

DSDM™

**Da färbt sich was Neues
im Nachweis übervergärender Hefen**



Agenda

DSDM™ – Döhler's Saccharomyces Diastaticus Medium

01

Mikrobiologische Situation in Brauereien

02

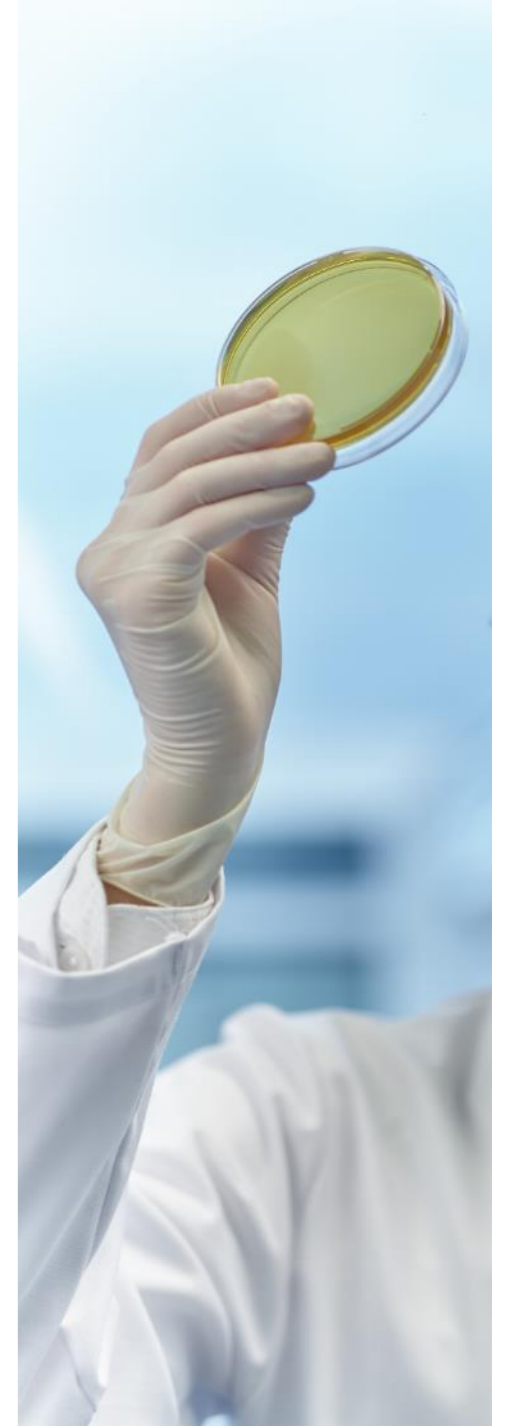
Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus

03

Hefedifferenzierung mittels kultureller Methode

04

**Entwicklung und Prüfung eines selektiven
Nachweismediums**



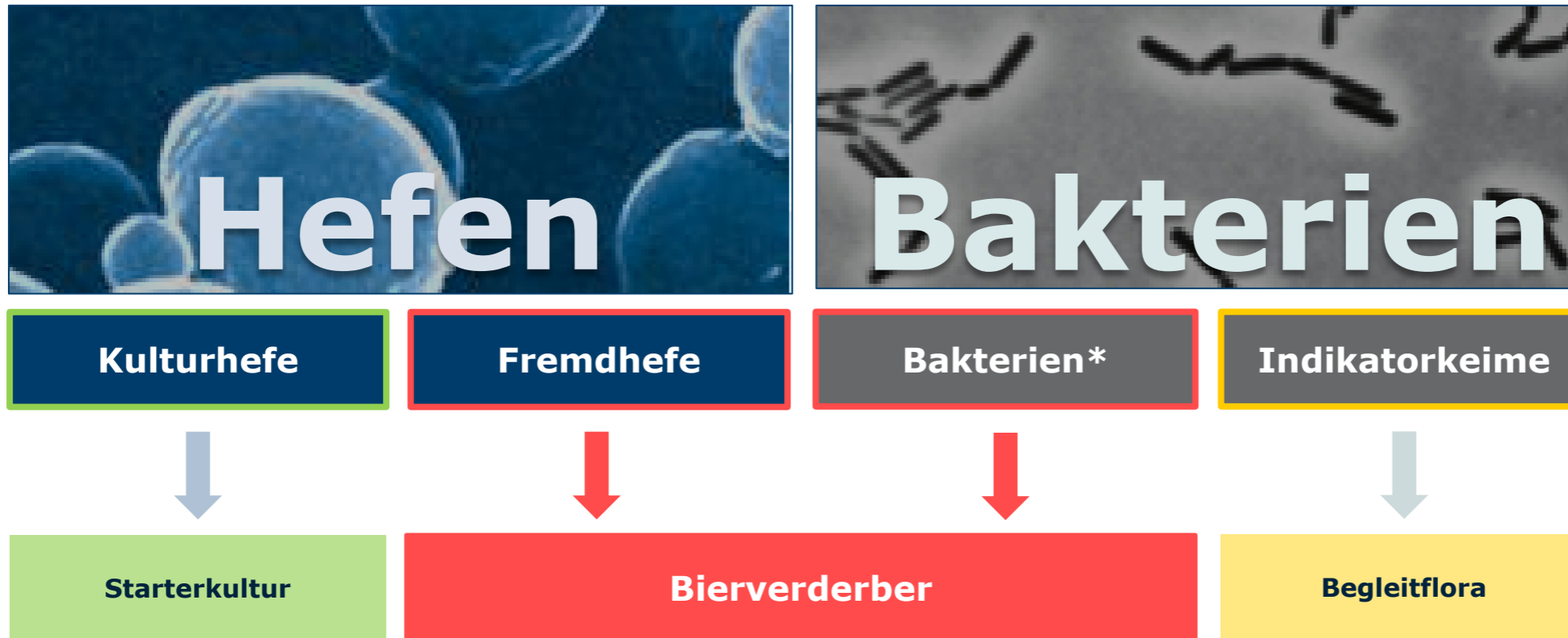
01

Mikrobiologische Situation in Brauereien



Mikrobiologische Situation in Brauereien

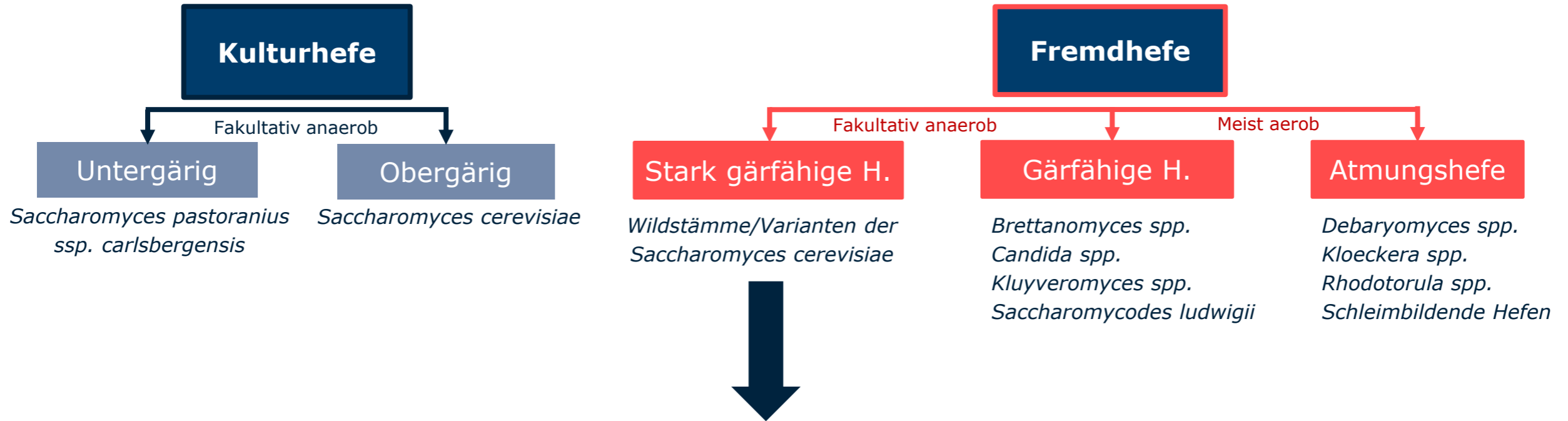
Relevante Mikroflora in der Brauerei



*Ausnahme: Starterkulturen, z.B. für die Herstellung von Sauergut

Mikrobiologische Situation in Brauereien

Hefen in der Brauerei



02

***Saccharomyces cerevisiae* var.
*diastaticus***



DER ÜBERVERGÄRER



Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus

Profilbild

1952 entdeckt, 1965 als *S. diastaticus* beschrieben, seit 2019 offiziell als Variante deklariert

Taxonomie/Morphologie:

- Variante der *Saccharomyces cerevisiae*
- Fakultativ anaerob
- Zellgröße kleiner im Gegensatz zu *S. cerevisiae*
können als kleine Zellen die Filterschichten passieren und so ins filtrierte Bier gelangen
- Fähigkeit zur Sporulation von Ascisporen bei Nährsubstratmangel

Toleranzen in der Matrix Bier:

- Teils hohe Toleranz gegen Alkohol, Hopfenbitterstoffe, tiefes pH-Milieu
 - Anaerobiose und niedrige Temperaturen
- >> Wachstum in allen Biertypen, unabhängig vom Vergärungsgrad

Besondere Eigenschaft:

enthält STA-Gen, das für die Bildung des Enzyms Glucoamylase kodiert. Dieses extrazelluläre Enzym spaltet niedere und höhere Dextrine zu Zucker, der das Risiko einer anschließenden Vergärung darstellt.



Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus

Profilbild

Schädigungsbild:

- Trübungs- und Sedimentbildung
- leerer Geschmack bis hin zu phenolischen Off-Flavor, herbere Bitternoten, kratziger Nachtrunk
- Gushing, Aufblähen bis hin zum Zerplatzen der Verpackung (Glasflasche, Dose, etc.).

Bierschädlichkeit:

KAT I (n. Prof. Back) = obligat, also höchste Stufe

Ist in Deutschland meldepflichtig, da von einer Gefahr der Gesundheit ausgegangen wird.

Auftreten:

- Als Primärkontaminant im Unfiltrat
- Als Sekundärkontaminant in der Abfüllung, z.B. durch Biofilm

Einschleppung:

- Kontaminierte Hefestämme
- Produktionsschwachstellen (Toträume, etc.)
- Raumluft, Leergut-Rücklauf, Rückbier



Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus

Physiologische Unterscheidungsmerkmale

S. Diastaticus, eine Saccharomyces cerevisiae, die zusätzlich Stärke und Dextrine verwerten kann.

S. cerevisiae var.	Fermentation (Gasbildung)							Stärke
	Dextrin	Galaktose	Maltose	Maltotriose	Melibiose	Raffinose	Saccharose	
bayanus	-	-	+	- / (+)	-	+	+	-
capensis	-	-	-	-	-	+	+	-
coreanus	-	+	-	-	+	+	+	-
cerevisiae (og BH)	-	+	+	+ / (-)	-	+	+	-
cerevisiae (Molk Isolat)	-	+	-	-	-	+	+	-
cerevisiae (AfG Isolat)	-	v	v	-	-	+	+	-
cratericus	-	+	+	-	-	+	+	-
chevalieri	-	+	-	-	-	+	+	-
diastaticus	+	+	+	+	-	+	+	+
ellipsoideus	-	+	+	-	-	+	+	-
globus	-	+	-	-	-	-	-	-
logos	+	+	+	+	+	+	+	-
willianus	v	-	+	+	-	+	+	-
S. pastorianus	-	+	+	v	+	+	+	-

Legende: Fermentation
 positiv +
 negativ -
 variabel v
 negative, selten pos. - / (+)
 positiv, selten neg. + / (-)

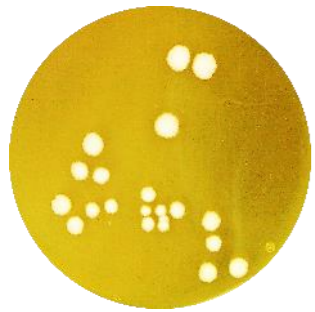
03

Hefedifferenzierung mittels kultureller Methode



Mikrobiologische Situation in Brauereien

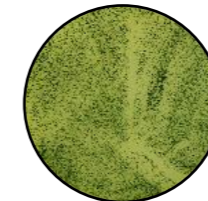
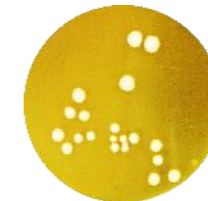
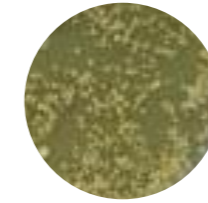
Hefedifferenzierung mittels kultureller Methode



Hefekolonien auf Würze-Agar



Nicht-Saccharomyces-WH	Lysin- oder Kupfersulfatagar/LCSM 4 - 6 d bei 28-30°C
Saccharomyces-WH	Kristallviolettagar/LWYM 4-6 d bei 28-30°C
Obergärige Hefe, Saccharomyces-WH, Non-Saccharomyces-WH	Würzeagar oder YM Agar 2-4 d bei 37°C
Übervergärende Hefe (<i>Saccharomyces diastaticus</i>)	Stärkeagarplatten oder in endvergorenem Bier 37° C mit Einsatz von Durhamröhrchen



Hefedifferenzierung mittels Molekulardiagnostik: PCR beschränkt sich derzeit auf STA 1/2/3 Gen (teilweise fehlenden Promotorregion)

04

Entwicklung und Prüfung eines selektiven Nachweismediums



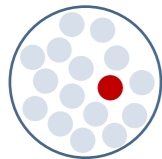
Entwicklung eines kulturellen Nachweismediums

Anforderungen



Zuverlässig

Hohe Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit



Selektiv

Auf den Zielkeim zugeschnittene Rohstoffe und Inkubationsparameter
Hemmung konkurrierender Flora



Einfach

Gebrauchsfertiges Pulver für maximale Flexibilität
Farbumschlag als Indikation eines Positivbefundes

Entwicklung eines kulturellen Nachweismediums

Auswahl der Keime

Zielkeime (*S. diastaticus*)

	Stamm	Stammname
S. diastaticus	TUM S160	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 3-D-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 203	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S91	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 1-H-7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S264	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 3-H-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	Praxisisolat II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	Praxisisolat III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S228	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S71	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S72	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM S263	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	PIBB 121	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 1-B-8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	BRY 402	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	SY1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	PIBA 109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
	TUM 541	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
Praxisisolat IV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	
Praxisisolat I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	

Selektivkeime (ug/og BH)

	Stamm	Stammname
Kulturhefen	TUM S81	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	TUM S23	<i>Saccharomyces pastorianus</i> ssp. <i>carlsbergensis</i>
	BRY 420	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	BRY 96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	TUM S21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Altbier)
	TUM S123	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	W68	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	W34-70	<i>Saccharomyces pastorianus</i> ssp. <i>carlsbergensis</i>
	US 05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	TUM S107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	TUM S250	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Altbier)

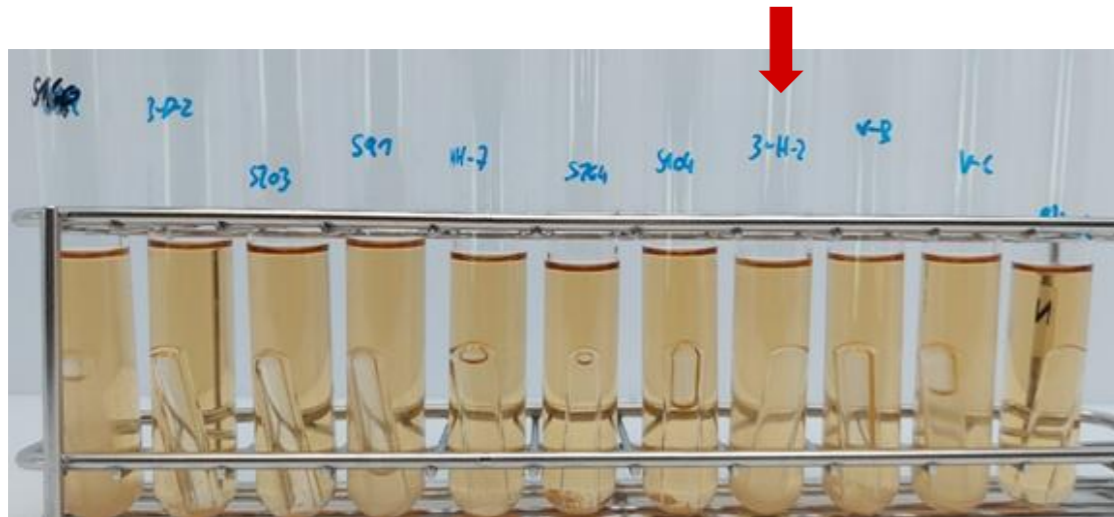
Nicht-Saccharomyces Hefen

	Stamm	Stammname
Wildhefen	TUM C49	<i>Candida boidinii</i>
	TUM C53	<i>Candida boidinii</i>
	DSM 5422	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	TUM C21	<i>Canida intermedia</i>
	TUM C57	<i>Candida sake</i>
	DSM 70001	<i>Dekkera bruxellensis</i>
	TUM H4	<i>Hansenula anomala</i>
	TUM D7	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	TUM P19	<i>Pichia anomala</i>
	TUM P24	<i>Pichia anomala</i>

Entwicklung eines kulturellen Nachweismediums

Testreihen und Ergebnisse

BIERSCHÄDLICHKEITSTEST



Ziel:

Testung der Diastaticus Stämme auf Bierschädlichkeit

Versuchsaufbau:

21 Target-Keime in der Verdünnungsstufe 10^5 in entkohlensäurten und endvergorenen Bier gespikt

Inkubationsparameter:

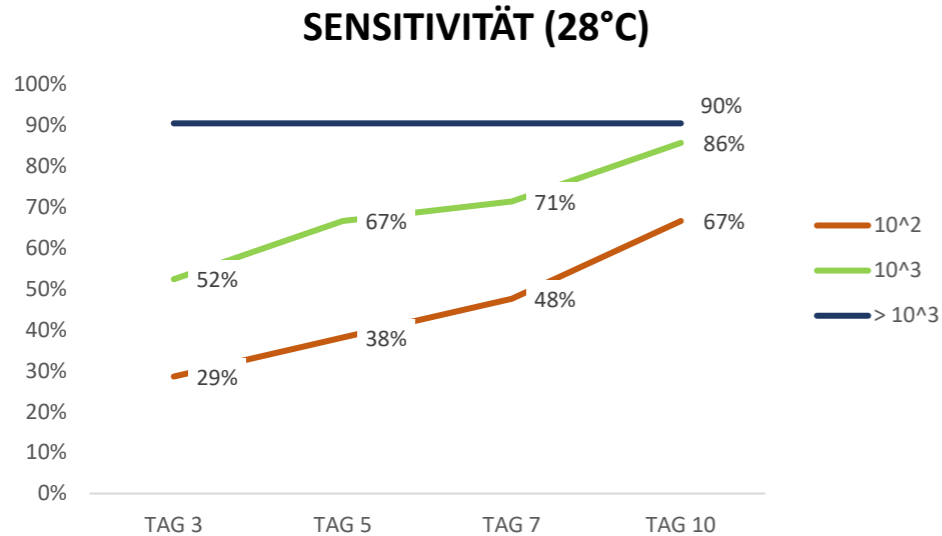
30°C aerob mit Einsatz von Durham Röhrrchen, 10d

Ergebnis:

Mit Ausnahme von Stamm 3-H-S, zeigten alle Stämme CO_2 Bildung
➔ 3-H-S zeigte keine CO_2 Bildung, obwohl STA Gen vorhanden.

Entwicklung eines kulturellen Nachweismediums

Testreihen und Ergebnisse Focus Farbumschlag



Ziel:

Sensitivitätsgrenzen von 10^3 bis 10^4 KBE/ml

Versuchsaufbau:

21 Target-Keime in den Verdünnungsstufen 10^2 bis $>10^3$

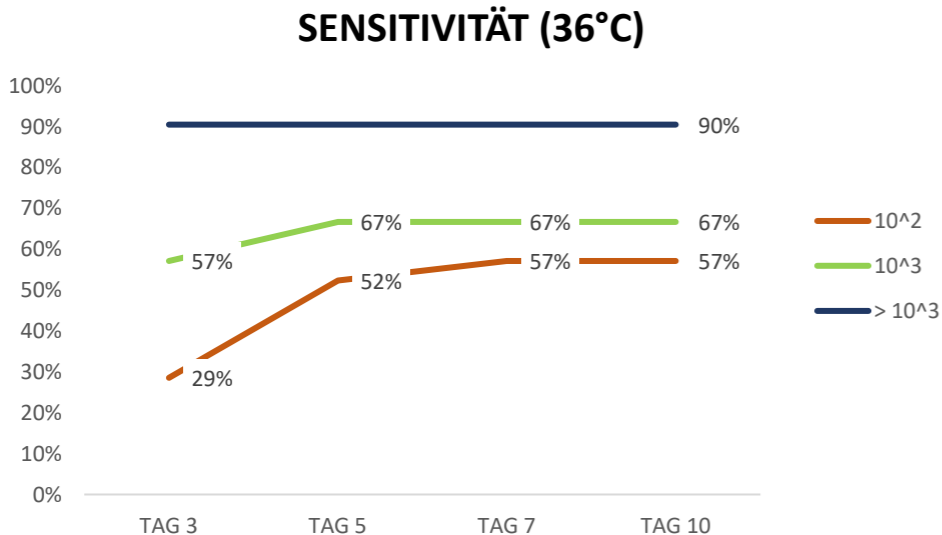
Inkubationsparameter:

28°C und 36°C, aerob

Ergebnis:

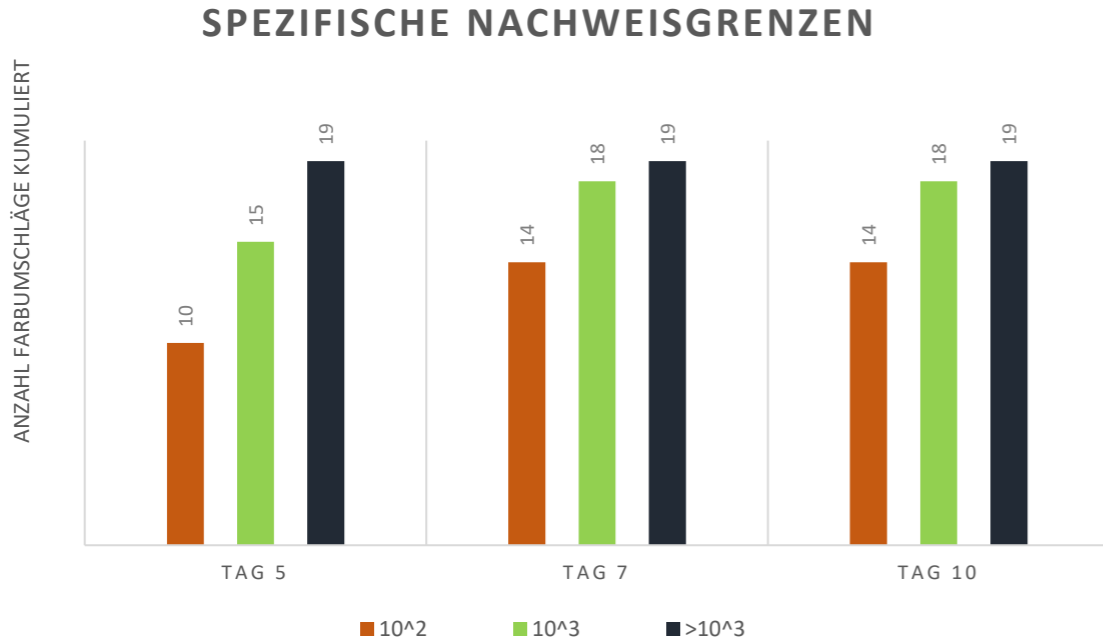
an Tag 7 wurden 71% aller Stämme bei 28°C und einer Keimzahl von 10^3 mit Farbumschlag detektiert

Die Bebrütung bei 36°C zeigt nur anfangs bessere Ergebnisse



Entwicklung eines kulturellen Nachweismediums

Testreihen und Ergebnisse Focus Farbumschlag



KBE/ml	Tag 5	Tag 7	Tag 10
10 ⁰	2 10%	3 14%	3 14%
10 ¹	6 29%	6 29%	6 29%
10 ²	10 48%	14 67%	14 67%
10 ³	15 71%	18 86%	18 86%
>10 ³	19 90%	19 90%	19 90%

Ziel:

Spezifitätsgrenzen von 10³ bis 10⁴ KBE/ml

Versuchsaufbau:

21 Target-Keime in den Verdünnungsstufen 10² bis >10³ in jeweils 10⁸ Zellen drei verschiedener Kulturhefen (US-05, S23, 34/70) gespikt

Inkubationsparameter:

28°C, aerob

Ergebnis:

Nach nur 7 Tagen wurden 18 von 21 Keimen bei einer Keimzahl von 10³ durch Farbumschlag detektiert

DSDM™ – Methodenbeschreibung

1.

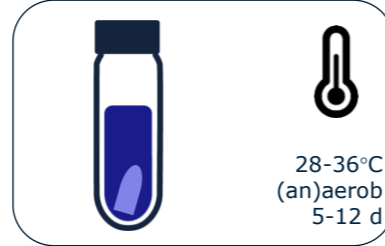
Flüssige Voranreicherung

1 ml Probe in die Bouillon geben



Inkubation

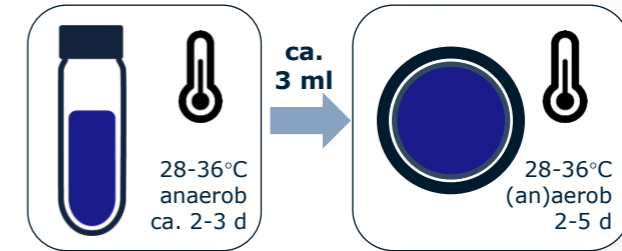
Einsatz Durham Röhrchen empfohlen



Positivbefund



Alternativ FVA + PG*



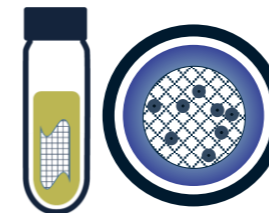
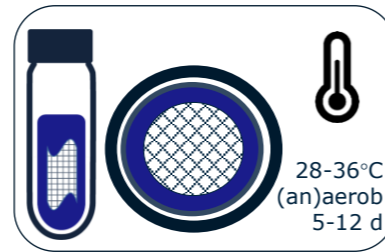
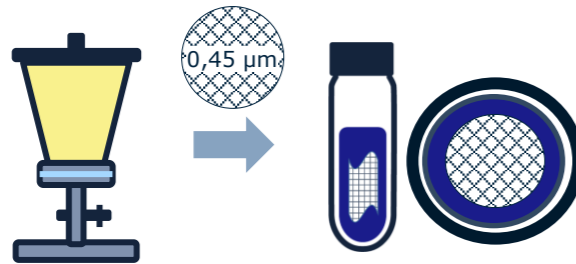
* FVA: Flüssige Voranreicherung
PG: Plattengußverfahren

2.

Membranfiltration

100-150 ml Probe
filtrieren

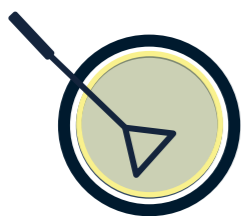
Filter in Bouillon
oder auf Agar legen



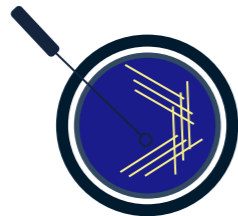
3.

Austrichplatte

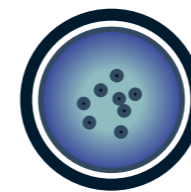
0,1-0,2 ml Probe auf
verfestigten Agar verteilen



a) Plattierung



b) Austrich



a) Plattierung

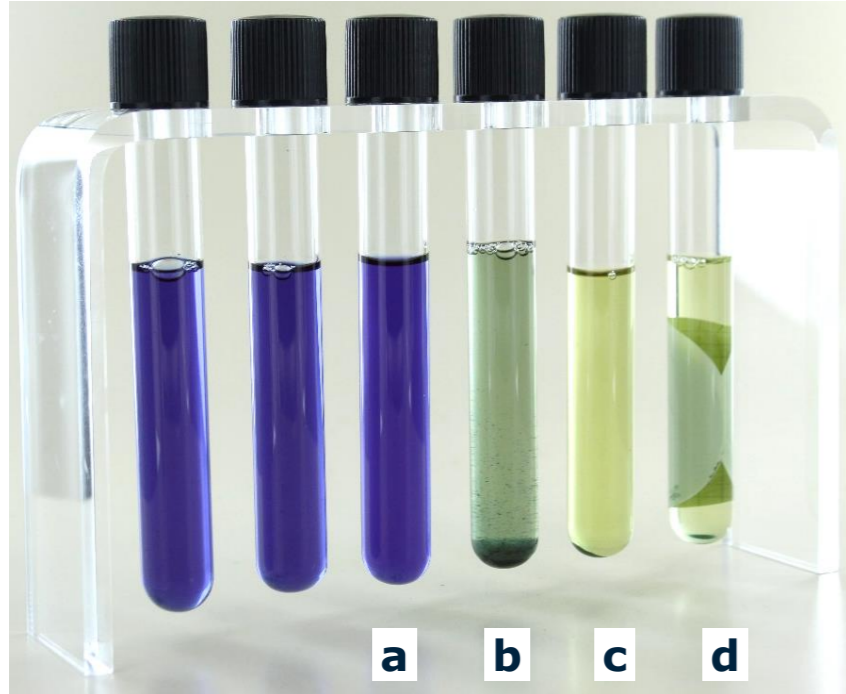


b) Austrich

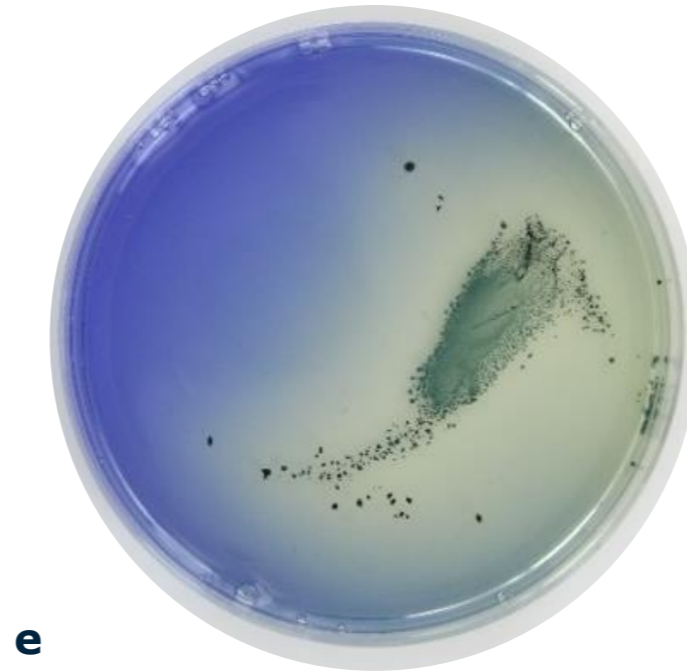


DSDM™ – Döhler Saccharomyces Diastaticus Medium

Bilder von Positivbefunden



- a** Negativkontrolle
- b** *S. diastaticus*, Hefeprobe, Anreicherung
- c** *S. diastaticus*, direkt inokuliert
- d** *S. diastaticus*, Bierprobe, Membranfilter



e *S. diastaticus*, direkt inokuliert)



f *S. diastaticus* Einzelkolonien (FVA + PG)

Siebel Kulturmedien – Partnerschaft mit Döhler

Seit 2019 Döhler produziert und vertreibt die weltweit bekannten Kulturmedien vom Siebel Institute of Technology für die mikrobiologische Analyse. DSDM™ ist die erste Portfolioerweiterung.



weltweit bekanntes amerikanisches Institut und Anbieter von Ausbildung, Produkten und Service für die Brauereindustrie

Alles für die mikrobiologische Hefe- und Bieranalyse

Vertrauen Sie auf unsere bewährten Lösungen für alle MiBi Analysen in der Brauerei!



Bierverderbende Bakterien



NBB®-B
Hefeanalyse



NBB®-C
Unfiltratanalyse



NBB®-A
Filtratanalyse



NBB®-PCR
fPCR Anreicherung



BQC Kit
Für Kleinlabore



LMDA | HLP



Wort Agar



DSDM | LCSM | LWYM

Bei den bierschädlichen Mikroorganismen handelt es sich neben der wilden Hefe hauptsächlich um fakultativ oder obligat anaerobe Milchsäurebakterien mit einer spezifischen Alkohol- und Hopfentoleranz, z. B. *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* oder *Pediococci* usw.. Sie können bereits in Rohstoffen wie Wasser oder Anstellhefe und im Produktionsprozess vom Sudhaus bis zur Abfüllung, vom unfiltrierten bis zum abgefüllten Bier vorhanden sein. Ein wesentlich höheres Kontaminationsrisiko besteht jedoch bei der Abfüllung, wenn sich Biofilme als Quelle einer Sekundärkontamination etablieren können.

Die **NBB®** range umfasst gebrauchsfertige Medien - von der Bouillon bis zum Agar - für den Nachweis von Spurenverunreinigungen in allen Proben entlang des gesamten Brauprozesses. Schon der Erfinder Prof. Dr. Werner Back legte höchsten Wert auf Sicherheit, Schnelligkeit und Selektivität. Durch seine Entdeckung spezieller Wachstumssubstanzen werden auch sehr langsam wachsende Keime in kürzester Zeit zuverlässig nachgewiesen.



Wasser



Soft drinks



Soft



Bier



Alkoholisch



Hygiene



Validierung

Hefen

Um die Sicherheit zu erhöhen werden nicht relevante Mikroorganismen gehemmt. Brauereien vertrauen auf **NBB®** rund um den Globus.

Das **BQC** (Brewers Qcheck Kit) enthält ausnahmslos einfach zu handhabende Einzeltests, deren Auswertung auch für nicht geschulte Laboranten unkompliziert ist.

"Halten Sie Ihre Hefe fit und rein". Unerwünschte Kontaminationen mit wilder Hefe lassen sich mit dem **Siebel**-Medienangebot nachweisen. Seit Jahren vertraut uns das **Siebel Institute of Technology US** die Herstellung seiner hochwertigen Produkte an.

Unsere neueste Eigenentwicklung im Bereich der Hefeanalyse ist das **DSDM™** Nachweismedium für *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* – selektiv und schnell!



WE BRING
IDEAS TO LIFE.

NATURAL INGREDIENTS
INGREDIENT SYSTEMS
INTEGRATED SOLUTIONS