

Qualitätssicherung beginnt bei der Hefeanzucht

HEFE IN REINSTFORM | Die kontinuierliche Qualität eines Bieres hängt von vielen Faktoren ab. Neben den Rohstoffen Wasser, Malz und Hopfen ist die Brauereihefe ein wichtiger Bestandteil, der zum Gelingen eines qualitativ hochwertigen Bieres beiträgt. Das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität der TU München hat eine umfassende Qualitätssicherung der Kulturhefeanzucht etabliert, die die hohen Ansprüche eines Bierbrauers an eine Hefereinkultur erfüllen.

DAS INSTITUT BIETET eine Vielzahl an Brauerei-, Brennerei-, Wein-, und Sektheffen zum weltweiten Versand an. Ebenso werden Bakterienstämme zur Herstellung von alternativ fermentierten Getränken oder zur biologischen Säuerung offeriert. Tabelle 1 zeigt die verfügbaren Fermentationsorganismen, sowie deren taxonomische und technologische Einordnung.

Es stehen im Bereich Hefereinkulturen drei verschiedene Versandformen zur Verfügung, die individuell je nach Bedarf der Brauerei geordert werden können: Reinkulturhefe auf Schrägagar, circa 10 ml Reinkulturhefesuspension auf steriler Watte oder circa 500 ml Reinkulturhefesuspension in einer sterilen Aluminiumflasche. Die Qualitätssicherung spielt während der einzelnen Stufen der Hefepropagation eine wichtige Rolle. Um eine optimale Reinkultur, frei von bierschädlichen Organismen und anderen Begleitkeimen, zu gewährlei-

sten, kommen diverse mikro- und molekularbiologische Untersuchungsmethoden zum Einsatz. Abbildung 1 veranschaulicht die Anzuchtzeiten der verschiedenen Hefeversandtypen und die Zeitpunkte der Qualitätssicherungsprobenahme.

Absolute Keimfreiheit

Durch die Qualitätssicherungsmatrix des Forschungszentrums Weihenstephan

für Brau- und Lebensmittelqualität wird festgelegt, wie Reinzuchthefen und Bakterienkulturen und deren Anzuchtmedien (z.B. Würze) und Versandbehältnisse mit Selektivmedien untersucht werden, um unerwünschte Fremdorganismen (bierschädliche Bakterien, Fremdhefen, Begleitflora wie z.B. Würzebakterien) nachzuweisen. Reinzuchthefen und Bakterienkulturen sollen hierbei stets frei von Fremdorganismen sein. Man spricht hierbei von absoluter Keimfreiheit der Mikroorganismen der Starterkultur. In diesem Zusammenhang müssen Reinzuchthefestämme, die verschiedenen Arten angehören (z.B. obergärige Brauereihefestämme der Art *Saccharomyces cerevisiae* und untergärige Brauereihefestämme der Art *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis*), mit unterschiedlichen Nährmedien untersucht werden, um die potenziell schädliche Flora nachzuweisen. Gleiches gilt für Spezialhefen – die meist den Nicht-*Saccharomyces*-Hefen angehören – und für Bakterienstarterkulturen. Ziel der

	Gärverhalten/ Flockungsverhalten		Biertyp/Getränktyp	Gattung/Art
Brauerei- hefestämme	untergärig	Bruchhefe	Pils, Export, Helles, Lager, untergäriges Spezialbier, untergäriges Leichtbier etc.	<i>S. pastorianus (ssp. carlsbergensis)</i>
		Staubhefe		
	obergärig	Staubhefe	Weizenbier, Ale, Stout, Kölsch, Alt, belgische Spezialbiere etc.	<i>S. cerevisiae</i>
	obergärig / untergärig	Staubhefe	alkoholarmes Bier	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
Brennerei-, Wein-,Sekt- hefestämme	obergärig	Staubhefe	Wein, Fruchtwein, Sekt, Brennereimaischen, etc	<i>S. cerevisiae</i>
Bakterien- stämme	-	-	alternativ fermentierte malzbasierte Getränke	<i>Gluconobacter sp. L. amylolyticus L. amylovorus</i>

Tab. 1 Verfügbare Fermentationsorganismen und deren taxonomische und technologische Einordnung

Autoren: D. Stretz, M. Hutzler, M. Grammer, K. Müller-Auffermann, H. Schneiderbanger, D. Cotterchio, F. Jacob, Technische Universität München, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising

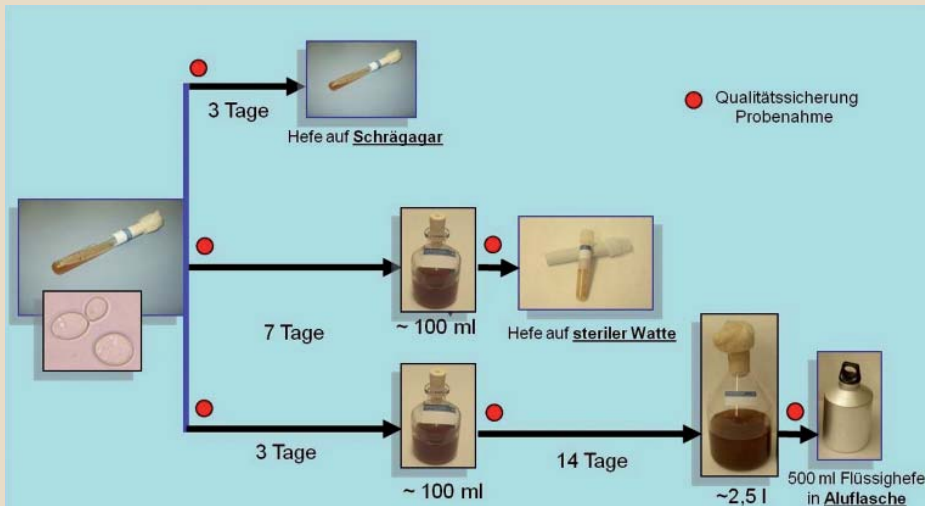


Abb. 1 Anzuchtzeiten der verschiedenen Hefensandtypen und die Zeitpunkte der Qualitätssicherungsprobenahme

Qualitätssicherungsmatrix ist eine reine Starterkultur, die Kunden des Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität angeboten werden kann.

Auf die einzelnen Überprüfungsmethoden der Nährmedien, der Versandgefäße der Spezialhefen und Bakterienstämme wird hier nicht weiter eingegangen, da im Rahmen dieses Artikels der Blick auf die Qualitätssicherung der unter- und obergärigen Brauereikulturhefen fokussiert werden soll.

Tabelle 2 verdeutlicht die aufwändige Überprüfung der Hefereinkulturen und deren umfassende Untersuchungsmethoden.

■ Nachweis von Fremdorganismen

Untergärige Brauereikulturhefen können bei einer Temperatur von 37 °C nicht wachsen. Der Großteil der Arten von wilden Hefen und obergärige Brauereikulturhefen vermögen bei dieser Temperatur zu wachsen [1, 3]. Wird untergärige Kulturhefe in ein Hefe-Universalmedium wie z.B. Würze, YPG, YGC oder YM inokuliert und dieses bei 37 °C bebrütet, können – falls eine Kontamination vorliegt – wilde Hefen und obergärige Brauereikulturhefen nachgewiesen werden (Tab. 2.1) [3].

Brauereikulturhefen können bei einer Anwesenheit von über 200 ppm Kupfersulfat (CuSO_4) in einem Nährmedium nicht wachsen. Der Großteil an wilden Hefen wird von dieser Konzentration nicht gehemmt. Somit ermöglicht ein Hefeuniversalmedium (z.B. YM) mit einem Zusatz von 200 ppm CuSO_4 einen Nachweis von wilden Hefen in unter- und obergärigen Brauereikulturhefen (Tab. 2.2) [2, 3, 7].

Das Überimpfen der aktiven Reinkulturen findet in 4-6-wöchigem Turnus statt. Zusätzlich zu den Fremdhefenachweisen YM 37 °C und YM + CuSO_4 werden die frischen Chargen mittels Kristallviolettagar (*Saccharomyces*-Fremdhefen), Lysinagar (Nicht-*Saccharomyces*-Fremdhefen) und EV-Bier (endvergorenes Bier -> Nachweis übervergärender Hefen) kontrolliert (Tab. 2.3) [8, 9].

Mit dem vorevakuierten Nährmedium NBB-Bouillon können *Pediokokken*, *Laktobacillen* und gram-negative Bierschädlinge nachgewiesen werden [1]. Hierbei wird ein Tropfen bzw. ein Tupfer der Reinkulturhefe in ein NBB-Bouillon Röhrchen gegeben (Tab. 2.4).

Die Hefe soll auch frei von anderen Begleitorganismen (z.B. Würzebakterien, Indikatorkeime) sein. Um Bakterien der Begleitflora nachzuweisen, eignet sich das Nährmedium Hefewasser. Bei der Untersuchung von Brauereikulturhefen mit Hefewasser sollten keine Bakterien festzustellen sein. Dieser Test ist ein Bestandteil der Hefereinzuchtüberprüfung, um eine absolute Freiheit von Fremdkeimen in einer Reinkulturhefe zu gewährleisten (Tab. 2.5).

Die mikroskopische Kontrolle von Hefen ist zwar als ungenau (geringe Nachweisgrenze) und subjektiv (abhängig von mikroskopischer Erfahrung des Mitarbeiters) einzustufen, jedoch unabdingbar, um einen schnelleren Überblick des mikrobiellen Status der Hefereinkulturen zu erhalten. So können z.B. grobe Produktionsfehler (partikelhaltige Würzen, Begleitflora) schnell vorevaluiert werden. Sind Fremdorganismen schon in der mikroskopischen Vorana-

lyse zu sehen, ist die Hefe sofort zu verwerfen (Tab. 2.6).

Frisch propagierte Reinzuchthefen sollten möglichst viele lebende Zellen beinhalten bzw. sollte die Anzahl an toten Zellen der Betriebshefen möglichst gering sein. Mittels Methylenblaulösung können tote Hefezellen identifiziert und prozentual angegeben werden. Die Viabilität der Hefen sollte nicht unter 95 Prozent liegen (Tab. 2.7).

Schnellnachweis mittels PCR

Die Nährmediennachweise 2.1-2.5 nehmen bis zur Auswertung 3-7 Tage in Anspruch. Um schon 2-4 h nach der QS-Probenahme eine Aussage über den mikrobiellen Status treffen zu können, werden am Forschungszentrum Weihenstephan moderne Polymerase-Chain-Reaction (PCR)-Analysen parallel zum Kultivierungsansatz durchgeführt. Es stehen Detektionssysteme für obligat und potenziell bierschädliche Bakterien und für ober- und untergärige

Hefen zur Verfügung. (Tab. 2.8-2.10) [3-6]. Hefeproben können somit schnell und zuverlässig auf ihre richtige Art-Zugehörigkeit hin untersucht werden und zudem können Spurenkontaminationen von bierschädlichen Bakterien und der „falschen“ Brauhefeart (z.B. untergärig in obergärig oder obergärig in untergärig) nachgewiesen werden [3-5]. Somit sind auch Verwechslungen ober- und untergäriger Hefen und Impffehler kontrollierbar und abschließbar.

Abb. 2 veranschaulicht die Auswertung von Real-Time PCR Analysen zur Qualitätskontrolle der Reinzuchthefen, welche am Forschungszentrum Weihenstephan eingesetzt werden. Bild A in Abbildung 2 zeigt den Nachweis bierschädlicher Bakterien, Bild B die Identifizierungskurve, Bild C den Nachweis untergäriger Hefen und Bild D den Nachweis obergäriger Hefen. Wird nun zum Beispiel eine saubere untergärige Reinzuchtheffe *S. pastorianus ssp. carlsbergensis* W 34/70 untersucht, müssen die Kurven A negativ, B negativ, C positiv und D negativ verlaufen. Somit ist

eine schnelle Reinheitskontrolle innerhalb von vier Stunden möglich. Es ist noch zu ergänzen, dass dem Forschungszentrum Weihenstephan weitere PCR-Nachweise für u. a. wilde Hefen, Essigsäurebakterien, Milchsäurebakterien, *Enterobacteriaceae* zur Verfügung stehen, diese jedoch nur im Verdachtsfall bzw. für Chargenkontrollen eingesetzt werden.

Differenzierung von Hefen auf Stammebene

Neben den erwähnten Methoden kann auch eine Differenzierung von Hefen auf Stammebene durchgeführt werden (siehe Abb. 3). Hierbei kommt die kombinierte Methodik PCR-Kapillarelektrophorese zum Einsatz. Abb. 3 zeigt exemplarisch, dass die Kapillarelektrophorese-Bandenmuster von *Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis* W 34/70, W 59 und *Saccharomyces cerevisiae* W 68, WB4 differenziert werden können. W 34/70 und W 59 sind zwei untergärige Bruchhefen, W 68 ist eine obergärige Weizenbierhefe und WB4 ist eine Brennereihefe.

UNTERSUCHUNGSMETHODEN ZUR QUALITÄTSSICHERUNG DER HEFEREINKULTUREN

Nachweis von	Kultivierungsmethoden				
	wilden und OG Saccharomyces Hefen	wilden Hefen	Fremdhefen		Bakterien
Untersuchung	1. 37°C Test = gehopfte Würze (UG)	2. YM + CuSO ₄ (OG)	3. KV, Lysin, EV (Chargenkontrolle)	4. NBB-Bouillon	5. Hefewasser
<i>Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis</i> UG Hefen	X			X	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OG Hefe		X		X	X
Nachweis von	Mikroskopische Methoden		Molekularbiologische Untersuchungen		
	Fremdorganismen	toten Hefezellen	Bakterien	Hefeidentifizierung	
Untersuchung	6. Mikroskopieren Fremdorganismen Fremdpartikel	7. Viabilität Untersuchung auf tote Zellen %	8. PCR Screening bierschädli. Bakt.	9. PCR Saccharomyces pastorianus	10. PCR Saccharomyces cerevisiae
<i>Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis</i> UG Hefen	X	X	X	X	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OG Hefen	X	X	X	X	X

Tab. 2

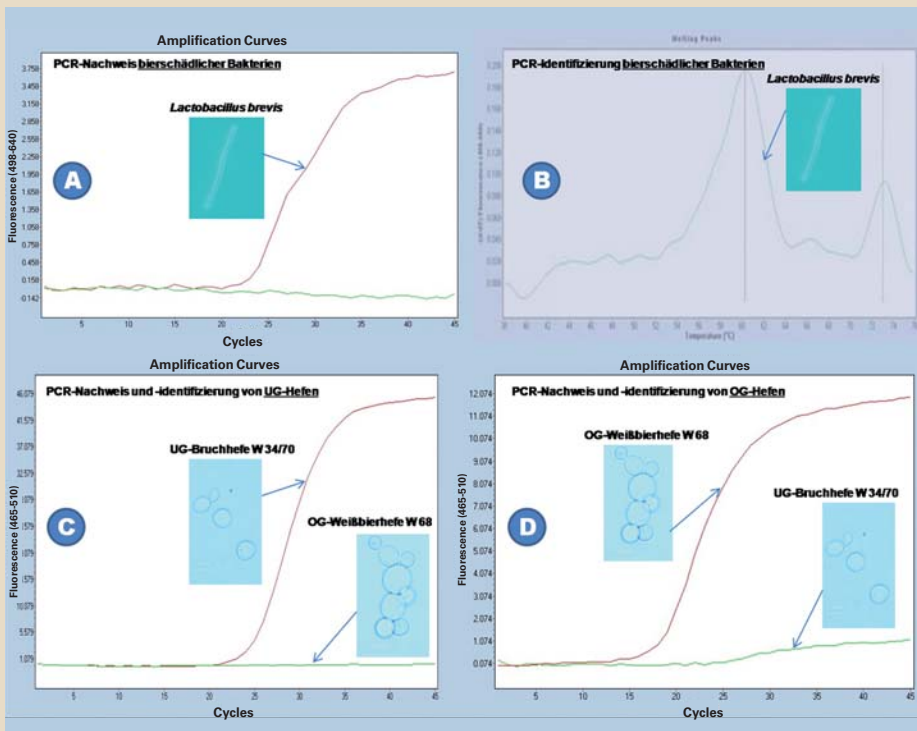


Abb. 2 Nachweis (A) und Identifizierung (B) bierschädlicher Bakterien am Beispiel *Lactobacillus brevis* und Nachweis und Identifizierung von untergärigen Hefen/ *S. pastorianus* ssp. *carlsbergensis* (C) und obergärigen Hefen/ *S. cerevisiae* (D) mittels Real-Time PCR Analytik

Diese Methodik eignet sich zur regelmäßigen Kontrolle der Stammidentität. Weicht das Bandenmuster vom stammsspezifischen originären Bandenmuster ab, liegt eine Kontamination mit einem weiteren Stamm vor, oder der Stamm hat sich genetisch verändert. Das Forschungszentrum Weihenstephan arbeitet an einer Erweiterung dieses Systems und an einer Referenzdatenbank von Kapillarelektrophogrammen.

Resümee

Zusammenfassend wurde die Qualitätssicherung für untergärige und obergärige Brauereihefen in Auszügen dargestellt. Für alle weiteren Mikroorganismen, die am Forschungszentrum Weihenstephan angeboten werden, bestehen äquivalente Qualitätssicherungssysteme.

Die mikroskopischen, mikro- und molekularbiologischen Methoden werden in der Abteilung Mikrobiologie des Forschungszentrums Weihenstephan, welche nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert ist, durchgeführt.

Literatur:

1. Back, W., Farbatlas und Handbuch der Getränkemikrobiologie, Vol. 1, Fachverlag Hans Carl Nürnberg, 1994.
 2. Brandl, A., Entwicklung und Opti-

mierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikroorganismen zur Routine-Anwendung in Brauereien. Dissertation, TU München, Freising-Weihenstephan, 2006.

3. Hutzler, M., Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Dissertation, TU München, Freising, 2009.
 4. Hutzler, M., Getränkerelevante Hefen – Identifizierung und Differenzierung. 1st ed. SVH-Verlag, Saarbrücken, 2010.
 5. Hutzler, M., Schuster, E. und Stettner, G., Ein Werkzeug in der Brauereimikrobiologie – Real-Time PCR in der Praxis. Brauindustrie, 2008, 4, S. 52 - 55.
 6. Kiehne, M., Berghof-Jäger, K., Fandke, M. and Grönewald, C., 2003. Detection of beer spoilage organisms by real-time PCR,

Wann war doch gleich...?

www.brauwelt.de – Kalender

Proc. 29th EBC Congr. Dublin. Fachverlag Hans Carl [CD-ROM], Nürnberg.
 7. Salek, A., Verbessertes kultureller Nachweis von Wildhefen. BRAUWELT, 2002, 44, S. 1580 - 1583.
 8. Seidel, H., Differenzierung zwischen Brauerei-Kulturhefen und wilden Hefen, Teil I: Erfahrungen beim Nachweis von wilden Hefen auf Kristallviolenagar und Lysinagar. Brauwissenschaft, 1972, 25, S. 384 - 398.
 9. Seidel, H., Differenzierung zwischen Brauerei-Kulturhefen und wilden Hefen von wilden Hefen auf SDM. Brauwissenschaft, 1973, 26, S. 179 - 183.

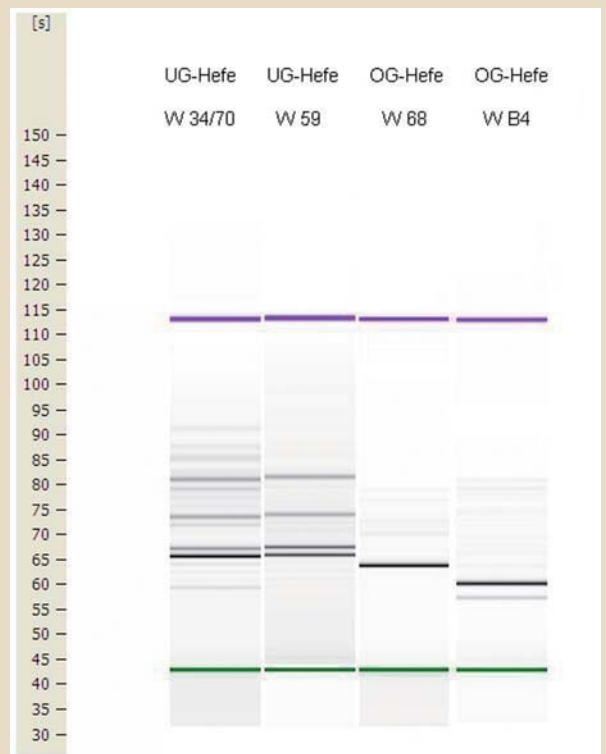


Abb. 3: Unterscheidung von Hefen auf Stammebene mittels PCR-Kapillarelektrophorese an den Beispielen *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* W 34/70, W 59 und *Saccharomyces cerevisiae* W 68, W B4