

Raka-Ray-Nährboden

Zur Isolierung von "Milchsäurebakterien" aus Bier und Brauereiprodukten.

Der Nährboden entspricht den Empfehlungen der American Society of Brewing Chemists (ASBC)¹ und der European Brewing Convention (EBC)².

Raka-Ray-Nährboden-Basis

Art.-Nr. CM 777

| Typische Zusammensetzung | (g/l) |
|--|---------|
| Hefeextrakt | 5,0 |
| Caseinpepton | 20,0 |
| Leberkonzentrat (getrockneter Leberextrakt) | 1,0 |
| Maltose | 10,0 |
| Fructose | 5,0 |
| Glucose | 5,0 |
| Betain | 2,0 |
| Diammoniumhydrogencitrat | 2,0 |
| Kaliumaspartat | 2,5 |
| Kaliumglutamat | 2,5 |
| Magnesiumsulfat | 2,0 |
| Mangan(II)-sulfat | 0,66 |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 2,0 |
| N-Acetylglucosamin | 0,5 |
| Agar | 17,0 |
| pH 5,4 ± 0,2 | |
| Supplementierung pro Liter | |
| "Tween" 80 | 10,0 ml |
| Cycloheximid | 7,0 mg |
| 2-Phenylethanol | 3 g |

Zubereitung

77,1 g Raka-Ray-Nährboden-Basis in 1 l Aqua dest. suspendieren. 10 ml "Tween" 80 und 7 mg Cycloheximid hinzufügen und mischen. 15 Minuten bei 121°C autoklavieren. Auf 50°C abkühlen, 3 g 2-Phenylethanol aseptisch hinzufügen und mischen. Platten gießen oder den Nährboden in Volumina zu je 4 ml möglichst kurz bei 50°C halten, wenn die Overlayer-Technik angewandt werden soll.

Beschreibung

Raka-Ray-Selektivnährboden basiert auf der Zusammensetzung von Saha, Sondag und Middlekauff³ und dient zum Nachweis von "Milchsäurebakterien" aus Bier und Brauereiprodukten. Seine Verwendung wird durch die American Society of Brewing Chemists (ASBC)¹ und die European Brewing Convention (EBC)² empfohlen.

Lactobazillen, die bei Brauereiprodukten vorkommen, können durch ihre Wachstums- bzw. Stoffwechselprodukte den Geschmack stark beeinträchtigen. Ihr Nachweis ist durch die divergierenden Nährstoff- und Anzuchtbedingungen kompliziert. Es wurden jeweils viele verschiedene Zusammensetzungen von Nährböden beschrieben, um sich den optimalen Bedingungen anzunähern.

Der Raka-Ray-Selektivnährboden ist entwickelt worden, um den Herstellungsprozeß des Bieres in bezug auf ein

breites Keimpektrum einschließlich der Pediokokken schnell und genau steuern zu können.

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen dem Universal-Bier-Agar verschiedene Kombinationen von wachstumsstimulierenden Agenzien zugefügt wurden. Im Vergleich zum nicht modifizierten Universal-Bier-Agar erbrachte eine Anzahl von Substanzen wie z. B. "Tween" 80, Leberextrakt, Hefeextrakt und N-Acetylglucosamin bessere Ergebnisse in bezug auf Koloniegroße und -zahlen sowie Bebrütungszeiten.

Diese Untersuchungen bildeten die Basis für die Zusammensetzung des Raka-Ray-Selektivnährbodens. Er enthält "Tween" 80 als allgemeinen Wachstumsstimulator für "Milchsäurebakterien"⁴, Fructose als essentielle Kohlenhydratquelle für *Lactobacillus fructivorans*⁵ und Maltose, das die Isolierung von Lactobacillen ermöglicht, die Glucose nicht verwerten konnten⁶.

Änderungen der hier vorgestellten Raka-Ray-Zusammensetzung sind verbreitet und sollen bestimmte Keime besonders im Wachstum fördern. Pediokokken scheinen eine universelle Fähigkeit zur Glucoseverwertung zu besitzen⁷. Ein teilweiser Ersatz des Fructosegehaltes durch Glucose ist beschrieben worden.

Die Selektivität des Nährbodens erhöht sich durch die Zugabe von 2-Phenylethanol (3 g/l) zur Hemmung gramnegativer Bakterien und von Cycloheximid (7 mg/l) zur Hemmung von Hefen⁸.

In einem Überblick über die Leistungsfähigkeit verschiedener Nährböden stellten Van Keer et al.⁵ fest, daß mit Raka-Ray-Selektivnährboden die höchste Koloniezahl isoliert wurde. Von 30 Lactobacillus-Stämmen unterschiedlicher Herkunft konnte mit Hilfe dieses Nährbodens unter semi-anaeroben Bedingungen innerhalb von 48 Stunden die größte Anzahl an Stämmen angezogen werden.

Bei einem Vergleich des Raka-Ray-Selektivnährbodens mit dem MRS-Nährboden stellten Hsu und Taparowsky⁹ fest, daß der Raka-Ray-Selektivnährboden für *Pediococcus cerevisiae* besser, dagegen weniger für *Lactobacillus gayonii* geeignet war. In einer anderen Studie verglichen Hug, Schlienger und Pfenniger¹⁰ den Raka-Ray-Selektivnährboden mit mehreren anderen Lactobacillus-Nährböden einschließlich MRS- und Saccharose-Nährboden und kamen zu dem Schluß, daß der Raka-Ray-Selektivnährboden und der MRS-Nährboden die besten Ergebnisse erbrachten.

Kulturverfahren Oberflächenbeimpfung

1. 0,1 ml der Probe auf Raka-Ray-Selektivnährboden ausstreichen.
2. Bei 25–30°C unter anaeroben Bedingungen bebrüten. Die Bebrütung sollte im Anaerobiotopf (OXOID, Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) mit dem AnaeroGen (OXOID, Art.-Nr. AN 25 bzw. AN 35) zur Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre erfolgen. Alternativ kann die Probe auch filtriert und das Membranfilter auf der Nährbodenoberfläche bebrütet werden.

Overlayer-Technik

1. Platten mit jeweils 15–20 ml Raka-Ray-Selektivnährboden nach Vorschrift zubereiten.
2. Jeweils 4 ml sterilen Raka-Ray-Selektivnährboden

aseptisch in kleine Röhrchen abfüllen und im Wasserbad bei 50°C halten.

3. Jeweils 1 ml der Probe mit 4 ml flüssigem Raka-Ray-Selektivnährboden mischen und sofort auf den festen Platten ausgießen, um auf diese Weise Einzelkolonien zu erhalten.
4. Unter anaeroben Bedingungen bei 25–30°C im Anaerobiotopf (OXOID, Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) mit dem AnaeroGen (OXOID, Art.-Nr. AN 25 bzw. AN 35) bebrüten.

Die Kolonien wachsen in der oberen, dünnen Oberschicht und können für weitere Untersuchungen leicht einzeln abgenommen werden.

Bebrütungsbedingungen

In der Regel reicht eine Bebrütungsdauer von 4 Tagen aus; einige Keime können bis zu 7 Tagen benötigen. Aufgrund der mannigfaltigen Wachstumsbedingungen von Lactobazillen kann eine mikroaerophile Atmosphäre von Nutzen sein, die durch den CampyGen (OXOID, Art.-Nr. CN 25 bzw. CN 35) im Anaerobiotopf (OXOID, Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) erreicht wird.

Lagerung und Haltbarkeit

Trockennährboden:

Fest verschlossen, lichtgeschützt, 10–25°C.

Haltbarkeit: siehe Etikett.

Qualitätskontrolle

Positivkontrolle

Lactobacillus fermentans ATCC 9338

Negativkontrolle

Escherichia coli ATCC 25922

Zusätzliche Hinweise

Beim Zusatz von Cycloheximid sind die "Allgemeine Richtlinien zur Verwendung von OXOID Trockennährböden" zu beachten.

Literatur

1. Methods of Analysis of the ASBC (1976) 7th Edn., The Society, St. Paul, Mn., USA.
2. European Brewing Convention, EBC "Analytica Microbiologica: Part II". J. Inst. Brewing (1981) 87, 303-321.
3. Saha, R.B., Sondag, R.J. und Middlekauff, J.E. (1974) Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, 9th Congress, 1974.
4. Mauld, B. und Seidel, H. (1971) Brauwissenschaft 24, 105.
5. van Keer, B. et al. (1983) J. Inst. Brewing 89, 361-363.
6. Lawrence, D.R. und Leedham, P.A. (1979) J. Inst. Brewing 85, 119.
7. Coster, E. und White, H.R. (1951) J. Gen. Microbiol. 37, 15.
8. Shaw, S. Pers. Mitteilung.
9. Hsu, W.P. und Taparowsky, J.A. (1977) Brewers Digest 52, 48.
10. Hug, H., Schlienger, E. und Pfenniger, H. (1978) Brauerei-Rundschau 89, 145.