

# Sicherer Hefenachweis in Erfrischungsgetränken



Mit der Einführung des durchflusszytometrischen Nachweises von lebenden Hefezellen haben die UFAG Laboratorien AG in Zusammenarbeit mit der Ramseier Suisse AG die mikrobiologische Freigabeanalytik abgefüllter Obstsaft- und Erfrischungsgetränke vereinfacht.

Obstsaft- und fruchtsafthaltige Erfrischungsgetränke sind als Durstlöcher- und Energie- und Vitaminspender beliebt. In leichte PET-Flaschen abgefüllt, sind die Getränke beim Verbraucher geschätzt und werden als wertvolle Lebensmittel anerkannt. Es bleibt, auch bei gut beherrschten Abfüllprozessen, das Restrisiko einer geringen Verkeimung. Bewährt hat sich hier eine mikrobiologische Stichprobenanalyse auf Hefen, insbesondere auf die sehr schnell wachsenden gärkräftigen Hefen (zum Beispiel *Saccharomyces spp.*). Bei einem angepassten Stichprobenumfang kann eine gute Aussage über den mikrobiologischen Status des gesamten Abfüllprozesses getroffen werden; Hefen sollten auch bei grösseren Stichprobenumfängen nicht nachweisbar sein.

**Klassische Methoden.** Bei Untersuchungen mit den klassischen mikrobiologischen Methoden stösst die Technik schnell an ihre Grenzen. Ist bei klaren Getränken oft noch die Untersuchung grösserer Volumina (zum Beispiel bis

zu 100 ml Probe) über Membranfiltrationsverfahren möglich, so ist bei trüben Getränken nur die Plattengusstechnik anwendbar. Auch bei Verwendung von 140-mm-Petrischalen ist die zu untersuchende Menge beschränkt. In beiden Fällen liegen die Ergebnisse erst nach einigen Tagen vor, die Abwesenheit von Hefen lässt sich erst nach fünf Tagen sicher diagnostizieren.

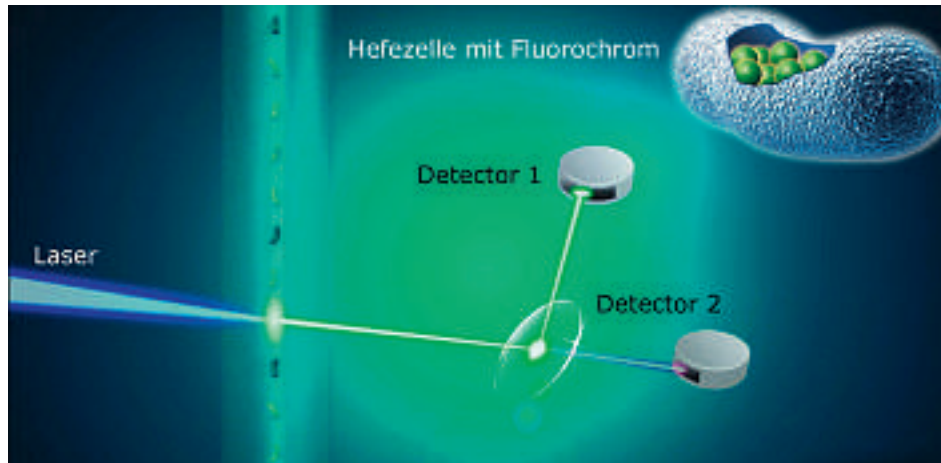
**Durchflusszytometrie.** Mit der Durchflusszytometrie nach Voranreicherung steht ein geeignetes Verfahren zur Verfügung, für das diese Begrenzungen nicht gelten. Die Methode basiert auf der Vermehrung der Hefen in einem gut geeigneten Flüssigmedium und dem anschliessenden spezifischen Nachweis der angefärbten Zellen in einem Durchflusszytometer. Bis zu 100 ml Getränk werden in einer Würzebouillon verdünnt und im Brutschrank 48 Stunden lang inkubiert. Selbst einzelne Hefezellen wachsen in dieser Zeit durch stetige Knospung und Zellteilung bis zu einer Zelldichte von

mehr als 1000 Hefezellen pro Milliliter Würzebouillon heran. Mit dieser Voranreicherung lässt sich bereits zwei Tage nach dem Analysestart der Nachweis auf Hefen mit der Durchflusszytometrie durchführen. Dazu reinigt das Laborpersonal die Voranreicherung über einen Spezialfilter von groben Saftbestandteilen und isoliert danach die Hefen und andere Saftkomponenten durch Zentrifugation.

Die Färbung des erhaltenen Rückstandes aus kleinen Zellbruchstücken des Saftes und der – falls vorhandenen – Hefezellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff geschieht im BactiFlow-ALS-System von Biomerieux vollautomatisch und zeitgesteuert über einen Pipettierroboter, der bis zu 23 Proben (plus Negativ- und Positivkontrolle) in einem Analysegang bearbeiten kann.

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde 1968 entwickelt und zunächst für die medizinische Blutanalyse verfeinert und weiterentwickelt. In den Jahren bis heute konnten Wissenschaftler eine Vielzahl verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe entwickeln, die jeweils verschiedene Zelltypen anfärben. Gleich bleibt jedoch immer das Färbeprinzip: Lebende Zellen werden mit einem Farbstoff versetzt, der durch die Zellwand oder Zellmembran ins Innere der Zelle eindringen kann und dort über eine zelleigene chemische Reaktion so verändert oder gebunden wird, dass der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Eine andere Färbetechnik erfolgt über farbstoffgebundene Antikörper, die ebenfalls sehr spezifisch an bestimmte Zelltypen binden.

**Laserdetektion.** Die gefärbten Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit durch eine sehr dünne Kapillare gepumpt. Der Durchfluss der Probesuspension in dieser Durchflussküvette wird durch hochentwickelte Strömungstechnik weiter fokussiert, sodass die gefärbten Zellen die Kapillare nur einzeln hintereinander passieren können. Kommen sie nun in dieser Kapillare in den Bereich, der mit einem Farblaser bestrahlt wird, fluoresziert der Farbstoff in der Zelle. Die Intensität dieses Leuchtens wird mit einer oder mehreren Wellenlängen aufgezeichnet. Jede einzelne Zelle wird als ein Signal registriert, das in Intensität und



### Verschiedene Zelltypen lassen sich mit Fluoreszenzfarbstoffen einfärben

Farbverteilung für die nachzuweisende Keimgattung spezifisch ist. So lassen sich gefärbte, lebensfähige Zellen gut von Zellbruchstücken oder anderen Bestandteilen mit Eigenfluoreszenz unterscheiden.

**Tiefere Nachweisgrenzen.** Die hohe Sensitivität und die deutlich verkürzte Analysenzeit waren für Ramseier die ent-

scheidenden Argumente, gemeinsam mit den Laborexperthen die mikrobiologische Qualitätskontrolle auf das Hefenachweisverfahren mit dem BactiFlow ALS umzustellen. Um die Hälfte verkürzte Analysezeiten und gleichzeitig eine tiefere Nachweisgrenze erhöhen die Sicherheit in der Produktbeurteilung deutlich und er-

lauben eine deutlich schnellere Chargenfreigabe. Alle Produkte lassen sich jetzt im Labor über ein einziges Protokoll analysieren und die Abläufe vereinheitlichen.

**Verlässliche Ergebnisse.** Durch die Einführung des durchflusszytometrischen Nachweises kann der Getränkehersteller jetzt bis zu drei Tage früher die abgefüllten Chargen freigeben. «Seit wir die Analysen bei den UFAG-Laboratorien durchführen, erhalten wir die Ergebnisse deutlich schneller. Die Resultate sind verlässlich und die Analytik klappt reibungslos», kommentiert Marc Kunz, Leiter der Qualitätssicherung im Betrieb Sursee bei Ramseier, die langjährige Zusammenarbeit mit dem akkreditierten Lebensmittelabor.

*Jochen Büttner,  
Kundenservice Mikrobiologie* ■

**Weitere Informationen:**  
**UFAG LABORATORIEN AG**  
**info@ufag-laboratorien.ch**