

Bierschädlichen Bakterien in der Hefe auf der Spur

OPTIMIERUNG DES NACHWEISES | Die Detektion von bierschädlichen Bakterien im Brauprozess ist von enormer Bedeutung. Diese Bakterien sind unter anderem in der Lage, Trübungen, Säure und geschmackliche Beeinträchtigungen im Produkt hervorzurufen. Dabei ist es gerade in der Hefereinzucht oder auch in Erntehefe äußerst schwierig, diese Bierschädlinge nachzuweisen, da ihr Wachstum durch die Hefe unterdrückt wird. Darüber hinaus treten diese Bakterien dort oftmals nur als Spurenkontamination auf. In dieser Studie wurde eine Methode entwickelt, bierschädliche Bakterien in Reinzuchthefer sicherer und schneller nachzuweisen als mit den bisherigen Methoden.

DIE QUALITÄTSSICHERUNG spielt in der Brauerei eine entscheidende Rolle. Neben chemisch-technischen Parametern ist vor allem die mikrobiologische Sicherheit des Bieres entscheidend. Ist die mikrobiologische Reinheit eines Bieres nicht gewährleistet, kann es zu negativen Aromaveränderungen, zu Trübungen, Säuerung bis hin zur Konsistenzänderung kommen. Aus diesem Grund sind Brauereien stets bemüht, mittels Stufenkontrollen sensible Bereiche in der Produktion regelmäßig mikrobiologisch zu untersuchen. In der

Brauereimikrobiologie unterscheidet man zwischen Bakterien, die optimal an das Milieu Bier angepasst sind und sich ohne Adaption darin vermehren können (obligat bierschädliche Bakterien), und solchen, die

erst nach einer gewissen Adaptionphase bzw. nur in Biertypen anwachsen können, die in ihren selektiven Eigenschaften reduziert sind (potentiell bierschädliche Bakterien).

■ Klassisches Verfahren

In vielen Brauereien werden die Produkt-, Spülwasser- oder Wischproben in einem klassischen Verfahren in diverse Nährmedien appliziert und bei für Bakterien optimalen Temperaturen (28 ± 1 °C) bebrütet, um kontaminierende Keime anzureichern. Diese Art der Untersuchung dauert je nach Art der Probe zwischen sieben und 21 Tagen, teilweise auch länger, bis sich die Zahl der Kontaminanten bis zur jeweiligen Detektionsgrenze (Mikroskop: 10^5 Zellen/ml; Realtime PCR (polymerase chain reaction): 10^2 - 10^3 Zellen/ml) vervielfältigt hat und ein sicherer Befund möglich ist. Vor allem in größeren Brauereien wird heute auf PCR-basierte Methoden zurückgegriffen,



Autoren: Dr. Hubertus Schneiderbanger (Foto); Jennifer Schneiderbanger; Prof. Fritz Jacob; Dr. Mathias Hutzler; alle Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, TU München, München

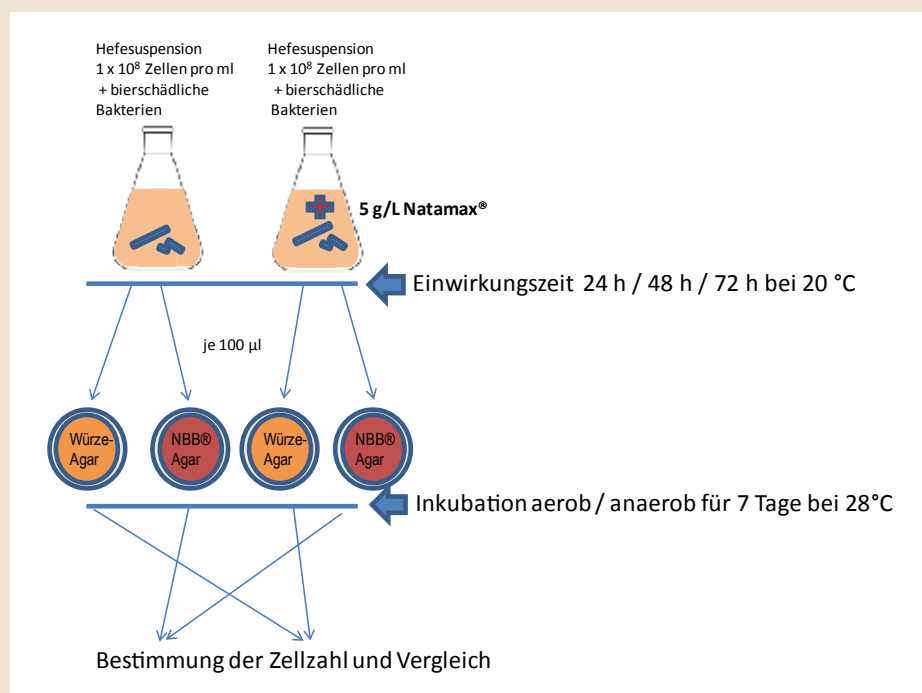


Abb. 1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

CT-WERTE DER VERSUCHSREIHE OHNE ZUGABE VON NATAMAX

| Bakterienstamm | Ausgangszellzahl [Zellen/ml] | ct-Wert 1 ohne Natamax | ct-Wert 2 ohne Natamax | ct-Wert 3 ohne Natamax | Mittelwert | Standardabweichung | Konfidenzintervall (95%) |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| <i>L. brevis</i> | 100 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>L. backi</i> | 100 | 33,2 | 31,2 | 40,0 | 34,8 | 3,8 | 4,3 |
| <i>L. casei</i> | 100 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 40,0 | 0,0 | 0,0 |
| <i>P. damnosus</i> | 100 | 40,0 | 40,0 | 31,1 | 37,0 | 4,2 | 4,8 |
| <i>L. harbinensis</i> | 100 | 32,7 | 31,8 | 32,3 | 32,3 | 0,4 | 0,5 |
| <i>L. lindneri</i> | 100 | 40,0 | 23,5 | 31,5 | 31,7 | 6,7 | 7,6 |

Tab. 1

CT-WERTE DER VERSUCHSREIHE MIT ZUGABE VON NATAMAX

| Bakterienstamm | Ausgangszellzahl [Zellen/ml] | ct-Wert 1 mit Natamax | ct-Wert 2 mit Natamax | ct-Wert 3 mit Natamax | Mittelwert | Standardabweichung | Konfidenzintervall (95%) |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| <i>L. brevis</i> | 100 | 15,5 | 16,5 | 16,6 | 16,2 | 0,5 | 0,6 |
| <i>L. backi</i> | 100 | 17,7 | 18,5 | 18,1 | 18,1 | 0,3 | 0,4 |
| <i>L. casei</i> | 100 | 40,0 | 34,0 | 33,2 | 35,7 | 3,0 | 3,4 |
| <i>P. damnosus</i> | 100 | 29,2 | 31,8 | 31,9 | 31,0 | 1,3 | 1,4 |
| <i>L. harbinensis</i> | 100 | 32,3 | 30,4 | 32,2 | 31,6 | 0,9 | 1,0 |
| <i>L. lindneri</i> | 100 | 16,8 | 16,7 | 16,5 | 16,7 | 0,1 | 0,2 |

Tab. 2

die eine schnelle Detektion geringer Konzentrationen ausgewählter Schadkeime gewährleisten.

Unabhängig von der Nachweismethode gibt es in Brauereien besondere Probleme beim Nachweis von bierschädlichen Mikroorganismen in der Kulturhefe. Sowohl in Propagationshefe wie auch besonders in Erntehefe können sich bierschädliche Bakterien „verstecken“, die inmitten der hohen Zahl an Hefezellen (z.B. 10² Zellen/ml Bakterien auf 10⁸ Zellen/ml Hefe) äußerst schwierig zu detektieren sind. Vitale Hefe unterdrückt zudem das Wachstum von Bakterien, sodass sich die meist von Grund auf geringe Zahl der in einer Probe enthaltenen Bakterien in Anwesenheit der Hefezellen selbst unter optimalen Bedingungen kaum steigert. Des Weiteren kommt bei Hefeprobe erschwerend hinzu, dass die kontaminierenden Keime nicht mechanisch aufkonzentriert werden können wie beispielsweise bei Drucktankproben über einen Membranfilter. Der konventionellen Brauereimikrobiologie bleibt daher nur

die wiederholte Bebrütung in spezifischen Nährmedien. Auch der sichere Nachweis von bierschädlichen Keimen durch moderne molekularbiologische Methoden ist nicht immer realisierbar, da die nötigen Nachweisgrenzen aufgrund der Unterdrückung durch die Brauhefe nicht erreicht werden.

■ Konkurrenzdruck reduzieren

Eine Forschungsarbeit am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität setzte sich mit dieser Problematik auseinander, mit dem Ziel, eine Methode zu entwickeln, die Hefezellen in hohen Konzentrationen sicher abtötet, ohne jedoch das Wachstum der bierschädlichen Bakterien negativ zu beeinflussen. Es sollte einerseits sichergestellt werden, dass das Wachstum der Bakterien deutlich früher einsetzen kann, da der Konkurrenzdruck der Hefezellen reduziert wird, und es zum anderen durch zusätzliche Nährstoffe, die von den autolysierenden Hefezellen freigesetzt werden, begünstigt wird

(sogenanntes Yeast Food). Das natürliche Antibiotikum Natamax® der Firma Danisco aus Kopenhagen, Dänemark, wird verwendet, um Hefezellen gezielt abzutöten. Natamax beinhaltet Natamycin, welches während der Fermentation durch das Bakterium *Streptomyces natalensis* produziert wird und mit Lactose vermengt wird. Dieses Mittel wird üblicherweise bei der Käseherstellung oder für andere unsterile Lebensmittel verwendet, um unerwünschte Hefen und Schimmelpilze zuverlässig abzutöten [1]. Es findet jedoch auch in anderen Bereichen der Lebensmittelindustrie wie z.B. bei der Produktion von Fisch- und Fleischerzeugnissen Verwendung. Natamycin greift in die Endozytose (aktive Aufnahme von Membranvesikeln in die Zelle) von Hefezellen ein, in dem es an Ergosterol bindet [2, 3, 4]. Im Gegensatz zu anderen fungiziden Mitteln wie Filipin und Nystatin wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran durch Natamycin nicht erhöht [4, 5]. Das heißt, Natamycin verhindert die Vermehrung von Hefen und Schimmelpilzen und führt zum Tod der Zellen, allerdings nicht durch den Austritt essentieller Zellbestandteile aufgrund einer Permeabilitätserhöhung der Membran. Die genauen Wirkweisen sogenannter polyener Antimycotica sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt, aber weitläufig diskutiert [6, 7, 5, 8, 9, 4, 10, 11, 3]. Das Wachstum von Lactic acid bacteria (LAB) wird durch die Zugabe von Natamycin nicht beeinflusst [12]. In verschiedenen Versuchsansätzen, die sowohl kulturelle als auch molekularbiologische Methoden umfassten, wurde in dieser Studie überprüft, ob die Zugabe von Natamax zur zu überprüfenden Hefeprobe die Detektion bierschädlicher Bakterien in hefehaltigen Proben beschleunigen kann (Abb. 1). Eine Zeitersparnis käme in der Praxis jedem braumikrobiologischen Labor zu Gute und am Ende auch der konsultierenden Brauerei, die die Befunde schneller erhalten und entsprechend reagieren kann.

Alle Proben ohne die Zugabe von Natamax waren nach der Inkubation auf Würzeagar mit Hefe überwachsen, so dass keine konkrete Zellzahl mehr festgestellt werden konnte. Die Zugabe von 5 g/l des Antibiotikums führte bereits nach einer Einwirkzeit von 24 h dazu, dass keine Hefekolonien nach der aeroben Bebrütung auf Würzeagar erkennbar waren. Aus den identischen Proben wurden 100 µl nach

24 h, 48 h und 72 h entnommen, auf NBB®-Agar ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen bei 28 °C bebrütet, um die bierschädlichen Bakterien nachzuweisen (siehe Abb. 2).

Mit der Verlängerung der Einwirkzeit des Antimykotikums steigt auch die Anzahl der Kolonien von *L. brevis* auf NBB-Agar. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Kolonien in Abhängigkeit von der eingesetzten Ausgangskeimzahl verzeichnet werden. Die geringe Wiederfindungsrate (z.B. Ausgangskeimzahl 10^4 Keime/ml; Keimzahl nach 48 h 150 Kolonien/100 μl = $1,5 \times 10^3$ Zellen/ml) erklärt sich durch die Exposition der Bakterienzellen mit Stress, ausgelöst durch das hefehaltige Medium, und durch die Tatsache, dass eine Kolonie auf Agar nicht einer Zelle entsprechen muss, sondern meist aus mehreren Zellen in einem Verbund besteht. Auch wenn die Ausgangskeimzahl von 10^4 Zellen/ml die besten Ergebnisse erbrachte, entspricht diese Konstellation nicht der für die Praxis erforderlichen Problemstellung. Die Zugabe des Antibiotikums sollte vor allem Spurenkontaminationen schneller und sicherer nachweisen, daher wurden in den folgenden Versuchen Bakterien-Zellzahlen von 10^1 und 10^3 Zellen/ml gewählt.

Bei einer Ausgangskeimzahl von 10^3 Zellen/ml ließ sich bei dem Keim *L. brevis* keine signifikante Steigerung der Keimzahlen durch die Zugabe des Antimykotikums ausmachen, da in beiden Ansätzen die Agarplatten vollständig überwachsen waren. *L. casei* dagegen ließ sich in beiden Versuchsansätzen (mit und ohne Natamax) nach 48-stündiger Einwirkzeit nicht mehr kultivieren. Bei den vier anderen Spezies konnte eine signifikante Steigerung der Keimzahlen durch die Zugabe von Natamax erzielt werden (siehe Abb. 3).

Beim Einsatz von lediglich 10 Zellen/ml wuchs *L. brevis* ebenfalls am schnellsten und überwuchs die entsprechenden Agarplatten sowohl im Ansatz mit wie auch ohne Natamax-Zugabe. *L. casei* und *P. damnosus* konnten unter den gewählten Bedingungen nicht kultiviert werden. Die Endkeimzahlen von *L. backi* unterschieden sich zwischen dem Ansatz mit und ohne Antibiotikum nicht signifikant. Eine deutliche Zellzahlsteigerung war bei den Keimen *L. harbinensis* und *L. lindneri* erkennbar (siehe Abb. 4).

Das kulturelle Nachweisverfahren zeigt, dass mit Hilfe der Natamax-Zugabe eine höhere Keimzahl an Bakterien de-

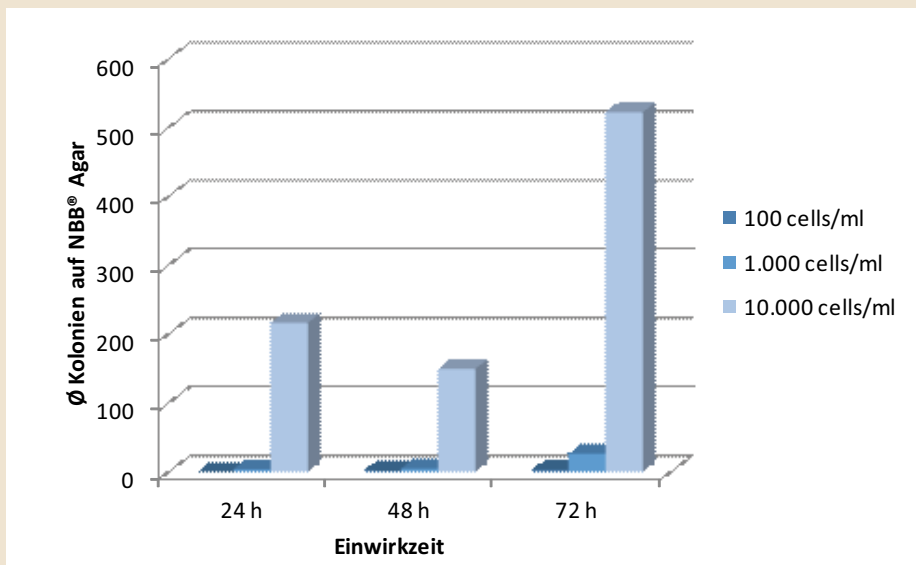


Abb. 2 Zellzahlveränderung von *L. brevis* in Abhängigkeit von der Ausgangskeimzahl und der Natamax-Einwirkungszeit

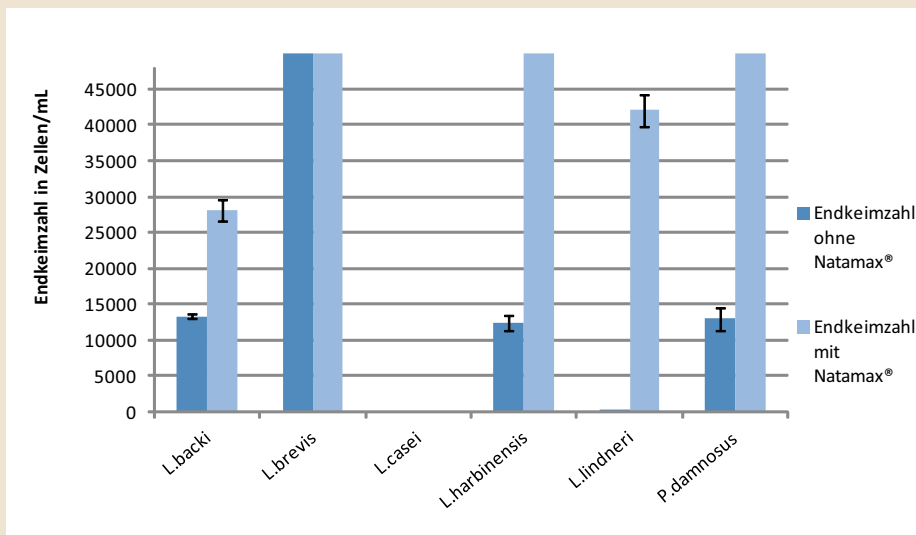


Abb. 3 Endkeimzahl der Proben mit und ohne Natamax-Zugabe bei einer Ausgangskeimkonzentration von 10^3 Zellen/ml

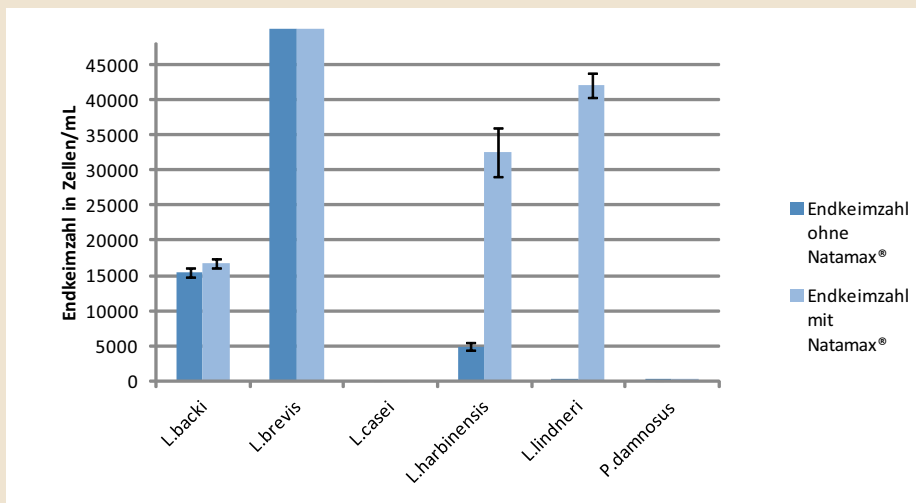


Abb. 4 Endkeimzahl der Proben mit und ohne Natamax-Zugabe bei einer Ausgangskeimkonzentration von 10^1 Zellen/ml

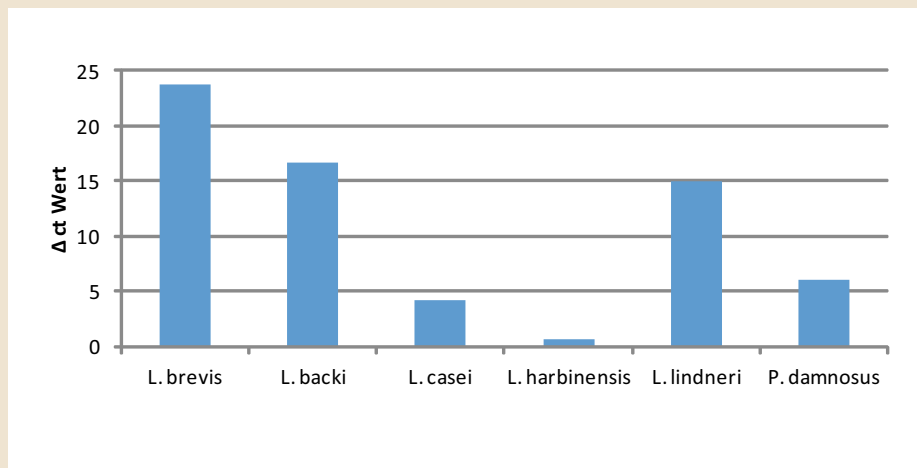


Abb. 5 Delta ct-Werte (= ct-Wert ohne Natamax – ct-Wert mit Natamax)

tektiert werden können. Diese Ergebnisse wurden mittels PCR-Untersuchung verifiziert. Da übliche PCR-Systeme eine Mindestkeimzahl von 100-1000 Keimen für einen sicheren Nachweis benötigen und die grundsätzlichen Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum vorangegangenen Versuch nicht verändert werden sollten, wurde mit einer Ausgangskeimzahl von 100 Zellen pro Milliliter gearbeitet. In den Tabellen 1 und 2 sind die entsprechenden ct-Werte dargestellt. Hierbei entspricht ein ct-Wert von 40 dem maximalen ct-Wert des verwendeten PCR-Systems. Das heißt, die in der Probe enthaltene DNA-Menge ist bei einem ct-Wert von 40 in zu geringen Mengen vorhanden, um detektiert zu werden.

Wie aus den Tabellen 1 und 2 sowie Abbildung 5 hervorgeht, konnten die Ergebnisse aus den Versuchen mit kultureller Anreicherung (Abb. 3 und 4) verifiziert werden. Die DNA aller untersuchten Bierschädlinge konnte in höheren Konzentrationen durch die Zugabe von Natamax nachgewiesen werden. Somit liegen alle ct-Werte unterhalb der untersuchten Proben, die keine Zugabe des Antibiotikums erfahren haben. Zwar lagen die ct-Werte der Proben von *L. casei*, *L. harbinensis* und *P. damnosus* recht hoch, aber dennoch im detektierbaren Bereich. Dies war ohne die Zugabe von Natamax nicht möglich.

Fazit

Durch die Verwendung des Natamycin-haltigen Antibiotikums konnte die Kulturhefe in einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml nach 48 h sicher abgetötet werden. Das Wachstum der relevantesten Bierschädlinge wurde dadurch nicht beeinflusst. Eine

Kontaktzeit von 24 h mit Natamax führte darüber hinaus zu einer signifikant höheren Keimzahl an bierschädlichen Bakterien, die auf Agarplatten nachweisbar waren. Diese Ergebnisse konnten mittels PCR-Untersuchungen bestätigt werden. Durch die Zugabe von 5 g/l Natamax zu herkömmlichen Hefeproben ist es demnach möglich, Spurenkontaminationen schneller und sicherer zu detektieren. Dies bedarf keinem relevanten Mehraufwand im Laboralltag in einer Brauerei, führt jedoch zu einer optimierten Qualitätssicherung. ■

Quellen

1. Aparico, J. E.; Colina, A. J.; Ceballos, E.; Martin, J. F.: „The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin – A New polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes”, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1999, S. 10133-10139.
2. Heese-Peck, A.; Pichler, H.; Zanolari, B.; Watanabe, R.; Daum, G.; Riezman, H.: „Multiple functions of sterols in yeast endocytosis”, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2002, S. 2664-2680.
3. Munn, A. L.; Heese-Peck, A.; Stevenson, B. J.; Pichler, H.; Riezman, H.: „Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast”, *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1999, S. 3943-3957.
4. Van Leeuwen, M. R.; Golovina, E. A.; Dijksterhuis, J.: „The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*”, *Journal*

of Applied Microbiology, 106, 2009, S. 1908-1918.

5. Welscher, Y. M. T.; Ten Napel, H. H.; Balague, M. M.; Souza, C. M.; Riezman, H.; De Kruiff, B.; Breukinko, E.: „Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane”, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 2008, S. 6393-6401.
6. Opekarova, M.; Tanner, W.: „Membrane Transport Inhibition as Mode of Action of Polyene Antimycotics: Recent Data Supported by Old Ones”, *Food Technology and Biotechnology*, 52, 2014, S. 8-12.
7. Bolard, J.: „How do the Polyene Macrolide Antibiotics Affect the Cellular Membrane-Properties”, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 864, 1986, S. 257-304.
8. Hamilton-Miller, J. M. T.: „Chemistry and Biology of Polyene Macrolide Antibiotics”, *Bacteriological Reviews*, 37, 1973, S. 166-196.
9. Streekstra, H.; Verkennis, A. E. E.; Jacobs, R.; Dekker, A.; Stark, J.; Dijksterhuis, J.: „Fungal strains and the development of tolerance against natamycin”, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 2016, S. 15-22.
10. Van Leeuwen, M. R.; Smant, W.; De Boer, W.; Dijksterhuis, J.: „Filipin is a reliable in situ marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation”, *Journal of Microbiological Methods*, 74, 2008, S. 64-73.
11. Van Leeuwen, M. R.; Van Doorn, T. M.; Golovina, E. A.; Stark, J.; Dijksterhuis, J.: „Water- and Air-Distributed Conidia Differ in Sterol Content and Cytoplasmic Microviscosity”, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2010, S. 366-369.
12. Romero-Gil, V.; Garcia-Garcia, P.; Garrido-Fernandez, A.; Arroyo-Lopez, E. N.: „Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in table olives”, *Food Microbiology*, 54, 2016, S. 79-86.
13. Bast, E.: *Mikrobiologische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999.