⁶
	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	15		
Probe 9	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	<1	<1	<1	<1	<1		
Probe 10 (Kontrolle)	0	-	-	-	-	0	0
	0	-	-	-	-		

n. a. nicht auszählbar

Anhang E: Mikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae* in Milchprodukten

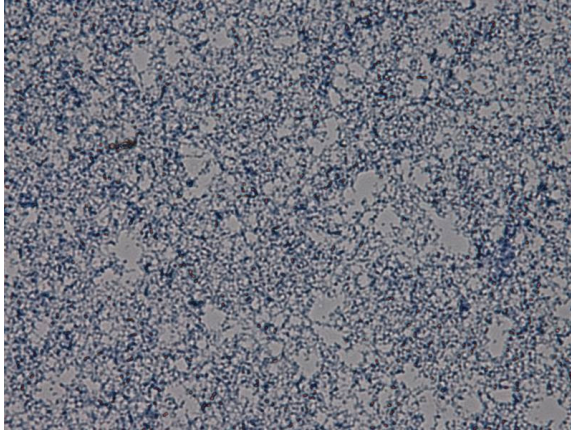


Abb. E1: Speisequarkzubereitung AH (Kontrolle)

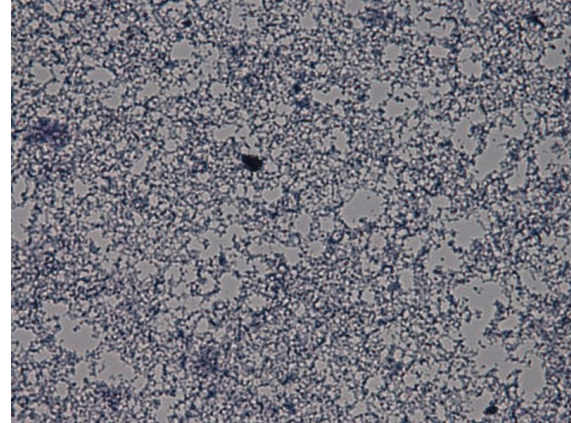


Abb. E2: Speisequarkzubereitung AH beimpft mit 10^0 Hefen

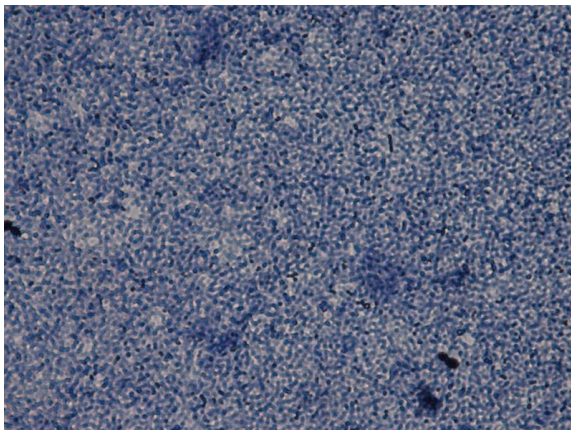


Abb. E3: Speisequarkzubereitung AH beimpft mit mit 10^1 Hefen

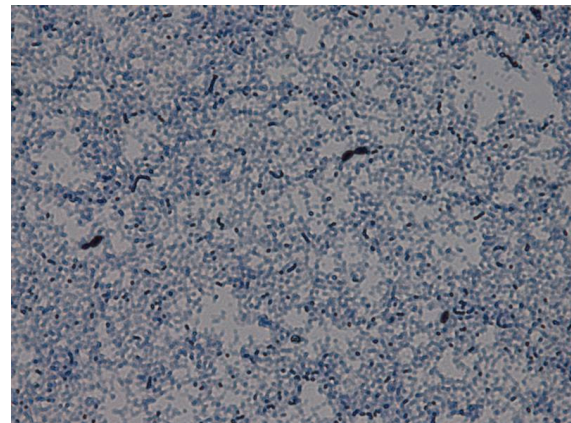


Abb. E4: Speisequarkzubereitung AH beimpft mit 10^2 Hefen

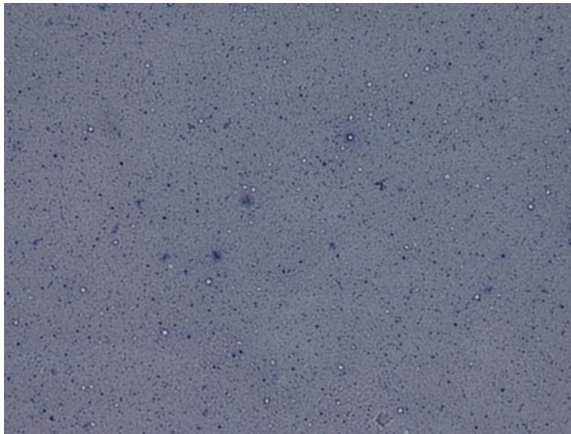


Abb. E5: Cremiger Joghurt (Kontrolle)

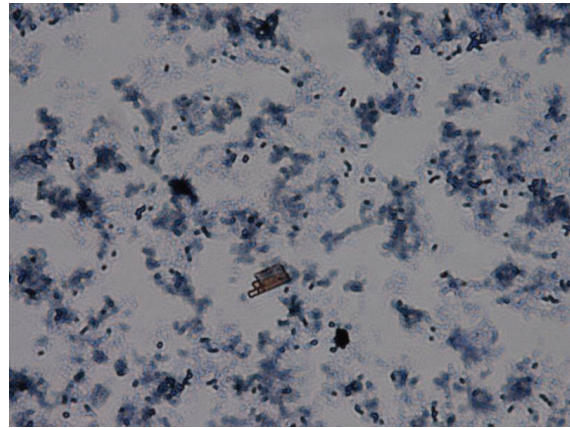


Abb. E6: Cremiger Joghurt beimpft mit 10^0 Hefen

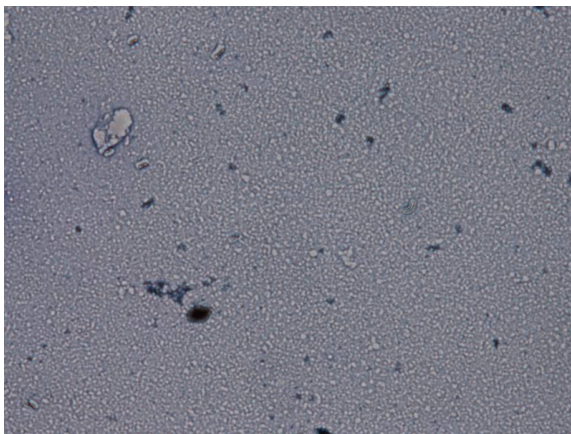


Abb. E7: Cremiger Joghurt beimpft mit mit 10^1 Hefen

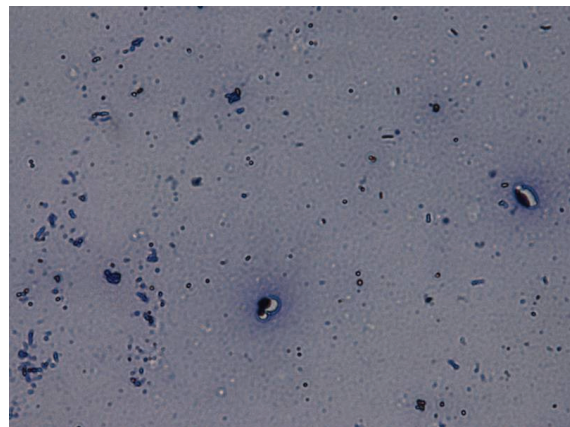


Abb. E8: Cremiger Joghurt beimpft mit 10^2 Hefen

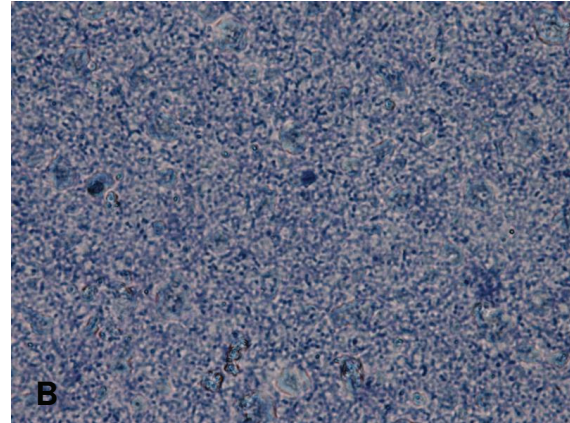
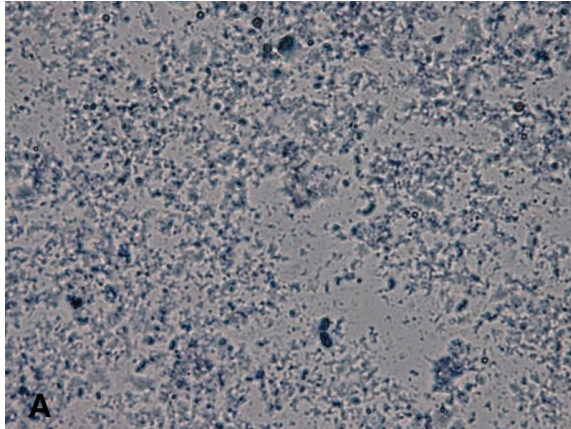


Abb. E9 Boordevool Fruchtquark Erdbeere A Hefenachweis; B kein Hefenachweis

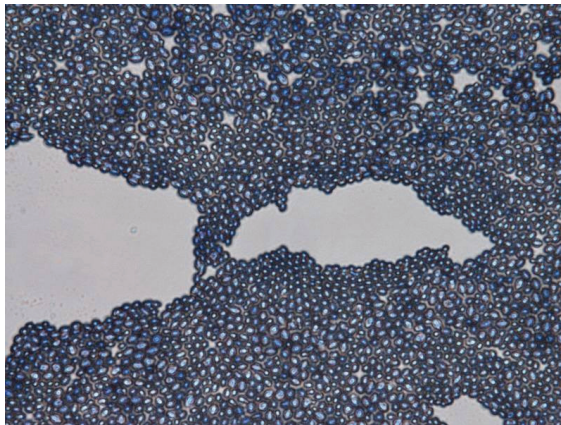


Abb. E10: *Saccharomyces cerevisiae*

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum Unterschrift