

Die Reinzucht als Risiko?

Mikrobiologie in Hefereinzuchtanlagen und Sauergutanlagen

In Hefereinzuchtanlagen und Sauergutanlagen kommt es häufiger zu Kontaminationen mit Bakterien und Fremdhefen. Einerseits kann es sich um typische bierschädliche Bakterien und Hefen handeln, andererseits um Keime, die hauptsächlich in diesen Produktionsbereichen wachsen und so in nachfolgende Zwischenprodukte verschleppt werden können. Das Endprodukt und die Prozesshygiene können bei solchen Kontaminationen in Mitleidenschaft gezogen werden. Als Beispiele sind hier Enterobacteriaceae und Essigsäurebakterien in der Hefereinzuchtanlage und thermotolerante wilde Hefen in der Sauergutanlage zu nennen. Die Betriebshygiene dieser Starterkulturanlagen sollte im Fokus jeder Brauerei stehen, sodass diese Anlagen nicht als Ausgangspunkt für Prozesskontaminationen („Keimschleudern“) fungieren. In diesem Artikel schlägt das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität (BLQ) eine Untersuchungsstrategie vor, um diese Anlagen möglichst umfassend auf Reinheit zu untersuchen.

Die große Herausforderung in der mikrobiologischen Überwachung der Propagations- und Sauergutanlagen liegt in der großen biologischen Masse des bewusst eingesetzten Starterkultur-Mikroorganismus (obergärige Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und untergärige Bierhefe *Saccharomyces pastorianus* bei Propagationsanlagen; thermotolerante, hopfensensitive Milchsäurebakterien wie z. B. *Lactobacillus amylovorus* bei Sauergutanlagen). Die Kontamination liegt neben diesem oft nur in Spuren vor, kann aber großen Schaden anrichten, wenn sie nicht rechtzeitig erkannt wird. Die Kontamination wird nur sichtbar, indem der gezielt vermehrte Organismus (hopfensensitiver Lacto-

bacillus sp., bzw. Kulturhefe) in kultur-basierten Methoden gezielt unterdrückt bzw. mit spezifischen Methoden (z. B. spezifische PCR-Systeme) gearbeitet wird.

Mikrobiologische Problematik Hefereinzuchtanlagen

Das Ziel einer jeden Propagationsanlage ist das Herführen großer Reinzuchthefermengen, um damit ganz oder teilweise (z. B. 30/70, 50/50; Verhältnis Propagationshefe/ Erntehefe) eine Anstellwürze anzustellen. Unter aeroben Verhältnissen produziert die Hefepopulation mehr Zellmasse pro Zeiteinheit,

bei geringerem Extraktabbau, verglichen mit anaeroben Umgebungsbedingungen.

Denn mit anaeroben Umgebungsbedingungen wie der Gärung steht die Hefe nicht nur in Konkurrenz zu alten bekannten potenziellen oder obligaten Bierschädlingen, sondern nun plötzlich auch zu aeroben Indikatorkeimen und indirekten Bierschädlingen. Es braucht also ein Nährmedium, welches unter aeroben Bedingungen der Kulturhefe die Arbeit erschwert und gleichzeitig Kontaminanten in ihrem Wachstum fördert.

Mikrobiologischer Nachweis in Proben aus Hefereinzuchtanlagen

Vor jedem nährmedienbasierten mikrobiologischen Nachweis sollte eine direkte Mikroskopie der Propagationshefe erfolgen. In Abbildung 1 sind Würzebakterien in einer obergärigen Kulturhefe in der Direktmikroskopie zu erkennen. Wird ein Keim pro Gesichtsfeld erkannt, ist ungefähr von einer Kontaminationsrate von 50.000 bis 100.000 Keimen pro ml auszugehen (abhängig von Mikroskop-Konfigurationen und Objektträger). D. h. diese Hefe ist stark kontaminiert und sie sollte umgehend verworfen und durch einen frischen Reinzuchthefeasatz ersetzt werden. Eine weitere Anreicherung der Keime ist bei positivem Befund in der Direkt-

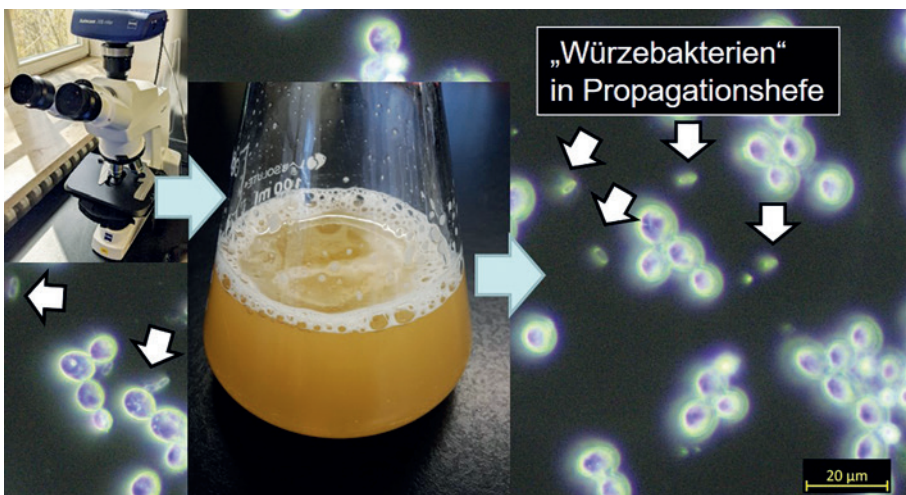


Abbildung 1: Mikroskopischer Befund einer obergärigen Propagationshefe mit Würzebakterien (Direktbefund); diese Hefe sollte verworfen und ersetzt werden

Charakteristika	Fertiges Bier (z. B. in Lager- o. Puffertank)	Fermentationssuspension in Propagator	Fermentationssuspension in Sauergutanlage
Zellkonzentration	< 10.000 Zellen pro ml bei filtrierten Bieren, ca. 1 bis 5 Mio pro ml bei unfiltrierten Bieren	ca. 80 bis 120 Millionen Zellen pro ml Kulturhefe am Ende der Propagation	Ca. 100 Millionen bis 1 Milliarde Zellen pro ml <i>Lactobacillus sp.</i>
pH-Wert	ca. 4,5 (Bier)	4,8 bis 5,2 (im Idealfall, wenn Propagator nicht zu intensiv gefahren wird)	< 3,6 (in der Regel 3,0 bis 3,5)
Nährstoffangebot	Reduziertes Nährstoffangebot (Bierhefe hat in Gärung viele Nährstoffe abgebaut)	Höheres Nährstoffangebot als in Bier (keine komplette Vergärung)	Hohes Nährstoffangebot, da <i>Lactobacillus sp.</i> dem Medium nur wenige Nährstoffe entnehmen
Sauerstoffverfügbarkeit	Im Optimalfall < 0,1 mg/l O ₂ , > 2,5 g CO ₂ (gespundetes oder abgefülltes Bier ca. 5 g/l CO ₂)	Permanent oder in Intervallen belüftet (zwar sehr schnelle Sauerstoffzehrung durch die Hefe, jedoch sehr gutes Milieu für aerobe Mikroben)	Aerobes/ microaerophiles Milieu (abhängig von Fermentationsphase), oft auch mit CO ₂ begast, um aerobe Keime (z. B. Kahlhefen) zu unterdrücken
Hopfen/Bitterstoffe	Ja	Ja	Nein (Vorderwürze oder verdünnte Vorderwürze)
Temperatur	Abhängig von Lagertemperatur des Bieres	~10 bis 20 °C (abhängig von Hefestamm und Propagationsführung)	~45 bis 48 °C (Abweichungen möglich)

Tabelle 1 stellt die Unterschiede der Betriebsmedien (Zwischenprodukte bzw. abweichende Matrices) im Vergleich zum Medium Bier dar. Diese Unterschiede begründen, warum in Sauergutanlagen und Propagatoren im Vergleich zu Bier potenziell ein anderes mikrobiologisches Spektrum an Keimen (andere Mikroflora) vorliegen kann und welche speziellen Herausforderungen an die Analytik gestellt werden. Deswegen macht es Sinn, die mikrobiologische Stufenkontrolle in diesen beiden Bereichen anzupassen.

mikroskopie nicht nötig. Eine Identifizierung der Kontaminationskeime ist empfehlenswert, um das Schadpotenzial, die Schädigung und die Persistenz des Keimes einschätzen zu können. Ist die Vormikroskopie ohne Befund, sollten andere Nährmedien und Nachweismethoden zum Einsatz kommen.

Eine übliche und weit verbreitete Methode stellt die Flüssiganreicherung in NBB-Bouillon dar. Sie ermöglicht eine gezielte Unterdrückung von Kulturhefen und ein selektives Milieu durch Vorhandensein von Hopfeninhaltsstoffen. Damit ermöglicht dies den Nachweis von potenziellen und obligaten bierschädlichen Bakterien, auch die Kombination mit PCR-basierten Methoden (Identifizierung bierschädlicher Bakterien) ist nützlich. Wallerstein Differential (WLD) Agar dient als Spatelplatte (z. B. 2 mal 0,5 ml) zur Kontrolle von allgemeiner Verkeimung durch seinen wenig selektiven Charakter. Er enthält Cycloheximid zur Unterdrückung der Kulturhefe und ermöglicht das Wachstum säuretoleranter Bakterien und deren Differenzierung durch unterschiedliche Farbgebung der Kolonien. Eine Quantifizierung der Verkeimung ist durch WLD Agar möglich.

Mittels Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD-Agar) als Spatelplatte (z. B. 2 mal 0,5 ml) werden *Enterobacteriaceae* in Propagationsanlagen nachgewiesen. Diese können über Rohstoffe eingetragen werden oder aus Biofilmen

stammen, die eine mangelhafte Reinigung indizieren. Die Flüssiganreicherung in YM mit Zusatz von CuSO₄ (YM + CuSO₄) ermöglicht einen Nachweis von Fremdhefen in der Propagationsanlage (in Proben der untergärigen Propagation kann auch die 37 °C-Anreicherung in YM oder Würze zum Einsatz kommen), während eine Flüssiganreicherung mit Würze unter Zusatz von Actidion (Würze plus Actidion) die Kulturhefe unterdrückt und einem sehr breiten Spektrum an Würzekontaminanten das Wachstum ermöglicht wird.

Zusätzlich zu den aufgeführten kultur-basierten Methoden bieten PCR-Methoden eine Möglichkeit, Kontaminanten im Spurenbereich zu detektieren (100 bis 1000 Zellen pro ml). So können, z. B. auch in Kombination mit flüssigen Voranreicherungen, PCR-Systeme zur Erfassung von *Enterobacteriaceae*, Essigsäurebakterien und Bierschädlingen eingesetzt werden. Abbildung 2 zeigt den Spurennachweis von Essigsäurebakterien in einer Propagator-Hefeprobe. Zusammenfassend ist es empfehlenswert, die Propagationsanlagen halbjährlich nach genanntem Schema umfassend zu überprüfen.

Mikrobiologische Problematik bei Sauergutanlagen

Das Ziel der Herstellung eines auf saurer Vorderwürze basierenden Mediums ist es, dass durch der Maische- oder

Würzesäuerung im Sudhaus der pH-Wert der Ausschlagwürze und der enzymatischen Prozesse gezielter eingestellt werden können. Der pH-Wert wird optimaler Weise mithilfe saurer Stoffwechselnebenprodukte von nicht bierschädlichen *Lactobacillus sp.*-Stämmen (z. B. *Lactobacillus amylolyticus* TUM L1, *Lactobacillus amylovorus* TUM L2) auf in der Regel pH 3,0 bis 3,6 abgesenkt. Dieser niedrige pH-Wert, zusammen mit der zeitlich immer nährstoffärmer werdenden Vorderwürze (verdünnt auf ca. 10 °Plato), limitiert letztendlich das Wachstum der *Lactobacillus sp.* Abbildung 3 zeigt symbolisch einen Sauerguterfermenter mit Rührwerk und mikroskopische Aufnahmen des Stammes *Lactobacillus amylovorus* TUM L2. Theoretisch lässt sich der Prozess als Fed-Batch-Verfahren unbegrenzt weiterführen, indem immer ein Rest des Sauergutes mit frischer, verdünnter Vorderwürze aufgefüllt wird. Kommt es hier im Laufe der Zeit jedoch zu einer Kontamination mit wilden Hefen oder anderen bierschädlichen Bakterien, ist dies ein schlechender Prozess. So lange, bis sich ein mikrobiologisches Gleichgewicht einstellt und im schlechtesten Fall erst dann auffällt, dass das Sauergut „früher irgendwie saurer war und auch bspw. nicht nach nasser Pferde-decke roch“. Die Ursache sind dann meistens Mischkulturen bestehend aus den ursprünglich reinen *Lactobacillus sp.*, bierschädlichen *Lactobacillus sp.* und *Pediococcus sp.*, in Verbindung mit bspw. *Dekkera spp.* und

anderen Fremdhefen. Sporuliert oder latent können diese Mikroorganismen dann in dem Sumpf der Sauergeranlage bei einem pH-Wert von ca. 3,0 bis 3,6 auf frische Nährstoffe und einen höheren pH-Wert, geliefert durch frische Vorderwürze, warten und dann wieder ihrer Arbeit nachgehen. Generell werden Sauergeranlagen selten mikrobiologisch überprüft. Bei Kontaminationen in Sauergeranlagen können von unerwünschten Mikroorganismen auch Vorläufersubstanzen (Precursor) gebildet werden, die später im Prozess durch die Kulturhefe zu wahrnehmbaren Fehlgerüchen metabolisiert werden. Dieses Phänomen konnte das Forschungszentrum schon häufiger beobachten und konnte z. B. auf die Kontaminate *Kluyveromyces marxianus* zurückgeführt werden. Eine umfassende mikrobiologische Überprüfung der Sauergeranlage wird mindestens jährlich empfohlen.

Mikrobiologischer Nachweis in Proben aus Sauergeranlagen

Die im vorigen Absatz beschriebenen Mikroorganismen lassen sich, falls vorhanden, durch ein Zusammenspiel verschiedener Nachweismedien differenziert detektieren.

Im besten Fall sollten außer der *Lactobacillus* sp.-Reinkultur keine weiteren Mikroorganismen präsent sein. Deren Spezies-Identität kann mittels Real-Time PCR überprüft werden. Das Ausspateln einer Würze-Agar-Platte mit Tetracyclin und aerober Inkubation bei 27 ± 1 °C liefert hier den Nachweis auf Hefen bei gleichzeitiger Unterdrückung der Bakterien. Weiter ist es sinnvoll, einen Vereinzelausstrich auf einem mit Bromkresolgrün versetzten, nicht selektiven Agar anzulegen, wie z. B. WLN-Agar, aerob inkubiert bei 27 ± 1 °C. Dieser Farbstoff wird von unterschiedlichen Gattungen, Spezies oder sogar Stämmen unterschiedlich stark

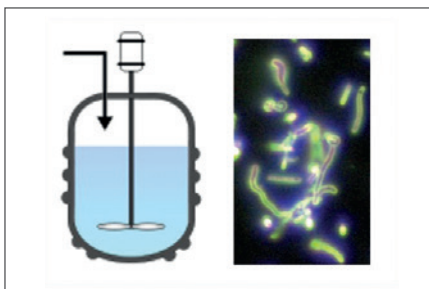


Abbildung 3: Symbolische Darstellung eines Sauergerfermenters mit Rührwerk und mikroskopisches Bild einer *Lactobacillus amylovorus* TUM L2 Kultur

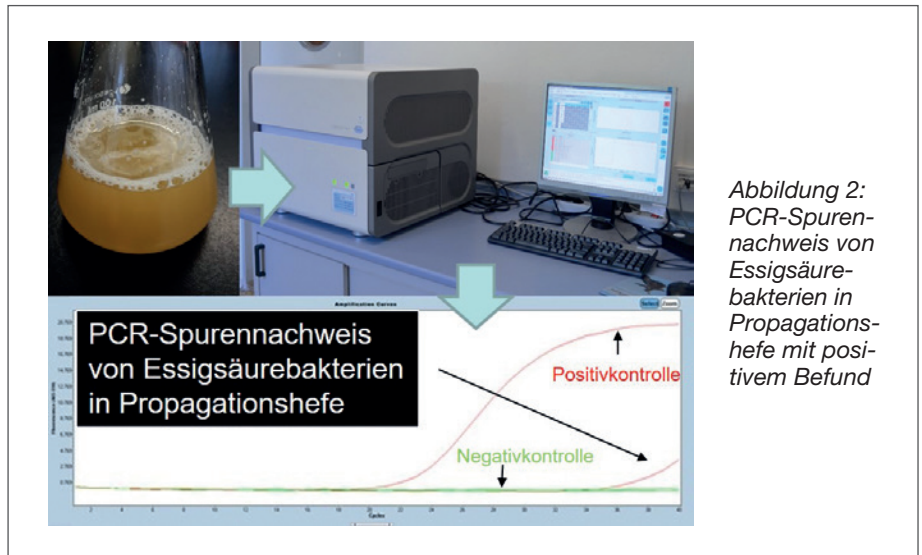


Abbildung 2: PCR-Spurenachweis von Essigsäurebakterien in Propagationshefe mit positivem Befund

assimiliert, was sich in verschiedenen Grüntönen der Kolonien bemerkbar macht. Zusammen mit den entstandenen unterschiedlichen Koloniemorphologien lässt sich auf den ersten Blick die Mikroorganismendiversität makroskopisch feststellen. Die Einzelkolonien der Platte können als Ausgangspunkt für weitere Identifizierungen dienen.

Der klassische Nachweis auf bierschädliche Bakterien wird mit NBB-B Anreicherung durchgeführt. Es empfiehlt sich, diese Anreicherung mit einem PCR-Nachweis auf bierschädliche Bakterien zu kombinieren. Finden sich bierschädliche Spezies empfiehlt sich neben einer Identifizierung auch ein PCR-Test auf die Anwesenheit von Hopfenresistenzgenen. Sind diese Hopfenresistenzgene vorhanden, ist von einer unmittelbaren mikrobiologischen Gefährdung des Bieres auszugehen. Zusätzlich empfiehlt sich ein PCR-Nachweis auf getränke-relevante Hefen. Auch die Überprüfung der Reinheit des verwendeten *Lactobacillus* in der Sauergeranlage kann mittels PCR oder Identifizierung durch MALDI-ToF-MS durchgeführt werden. Hierzu bietet sich ein Ausstrich einer Probe der Sauergeranlage auf MRS-Agar mit Actidion und anaerobe Inkubation bei 45 °C an. Die Einzelkolonien werden darauffolgend identifiziert.

Zusammenfassung und Ausblick

Erfahrungen des Forschungszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität der TU München zeigen, dass viele Kontaminationen im Braubetrieb ursprünglich aus der Propagationsanlage oder dem Sauerger stammen und sich durch den gesamten Be-

trieb ziehen können. Die Folgen für die Bierqualität können immens sein. Durch die Fremdorganismen können Fehlgerüchen im Bier entstehen oder Vorläufersubstanzen (Precursor) für solche gebildet werden. Auch biogene Amine können bei Kontaminationen in kritischen Mengen im Bier nachgewiesen werden. Diese können auch als Indikator für eine Kontamination dienen. DMS und Diacetyl können ebenso als chemische Indikatorparameter herangezogen werden. Sind diese Werte erhöht, sollte eine mikrobiologische Kontrolle der erwähnten Bereiche geplant werden. Bei Vorliegen einer Kontamination sollten die Fremdorganismen identifiziert werden, um das Ausmaß der Kontamination einschätzen zu können und die Quelle zu lokalisieren. Die mikrobiologische Reinheit der Hefepropagation und Sauergeranlage sind unerlässlich, um eine hohe Bierqualität zu gewährleisten.

Das Forschungszentrum Weihenstephan empfiehlt eine intensive Überprüfung der Anlagen in halbjährlichem oder jährlichem Abstand, um frühzeitig Probleme erkennen zu können. □

Dr.-Ing. Mathias Hutzler
Sebastian Hans
Oliver Kunz
Franziska Elisath
Margit Grammer
Prof. Dr.-Ing. Fritz Jacob

Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, TU München, 85354 Freising-Weihenstephan
www.blq-weihenstephan.de