

Dr. habil. Anna Salek

e-mail: Anna.Salek@T-Online.de

Verbesserter kultureller Nachweis von Wildhefen in Brauereibetrieben mit Hilfe des Wildhefen-Selektivmediums (WY-Agar)

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass das vorgeschlagene Wildhefen-Selektivmedium einen deutlich höheren Anteil von Fremdhefen nachweist als der in der Praxis häufig verwendete Lysin-Agar. Letzterer ist zum Nachweis von Fremdhefen der Gattungen *Saccharomyces* und *Candida* nicht geeignet. Die erzielten Ergebnisse legen eine effiziente Kupfer-Konzentration von 200 ppm CuSO₄ nahe. Diese wird auch von der American Society of Brewing Chemists (1) empfohlen. Die Vorteile des vorgeschlagenen Mediums liegen in der erhöhten Sicherheit der Ergebnisse, der einfachen Zubereitung und den geringen Herstellungskosten.

Einleitung

Als Wildhefen werden in der Brauereiindustrie solche Arten und Stämme bezeichnet, welche bei Brauprozess aus verschiedenen Gründen nicht erwünscht sind (2). Sie sind trotz moderner Methoden nach wie vor schwierig nachzuweisen, da sie starke physiologische und biochemische Ähnlichkeiten mit Kulturhefen aufweisen (3). Wildhefen der Gattung *Saccharomyces* werden als bedeutende Bierschädlinge angesehen, da sie in der Lage sind, sich innerhalb von 17 Tagen in der Bierflasche mit anderen Hefen bei Raumtemperatur stark zu vermehren.

Beim Nachweis von Wildhefe-Zellen muss beachtet werden, dass deren Zahl normalerweise weit unterhalb jener der Kulturhefe-Zellen liegt. Dies verlangt eine hohe Selektivität des verwendeten Nachweissystems. Heute werden Wildhefen im Brauereiwesen durch eine ganze Reihe von Selektivmedien nachgewiesen. Eine herausragende Rolle spielt dabei der Lysin-Agar. Da Kulturhefen Lysin im Unterschied zu Wildhefen nicht verwerten können, wachsen erstere auf diesem Agar nicht. Andere Untersuchungen zeigen, daß nur maximal 56% aller untersuchten Wildhefe-Stämme nachgewiesen werden können (4). Um diese Ergebnisse zu verbessern wird das Wildhefen-Selektivmedium, in fplgenden als WY-Agar bezeichnet, vorgeschlagen.

Material und Methoden

Das Wildhefen-Selektivmedium (WY-Agar) wurde parallel zu einem käuflichen Lysin-Agar getestet. Zur Auswertung kamen 23 Proben aus der Brauereiindustrie, mit darin vorkommenden Wild- und Fremdhefen sowie die Brauerei-Kulturhefen *Saccharomyces*

cerevisiae 68 und *Saccharomyces carlsbergensis* 34/70. Eine Übersicht über die untersuchten Proben zeigt Tabelle 1.

Tab. 1. Untersuchte Hefeproben

Nr.	Stamm	Typ Hefen
1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 68	Brauerei Referenzstamm
2.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 34/70	Brauerei Referenzstamm
3.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 69	Brauerei Referenzstamm
4.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 71	Brauerei Referenzstamm
5.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> DSM 8483	Brauerei Referenzstamm
6.	Mischkultur von Brauerei Innstadt, Passau	Industrie Kultur
7.	Mischkultur von Brauerei Weihenstephan, Freising	Industrie Kultur
8.	Mischkultur von Brauerei Löwen, Passau	Industrie Kultur
9.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D-273/100	Backhefe, Weihenstephan
10.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S-6/1	Backhefe, Killerhefe
11.	<i>Saccharomyces diastaticus</i> ATCC 60270	Amylolitische Hefe
12.	<i>Candida valida</i> DSM 70178	Wildhefe
13.	<i>Candida glabrata</i> NCYC 388	Wildhefe, Killerhefe
14.	<i>Candida versatilis</i> ATCC 60131	Wildhefe
15.	<i>Candida kefyr</i> ATCC 2512	Milchhefe
16.	<i>Candida tropicalis</i> DSM 7524	Wildhefe
17.	<i>Torula cremoris</i> ATCC 8553	Milchhefe
18.	<i>Debaromyces hansenii</i> DSM 70244	Weinhefe, Milchhefe
19.	<i>Kluyveromyces marxianus</i> IFO 4906	Weinhefe
20.	<i>Hanseniaspora valbyensis</i> CBS 311	Weinhefe
21.	<i>Pichia anomala</i> UCSC 25F	Weinhefe, Killerhefe
22.	<i>Zygosaccharomyces bailli</i> DSM 70834	Weinhefe
23.	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 1345	Wildhefe

Die Proben wurden aus einer Flüssigkultur auf festes Anreicherungsmedium (YPG-Agar, Hefeextrakt-Glukose-Agar) ausplattiert. Davon wurde jeweils eine Kolonie auf den Lysin-Agar und auf das Hefen-Selektivmedium (WY-Agar) übertragen und flächig ausgestrichen. Die Platten wurden für jeweils 48 Stunden bei 30°C bebrütet. Ausgewertet wurde danach, ob die Hefen auf den jeweiligen Medien wachsen und sich separate Einzelkolonien bilden konnten oder nicht.

Die Untersuchungen werden zweimal durchgeführt.

Herstellung des Wildhefen-Selektivmediums (WY-Agar) und des Lysin-Agars

Für den WY-Agar wurden 21,00 g eines käuflichen Malzextrakt-Agar-Mediums (0,3% Malzextrakt, 0,3% Hefeextrakt, 0,5% Pepton, 1% Dextrose) in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Nach dem Autoklavieren für 20 Minuten bei 120 °C wurden 10 ml einer CuSO₄-Lösung zugesetzt (0,1 g/10ml H₂O, 200 ppm). Beim Abkühlen auf 50°C wurde der flüssige Agar in Platten gegossen.

Das Lysin-Agar-Medium wurde gemäß den Angaben des Herstellers zubereitet.

Ergebnisse und Diskussion

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt Tabelle 2.

Tab. 2. Vergleichendes Wuchsverhalten auf Lysin-Agar und WY-Agar

Nr.	Stamm	Lysin-Agar	WY-Agar
1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 68	-	-
2.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 34/70	-	-
3.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 69	-	-
4.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 71	+	-
5.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> DSM 8483	-	-
6.	Mischkultur von Brauerei Innstadt, Passau	-	-
7.	Mischkultur von Brauerei Weihenstephan, Freising	-	-
8.	Mischkultur von Brauerei Löwen, Passau	-	-
9.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D-273/100	-	+++
10.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S-6/1	-	++
11.	<i>Saccharomyces diastaticus</i> ATCC 60270	-	+++
12.	<i>Candida valida</i> DSM 70178	++	+++
13.	<i>Candida glabrata</i> NCYC 388	-	++
14.	<i>Candida versatilis</i> ATCC 60131	-	++
15.	<i>Candida kefyr</i> ATCC 2512	++	+++
16.	<i>Candida tropicalis</i> DSM 7524	+	+++
17.	<i>Torula cremoris</i> ATCC 8553	++	+++
18.	<i>Debaromyces hansenii</i> DSM 70244	++	+++
19.	<i>Kluyveromyces marxianus</i> IFO 4906	++	+++
20.	<i>Hanseniaspora valbyensis</i> CBS 311	+	+++
21.	<i>Pichia anomala</i> UCSC 25F	++	+++
22.	<i>Zygosaccharomyces bailli</i> DSM 70834	+	++
23.	<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 1345	+++	+++

Beschreibung des Wuchsverhaltens:

- kein Wachstum
- + schwaches Wachstum
- ++ Wachstum
- +++ gutes Wachstum

Auf Lysin-Agar wuchsen die untersuchten Brauerei-Kulturhefen nicht. Zusätzlich zeigten jedoch die Wildhefen-Stämme *Saccharomyces cerevisiae* (als nicht Brauereistämme), *Saccharomyces diastaticus*, *Candida glabrata* und *Candida versatilis* kein Wachstum. Diese sind in der Routine somit nicht oder zumindest schwierig von Brauerei-Kulturhefen zu unterscheiden.

Auf WY-Agar zeigten die untersuchten Brauerei-Kulturhefen kein Wachstum. Alle untersuchten Wildhefen wuchsen zu distinkten Einzelkolonien und waren somit als Gruppe von den Kulturhefen deutlich zu unterscheiden (Abb.1, A und B).

Abb.1: Wuchsverhalten einiger Wildhefen auf WY-Agar und Lysin-Agar.

Lysin-Agar hat eine hohe Selektivität nur für die Gruppe der appikulaten Hefen (5). Aus diesem Grund wird in der Literatur mehrfach ein Medium mit Kupferzusatz empfohlen (4, 6, 7-17). Dieses enthält Malz- und Hefeextrakt, Glucose, Pepton bzw. Agar und wird nur noch mit CuSO_4 supplementiert.

Für einige Hefearten konnte gezeigt werden, dass Kupfer auf Wachstum und Fermentationsleistung stark hemmend wirkt. Dies war vor allem bei solchen Nährmedien der Fall, welche Glucose als Kohlenstoffquelle enthielten (18, 19, 20). Die Toxizität des Kupfers teigt dabei mit abnehmender Temperatur an (19, 21).

Verschiedene Hefestämme sind gegen Kupfer unterschiedlich resistent. Höhere Konzentrationen von Kupfer führen zu morphologischen Veränderungen und atypischer Zellteilung. Durch die Anwesenheit von Proteinen wird die Aktivität des Kupfers reduziert.

Im Vergleich des WY-Mediums mit einem industriell hergestellten Selektivnährboden wie Lysin-Agar ist erster besser in der Lage, Braureistammkulturen von Wildhefe in der Bierproduktion zu unterscheiden.

Erste Untersuchungen in der Praxis bestätigen dieses Ergebnis.

Literatur

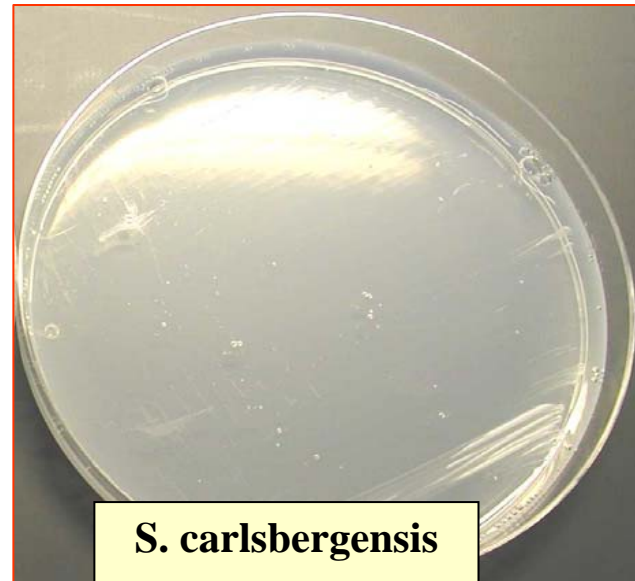
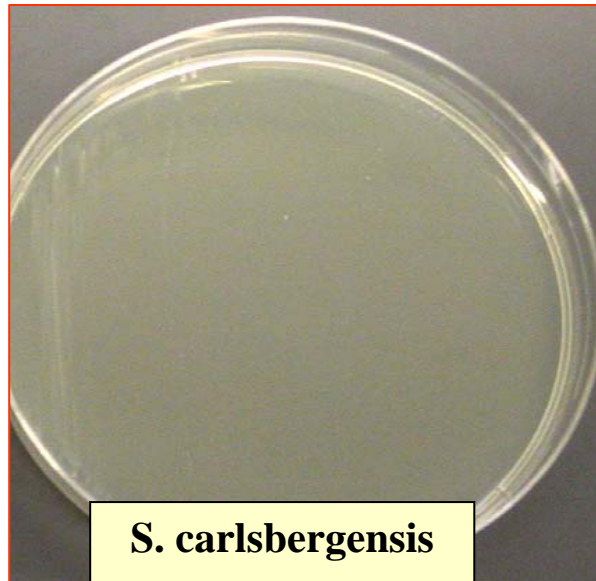
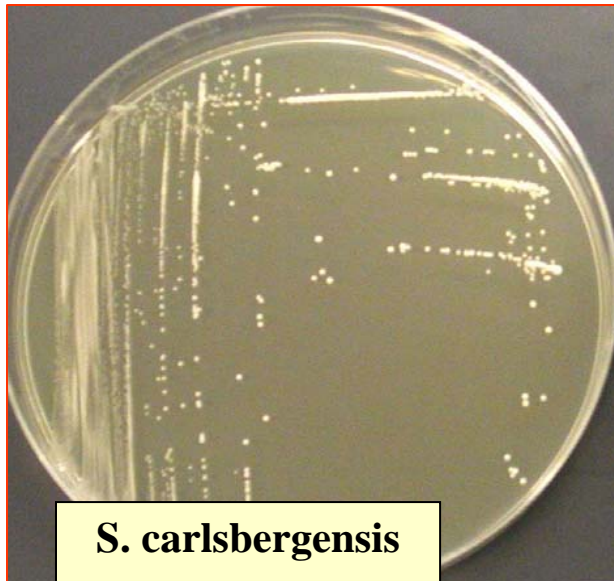
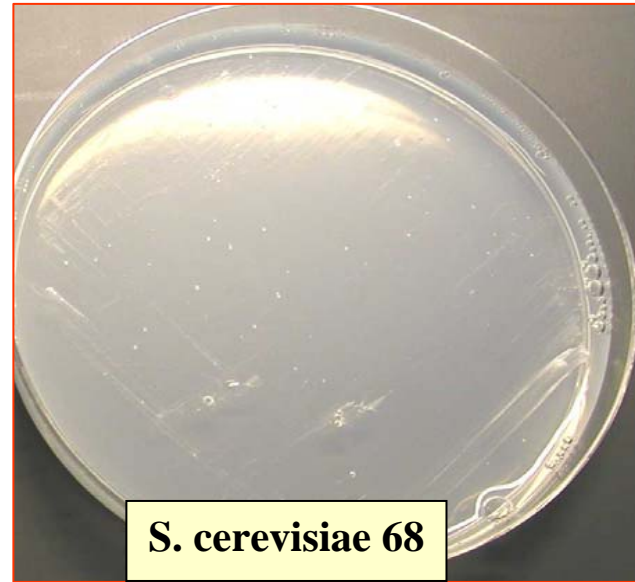
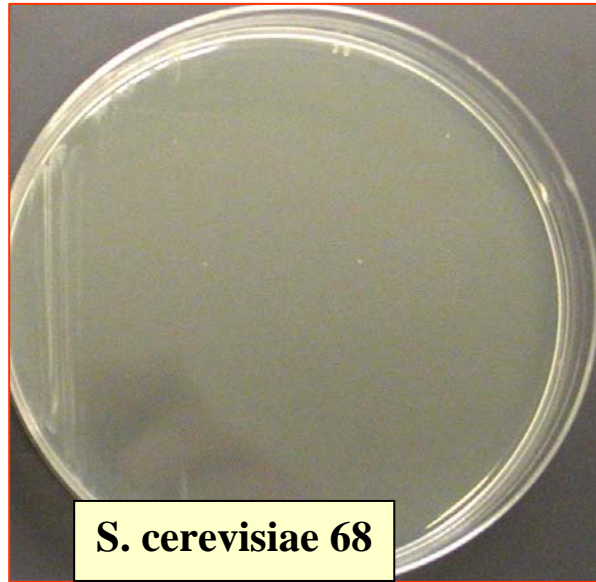
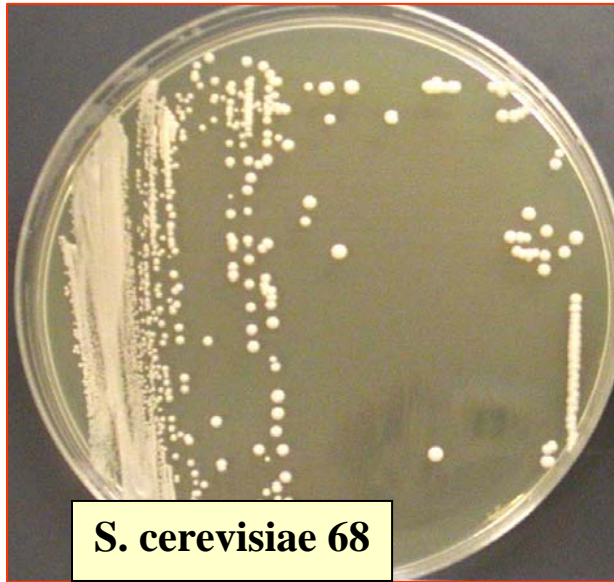
- 1
- 2 Priest F.G. Contamination. In: An Introduction to Brewing Science and Technology. Part II. The Institute of Brewing. London, 1981, S. 23-31.
- 3 Röcken W., Schulte S.: „Nachweis von Fremdhefen“. Brauwelt, S. 1921-1927, 1986.
- 4 van der Aa Kühle A., Jespersen L.: “Detection and identification of wild yeasts in lager breweries”, Inter. Journal of Food Microbiology, Volume 43, S. 205-213, 1998.
- 5 Walters L.S., Thiselton M.R.: “Utilisation of lysine by yeasts”, J. Inst. Brew., Volume 59, S. 401-404, 1953.
- 6 Taylor G.T., Marsh A.S.: “MYGP + copper, a medium that detects both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast”, J. Inst. Brew., Volume 90, S. 134-145, 1984.
- 7 Bendiak D.S.: “A modified copper medium for wild yeast identification”, Am. Soc. Brew. Chem. J., Volume 49, S. 38-39, 1991.
- 8 Beuchat L.R.: “Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts”, Int. J. Food Microbiol., Volume 19, S. 1-14, 1993.
- 9 Brenner M.W., Kariscak M., Stern H., Hsu W.P.: “A differential medium for detection of wild yeast in the brewery”, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., S. 79-88, 1970.
- 10 De Angelo J., Siebert K.J.: “A new medium for the detection of wild yeast in brewing

- culture yeast”, Am. Soc. Brew. Chem. J., Volume 45, S. 135-140, 1987.
- 11 Guseva I.I., Fin L.M.: “Primary classification of beer infecting yeast by a combined test”, Prikl. Biokhim. Mikrobiol., Volume 11, S. 269-273, 1975.
 - 12 Hall J.F.: “Detection of wild yeasts in the brewery”, J. Int. Brew., 77:513.516, 1971.
 - 13 Kato S.: “A new measurement of infections wild yeasts in beer by means of crystal violet medium”, Bull. Brew. Sci., Volume 13, S. 19-24, 1967.
 - 14 Lin Y.: “Detection of wild yeasts in the brewery: a new differential medium”, Proc. Am. Soc. Brew. Chem., S. 69-76, 1974.
 - 15 Lin Y.: “Detection of wild yeasts in the brewery. Efficiency of differential media”, J. Inst. Brew., Volume 81, S. 410-417, 1975.
 - 16 Lin Y.: “Formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection”, J. Inst. Brew., Volume 87, S. 151-154, 1981.
 - 17 Martin C.P., Siebert K.J.: “Evaluation of multinitrogen source media for wild yeast detection in brewing culture yeast”, Am. Soc. Brew. Chem. J., Volume 50, S. 134-138, 1992.
 - 18 Ross I.S.: “Effect of glucose on copper uptake and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*”, Trans. Br. mycol. Soc., Volume 69, S. 77-81, 1977.
 - 19 Ross I.S., Walsh A.L.: “Resistance to copper in *Saccharomyces cerevisiae*”, Trans. Br. mycol. Soc., Volume 77, S. 27-32, 1981.
 - 20 White J., Munns D.J.: “Inhibitory effect of common elements towards yeast growth”, J. of the Institute of Brewing”, Volume 58, S. 175-179, 1951.
 - 21 Ashida J., Higashi N., Kikuchi T.: “An electromicroscopic study on copper precipitation by copper-resistant yeast cells”, Protoplasma, 59, S. 29-32, 1963.

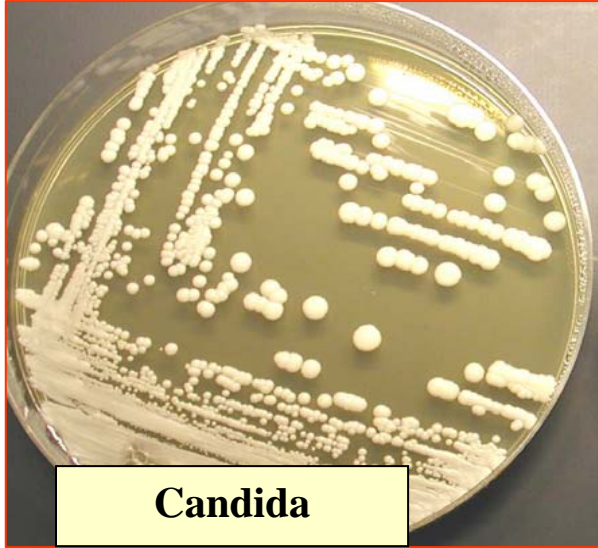
YPG-Agar

WY-Agar

Lysin-Agar

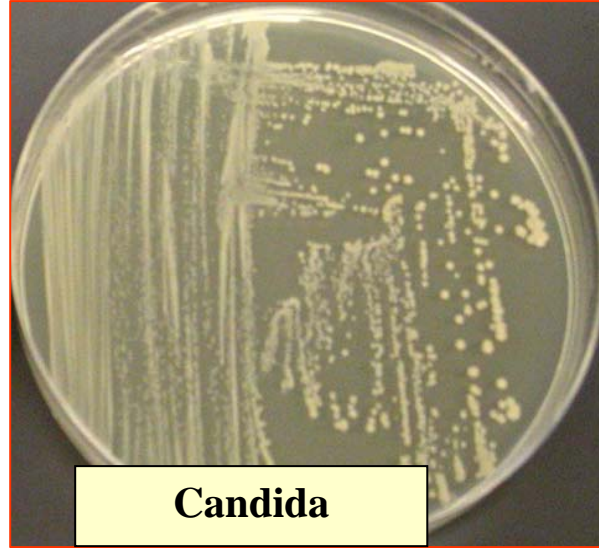


YPG-Agar



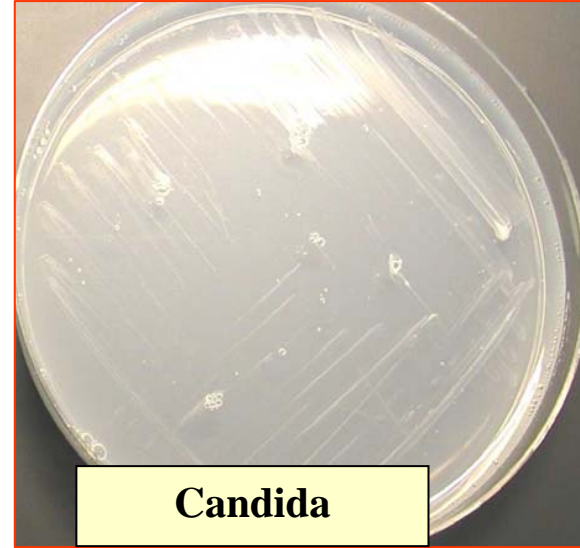
Candida

WY-Agar

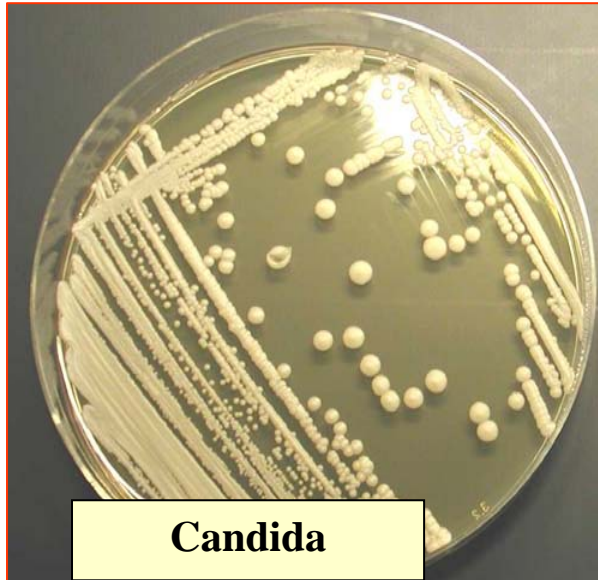


Candida

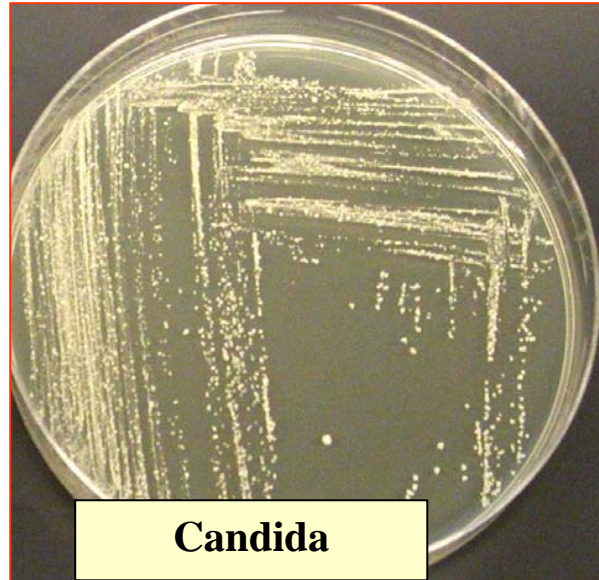
Lysin-Agar



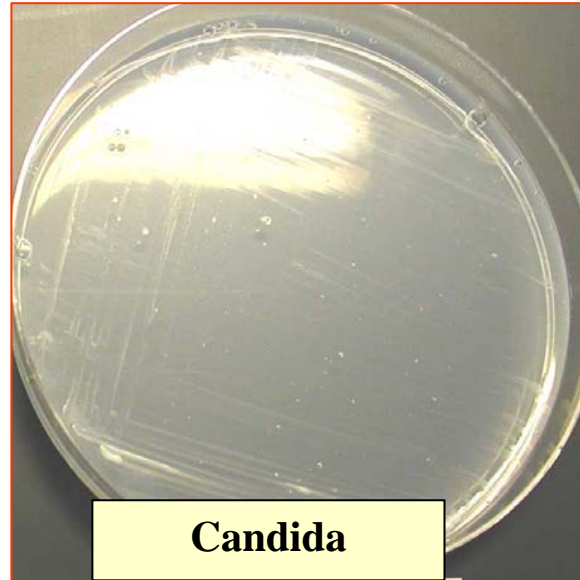
Candida



Candida



Candida



Candida