

Versuchs- und Lehranstalt
für Brauerei in Berlin e.V.



VLB
BERLIN

Forschungsthema:

Nachhaltige und schonende Getränkepasteurisation unter Berücksichtigung der individuellen mikrobiologischen und verfahrenstechnischen Bedingungen am Beispiel Bier



AiF-Vorhaben-Nr.:

17129 N

IGF

Industrielle
Gemeinschaftsforschung

Name der Forschungsstelle(n):

Hochschule Ostwestfalen Lippe
Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V. /
Forschungsinstitut für Biotechnologie und Wasser (FIBW)

AiF

Forschungsnetzwerk
Mittelstand

Kontakt:

Dr.-Ing. Martin Hageböck, m.hageboeck@vlb-berlin.org

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Bewilligungszeitraum:

1.5.2011 – 31.10.2013

SCHLUSSBERICHT



WISSEN
SCHAFFT
QUALITÄT

Versuchs- und Lehranstalt
für Brauerei in Berlin e.V.



VLB
BERLIN

Forschungsthema:

Nachhaltige und schonende Getränkepasteurisation unter Berücksichtigung der individuellen mikrobiologischen und verfahrenstechnischen Bedingungen am Beispiel Bier



AiF-Vorhaben-Nr.:

17129 N

Name der Forschungsstelle(n):

Hochschule Ostwestfalen Lippe
Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V. /
Forschungsinstitut für Biotechnologie und Wasser (FIBW)



Forschungsnetzwerk
Mittelstand

Kontakt:

Dr.-Ing. Martin Hageböck, m.hageboeck@vlb-berlin.org

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Bewilligungszeitraum:

1.5.2011 – 31.10.2013

SCHLUSSBERICHT



WISSEN
SCHAFFT
QUALITÄT

Impressum

Herausgeber:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

www.vlb-berlin.org

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

Ziel des Vorhabens war es, die Parametrierung der Pasteurisation von Bier zu verbessern. Dabei gliederten sich die Untersuchungen in drei wesentliche Schritte: Die präzise und zeitnahe Erfassung der Mikroorganismen des lagernden Bieres, die genaue Bestimmung des Wärmeeintrags bei Kurzzeiterhitzungsanlagen sowie Flaschenpasteuren. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Sekundärkontamination von Flaschen und zur Absterbekinetik der Bierschädlinge durchgeführt.

Im ersten Abschnitt, der schnellen Bestimmung von hoch verdünnten Bierschädlingen, konnten die Ziele zum Teil erreicht werden. Es konnten eine Reihe von Primern identifiziert werden, die es ermöglichen alle wichtigen Bierschädlinge in einer quantitativen PCR zu bestimmen. Allerdings blieb die Konzentrationsuntergrenze, ab der eine Messung ohne Voranreicherung möglich war, mit $1 \cdot 10^3$ Koloniebildenden Einheiten/mL hinter den Erwartungen zurück. Dies lag darin begründet, dass das PEI-PE Polymer der Firma GEN-IAL (entwickelt vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Potsdam), das als Adsorptionsmedium getestet wurde, sich in der vorliegenden Form nicht eignet, da das Bindungsvermögen für Mikroorganismen zu hoch ist und sich die Bindung als irreversibel herausgestellt hat. Alternativen, wie eine Bindung an Aktivkohle sowie die Filtration des Produktes wurden daher zusätzlich getestet. Die Ergebnisse konnten allerdings nicht befriedigen. Die Ergebnislage ist daher insofern wertvoll, als dass sie als Ausgangspunkt für die Verbesserung der Technik nützlich sind. Die Oberfläche des PEI-PE Polymers kann in Zusammenarbeit mit der Firma GEN-IAL und dem Fraunhofer Institut so modifiziert werden, dass die Bindung der Mikroorganismen abgeschwächt wird um diese zur Analyse wieder ablösen zu können.

Zur genaueren Untersuchung der thermischen Entkeimung in Kurzzeiterhitzungsanlagen wurde ein Zeit-Temperatur-Integrator (TTI für Time-Temperature-Integrator) entwickelt, mit dem eine genauere Analyse der tatsächlich einwirkenden thermischen Belastung möglich ist. Der TTI beruht dabei nicht, wie die bisher gängigen Verfahren auf dem Absterbeverhalten von Mikroorganismen (Challenge Test), sondern auf einem chemischen Prozess, der deutlich genauer untersucht werden kann. Die Hydrolyse von Saccharose verläuft mit einer sehr genau bestimmbar Aktivierungsenergie E_A von 105,3kJ/mol. Die tatsächliche Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich durch den pH-Wert des Mediums einstellen, so dass die Reaktion auf die Versuchsparameter anpassbar ist. Ein Vergleich mit einem mikrobiologischen Challenge Test zeigte, dass sich mit dem TTI deutlich plausible und genauere Ergebnisse im Bereich der Heißhaltestrecke erzielen lassen als mit herkömmliche Verfahren. Dies gilt so allerdings nur für annähernd isotherme Abschnitte der Anlage (Heißhaltestrecke). Im Bereich der Aufheiz- und Abkühlstrecke, wo anisotherme Verhältnisse vorliegen, spielt die niedrige E_A im Vergleich zu der der thermischen Abtötung von Mikroorganismen eine Rolle. Die errechnete wirksame Temperatur liegt dann über der, die für Mikroorganismen gilt. Der Wert ist also, bei Einbezug der gesamten Anlage, mit einer Sicherheitsmarge versehen.

Der Wärmeeintrag in Gebinde bei der Vollpasteurisation ist im Vergleich zur KZE schwieriger genau zu bestimmen. Die klassische Methode der Messung des Temperaturverlaufs am kältesten Punkt (Cold Spot) gibt nur eine Untergrenze für die möglichen effektiven PE an. Der TTI lässt sich aufgrund der sehr weiten Temperaturänderungen bei der Vollpasteurisation hier nicht auf Mikroorganismen übertragen. Um genauere Einblicke in die Temperaturverteilung innerhalb des Gebindes zu bekommen wurde der Vorgang mit dem Programm Ansys CFX 14.0 (Ansys Inc. EUA), numerisch simuliert. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Teilchenbewegung und den Temperaturverlauf einzelner Volumenelemente (Partikel tracking) gelegt. Letzterer wurde dann verglichen mit der klassischen Cold Spot Messung. Es zeigte sich, dass die Temperatureinwirkung auf die einzelnen Partikeln, abhängig vor allem, aber nicht nur, vom Aufenthaltsort zu Beginn der Pasteurisation, stark voneinander abweicht (3 - 25 PE). Weiter wurde festgestellt, dass selbst die Partikeln mit der geringsten thermischen Dosage eine höhere PE-Belastung erfahren, als die Messung am Cold Spot ergibt.

Über diese zentralen Themen hinaus wurden Untersuchungen zur primären (Bier) und sekundären (Gebinde) Verkeimung des Bieres durchgeführt. Hierzu wurden Proben in insgesamt 9 Brauereien gezogen. Beprobte wurden Filtrat-Drucktanks sowie die Flaschen auf dem Transportband zur Abfüllung. Vor allen bei letzteren konnte eine deutliche Abhängigkeit der Keimbelastung vom allgemeinen Hygienezustand und den Hygienemaßnahmen vor Ort festgestellt werden. Gute Hygiene konnte die Belastung der Flaschen vor der Abfüllung um ein bis zwei Zehnerpotenzen senken.

Die Absterbekinetiken, die in der Literatur veröffentlicht sind, wurden gesichtet und in die Lemgo D- and z-value Database for Food übernommen. Es zeigte sich, dass bei einigen Keimen noch erhebliche Wissenslücken bestehen. Bei anderen sind zwar Untersuchungen vorgenommen worden, aber aufgrund der beschriebenen Methodik bestand erheblicher Zweifel an den Daten. Hier wurden eigene D-Wert-Bestimmungen durchgeführt um einen Teil der Lücken zu füllen. Insgesamt wurden D- und z-Werte für 4 Keime bestimmt. Bei *Lactobacillus brevis* DSM 6235 wurde zudem der Alkoholgehalt des Weizenbieres, das als Aufwuchs- und Abtötungsmedium diente variiert. Aufgrund der Größe der Wissenslücken konnten diese aber nur zum Teil geschlossen werden.

Das Ziel des Vorhabens wurde teilweise erreicht.

Wissenschaftlich-technischer Nutzen

Die Ziele des Vorhabens wurden teilweise erreicht. Der angestrebte Nutzen der Ergebnisse weicht daher von den Erwartungen ab, weist neben unvollständigen Zielerreichungen mit Konsequenzen für die unmittelbare Übertragung in die Praxis teilweise aber auch ein über den Erwartungen stehenden Erfolg und Nutzen auf.

Hinter den Zielen blieb die Datenlage für die Inaktivierungskennwerte bierschädlicher Mikroorganismen. Die mathematischen Grundlagen für eine präzisere Berechnung der Pasteurisationseinheiten (PE) liegen allerdings vor. Die kinetischen Daten für bierschädliche Mikroorganismen müssen jedoch weiter erarbeitet werden, denn die Recherche von Daten ergab so große Lücken, dass diese im Rahmen des Projektes nur teilweise gefüllt werden konnten. Somit kann eine schonendere Entkeimung zwar von jeder Brauerei sofort vorgenommen werden, die Sicherheitszuschläge können jedoch mit einer besseren Datenlage noch weiter reduziert werden. Dies gilt entsprechend für andere Getränke, die pasteurisiert werden.

Ebenfalls kann keine Methode zur prozesszeitnahen Bestimmung der Verkeimung *in hoher Verdünnung* bereitgestellt werden. Wobei nur die hohe Verdünnung noch nicht befriedigend gelöst ist. Die prozesszeitnahe Bestimmung ist möglich und wird durch eine Primersammlung erheblich erleichtert. Tatsächlich sind die Preise für Real-Time-PCR-Systeme ebenfalls deutlich niedriger als vor einigen Jahren, so dass dies für immer mehr Betriebe eine neue Möglichkeit der biologischen Kontrolle darstellt, die aufgrund der in dem Projekt erarbeiteten Grundlagen, auch für die Parametrierung der Pasteure genutzt werden kann.

Der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn wird als sehr groß erachtet und konnte durch mehrere Publikationen (Peer Review Verfahren) und Vorträge bekannt gemacht werden, weitere sind in Vorbereitung. Für die Praxis können die Ergebnisse unmittelbar zu einer Reduktion der thermischen Belastung bei der Pasteurisation (KZE und Vollpasteurisation) genutzt werden. Es wird jedoch dazu geraten eine adäquate mikrobiologische Kontrolle durchzuführen. Diese schonendere Einstellung lässt sich zurückführen auf folgende Erkenntnisse und Ergebnisse:

- a) Erkenntnis über den Zusammenhang der Keimzahldichte vor der Pasteurisation und den Hygienemaßnahmen im Abfüllbereich
- b) Bewertung der „Bierformel“ anhand neu erarbeiteter und recherchierter Abtötungskennwerte, die zeigen, dass die Bierformel gleichsam bereits einen Sicherheitszuschlag enthält.
- c) Erkenntnis, dass Verweilzeitverteilungseffekte mit Ausnahme sehr hoher Viskositäten einen nur vernachlässigbar kleinen (negativen) Einfluss auf die Keiminaktivierung in KZE-Anlagen haben.
- d) Eine einfache, genauere Methode erlaubt es den tatsächlichen Inaktivierungseffekt in einer KZE-Anlage präziser zu überprüfen als zuvor.
- e) Die Partikelbewegung in Flaschen führt zu einem höheren mittleren Inaktivierungseffekt als durch die Berechnung mit Bezug auf den „Cold Spot“ angenommen wird.

zu a) Die Erkenntnisse über die Verkeimungszustände vor der Pasteurisation (Primär- sowie auch Sekundärkontaminationen) sind wichtige Hinweise für die Betriebe in der Praxis erarbeitet worden. Unterscheide von bis zu 2 Zehnerpotenzen in der Keimzahldichte scheinen in einem Zusammenhang mit den Hygienemaßnahmen im Abfüllbereich zu stehen. Dies kann zur Anpassung der Pasteurisation an den Hygienezustand genutzt werden und schließlich zu einer schonenderen bzw. sichereren Pasteurisation.

zu b) Die Ergebnisse zu den Abtötungskennwerten bierschädlicher Mikroorganismen erlaubt die über 50 Jahre alte Berechnungsformel für die PE in Brauereien („Bierformel“) besser zu bewerten. Die Analyse der z-Werte zeigt, dass die so genannte Bierformel eine gute Annäherung an die Anforderung des tatsächlichen Spektrums der bierschädlichen Mikroorganismen ist, die jedoch bereits eine Sicherheitsmarge enthält. Ein weiterer Sicherheitszuschlag ist hinsichtlich der mikrobiologischen Anforderung („Soll-PE“) nicht notwendig. Auch dies kann zu einer schonenderen Pasteurisation genutzt werden.

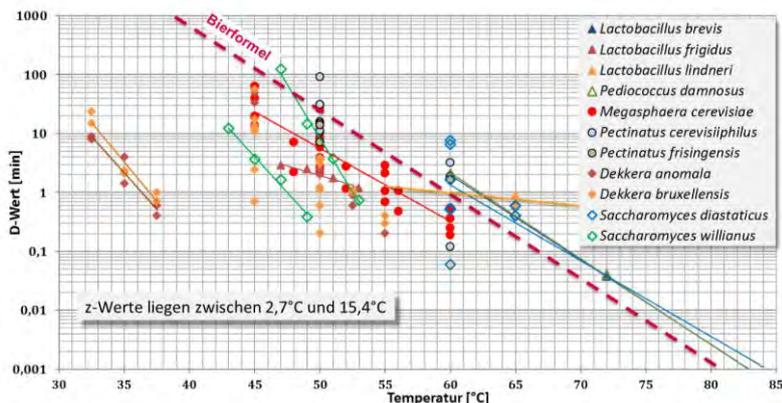
zu c) Hinsichtlich der tatsächlich angewendeten PE in KZE-Anlage konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeitverteilung nur bei sehr hohen Viskositäten (z. B. bei Zuckersirup oder Grundstoffen) berücksichtigt werden muss und ansonsten keine zusätzlichen Sicherheitszuschläge notwendig sind.

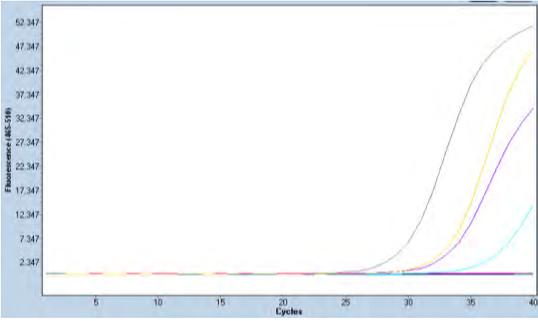
zu d) Die Untersuchung eines Verfahrens zur exakten Messung der thermischen Belastung (auch als PE ausgedrückt) hat zu einer leicht umsetzbaren chemischen Methode geführt, welche das Potential besitzt die herkömmliche, schwierige und vergleichsweise ungenaue mikrobiologische Methoden abzulösen. Der Test kann im Betrieb und auch von Beratungsunternehmen mit geringem Aufwand durchgeführt werden, z. B. bei technischen Abnahmen.

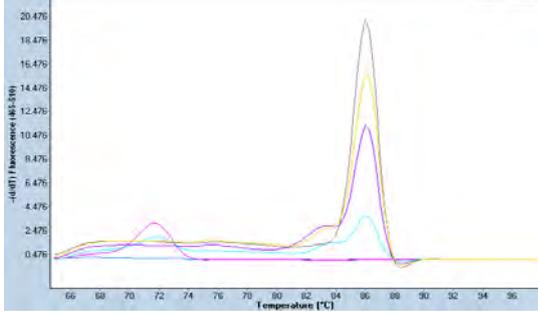
zu e) Bei Tunnelpasteuren ergab sich, dass der Bezug der PE-Berechnung auf den Cold-Spot bereits eine erhebliche Sicherheitsmarge enthält. Somit ist auch hier eine schonendere Entkeimung möglich. Es wird jedoch empfohlen bei Änderungen in der Parametrierung adäquate mikrobiologische Kontrollen durchzuführen.

Anlagenhersteller können mit dem Wissen über den Einfluss der Verweilzeitverteilung in KZE-Anlagen und über das Verhalten von Partikeln in Flaschen / Dosen bei der Vollpasteurisation bessere Auslegungen und Verbesserungen im Anlagendesign vornehmen. Der Projektpartner KHS GmbH hat angekündigt, dieses Wissen zu nutzen, welches dann z. B. durch kleinere Tunnelpasteure oder eine geringere thermische Belastung den Betreibern der Neugeräte nützlich ist. Beispielhaft sei erwähnt, dass eine Vermeidung der Flaschenbodenerwärmung die Strömungsführung in der Flasche verbessert, die wesentlich ist für den Wärmetransport in das Gebinde.

Verwendung der Zuwendung und Ergebnisse im Berichtszeitraum

Projektabschnitt A: Grundlagen zur präzisen Ermittlung der mikrobiologisch erforderlichen Temperatur-Zeit Parametrierung von Getränkepasteurierungen	
Arbeitspaket A1	Recherche vorhandener Abtötungskennwerte getränkesspezifisch schädlicher Mikroorganismen und Weiterentwicklung der ‚Lemgo D- und z-value Database for Food‘ zu einem Informationsportal zur Pasteurisation
Verwendung der Zuwendungen	<p>Durchgeführte Arbeiten: D- und z-Werte für Bierschädlinge wurden recherchiert und in die Datenbank eingepflegt. Darüber hinaus wurden für 3 Mikroorganismenarten (4 Stämme) eigene D-Wert-Bestimmungen durchgeführt. In kürze wird eine Version 2.0 der Datenbank veröffentlicht, die neben den neu gemessenen Kennwerten auch Berechnungsgrundlagen für die PE-Berechnung in KZE und Vollpasteurisationsanlagen enthält.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der Forschungsstelle (FS) 1 haben zwei wissenschaftliche Mitarbeiter 8,5 Personenmonate (PM) auf das Thema verwendet.</p> <p>Zur Bestimmung der D-Werte wurde die Sicherheitswerkbank (Laminarflow EF/S 4) eingesetzt.</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>Abbildung 1 zeigt die bei der Recherche gefundenen D-Werte zu Bierschädlingen. Vergleicht man die gefundenen Werte mit den Annahmen, die in die Bierformel eingegangen sind, so stellt man fest, dass die überwiegende Zahl der untersuchten Keime (zum Teil deutlich) geringere D-Werte aufweisen, also empfindlicher sind. Allerdings weichen die z-Werte zum Teil erheblich von 7°C ab, was bedeutet, dass die Bierformel bezüglich der Temperaturabhängigkeit keine gute Näherung darstellt.</p>  <p>Abbildung 1: Literaturdaten zu D- und z-Werte (Linien) von Bierschädlingen. Die gestrichelte Linie entspricht der Annahme in der Bierformel $D_{60^{\circ}\text{C}} = 1 \text{ min}$ und $z = 7^{\circ}\text{C}$</p> <p>Obwohl einige Werte gefunden wurden sind doch für etliche Schädlinge keine Daten gefunden worden. Bei anderen Keimen erschienen die verwendeten Messmethoden nicht angemessen. Daher wurden eigene Untersuchungen für einige wichtige Keime durchgeführt.</p> <p>Für <i>Lactobacillus brevis</i> wurden D- und z-Werte für zwei Stämme in MRS-Brühe, beziehungsweise in Weizenbieren mit verschiedenem Alkoholgehalt bestimmt. Des Weiteren wurden die Kennwerte für <i>Pediococcus damnosus</i> sowie <i>Lactobacillus hilgardii</i> bestimmt. Für <i>L. brevis</i> und <i>P. damnosus</i> wurden deutliche Abweichungen von den Literaturdaten festgestellt. Die gemessenen D-Werte lagen um den Faktor 40 niedriger als die Literaturwerte und damit deutlich unter den Werten der Bierformel. Da die vorhandenen Lücken in den Literaturdaten größer waren als erwartet konnten sie in der Projektzeit leider nicht alle geschlossen werden. Hier ist noch weitere Forschungsarbeit notwendig.</p> <p>Sowohl die gefundenen, als auch die selbst gemessenen D-Werte wurden in die ‚Lemgo D- und z-value Database for Food‘ eingepflegt. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der Projektabschnitte B und C so aufbereitet, dass interessierten Brauern ein Handlungsleitfaden für eine genauere Parametrierung von Pasteurisationsanlagen an die Hand gegeben wird. Diese Erweiterung der Datenbank wird mit dem nächsten Update der Datenbank veröffentlicht.</p> <p>Obwohl einige Daten in der Literatur gefunden wurden und weitere selbst gemessen wurden konnte noch kein vollständiges Bild über alle Entkeimungsdaten von Bierschädlingen zusammengestellt werden. Damit konnten die Aufgaben dieses Arbeitspaketes in wesentlichen Punkten, aber nicht</p>

	vollständig erfüllt werden
Arbeitspaket A2	Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Getränkeschadorganismen in hoher Verdünnung
Verwendung der Zuwendungen	<p>Durchgeführte Arbeiten: Es wurde zunächst im Labormaßstab die Bindung von <i>Lactobacillus brevis</i> und anderen Modellorganismen in unterschiedlichen Konzentrationen an PEI-PE Polymer und Aktivkohle untersucht. Anschließend wurde versucht die Bindung an PEI-PE Polymer auf einen industriellen Maßstab zu übertragen. Da dies nicht gelang wurden alternativer Methoden getestet. Zur qualitativen und quantitativen Analytik wurden verschiedene Methoden der PCR- sowie LC-PCR angewendet und optimiert.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 2 haben zwei wissenschaftliche Mitarbeiter insgesamt 23 PM auf das Thema verwendet.</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>Der Kontaminationsgrad in realen Proben ist meist sehr gering. Um die Konzentration dennoch mittels LC-PCR ermitteln zu können wird daher ein größeres Probevolumen benötigt. Um diesem Umstand gerecht zu werden sollte Bier mit geringen Konzentrationen an bierschädlichen Organismen kontaminiert werden. Anschließend sollte unter Verwendung von PEI-PE Polymer und alternativ Aktivkohle die Abtrennung und Aufkonzentration der Mikroorganismen realisiert werden. Es konnten mehr als 90 % aller im Produkt verfügbaren Mikroorganismen an das Polymer gebunden werden. Die Bindung des Modellorganismus <i>Lactobacillus brevis</i> an Aktivkohle war mit Bindungsraten von bis zu 40 % signifikant schlechter. Obwohl die Detektion der Organismen via PCR im Aktivkohlesystem sehr gute Ergebnisse brachte wurde das Modell aufgrund der schlechten Bindung zugunsten des Polymers verworfen. Darüber hinaus zeigt Aktivkohle einen Einfluss auf das zu beprobende Produkt (Bier) wohingegen sich das Polymer hinsichtlich Extrakt, Bittereinheiten, Gesamtstickstoff sowie Polyphenol- und Anthocyanogenfraktion inert verhält. Die im Labormaßstab entwickelte Methode zur Abtrennung des Polymers aus dem Produkt lässt sich via Upscaling nicht in die Praxis übertragen. Die Lösung wäre ein Bypasssystem im Produktstrom, wofür eine Abtrennung der Organismen vom Polymer notwendig ist. Das verwendete PEI-PE besitzt jedoch 3 pKs-Werte und damit einen breiten pH-Übergangsbereich vom geladenen zum ungeladenen Zustand. Die Fangeigenschaften sind sehr komplex und nur schwer vorhersagbar. Hier sind weitere Forschungstätigkeiten erforderlich, da gerade das möglichst vollständige Ablösen der gebundenen Mikroorganismen bzw. deren DNA für eine quantitative Aussage notwendig ist. Da sich der Einsatz des PEI-PE Polymers zur Isolierung von Mikroorganismen aus einem großen Volumen als sehr aufwendig erwiesen hat wurde eine alternatives Verfahren getestet. Hierbei handelt es sich um eine in Brauereien gängige Methode. Die Mikroorganismen werden über eine Membranfiltrationsanlage auf einem 0,45 µm Zellulose-Nitrat-Filter aufkonzentriert und anschließend mit einem Drigalski-Spatel und einem entsprechenden Puffer abgenommen. Der verwendete Puffer beinhaltet oberflächenaktive Substanzen, welche die Zellen von der Filtermembran lösen können. Diese Methode wurde bei Bierproben mit bekannten Kontaminanten getestet. Die Probe wurde jeweils mit 10^3 Zellen/100 mL bzw. mit 10^5 Zellen/100 mL definiert kontaminiert, anschließend wurden jeweils 100 mL der Probe filtriert. In Abbildung 2 ist der Nachweis von <i>Lactobacillus brevis</i> als Kontamination in einer Bierprobe dargestellt. Für den Nachweis des Kontaminationsgrades wurden bekannte Konzentrationen von <i>Lactobacillus brevis</i> im Nachweis mitgeführt. Es ist zu sehen, dass die Cp-Werte den jeweiligen Konzentrationen zugeordnet werden können und demnach eine Konzentrationsbestimmung erfolgen kann. Dieser quantitative Nachweis ermöglicht die Anpassung Pasteurisationseinheiten hinsichtlich der <i>Lactobacillus brevis</i> Belastung.</p> <p>A</p>  <p>Abbildung 2: A: Amplifikationskurve und B: Schmelzkurvenanalyse zur Wiederfindung von Kontaminationen Filtrierte Bierproben von <i>L. brevis</i> in der Konzentration von 10^5 Zellen/100 mL und 10^3 Zellen/100 mL zum Standard <i>L. brevis</i> von 10^6 Zellen/mL und 10^5 Zellen/mL, Auswertung bei 465-510 nm am LC 480 II und Verwendung des LightCycler® 480 SYBR Green I Master</p>

	 <p>Damit konnten die Aufgaben dieses Arbeitspaketes in wesentlichen Punkten, aber nicht vollständig erfüllt werden.</p>
<p>Arbeitspaket A3</p>	<p>Feldstudie zur Ermittlung realer Verkeimungen von Getränken</p>
<p>Verwendung der Zuwendungen</p>	<p>Durchgeführte Arbeiten: Im Rahmen der Feldstudie zur Ermittlung realer Verkeimungen von Getränken wurden von der Forschungsstelle 2 insgesamt 7 Filtrate (verschiedene Biere/Biertypen) aus 4 Brauereien hinsichtlich der Kontamination vor der Pasteurisation überprüft.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 2 haben zwei wissenschaftliche Mitarbeiter insgesamt 4 PM auf das Thema verwendet.</p>
<p>Erzielte Ergebnisse</p>	<p>Die direkt vom Drucktank gezogenen Proben wurden sowohl molekularbiologisch als auch entsprechend den VLB Standards der klassischen Mikrobiologie untersucht. In einer Brauerei wurde bei zwei vor Ort beprobten Drucktanks mit verschiedenen Bieren eine Kontamination mit Hefen nachgewiesen, die Untersuchung auf bierschädliche Bakterien hingegen blieb ohne Befund. Der Nachweis der Hefen erfolgte in Doppelbestimmung mittels klassischer Mikrobiologie mit Anreicherung auf einem Nährmedium. Die bestehenden Nachweisgrenzen der PCR-Analytik gemäß dem im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelten Verfahren ließen eine Detektion der Kontamination ohne Voranreicherung nicht zu. Die Filtratproben der anderen teilnehmenden Brauereien waren hinsichtlich aerober und anaerober Keime nicht zu beanstanden.</p>
<p>Arbeitspaket A4</p>	<p>Anpassung bekannter Methoden zur prozesszeitnahen quantitativen und qualitativen Bestimmung der Ausgangsverkeimung</p>
<p>Verwendung der Zuwendungen</p>	<p>Durchgeführte Arbeiten: Der prozesszeitnahe quantitative und qualitative Nachweis von bierschädlichen Mikroorganismen wurde mittels Real-Time-PCR mittels der LC480 der Firma Roche etabliert. Der Nachweis von positiven Reaktionen erfolgte durch die Verwendung von SybreGreen als Detektionsfarbstoff. Verwendet wurden folgende Mikroorganismen in Rein- als auch Mischkultur: Lactobacillus brevis, Lactobacillus lindneri, Pediococcus damnosus, Pectinatus frisingensis, Megasphaera cerevisiae, Saccharomyces distaticus, Pichia membranefaciens, Dekkera bruxellensis sowie eine untergärige Brauhefen. Die getesteten Primer zum Nachweis der Mikroorganismen sind in Anhang 1 aufgeführt.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 2 haben zwei wissenschaftliche Mitarbeiter insgesamt 12,7 PM auf das Thema verwendet.</p>
<p>Erzielte Ergebnisse</p>	<p>Durch den Einsatz von universellen Primern zum Nachweis von Bakterien bzw. Hefen können Mikroorganismen über die Schmelzkurvenanalyse identifiziert werden. In einer Mischkultur erweist sich dies allerdings als sehr komplex, da alle Mikroorganismen erfasst werden und die Schmelzpunkte der Amplifikate sehr dicht beieinander liegen bzw. teilweise mehrere Schmelzpunkte bei einem Keim auftreten. Zur Verdeutlichung ist die Analyse der einzelnen verwendeten Mikroorganismen mit den universellen Primern 16S_fw und 16S_rv in Abbildung 3 dargestellt.</p>

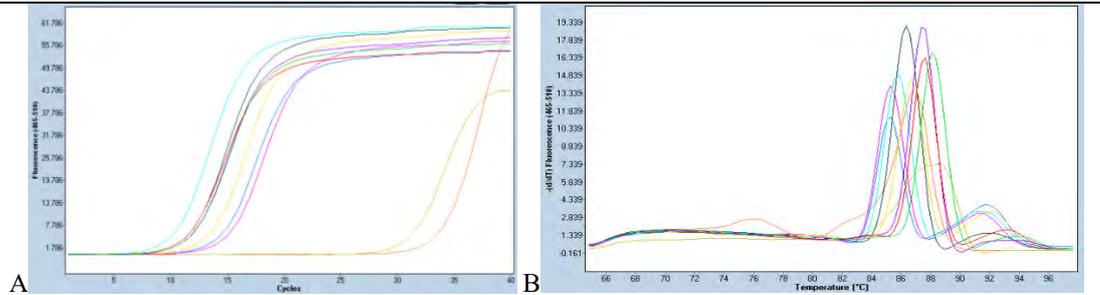


Abbildung 3: A: Amplifikationskurve und B: Schmelzkurvenanalyse bei Verwendung der Primer 16S_fw/16S_rv und der Mikroorganismen *S. pastorianus*, *S. diastaticus*, *P. membranifaciens*, *L. lindneri*, *L. brevis* DSM 20054, *P. damnosus*, *M. cerevisiae*, *Pec. frisingensis*, Exkrationskontrolle, NTC, cPrimer: 0,8 µM, Ta: 51 °C, 40 Zyklen, Auswertung bei 465-510 nm (analysiert in Reinkulturen)

Die Verwendung der universellen Primer CS und Lacto3 ermöglicht jedoch eine generelle Einteilung bzw. Bestimmung der Mikroorganismen in der zu untersuchenden Probe. Mittels der CS-Primer konnten bis auf *Dekkera bruxellensis* alle untersuchten Hefen bestimmt werden. Der Lacto3-Primer kann spezifisch nur die Milchsäurebakterien nachweisen.

Um einen deutlichen und schnell zuzuordnenden Nachweis zu erbringen wurden verschiedene, für die jeweiligen Mikroorganismen spezifische Primer getestet. Mit den Primern Debru, Labre1, Mece2, Peda3, Pefri, Sadi konnten die getesteten Mikroorganismen spezifisch nachgewiesen werden, d. h. nur die jeweils für den entsprechenden Primer spezifischen Mikroorganismen ergaben ein positives Signal. Bei Verwendung des Primers Peda3 zum Nachweis von *Pediococcus* und *Lactobacillus* erfolgt eine eindeutige Zuordnung anhand der Schmelzkurvenanalyse. In Abbildung 4 ist der spezifische Nachweis von *Pectinatus frisingensis* mittels LC-PCR dargestellt.

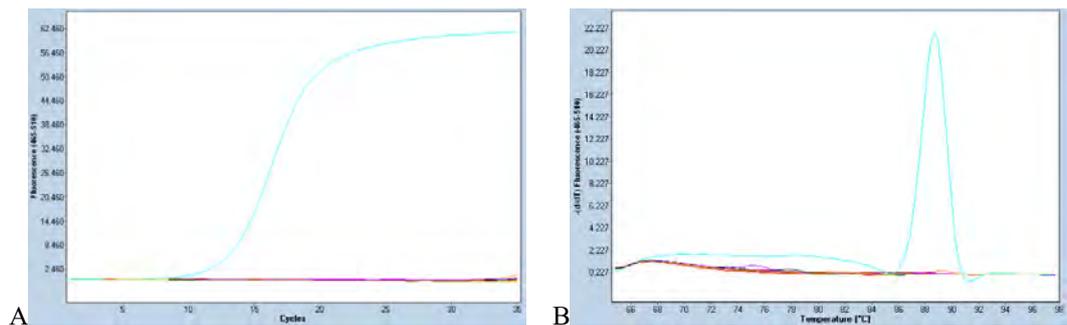


Abbildung 4: A: Amplifikationskurve und B: Schmelzkurvenanalyse bei Verwendung der Primer Pefri_fw/Pefri_rv und der Mikroorganismen *S. pastorianus*, *S. diastaticus*, *P. membranifaciens*, *D. bruxellensis*, *L. lindneri*, *L. brevis* (DSM 20054), *L. brevis* (WS242/01), *P. damnosus*, *M. cerevisiae*, *Pec. frisingensis*, NTC, cPrimer: 0,8 µM, Ta: 60 °C, 35 Zyklen, Auswertung bei 465-510 nm

Alle Mikroorganismen konnten eindeutig bis zu einer Konzentration von 10^3 Zellen/mL nachgewiesen werden, die Zuordnung von Konzentrationen anhand der Cp-Werte konnten unter Verwendung von Standardreihen von 10^7 Zellen/ml bis 10^3 Zellen/ml realisiert werden. Das innerhalb des Projektes entwickelte Nachweissystem mittels LC-PCR und SybreGreen setzt sich wie in Tabelle 1 dargestellt zusammen.

Tabelle 1: Primer zum spezifischen Nachweis von Mikroorganismen bzw. Mikroorganismengruppen mittels LC-PCR und SybreGreen

	Primer		C _{primer} [µM]	Annealing- temperatur Ta [°C]	Zyklen	positive Mikroorganismen	Schmelz- temperatur Tm [°C]
	forward	reverse					
	universelle Primer						
	CS_fw	CS_rv	0,8	60	35	<i>S. pastorianus</i> , <i>P. membranifaciens</i> <i>S. diastaticus</i>	84 84 88
	Lacto3_fw	Lacto3_rv	0,8	60	35	Milchsäurebakterien	83
	spezifische Primer						
	Debru_fw	Debru_rv	0,6	60	35	<i>D. bruxellensis</i>	85
	Labre1_fw	Labre1_rv	0,6	60	35	<i>L. brevis</i> DSM 20054, <i>L. brevis</i> WS242/01	86
	Mece2_fw	Mece2_rv	0,8	60	35	<i>M. cerevisiae</i>	88
	Peda3_fw	Peda3_rv	0,8	60	35	<i>P. damnosus</i> <i>L. brevis</i> DSM 20054, <i>L. brevis</i> WS242/01	83 87 87
	Pefri_fw	Pefri_rv	0,8	60	35	<i>Pec. frisingensis</i>	89
	Sadi_fw	Sadi_rv	0,6	60	35	<i>S. diastaticus</i>	85
	<p>Bei dem System handelt es sich jeweils um Einzelnachweise in einzelnen Reaktionsansätzen d. h. die zu untersuchenden Proben müssen z.B. in einer 98-well Platte mit den jeweiligen Primern einzeln untersucht werden. Dies unterscheidet sie von anderen kommerziellen Nachweiskits wie z. B. foodproof Beer Screening Kit (LC 480) von BIOTECON oder das First-Beer PCR Kit von GEN-IAL. Beide verwenden Sonden zum Nachweis von spezifischen Mikroorganismen, wodurch mehrere Mikroorganismen in einem Ansatz untersucht werden können. Es handelt sich demnach um Multiplex-Systeme. Nachteilig ist jedoch, dass hauptsächlich Gruppen identifiziert werden. Der spezifische Nachweis von Hefen erfolgt bei BIOTECON gar nicht. Das First-Beer PCR Kit von GEN-IAL kann auch für die Hefen lediglich eine ja/nein-Aussage machen. Für eine eindeutige Bestimmung der Pasteurisationseinheiten ist jedoch ein spezifischer Nachweis der jeweiligen Mikroorganismen nötig, wo der eindeutige Vorteil des im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelten Systems zu sehen ist.</p> <p>Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.</p>						
Projektabschnitt B:	Präzise Ermittlung der technisch erforderlichen Temperatur-Zeit Parametrierung in kontinuierlichen Erhitzungsanlagen						
Arbeitspaket B1	Untersuchung der Verweilzeitverteilung in kontinuierlichen Kurzzeiterhitzungsanlagen						
Verwendung der Zuwendungen	<p>Durchgeführte Arbeiten: Zunächst wurde nach einem für die Anwendung geeigneten Spurstoff für die Untersuchung der Verweilzeitverteilung gesucht. Zur Einstellung unterschiedlicher Viskositäten konnte nicht wie ursprünglich vorgesehen Pektin verwendet werden, da hier ein zunehmend strukturviskoses Verhalten auftritt, daher wurde ein geeigneteres Verdickungsmittel gesucht. In einer Kurzzeiterhitzungsanlage in der FS 1 wurde die Verweilzeitverteilung bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten, Viskositäten und Rohrlängen untersucht. Aus den Ergebnissen wurden beispielhafte Entkeimungswirkungen berechnet und mit der theoretischen mittleren Verweilzeit verglichen.</p> <p>Von den Industriepartnern wurde die Frage herangetragen, welche Auswirkungen durch extrem hohe Viskositäten auf Verweilzeitverteilungen und Absterbekinetiken zu erwarten sind. Daher wurden weitere Verweilzeitverteilungen mit einer Lösung durchgeführt, die in etwa der Viskosität einer 50 %igen Zuckerlösung entsprach. Auffällig war, dass die in der Industrie verwendete Anlage eine 4-fach so Große Verweildauer in der Aufheizphase im Vergleich zur Haltestrecke besitzt. Daher wurde mit dem im AP B2 entwickelten TTI untersucht wie sich die Aufheizphase auf die tatsächlichen PE auswirkt.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 1 haben zwei wissenschaftliche Mitarbeiter zusammen 5 PM auf das Thema verwendet.</p>						
Erzielte Ergebnisse	<p>Die Versuche haben ergeben, dass die rechnerische Entkeimung basierend auf der theoretischen mittleren Verweilzeit in jedem Fall einen zu hohen Wert angibt. Wie groß die Auswirkung der Verweilzeitverteilung ist hängt aber von verschiedenen Faktoren ab. Je nach Viskosität, Fließgeschwindigkeit oder (in geringerem Maße) Rohrlänge kann der Fehler vernachlässigbar klein sein, oder auch mehrere Dekaden betragen. Wichtig ist dabei auch die Abtötungskinetik, welche über den D- und z-Wert beschrieben wird. Bei niedrigen D-Werten, also bei der Betrachtung empfindlicher Keime, wirkt sich die Verweilzeitverteilung deutlich stärker aus als bei weniger empfindlichen Keimen. Verallgemeinert gilt, dass je höher die Gesamtkeimreduktion, desto größer</p>						

	<p>wird der Prozentuale Fehler. Bei den Versuchen mit einer Viskosität einer 50%igen Zuckerlösung konnte durch die hohe Viskosität in der Heißhaltestrecke keine turbulente Strömung mehr aufrechterhalten werden. Die Folge ist eine deutlich breitere Verweilzeitverteilung als bei niedrigerer Viskosität. Dies hat dann erhebliche Auswirkungen auf die Effektivität der Entkeimung. Im konkreten Fall liegen die tatsächlichen PE um 25 % unter der durch eine mittlere Verweilzeit errechneten Entkeimungswirkung.</p> <p>Zusätzlich zur Verweilzeitverteilung wurde auch der Einfluss der Aufheizphase auf das Entkeimungsergebnis untersucht. Hierfür wurde der im AP B2 entwickelte TTI in der Laboreigenen KZE angewendet. Bei einem Aufheizvolumen-zu-Heißhaltestrecke-Verhältnis von 0,6-1,5 : 1, was dem Verhältnis der meisten KZE-Anlagen für niedrigviskose Flüssigkeiten entspricht, ergab sich eine im Vergleich zu den in der Heißhaltestrecke induzierte PE, von nur 1,5-7%. Da in der Industrieanlage für hochviskose Flüssigkeiten (Sirup) jedoch ein Verhältnis von 4 : 1 vorliegt, wird hier die Aufheizphase einen erheblich größeren Anteil haben. Nach Abschätzungen dürften 20 – 25% der PE der Heißhaltestrecke zusätzlich in der Aufheizstrecke auf das Produkt einwirken. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.</p>
Arbeitspaket B2	Entwicklung eines chemisch-analytischen Tests zur Prüfung der mittleren angewendeten Temperatur in Erhitzungsanlagen
Verwendung der Zuwendungen	<p>Durchgeführte Arbeiten: Zunächst wurde untersucht, ob die angedachte chemische Reaktion (Hydrolyse von Saccharose) für die Nutzung als Time-Temperature-Integrator (TTI) geeignet ist, oder ob es alternative Lösungen gibt. Anschließend wurde ein Vergleich zwischen zwei Kalibrierungsmethoden (isotherm und nicht-isotherm) durchgeführt. Der Test wurde kalibriert indem die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Säurekonzentration bestimmt wurde. Zur Kontrolle wurden die Ergebnisse mit einer zweiten Säure überprüft. Zum Abschluss wurde ein mathematisches Modell entwickelt, mit dem die optimale Säurekonzentration für eine Entkeimungsanlage ermittelt werden kann.</p> <p>Nach der Kalibrierung mit der 5%igen Zuckerlösung konnte der Test in einer KZE angewendet werden. Zur Berechnung der mittleren wirkenden Temperatur und daraus der wirkenden PE wurden die nötigen Gleichungen ermittelt. Um eine statistisch sichere Aussage über die Qualität dieses TTI treffen zu können wurden 5-fach Bestimmungen bei jeweils 3 Haltezeiten und 5 Temperaturen durchgeführt. Aufgrund der Viskositätsabhängigkeit der Versuche eignet sich die 5%ige Zuckerlösung besonders für Bier und andere eher wässrigen Getränken. Um den Test auch für viskosere Substanzen wie Sirupe durchführen zu können wurde zusätzlich die Reaktion mit einer 52%igen Zuckerlösung kalibriert.</p> <p>Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 1 haben die beiden wissenschaftlichen Mitarbeiter zusammen 7 PM auf das Thema verwendet.</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>Alternativ zur Hydrolyse von Saccharose wurden auch enzymatische Reaktionen (Zersetzung von Maltose durch Glycoamylase) und die Oxidation von Ascorbinsäure auf Ihre Eignung als Integrator getestet. Glycoamylase zeigte jedoch keine lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur. Bei dem Zerfall der Ascorbinsäure gibt es 2 Reaktionsmechanismen abhängig von der Sauerstoffkonzentration mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Hydrolyse von Saccharose erfüllt alle Anforderungen an einen TTI.</p> <p>Die nicht-isotherme Kalibrierungsmethode stellte sich als die exaktere heraus. Mit dieser wurde eine Kalibrierkurve abhängig von der Säurekonzentration aufgestellt. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse hängt semilinear von der Säurekonzentration ab:</p> $k_0[s^{-1}] = c(H^+)^{1.063} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \cdot 4.467 \cdot 10^{14} \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{s}} \right]$ <p>Aufgrund dieser Abhängigkeit wurde ein mathematisches Modell entwickelt, mit dem man die Säurekonzentration des Indikators an die Gegebenheiten des zu untersuchenden Prozesses anpassen kann.</p> <p>Diese Versuche wurden zunächst mit Salzsäure als H⁺-Quelle durchgeführt. Anschließend wurden einige Versuche mit Salpetersäure durchgeführt. Die obige Gleichung konnte mit hoher Genauigkeit auch mit dieser Säure dargestellt werden. Beim Einsatz in Kurzzeiterhitzungsanlagen ist der Stahl gegenüber Salpetersäure weitgehend beständig, während Salzsäure zu Korrosion führen könnte. Daher wurden für die weiteren Versuche Salpetersäure verwendet.</p> <p>Aufgrund der unterschiedlichen Aktivierungsenergien von der Abtötung von Mikroorganismen und der Hydrolyse von Zucker kann mit dem TTI nicht die gesamte Anlage also Aufheizphase, Haltestrecke und Abkühlphase auf einmal getestet werden. Damit eine genaue Aussage über die Heißhaltestrecke getroffen werden kann müssen am Anfang und am Ende der Heißhaltestrecke gesondert Proben entnommen werden, sodass der Umsatz der Hydrolyse in der Heißhaltestrecke bestimmt werden kann. Aus dem Umsatz und der Verweilzeitverteilung konnte dann iterativ die</p>

mittlere wirkende Temperatur bestimmt werden. Diese wurde dann mit der gemessenen Ein- und Ausgangstemperaturen der Heißhaltstrecke verglichen, wobei die mittleren Temperaturen, außer bei wenigen Ausreißern, immer zwischen diesen Grenztemperaturen lagen (Abbildung 5).

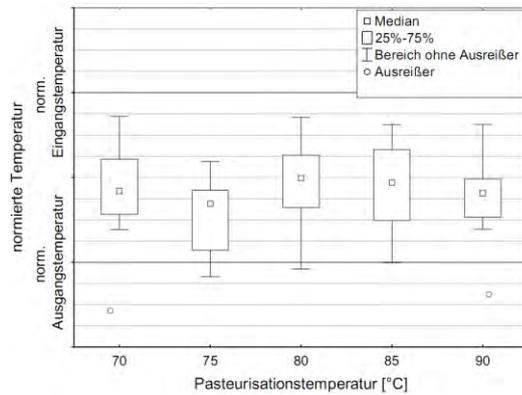


Abbildung 5: Darstellung der gemessenen mittleren wirkenden Temperatur im Vergleich zur Ein- und Ausgangstemperatur in der Heißhaltstrecke einer KZE in normierter Form:

$$\vartheta_{TTI \text{ normiert}} = \left(\frac{\vartheta_{TTI} - \vartheta_{outlet}}{\vartheta_{inlet} - \vartheta_{outlet}} \right)$$

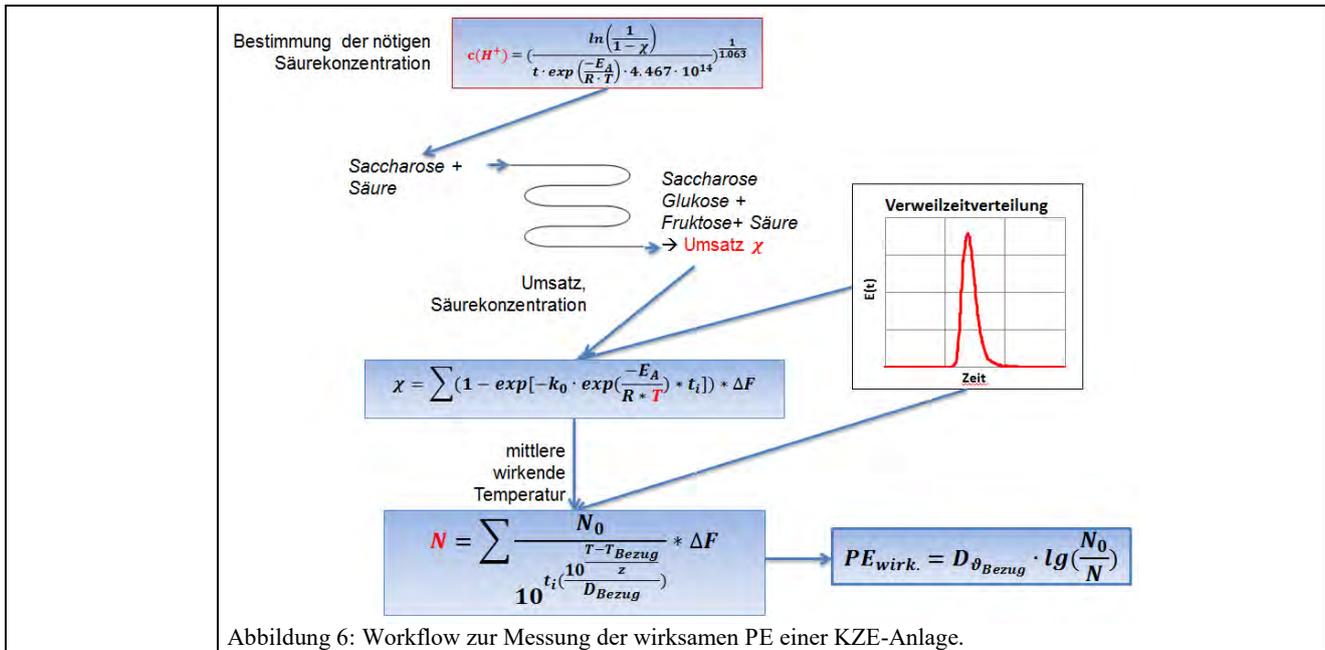
Die Spanne zwischen Ein- und Ausgangstemperatur betrug zwischen 1 und 4°C. Je Temperatur gingen 15 Versuche ein.

Um aus der mittleren wirkenden Temperatur wirkende PE berechnen zu können werden die Einflüsse der Verweilzeitverteilung sowie die zugrundeliegende Absterbekinetik der Mikroorganismen, also die D- und z-Werte, einbezogen. So kann zunächst die resultierende Keimzahl und dann die wirkende PE berechnet werden.

Das ausgeprägte Temperaturprofil während der Aufheiz- und Abkühlphasen führt im Zusammenspiel mit der sehr unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit von chemischer Reaktion und biologischer Absterberate dazu, dass man nur ungefähre, aber eher zu niedrige PE für diese Abschnitte angeben kann.

Zusätzlich wurde noch die Hydrolyse von Zucker mit einer 52%igen Zuckerlösung kalibriert. Es ergab sich eine etwas höhere Aktivierungsenergie als mit einer 5%igen Zuckerlösung und die Reaktion verläuft an sich schneller, sodass bei der Anwendung niedrigere Säurekonzentrationen nötig sind. Die Abhängigkeit wurde für Säurekonzentrationen zwischen 0,002 und 0,6 mol/L ermittelt.

Arbeitspaket B3	Entwicklung von Computerprogrammen zur Berechnung der erforderlichen und der wirksamen PE und Implementation in die Internetdatenbank
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Die ermittelten Berechnungsgrundlagen aus den AP B1 und B2 wurden aufgearbeitet um sie als einfachen Workflow für Anwender in das Datenbankportal einzubinden. Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 1 hat ein Wissenschaftler 2,5 PM auf das Thema verwendet.
Erzielte Ergebnisse	Aus den ermittelten Gleichungen wurde ein Workflow für eine einfache Bestimmung der wirksamen PE mithilfe des entwickelten TTIs sowie optional der Verweilzeitverteilung entwickelt (Abbildung 6). Mithilfe dieses Workflows ist es auch kleinen und mittleren Brauereien möglich eine präzisere Bestimmung der Pasteurisationswirkung ihrer KZE durchzuführen, ohne ihre Anlage mit eingebrachten Keimen zu kontaminieren. Der Einbau dieses Workflows in die Benutzeroberfläche der Datenbank wird in AP A1 durchgeführt. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.



Arbeitspaket B4	Verifikation der Berechnungen der wirksamen PE an einem mikrobiologischen Count-Reduction-Test
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Zunächst wurde anhand der in der Datenbank vorhandenen Daten ein Keim selektiert, der sich für die Durchführung des Count-Reduction-Tests eignet. Er sollte bei Prozessparametern, die der realen Pasteurisation nahe kommen um einige Dekaden reduziert werden ohne ganz abgetötet zu werden. Da die Literaturdaten für unsere Zwecke als nicht präzise genug erschienen, wurden Messungen zu einer genaueren Bestimmung der D- und z-Werte durchgeführt. Anschließend wurde der Count Reduction Test mit dem Testkeim sowie ein TTI mit den gleichen Testparametern an der KZE durchgeführt. Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 1 haben die beiden wissenschaftlichen Mitarbeiter zusammen 4 PM auf das Thema verwendet.
Erzielte Ergebnisse	Als möglicher Keim wurde aufgrund der Literaturdaten in der Datenbank zunächst der obligat bierschädliche Keim <i>Pediococcus damnosus</i> gewählt. Es zeigte sich, dass der von uns verwendete Stamm empfindlicher auf Hitzeeinwirkung reagiert, als in der Literatur angegeben. Da der Count Reduction Test mit dem <i>P. damnosus</i> deutlich unter 60°C durchgeführt werden müsste um eine Endkeimzahl über der Nachweisgrenze zu erhalten, wurde nach einem besser geeigneten Keim gesucht. Bei den D- und z-Wert Bestimmungen für die Datenbank wies <i>L. brevis</i> auch einen niedrigeren Wert als in der Literatur angegeben auf und erwies sich ebenfalls als untauglich. Daraufhin wurde der <i>L. Hilgardii</i> als möglicher Testkeim untersucht. Dieser hatte unter den gewählten Bedingungen (in Verdünnungsflüssigkeit kurz nach der exponentiellen Phase) einen $D_{60^\circ\text{C}}$ -Wert von 0,75 min und einen z-Wert von 5,4°C. Mit dieser Abtötungskinetik konnte der Count Reduction Test mit Temperaturen um 61°C durchgeführt werden. Um den Count Reduction Test und den TTI miteinander vergleichen zu können wurden beide Tests mit denselben Pasteurisationsbedingungen durchgeführt. Dabei lagen die ermittelten wirkenden Temperaturen vom TTI wieder etwa in der Mitte zwischen Eingangs- und Ausgangstemperatur. Der CRT lag hingegen über der Ausgangstemperatur. Somit lieferte der TTI plausiblere Ergebnisse als der klassisch angewendete CRT. Der TTI ist demnach nicht nur einfacher an zu wenden und mit geringeren Verunreinigungen für die Anlage verbunden, er liefert auch plausiblere Ergebnisse als der CRT. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.
Projektabschnitt C: Präzise Ermittlung der Temperatur-Zeit-Parametrierung in Vollpasteurisationsanlagen	
Arbeitspaket C1	Erforschung der maximalen Kontaminationskeimzahl bei Sekundärkontaminationen
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Es wurden 5 Brauereien besucht um vor Ort Proben zu nehmen, um die mögliche Kontamination von Bierflaschen vor der Abfüllung zu bestimmen. Hierfür wurden je 15 Flaschen direkt nach der Flaschenwaschmaschine entnommen. Weitere 15 Flaschen wurden sterilisiert und am Ausgang der Flaschenwaschmaschine auf das Transportband gesetzt. Entnommen wurden diese möglichst nah vor dem Füller. Alle Flaschen wurden auf Ihren Keimgehalt untersucht. Darüber hinaus wurden wichtige Parameter zur Hygiene bei

	<p>den Brauereien abgefragt. Dazu benötigt und eingesetzt: An der FS 1 haben die beiden wissenschaftlichen Mitarbeiter zusammen 1,5 PM auf das Thema verwendet</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>Zunächst wurde eine Methode entwickelt um den für den Brauereibereich relevanten Teil der Verkeimung von Bierflaschen untersuchen zu können. Hierzu wurden die Flaschen mit Verdünnungslösung ausgespült und die Lösung per Membranfiltration und auf Tropfplatten analysiert. Die Vermehrung der Keime erfolgte auf MRS-Agar. In nahezu allen frisch gewaschenen Flaschen konnten auf MRS-Agar Keime nachgewiesen werden. Dabei schwankte aber die Zahl der Keime deutlich zwischen wenigen Einzelkeimen und bis zu 20.000 KbE. Hygienemaßnahmen, wie eine regelmäßige Überwachung der Waschanlage, führen dabei zu einer deutlichen Reduktion der Kontamination auf unter 200 KbE. Einzelne Flaschen mit höherer Keimbelastung lassen sich aber auch hier nicht vermeiden und müssen in die Risikoabschätzung einbezogen werden. Auch bei der Untersuchung der Neuverkeimung durch Keime, die während des Bandtransportes in die Flasche gelangen, konnte eine Abhängigkeit von den Hygienemaßnahmen festgestellt werden. Während in einer Brauerei in den meisten Flaschen zwischen 1.000 und 10.000 KbE Keime gefunden wurden, waren in einer anderen nur 4 Flaschen mit 100 bis 1000 KbE Keimen belastet, der Rest war nahezu Keimfrei. Die gesamte Belastung der Flasche ist mit bis zu 30.000 KbE belastet. Bei guten Hygienemaßnahmen kann dies auf 5.000 KbE reduziert werden. Diese Maximalwerte können einer Berechnung der notwendigen PE zugrunde gelegt werden. Auch wenn die Beprobung aufgrund der verringerten Bearbeitungszeit (Andere AP benötigten mehr Zeit als gedacht) gekürzt wurde konnten wesentliche Erkenntnisse gewonnen werden und die Kernpunkte des Arbeitspaketes konnten abgeschlossen werden.</p>
Arbeitspaket C2	Ermittlung der wahren PE in Vollpasteurisationsanlagen in Abhängigkeit der zeitlichen Änderungen der Temperatur und der Partikelbewegungen durch Simulation
Verwendung der Zuwendungen	<p>Durchgeführte Arbeiten: Zunächst wurden die genauen Versuchsbedingungen für die angestrebten Simulationen festgelegt. Die notwendigen physikalischen Grundlagen wurden recherchiert. Anschließend wurde die numerische Simulation der Pasteurisation einer NRW-Flasche mit einem Temperaturprofil, das zu 20 PE nach klassischer Berechnung führt, durchgeführt. In weiteren Simulationen wurden das Erhitzungsregime sowie das Gebinde variiert. Dazu benötigt und eingesetzt: Für diese Aufgaben wurden an der FS 1 2 Personenmonate benötigt. Das ISF (Innovation, Simulation, Forschung) im Institut für wirtschaftliche und technologische Unternehmensführung an der Hochschule OWL e.V. wurde mit der Durchführung der Simulation beauftragt.</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>Zunächst wurden die Versuchsparameter der Simulation bestimmt. Als verbreitetes Gebinde wurde eine NRW-Flasche verwendet. Als Medium erhielt Wasser den Vorzug vor Bier, da hier die physikalischen Eigenschaften genauer bekannt sind, insbesondere die Viskosität und die Dichte (beide in Abhängigkeit von der Temperatur). So ließ sich ein besserer Vergleich zu den Realversuchen (C4) durchführen. Aus dem gleichen Grund wurden statt eines typischen Temperaturverlaufs eines Tunnelpasteurs (schnelle Temperaturwechsel zwischen den Zonen) flachere Rampen gewählt, die dem Verlauf der Spraytemperatur in dem Laboreigenen Kammerpasteur entsprachen. Die Simulation ergab die zu erwartende Temperaturverteilung (vergl. C4) und die bekannte Bewegung der Partikel in der Aufheiz- beziehungsweise Abkühlphase. Durch das Partikeltracking konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Volumenelemente thermische Energie nahezu nur im Wandbereich aufnehmen. Die einzelnen Partikel haben ein Stufenförmiges Temperaturprofil. Es findet nahezu kein Wärmetransport quer zur Strömung statt. Dagegen erfolgt die Erhitzung des Flascheninneren durch den Transport heißer Volumenelemente ins Innere. Die Folge ist, dass die einzelnen Partikel unterschiedliche Temperaturprofile haben und sich damit in den wirksamen PE deutlich unterscheiden (bis Faktor 10). Alle betrachteten Volumenelemente erfahren aber mehr PE als der Cold Spot 10 mm über dem Boden in der Gebindemitte (Abbildung 7)</p>

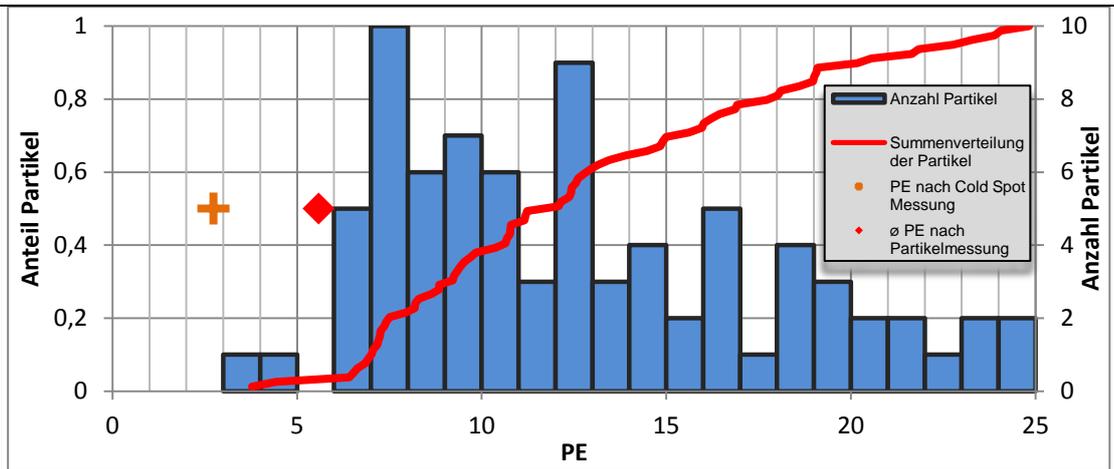


Abbildung 7: Wärmeeintrag in Pasteureinheiten (PE) des Cold Spot im Vergleich zu dem von 80 beobachteten Partikeln.

Das Bild, das sich bei diesen Versuchsparametern ergab wurde auch bei der Variation der Erhitzungsprofile sowie des Gebindes bestätigt. Allerdings konnte kein Wert angegeben werden, um welchen Prozentsatz man die am Cold Spot gemessenen PE erhöhen kann. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.

Arbeitspaket C3	Erstellung eines Handlungsleitfadens zur Vollpasteurisation sowie eines Berechnungstools zur Parametrisierung von Pasteuren
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Die Erkenntnisse aus AP C1 und C2 wurden aufbereitet um sie als Handlungsleitfaden für Anwender in das Datenbankportal einzubinden. Dazu benötigt und eingesetzt: Für diese Aufgaben wurden an der FS 1 1 Personenmonate benötigt.
Erzielte Ergebnisse	Die Ergebnisse der vorangegangenen AP haben gezeigt, dass eine objektive Berechnung der notwendigen PE kaum möglich ist. Es gehen zum einen schwer objektivierbare Parameter, wie der Hygienestatus der Brauerei, zum anderen die angestrebte Sicherheit für das einzelne Gebinde, welche eine individuelle Entscheidung der Brauerei ist, in die Berechnung ein. So wurden die Ergebnisse zu einem Leitfaden zusammengefasst, mit dem der zuständige Brauer zu einer objektiveren Entscheidung für die Parametrierung seiner Anlage kommen kann zusammengefasst, ohne ein direktes Berechnungstool zur Verfügung zu stellen. Der Einbau dieses Leitfadens in die Benutzeroberfläche der Datenbank wird in AP A1 durchgeführt. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.
Arbeitspaket C4	Experimentelle Verifikation der Simulationsversuche zur Flaschenpasteurisation
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Um die Realitätsnähe der numerischen Simulation zu bestätigen wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst wurden in einem Kammerpasteur Pasteurisationen von 4 Gebinden mit je 4 Thermoelementen durchgeführt und die örtlichen Temperaturprofile mit denen aus der Simulation verglichen. In einer zweiten Versuchsreihe wurden Gebinde mit einer sauren Zuckerlösung pasteurisiert und die mittlere wirksame Temperatur mittels TTI ermittelt. Auch hier wurden die Ergebnisse mit der Simulation verglichen. Dazu benötigt und eingesetzt: Für diese Aufgaben wurden an der FS 1 2,5 Personenmonate benötigt.
Erzielte Ergebnisse	Der Temperaturverlauf der gemessenen und der berechneten Punkte stimmen gut überein. Allerdings liegt die absolute Temperatur bei der Simulation im unteren Teil des Gebindes um ca. 3°C unter der gemessenen Temperatur. Da für die Untersuchung ein Vergleich innerhalb der simulierten Daten angestrebt wurde sollte diese niedrigere Temperatur einen geringen Einfluss auf das erzielte Ergebnis haben. Die Untersuchung der Pasteurisation mittels des TTI ergab eine mittlere, wirksame Temperatur von 51,3°C. Berechnet man analog eine mittlere wirksame Temperatur aus allen beobachteten Partikeln (vergl. AP C2), so ergibt sich eine mittlere, wirksame Temperatur von 49,7°C. Bedenkt man die niedrigere Temperatur innerhalb der Simulation ist dies eine gute Übereinstimmung und somit ein Hinweis, dass die Partikel eine gute Repräsentation aller Partikel darstellen. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.
Arbeitspaket D	Berichte, Präsentationen und Kommunikation
Verwendung der Zuwendungen	Durchgeführte Arbeiten: Die Projektergebnisse wurden durch Vorträge, Poster und Veröffentlichungen bekannt gemacht. Es fanden vier Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses (PA) statt. Mit diesem Schreiben liegt neben den beiden Zwischenberichten auch

	<p>der Abschlussbericht vor. Dazu benötigt und eingesetzt: Für diese Aufgaben wurden an der FS 1 1 Personenmonat und an der FS 2 0,3 Personenmonate benötigt.</p>
Erzielte Ergebnisse	<p>In den PA wurden jeweils die aktuellen Ergebnisse des Projekts vorgestellt. Anschließend fand eine Diskussion über die Ergebnisse und die weitergehenden Ziele statt, bei der nicht nur die anwesenden Vertreter der Brauereien, sondern auch die Vertreterinnen der Mineralwasserhersteller ihr reges Interesse an den Ergebnissen bekundeten. Genauere Angaben zu den Veröffentlichungen und zu weiteren Maßnahmen zum Ergebnistransfer finden sich im Kapitel ‚Ergebnistransfer in die Wirtschaft‘. Damit sind die Aufgaben dieses Arbeitspaketes erfolgreich abgeschlossen worden.</p>

Gewerbliche Schutzrechte

Es wurden weder gewerblichen Schutzrechte erworben, noch ist dies geplant.

Ergebnistransfer in die Wirtschaft

Informationen zu den Inhalten und Ergebnissen des Projekts wurden bzw. werden seitens der Forschungsstellen über folgende Maßnahmen und Wege transferiert, um eine breitenwirksame Nutzung der Ergebnisse in der Wirtschaft sicherzustellen:

Maßnahme	Ziel	Rahmen/Mittel	Erfolgte Maßnahmen
A Informationen über Plattformen der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei	Ergebnistransfer in die Wirtschaft und Wissenschaft mit laufenden Rückkopplungen	Präsentation von Projekt (-zwischen-) berichten beim Technischen Wissenschaftlichen Ausschuss (TWA) der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei e. V. (VLB) und Weitergabe dieser Berichte über die VLB an alle interessierten Unternehmen (elektronisches Informationssystem)	2 Vorträge TWA März 2012 Berichterstattung über Zeitschrift Brauereiforum
		Einpflegung in die Technische Datenbank der VLB (Zugang für alle TWA-Mitglieder)	Berichterstattung über TWA Internetplattform
B Informationsportal zur Pasteurisation	Bereitstellung von Servicetools in der Datenbank als Ergebnis der Arbeit	Die Daten der Datenbank werden erweitert. Die Datenbank wird zu einem Informationsportal erweitert. Die entwickelten Anwendungswerkzeuge und weitere Informationen stehen den Nutzern kostenlos zur Verfügung.	Erweiterung der Datenbankfunktionalität und Veröffentlichung von neuen D- und z-Werten ist vorbereitet und erfolgt mit dem nächsten Update.
C Entwicklung der Software bzw. Anlagentechnik der Anlagenhersteller	Verbreitung der neuen Verfahren über bestehenden und neuen Anlagen durch die Anlagenbauer	Vorstellung der Ergebnisse bei den bekannten Fachleuten der Anlagenbauer (im PA und außerhalb des PA) und Begleitung gemeinsamer „Pionierprojekte“	(nach Projektende, geplant für Januar 2014)
		Veröffentlichung und Verbreitung der Ergebnisse aus „Pionierprojekten“	(nach Projektende)
		Eigenständige Übernahme und Weitergabe der verbesserten Verfahren durch die Anlagenbauer	(nach Projektende)
D Einbeziehung bzw. Beteiligung von Branchenfachverbände als Informationsmultiplikatoren gegenüber der potentiellen Nutzergruppe	Rascher branchenfokussierter Ergebnistransfer in die Wirtschaft (Getränkeproduzenten und Zulieferindustrie)	Präsentation der Projekt (-zwischen-) berichte beim Technischen Ausschuss des Deutschen Brauerbundes (DBB) und Weitergabe dieser Berichte über den DBB an alle interessierten Unternehmen (elektronisches Informationssystem)	Ein Vortrag im Technischen Ausschuss des DBB am 2. 12.2011 in Berlin. Ein weiterer Bericht avisiert für 2014
		Information des VDI und des VDMA in Berichtsform und ggf. Präsentationen	erfolgt mit Zwischenbericht März 2013, weitere Info geplant Jan/Feb 2014
		Information des Verbandes der Wirtschaftsvereinigung Alkoholfreier Getränke (wafg) und Verband der Mineralbrunnen sowie beim Verband der Fruchtsaftindustrie durch	erfolgt erneut mit Zwischenbericht März 2013, weitere Info geplant Jan/Feb 2014

		Vorlagen in den technischen Gremien	
E Information und Beratung interessierter Unternehmen	Projekt begleitende Information und Beratung zur wirtschaftlichen- technischen Nutzung	Regelmäßige Sitzungen zur Information und Diskussion mit dem Projektbegleitenden Ausschuss (PA)	1. PA 10.10.2011 in Berlin 2. PA 6.11.2012 in Lemgo 3. PA 5.2.2013 in Berlin 4. PA 28.10.2013 in Berlin
		Beratung durch die VLB Berlin e.V. und das Technologietransferbüro der Hochschule Ostwestfalen-Lippe	Verschiedene Gespräche und Firmenbesuche fanden bereits statt, u.a. in einem Mineralbrunnen/AfG- Unternehmen, der Fa. KHS und in 9 Brauereien)
		Bei Interesse Erstellung eines Konzeptes zur Implementation in den Betrieben durch die Forschungsstellen	
F Präsentation der (Zwischen-) Ergebnisse bei Tagungen und Seminaren	Ergebnistransfer in die Wirtschaft und Wissenschaft	Maschinentechnische Arbeitstagung der VLB	Vortrag bei der internationalen Maschinentechnische Arbeitstagung der VLB in Siegen 2012 geplant für März / Oktober 2014
		European Brewery Congress, World Brewing Congress	Vortrag in Luxembourg Mai 2013 Poster in Luxembourg Mai 2013
		Fresenius Fachtagung Abfüllung sensibler Getränke	Vortrag 29.9.2011
G Publikationen in Zeitschriften	Ergebnistransfer in die Wirtschaft und Wissenschaft	Publikation der Ergebnisse in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	2 Peer Reviewed Artikel Sind Erschienen, 1 Peer Reviewed Artikel ist eingereicht, 1 weiterer ist in der Bearbeitung
		Publikation der Ergebnisse in Branchen- Fachzeitschriften	mehrere Fachartikel und Vorträge sind erfolgt. Siehe Liste am Ende der Tabelle
H Übernahme in die akademische Lehre	Ergebnisbereitstellung für künftige Führungskräfte und Unternehmer	Übernahme in der Lehre der TU Berlin (über Lehrbeauftragte der VLB)	erfolgt
		Übernahme in zahlreiche Kurse der VLB (u.a. certified brewmaster course)	erfolgt
		Übernahme in die Lehre der Hochschule Ostwestfalen-Lippe	erfolgt
		Transfer über studentische Abschlussarbeiten und Dissertationen	Dissertation Anna Dammann (voraussichtlich 2014 fertig) Studentische Arbeiten folgender Absolventen: Maximilian Behler 2013 Lara Böhm 2013 Katrin Leimkühler 2013 Susanne Petig 2012 Maximilian Vogt 2011 Thorsten Vullriede 2011

Das Transferkonzept wurde fortlaufend angepasst. Das Konzept funktioniert und wird weitergeführt. Insbesondere wird die Implementation in die Interndetdatenbank „LDzBase“ weitergeführt und soll anhaltend einen Transfer neuer Ergebnisse, auch anderer Arbeitsgruppen, die sich mit dem Thema beschäftigen, ermöglichen. Die Umsetzung und Nutzung der Ergebnisse in den Unternehmen der Getränkeproduktion und denen des Anlagenbaus ist bereits von diesen angekündigt worden.

Übersicht über veröffentlichte Artikel und Vorträge:

Scientific Journals

Dammann, A., Schwarzer, K., Müller, U., Schneider, J.: Study on the residence time distribution in flash pasteurizers and its effect on the thermal death of microorganism under consideration of the heating and cooling sections. (IN PREPARATION)

Dammann, A., Schwarzer, K., Müller, U., Schneider, J.: Evaluation of the acidic sucrose hydrolysis as Time-Temperature Integrator in Flash Pasteurizers. *Brewing Sciences* (SUBMITTED)

Dammann, A., Schwarzer, K., Vullriede, T., Müller, U., Schneider, J.: Determination of the Kinetic Parameters of a Time-Temperature Integrator for the Flash Pasteurization *Brewing Sciences* 65, 2012, 130-135

Dammann, A., Schwarzer, K., Müller, U., Schneider, J.: Flash Pasteurization of beer – a critical review. *Brewing Sciences* 64, 2011, 32-40

Professional Journal

Schwarzer, K.; Schneider, J.; Müller, U.; Becker, B.; Wilhelm, P.: Lemgo Database for D- and z-values: useful for beverage spoilage micro organisms: *Brauwelt International V* (2010), 252-256

Oral Presentations international

Schneider, J.; Schwarzer, K.; Dammann, A.; Müller, U.: Gentle Beverage Pasteurisation. KHS Forum, drinktec, Munich, September 17th 2013

Schneider, J.; Schwarzer, K.; Dammann, A.; Müller, U.: Time-Temperature Integrator for the Flash Pasteurisation. 34th EBC Congress, Luxembourg (Lux), May 28th 2013

Folz, R. (Lect.); Dammann, A.; Schwarzer, K.; Müller, U., Woest, H.; Schneider, J.:

Minimal Processing, a way to a gentle Pasteurization of Beer and Beverages, 8th VLB Seminar for the Brewing Industry, Russia, 27/28 November 2012

Bilge, D. (Lect.); Dammann, A., Schwarzer, K.; Müller, U.; Schneider, J.; Woest, H.: Minimal Processing - a Way to a Gentle Pasteurization of Beer and Beverages. 3rd Iberoamerican Symposium Brewing and Filling Technology, Brazil, 18. – 21. June 2012

Schneider, J. (Lect.); Dammann, A., Schwarzer, K., Müller, U.: The Way to gentle pasteurisation of beer and beverages. International Spring Meeting VLB. Siegen, 7.3.2012

Oral Presentation national

U. Müller (Votr.), K. Schwarzer: Die 'Lemgo D- and z-value Database for Food' (LDzBase). GDL-Symposium Sicherung der Lebensmittelqualität – kinetische Aspekte, Potsdam, 24./25. Juni 2013

Dammann, K. (Votr.) Schwarzer, U. Müller, J. Schneider: Bestimmung des Einflusses der Zeit- und Temperaturverteilung auf die Kurzzeiterhitzung von Getränken am Beispiel von Bier. GDL Kongress 2012, Dresden, 27.-29.9.2012

Dammann, A. (Votr.); Schneider, J., Schwarzer, K., Müller, U.: Bestimmung des Einflusses der Zeit- und Temperaturverteilung auf die Kurzzeiterhitzung von Getränken am Beispiel von Bier. Processnet Tagung, Hohenheim, 21.3.2012

Schneider, J. (Votr.); Dammann, A. (Votr.), Schwarzer, K., Müller, U.: Pasteurisation von Getränken: Verweilzeitverteilungen in der KZE und Chemischer Temperatur-Zeit-Indikator zur Prüfung von KZE-Anlagen. Technisch-wissenschaftlicher Ausschuss der VLB. Siegen, 5.3.2012

Schneider, J. (Votr); Schwarzer, K., Dammann, A; Müller, U. Voetz, M.: Ressourcen schonende Bierpasteurisation. Technischer Ausschuss des Deutschen Brauerbundes, Berlin 2. 12. 2011

Schneider, J. (Votr); Schwarzer, K., Dammann, A; Müller, U. Voetz, M.: Minimal Processing - Der Weg zur Produkt und Ressourcen schonenden Getränkepasteurisation. Fresenius Fachtagung Abfüllung sensibler Getränke, Berlin 29.-30. 10. 2011

Posters

Müller, U.; Schwarzer, K.: Lemgo D- and z-value Database for Food (LDz-Base), a database on key figures for food pasteurization, Exzellente Forschung aus den NRW-Hochschulen zum Thema „Safety & Security“ Brüssel (Belgien), 18.6.2013

Schwarzer, K.; Dammann, A.; Müller, U.; Schneider, J.: Critical view on the calculation of pasteurization units in beer. 34th EBC Congress, Luxembourg (Lux), 26.-30.5.2013

Schwarzer, K.; Schneider, J.; Becker, B.; Müller, U.: Entkeimungsauslegung mit der „Lemgo D- and z-value Database for Food“. GDL Kongress 2012, Dresden, 27.-29.9.2012

Schwarzer, K.; Schneider, J.; Becker, B.; Müller, U.: Entkeimungsauslegung mit der „Lemgo D- and z-value Database for Food“. Processnet Tagung, Hohenheim, 19.-22.3.2012

Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben 17129 N der Forschungsvereinigung Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Anhang 1

Getestete Primer zum Nachweis von verschiedenen Mikroorganismen mittels LC-PCR (unter Verwendung von SybreGreen als Detektionsfarbstoff)

Name	Nachweis von	Nukleotidsequenz 5'-3'	Größe [bp]	Tm [°C]	Referenz
universelle Primer					
NL-1	Hefen	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	24	59,3	Kawahata et al., 2007
NL-4		GGTCCGTGTTTCAAGACGG	19	58,8	
ITS3	Hefen	GCATCGATGAAGAACGCAGC	19	59,4	Casey und Dobson, 2004
ITS4		TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	55,3	
16S_fw	Bakterien	GGGCTACACACGYGCWAC	18	59,4	Turner et al., 1999
16S_rv		GGTTACCTTGTACGACTT	19	52,4	
CS_fw	Hefen	GCATATGGTGGTTATGAGAGG	21	57,9	Casey und Dobson, 2004
CS_rv		AGCAGAAACATTACCACCTTC	21	55,9	
Hefe_fw	Hefen	GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC	22	60,3	Hiero et al., 2006
Hefe_rv		TCCTTTCCCAAAGTTCTTTTCATCTT	26	59,3	
Lacto1_fw	Milchsäurebakterien	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	19	54,5	Rinttilä et al., 2004
Lacto1_rv		CACCGCTACACATGGAG	17	55,2	
Lacto2_fw	Milchsäurebakterien	ATCCGGCGGTGGCAAATCA	19	58,8	Sami et al., 1997 Suzuki et al., 2005
Lacto2_rv		AATCGCCAATCGTTGGCG	18	56	
Lacto3_fw	Milchsäurebakterien	TGGATGCCCTTGGCACTAGGA	20	59,4	Haarmann und Knol, 2006
Lacto3_rv		AAATCTCCGGATCAAAGCTTACTTAT	26	58,5	
Sequenzspezifische Primer					
Debru_fw	<i>Dekkera bruxellensis</i>	GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC	23	64,2	Phister und Mills, 2003
Debru_rv		GAAGGGCCACATTCACGAACCCCG	24	67,8	
Labre1_fw	<i>Lactobacillus brevis</i>	CTGATTTCAACAATGAAGC	19	50,2	Iijima et al., 2007
Labre1_rv		CCGTC AATTCCTTTGAGTTT	20	53,2	
Labre2_fw	<i>Lactobacillus brevis</i>	GGAAGATCAAGAATATCGGTG	21	55,9	Petri et al., 2013
Labre2_rv		CGCTCTTAATTCACCTGAGC	20	57,3	
Lali1_fw	<i>Lactobacillus lindneri</i>	AACTTACACCGATCAAAAATC	20	51,1	Iijima et al., 2007
Lali1_rv		CTTAACCTTGCATGCAACT	19	52,4	
Lali2_fw	<i>Lactobacillus lindneri</i>	ATCCCTCTTTCGATTGATGGTTG	24	61	Suzuki et al., 2005
Lali2_rv		TACCTCAAGAACATCTCTGCCTC	24	61	
Mece1_fw	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	CATTTCCGTTAAAAGAATCA	20	49,1	Iijima et al., 2008
Mece1_rv		GGTTAAATACCGTCACTGGG	20	57,3	
Mece2_fw	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	GATGGGGACACAGCTGGA	19	58,8	Ohnishi et al., 2011
Mece2_rv		GACTCTGTTTTGGGGTTT	19	52,4	
Peda1_fw	<i>Pediococcus demnosus</i>	CTGTGTCTGGCGTTTCTGTAGG	21	62,1	Delaherche et al., 2004
Peda1_rv		GCCACCGCATAGGGTATTTGTC	22	62,1	
Peda2_fw	<i>Pediococcus demnosus</i>	ACCGAATACGATCTAAAG	18	49,1	Iijima et al., 2008
Peda2_rv		TTAAGACCGACTTACCGA	18	51,4	
Peda3_fw	<i>Pediococcus demnosus</i>	GTCTAAACTGGTGGTTAAACG	21	55,9	Petri et al., 2013
Peda3_rv		ATCGCACCTGGTTCAATGC	19	56,7	
Petri_fw	<i>Pectinatus frisingensis</i>	CGTATCCAGAGATGGATATT	20	53,2	Iijima et al., 2008
Petri_rv		CCATCCTCTTGAAAATCTC	19	52,4	
Sadi_fw	<i>Pectinatus frisingensis</i>	TTGCGAATACACTACTGAAGC	22	55,9	Dörries, 2006
Sadi_rv		CGTATACCACTGTCCCATTCAT	22	58,4	