



Forschungsthema:

Einbringung von aktuell nicht in der Brauerei eingesetzten Hefen zur Optimierung von High-Gravity-Brewing

AiF-Vorhaben-Nr.:

16713 N

Name der Forschungsstelle(n):

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei Berlin (VLB) e.V. / Forschungsinstitut für
Bier- und Getränketechnologie / Forschungsinstitut für Mikrobiologie

Kontakt:

Dr.-Ing. Roland Pahl, pahl@vlb-berlin.org

Bewilligungszeitraum:

1.10.2012 – 31.3.2015



Forschungsnetzwerk
Mittelstand

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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.

Schlussbericht

zu dem IGF-Vorhaben

***Einbringung von aktuell nicht in der Brauerei eingesetzten Hefen
zur Optimierung von High-Gravity-Brewing***

der Forschungsstelle(n)

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.

FS1: Forschungsinstitut für Bier- und Getränketechnologie

FS2: Forschungsinstitut für Mikrobiologie

Das IGF-Vorhaben 16713N der Forschungsvereinigung Brauerei wurde über die



im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Berlin, den 10.09.2015

Dr.-Ing. Roland Pahl (FS1)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Pahl', written over a horizontal line.

Dr.-Ing. Martin Senz (FS2)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Senz', written over a horizontal line.

Ort, Datum

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Die Hefe in der Brauerei	4
1.2	High-Gravity-Brewing	4
1.3	Stressfaktoren für Brauhefen während des Brauprozesses	5
1.4	Verwendung von Nicht-Brauereihefen für High-Gravity-Brewing	7
2	Ergebnisse	8
2.1	Koordination und Projektplanung	8
2.2	Erweitertes Vorscreening	8
2.3	Selektionsmaßnahmen	12
2.4	Mutagenese	16
2.5	Gärversuche auf EBC-Gärsäulen	19
	• Gärungen mit den gescreenten „High-Gravity“ Hefen	19
	• Gärung der Hefen aus der Mutagenese	29
	• Gärung mit den 2-Desoxy-Glucose-Klonen der Hefe 10	34
	• Gärung mit den neu gescreenten maltotrioseverwertenden Hefen	36
2.6	Genetische Stabilität	50
2.7	Scale up	57
2.8	Hybridisierung von Hefestämmen	61
3	Zusammenfassung	64
4	Literaturverzeichnis	66
5	Veröffentlichungen	70
6	Verwendung der Zuwendung	71
7	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	73
8	Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	74

9	Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	76
10	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts	78
11	Angaben über gewerbliche Schutzrechte	80

1 Einleitung

1.1 Die Hefe in der Brauerei

Die Brauhefe ist, aufgrund ihres Gärvorganges, ein entscheidender Faktor für die Bierproduktion. Neben der Produktion von Ethanol erhält das Bier sein charakteristisches Aroma und seinen charakteristischen Geschmack aufgrund der Produktion von Acetaldehyden, Estern und höheren Alkoholen durch die Hefe. Darüber hinaus ist die Bierherstellung von dem Flockulationsverhalten der Brauhefe abhängig. Die Flockulation beschreibt die Agglomeration einzelner Zellen zu Flocken, die aus einer Vielzahl von Zellen bestehen. Diese stammspezifische Eigenschaft ist wichtig, damit die Hefe sich nach Beendigung der Gärung absetzt und eine weitgehende Klärung hervorgerufen werden kann [Back, 2008]. Die Brauhefen unterscheiden sich in ihrem Flockulationsverhalten und werden daher in zwei Gruppen eingeteilt: in untergärige und obergärige Bierhefen [Saerens et al., 2010]. Die untergärige Bierhefe, *Saccharomyces pastorianus*, ist eine natürliche Hybrid-Form aus *Saccharomyces cerevisiae* und einer *Saccharomyces bayanus*- Art. Sie wird vor allem für die Lagerbierproduktion verwendet, die mit 90% den Biermarkt dominiert. Außerdem präferiert diese Brauhefeart Temperaturen von 8°C - 14° C [Lodolo et al., 2008]. Die Fermentation bei diesen niedrigen Temperaturen hat den Vorteil, dass sich unerwünschte Mikroorganismen weniger stark vermehren und ist daher besonders attraktiv für die Bierherstellung [Meyerhoff, Bischof, 2010]. Während der Fermentation setzt sich die untergärige Brauhefe auf den Boden des Gärgefäßes ab. Die obergärige Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae* hingegen schwimmt spätestens nach der Fermentation an der Oberfläche des Bieres. Diese Brauhefeart wird vor allem für die Aleproduktion verwendet. Die Fermentationstemperatur liegt zwischen 15°C- 24°C [Lodolo et al., 2008].

1.2 High-Gravity-Brewing

Traditionell wird ein Würzegehalt von 12°Plato, d.h. 12 g Extrakt (Stammwürze, bestehend aus dem Malz und Hopfen in Wasser gelöst, nicht flüchtigen Stoffen vor der Gärung) auf 100 g Flüssigkeit, während der Bierfermentation verwendet, um am Ende

ein Bier mit einem Alkoholgehalt von 5 Vol.- % zu erhalten. Heutzutage verwenden jedoch immer mehr Brauereien das Verfahren HGB, um effizienter und zeitsparender zu produzieren. Bei diesem Verfahren wird üblicherweise ein Würzegehalt von $>12^{\circ}\text{P}$ verwendet, so dass das produzierte Bier einen Alkoholgehalt von 7,5 Vol.- % aufweist. Anschließend wird das Bier auf einen Alkoholgehalt von 5 Vol.-% verdünnt [Blicke et al., 2007]. Das HGB bietet weitere Vorteile für den Produzenten. Neben der Reduzierung von Labor- und Energiekosten, können die Trübung und die Gleichmäßigkeit des Bieres verbessert werden [Casey et al., 1984]. Der Einsatz von höher konzentrierter Würze impliziert ebenso Nachteile für die Brauhefe während der Bierherstellung. Durch die Anwendung des HGB kann es zu veränderten Geschmacksprofilen und, aufgrund einer Freisetzung von proteolytischen Enzymen, zu einer Destabilisierung des Schaumes kommen [Huuskonen et. al, 2010]. Außerdem werden längere Fermentationszeiten beobachtet, so dass die Stressfaktoren, die auf den Brauhefestamm wirken, verstärkt werden. Dies kann das Wachstum der eingesetzten Brauhefe inhibieren [Puligundla et al., 2011]. Des Weiteren wird der physiologische Zustand des Brauhefestammes nach dem HGB verschlechtert, so dass der erneute Einsatz in der Bierherstellung nicht mehr gesichert ist [Huuskonen et. al, 2010].

1.3 Stressfaktoren für Brauhefen während des Brauprozesses

Auf die Brauhefe wirken während des Brauens, vor allem bei Verwendung von HGB, verschiedene Stressfaktoren, so dass es zu einer trägen und unvollständigen Fermentation kommen kann. Die Stressfaktoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: medienbedingte und verfahrenstechnische Stressfaktoren. Zu den medienbedingten Belastungen zählen die Zusammensetzung des Nährmediums, die Konzentrationen der verfügbaren Nährstoffe und der Ethanolgehalt, der während der Gärung gebildet wird. Sobald die Hefezellen in eine Umgebung mit höherer Zuckerkonzentration gelangen, sind die Hefezellen osmotischem Stress ausgesetzt. Das Wasser, das in der Hefezelle höher konzentriert vorliegt als in dem hypertonischen Medium, wird die Zelle aufgrund von Osmose verlassen. Dadurch kommt es zu einer Plasmolyse der Hefezelle. Dies bedeutet, dass sich das Volumen der Hefezelle verringert und es kann dadurch zu einer Aktivitätseinschränkung kommen [Latterich, Watson, 1993]. Beim Einsatz des HGB-Verfahrens verstärkt sich der Effekt, da ein höherer konzentrierter Würzegehalt

verwendet wird [D'amore et al., 1989]. Auch eine medienbedingte hohe Ethanolkonzentration hat verschiedene Effekte auf die Brauhefe. Es wurden eine reduzierte Zellgröße, eine Wachstumsinhibierung [Canetta et al., 2006] und eine verringerte Glukoseaufnahme [Pascual et al., 1987] beobachtet. Vor allem sei jedoch die Zellmembran betroffen, die durch die Ethanoltoxizität eine erhöhte Permeabilität aufweist [Mansure et al., 1994]. Zu den verfahrenstechnischen Stressbelastungen gehören die Hefebelüftung, Temperaturänderungen, der physiologische Zustand der Hefe und Scher- und Druckkräfte, die im Fermenter und in Pumpleitungen auftreten können. Am Anfang einer Fermentation erfolgt die Hefevermehrung unter aeroben Bedingungen, um optimal entwickelte Zellen zu erhalten. Die Proteine und DNA-Struktur in der Hefezelle können durch den oxidativen Stress und die damit auftretenden ROS (reactive oxygen species) nachhaltig geschädigt werden [Bahrim et al., 2003]. Bei Herabsetzen der Temperatur kann es zu einer Einschränkung der Membranfluidität und somit zu einer verminderten Stoffwechselaktivität kommen [Shinitzky, 1984]. Außerdem wird der physiologische Zustand der Hefe durch die Aufarbeitung der Brauhefe, deren Lagerungsort und die Lagertemperatur beeinflusst. Hierbei können ungünstige Bedingungen, bevor die Hefe im Brauprozess eingesetzt wird, eine eingeschränkte Zellvitalität hervorrufen. Die Zellvitalität beschreibt die Fähigkeit der Hefe, ihren Stoffwechsel und ihre Funktionen aufrechtzuerhalten, auch wenn Stressfaktoren während des Brauprozesses auf sie wirken [Mochaba et al., 1997]. Durch mechanischen Stress, wie Scher- und Druckkräfte, konnte eine Freisetzung von Polysacchariden aus der Hefezelle beobachtet werden, so dass eine Abgangsgeschmacksbildung und ein verändertes Flockulationsverhalten auftraten. Darüber hinaus wurde eine verringerte Anzahl an Lebendzellen festgestellt [Bahrim et al., 2003]. Die Zellviabilität, die die Reproduktionsfähigkeit einer Zelle beschreibt, wird, vor allem durch eine Schädigung und unzureichende Integrität der Zellmembran, herabgesetzt [Bouix, Leveau, 2000]. Auf diese verschiedenen Stressbelastungen reagiert die Hefezelle mit passiven oder aktiven Stressantworten. Bei einer passiven Stressantwort ändert sich der Stoffwechsel der Hefe durch eine Veränderung der Umgebung unspezifisch, so dass es langfristig zu Schäden kommen kann. Tritt eine Erhöhung der Temperatur ein, wird eine passive Stressantwort bei der Brauhefe ausgelöst, indem eine Beschleunigung des Stoffwechsels stattfindet. Bei einer aktiven Stressantwort werden gezielte Änderungen im Stoffwechsel durchgeführt. Somit versucht die Brauhefe an die neuen Bedingungen zu adaptieren und ihr Überleben zu sichern [Gibson et al., 2007], [Bahrim

et al., 2003]. Die Brauhefe synthetisiert vermehrt Trehalose als Stressantwort auf eine hohe Ethanolkonzentration. Dadurch wird die Membranpermeabilität verringert und die Ethanoltoleranz erhöht [Mansure et al., 1994]. Aufgrund der Vielzahl von Stressfaktoren und die daraus resultierenden negativen Effekte während des Brauprozesses, wird stetig nach Möglichkeiten gesucht, die Fermentationseigenschaften und die Stressempfindlichkeit der Brauhefestämme zu optimieren

1.4 Verwendung von Nicht-Brauereihefen für High-Gravity-Brewing

Für die Verwendung von HGB wird gezielt nach Hefen gesucht, die eine hohe Zuckertoleranz vertragen. Diese Eigenschaft wird als Osmotoleranz bezeichnet. Diese Art von Hefen wurde in Honig, Marzipan und Traubenmost vorgefunden. Das Forschungsteam um Marvin (1928) hat mehrere Hefen der Gruppe *Zygosaccharomyces* aus Honig isoliert. Aus Marzipan konnte Esperanza Casas et al. (1998) zwei Hefespezien isolieren. Sipiczki (2003) konnte aus Weinmost vier Weinhefen isolieren, die eine Osmotoleranz aufwiesen.

Industriell wird bei der Weinherstellung bevorzugt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Im Gegensatz zu den Bierhefen haben die Weinhefen den großen Vorteil, dass sie Ethanolgehalte von 8 bis 15 % und Zuckerkonzentrationen von bis zu 260 g/l vertragen.

Aufgrund der erhöhten Osmotoleranz, die bei HGB von großer Relevanz ist, werden im vorliegenden Vorhaben insbesondere Weinhefen für die Anpassung an den Brauprozess eingesetzt und der Einsatz für das High Gravity Brewing überprüft.

2 Ergebnisse

2.1 Koordination und Projektplanung

In diesem Arbeitsschritt wurden notwendige Kommunikationen zwischen den beiden Forschungsstellen durchgeführt. Im Besonderen war es Ziel, geeignete Hefen auszuwählen sowie einen Versuchsaufbau für das durchzuführende Screening der Hefen zu diskutieren und methodisch darzustellen.

Darüber hinaus wurde die Literaturrecherche intensiviert und neue Erkenntnisse konnten mit in das Projekt einfließen.

Die Grundlagen für einen erfolgreichen Projektstart wurden gelegt.

2.2 Erweitertes Vorscreening

Für das Hefe-Screening wurden verschiedenste Hefen herangezogen. Bei der Wahl der jeweiligen Hefen musste darauf geachtet werden, dass diese eine hohe Osmotoleranz aufweisen. Dazu zählen Hefen, die z. B. in Honig, Marmelade oder Marzipan vorkommen können wie z. B. *Zygosaccharomyces*. Jedoch kommen auch *Saccharomyces*-Hefen in Produkten mit hohen Zuckerkonzentrationen vor. Das Substrat für die Weinhefe ist generell auch eine 25 %-ige Maische der Früchte. Daher haben Weinhefen eine hohe Osmo- und Ethanoltoleranz. Dies gilt auch für die Destillierhefen. Beide Hefe-Typen gehören den *Saccharomyces*-Hefen an. Da die Brauhefe ebenfalls eine *Saccharomyces*-Hefe ist, lag der Focus auch verstärkt auf den Weinhefen, da das Aromaprofil daher eventuell besser an Bier angepasst werden kann. Die jeweiligen für das Screening verwendeten Stamm-Typen und deren Codierung können der Tabelle 1 entnommen werden.

In Kleinansätzen von max. 10 ml im Parallelansatz wurde mit dem „Screening“ der Hefen begonnen. Der Ansatz umfasste zwei Vorkulturen, bevor ein Animpfen der eigentlichen Hauptkultur mit einer Startzellkonzentration von $1,00E+07$ Zellen/ml erfolgte. Das Screening wurde in einem chemisch definierten Medium mit 250 g/L Maltose durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen für 7 d bei 30 °C. Die anaeroben Bedingungen wurden mittels Überschichten mit Paraffin erreicht. Da-

durch konnte auch die Gasproduktion beobachtet werden. Die Beurteilung der Eignung der jeweiligen Hefen für den Einsatz in einer Fermentation, erfolgte über eine sensorische Bewertung der jeweiligen Fermentationsprodukte. Die Bewertungen können der Tabelle 1 entnommen werden. Dabei wurde nur auf die geruchliche Beurteilung geachtet. Dabei war vor allem der fruchtige und ethanolische Geruch der Hefen auffällig.

Tabelle 1: sensorische Beurteilung der gescreenten Hefen (im chemisch definierten Medium, 250 g/l Maltose) für den Einsatz im High-Gravity-Brewing (grau unterlegte Hefen wurden für Gärversuche verwendet, rot unterlegte Hefen sind untergärige Brauhefen als Referenz) (Z.: *Zygosaccharomyces*, Schizo.: *Schizosaccharomyces*, S.: *Saccharomyces*)

Nr.	Stamm-Typ	Sekt Wein	Apfelig fruchtig	Sauer CO ₂	Hefig	Ethanol	Löse-mittel	Schwe-fel	Andere
4	Weinhefe	++	+	+++		++			
5	<i>Z. rouxi</i>		+	++	+++	++			
6	Weinhefe	++	+	++					
7	Weinhefe		++	+	+	+			
8	<i>Schizo. pombe</i>		++	+	++	+++	+		
9	Weinhefe	+++	+++			++			
10	Weinhefe		++	++	++	++			
11	Weinhefe		++	++		+++	++		
12	Weinhefe		+++	+		++	+		
13	Weinhefe		+		++	++	+		
14	Weinhefe				++	+			
15	Weinhefe		+		++	+++	++	++	
16	Brennereihefe	++				++			
17	Weinhefe			++	++	+			
18	Weinhefe		+		+++	++			
19	Weinhefe		+			+++	++		
20	Weinhefe		+		+	+		+	
21	Weinhefe		++	+	++	+			
22	Weinhefe		+		++	++			
23	Weinhefe	++	+			+			
24	Weinhefe		++			+			
25	Weinhefe		+		+	+			
26	Weinhefe		++			+			
27	Weinhefe	++			+	+			
28	Weinhefe	+++				+++	++		

29	Weinhefe					+			++*
30	<i>S. oviformis</i>					+	+++	++	+++**
31	<i>Schizo. pombe</i>	++	+	+++		++			
32	<i>Schizo. pombe</i>		+			++			
33	ug. Brauhefe		-	-					
34	ug. Brauhefe		-	-					
35	<i>Z. rouxii</i>		+	+	+				
38	<i>Z. rouxii</i>		+	+	+				
39	<i>Z. rouxii</i>		-	-	-			-	
40	<i>Z. rouxii</i>		+	+	+				
41	<i>Z. rouxii</i>		+	+	+				
42	<i>Z. rouxii</i>		+	++	++				
43	<i>S. acetii</i>		+	++	++	+			
44	ug. Brauhefe	++	++	+		++			
45	<i>Z. rouxii</i>		+	+	+				+***
46	<i>Z. rouxii</i>								
47	<i>Z. rouxii</i>								
48	<i>Z. rouxii</i>		++	+		+			

* erdig

** gammelig

*** buttrig

Des Weiteren wurden die erreichten Zellkonzentrationen und die Maltoseverwertung bzw. Ethanolproduktion bestimmt. Die Maltoseverwertung der gescreenten Hefen in chemisch definiertem Medium mit 250 g/l Maltose kann der Abbildung 1 bzw. die Ethanolproduktion der Abbildung 2 entnommen werden. Die während der Inkubation erreichten Zellkonzentrationen können der Abbildung 3 entnommen werden.

Entsprechend der sensorischen Beurteilungen, einer hohen Zuckerverwertung bzw. einer hohen Ethanolproduktion wurden ausgewählte Stämme für Gärungen in High-Gravity-Würze herangezogen. Die Hefestämme 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 22, 31 wurden aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften sowie ihrer höheren Maltoseaufnahme sowie Ethanolproduktion für weitere Fermentationen in High-Gravity-Würze in den EBC-Glassäulen verwendet. Bei dem Stamm 34 handelte es sich um eine untergärige Hefe, die als Referenz bzw. als Vergleichsstamm bei den jeweiligen Fermentationen mitgeführt wurde.

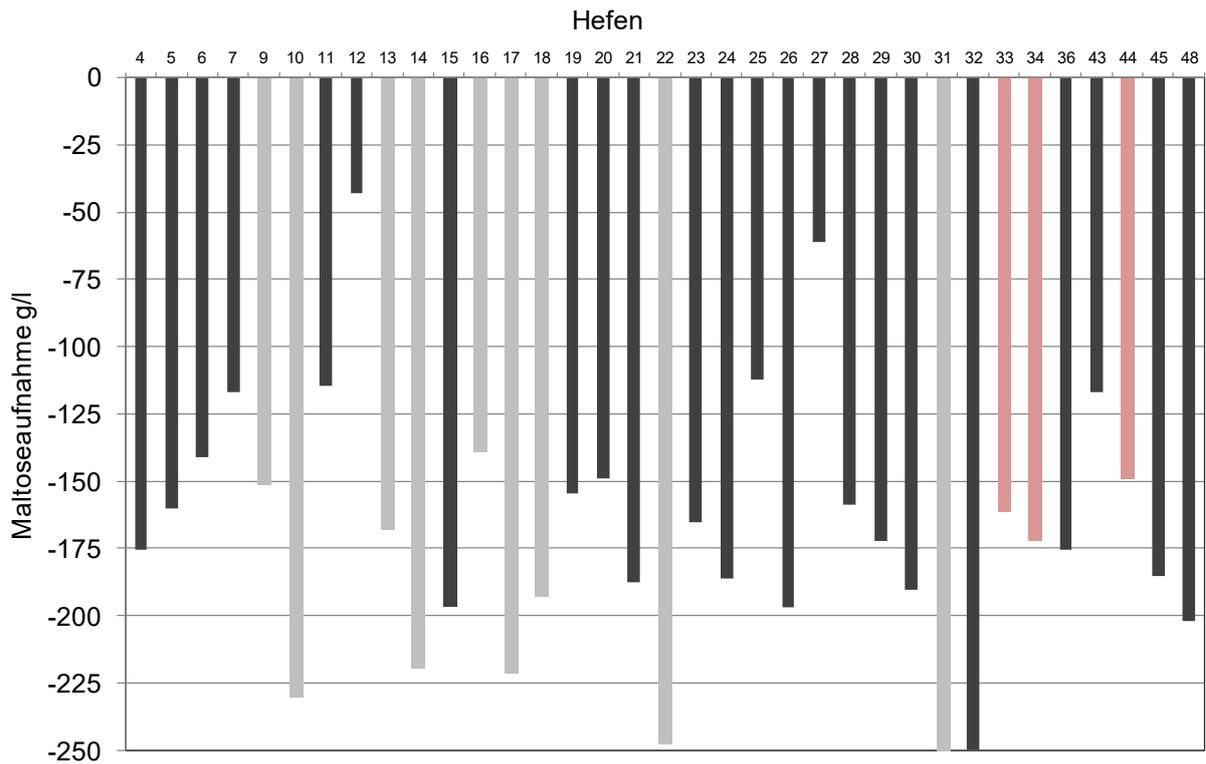


Abbildung 1: Screening von Nicht-Brauhefen auf ihre Fähigkeit, hohe Zuckerkonzentrationen zu verwerten. Versuche wurden in chemisch definierten Medien mit 250g/l Maltose durchgeführt. ausgewählte Hefen für weitere Gärungen Referenzstämme (untergärige Brauhefe). Stamm 34 wird als Referenzstamm bei den jeweiligen Fermentationen mitgeführt

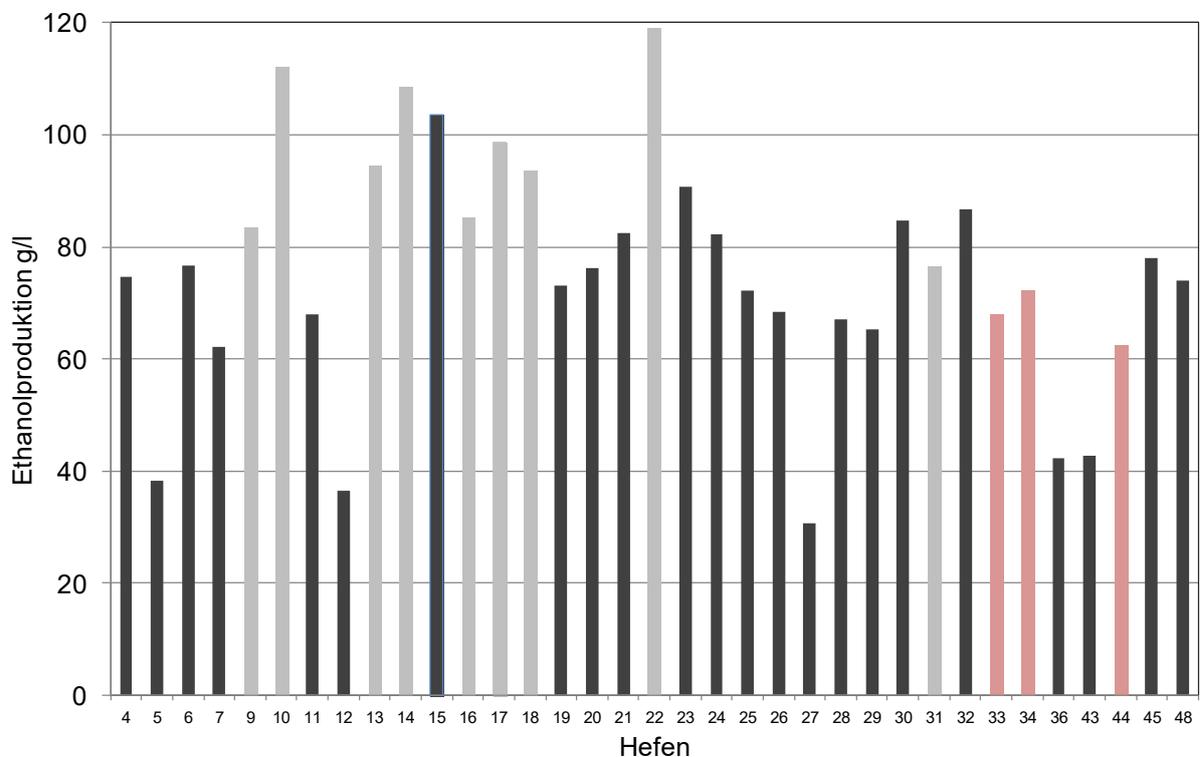


Abbildung 2: Screening von Nicht-Brauhefen auf ihre Fähigkeit, im Medium mit hohen Zuckerkonzentrationen Ethanol zu produzieren. Versuche wurden in chemisch definierten Medien mit 250g/l Maltose durchgeführt. ausgewählte Hefen für weitere Gärungen. Referenzstämme (untergärige Brauhefe). Stamm 34 wird als Referenzstamm bei den jeweiligen Fermentationen mitgeführt

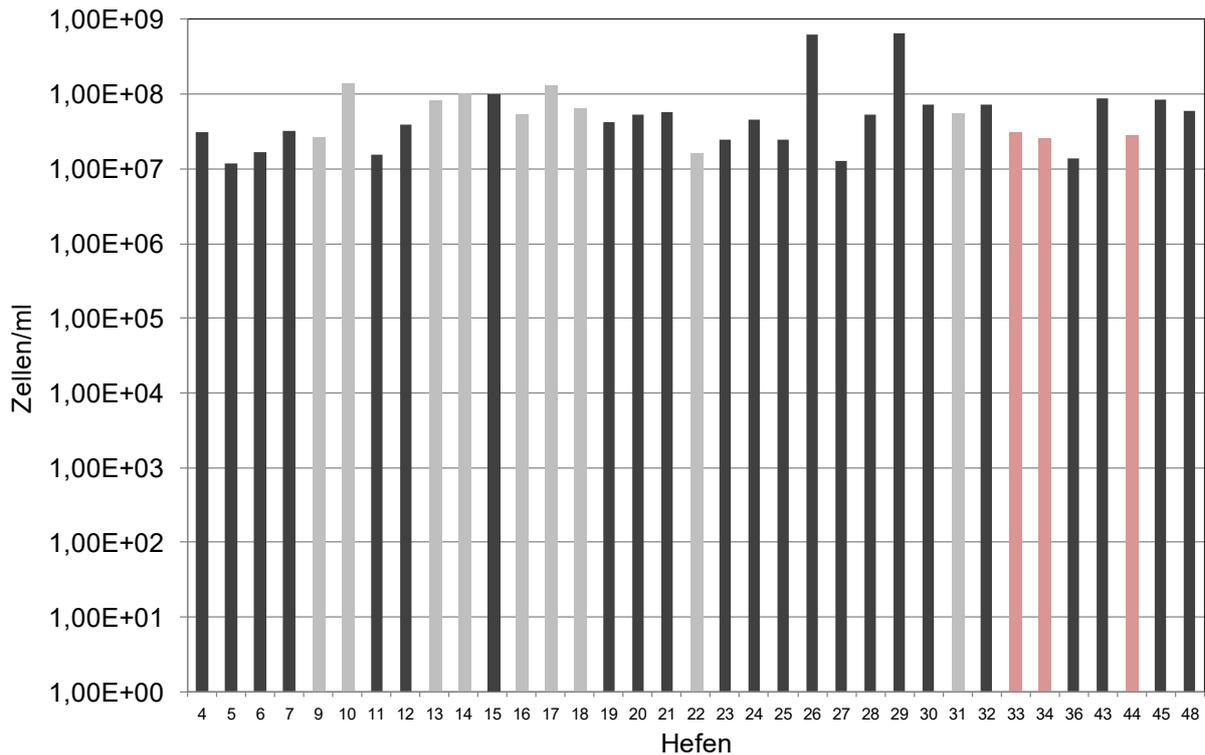


Abbildung 3: Zellkonzentration der gescreenten Hefen im Medium nach anaerober Inkubation (in chemisch definierten Medien mit 250g/l Maltose).
 □ ausgewählte Hefen für weitere Gärungen. □ Referenzstämme (untergärrige Brauhefe). Stamm 34 wird als Referenzstamm bei den jeweiligen Fermentationen mitgeführt

2.3 Selektionsmaßnahmen

Mit diesem Arbeitspaket sollten durch natürliche Selektion mit einem gezielten Selektionsdruck Hefen mit verbesserten Eigenschaften isoliert werden.

- High-Gravity-Bedingungen:

Ausgewählte Hefen konnten in Würze mit einem Stammwürzegehalt von 25 °P fermentiert werden. Für die optimale Gäraktivität von den ausgewählten Hefen (hauptsächlich Weinhefen) wurde eine Fermentationstemperatur von 26 °C gewählt. Auch bei 14 °C konnte ein Wachstum von Hefen in High-Gravity-Würze beobachtet werden. Sie sind damit für den Einsatz in High-Gravity-Würze geeignet.

- Steigerung der Ethanoltoleranz

Um die Ethanoltoleranz von Hefen zu erhöhen, wurden die Hefen auf Nähragar mit einem Ethanolgehalt von 20 % inkubiert. Bei solch hohen Ethanolkonzentrationen konnte jedoch keine Bildung von Kolonien beobachtet werden. Um jedoch

ethanolresistente Hefezellen zu isolieren, wurden diese mittels Mutagenese regeneriert (siehe Abschnitt 2.4)

- Glukose-Repression

Würze enthält die Zucker Saccharose, Glukose, Fruktose, Maltose und Maltotriose, welche in dieser Reihenfolge mit abnehmender Priorität verstoffwechselt werden. Den Hauptanteil an Zuckern in der Stammwürze bildet Maltose, gefolgt von Maltotriose (Stewart, 2009). Während Glukose, Fruktose und auch Saccharose (diese wird vorher in der äußeren Zellwand durch die zelleigene Invertase hydrolysiert) über eine Träger-(Carrier-)gebundene, erleichterte Diffusion ins Zellinnere aufgenommen werden, gelangen Maltose und auch Maltotriose über das Maltose-Transportsystem („Maltosepermease“) in die Zelle hinein. Innerhalb der Zelle werden beide Substanzen dann durch das Enzym α -Glucosidase (Maltase) zu Glukose hydrolysiert (Annemüller *et al.*, 2008). Aufgrund ihres hohen Anteils in der Stammwürze ist der Transport, die Hydrolyse und Fermentation von Maltose besonders wichtig bei der Bierherstellung. Die Enzyme für die Aufnahme und Verstoffwechslung von Maltose und Maltotriose sind bei den meisten Brauhefen nicht konstitutiv in der Zelle vorhanden und werden erst nach Adaption an Maltose und Maltotriose gebildet. Zudem wird die Synthese der Enzyme durch einen hohen Glucosegehalt unterdrückt, was als Katabolitrepression (Glucoserepression) bezeichnet wird (Annemüller *et al.*, 2008). Der Einfluss von Glukose stellt demnach einen limitierenden Faktor bei der Fermentation von Würze und die damit verbundene Aufnahme von Maltose bzw. Maltotriose dar. Erst nach dem Verbrauch von ungefähr 50 % Glukose aus der Würze, beginnt die Aufnahme der Maltose ins Innere der Zelle [Stewart, 2009]. Um diese Glucoserepression zu umgehen und damit eine parallele Verwertung der Zucker (bzw. von Glukose und Maltose) für einen verbesserten und schnelleren Fermentationsverlauf zu erzielen, muss die sog. Glukose-Repression ausgeschaltet werden. Durch die Selektion von Klonen auf 2-Desoxy-Glukose könnten solche Hefezellen selektiert werden [Novak *et al.*, 1990, Novak *et al.*, 1991; Stewart, 2009]. 2-Desoxyglukose ist ein Glucoseanalogon, welches zu Desoxyglucose-Phosphat umgewandelt wird. Im nächsten Schritt der Glycolyse kann dieses Produkt nicht mehr von der Phosphoglucoisomerase verstoffwechselt werden, was zur Anhäufung von 2-Desoxy-D-Glucose-Phosphat führt. Somit erhält die Hefe keine Energie mehr und ist gezwungen, die anderen verwertbaren Zuckerarten aufzunehmen. Hefe-Mutanten mit solch einer Glukose-Dderepression können auf dem

2-Desoxy-Glukose-Medien selektiert werden. Dadurch soll die Fermentationsperformance bzw. die Zuckeraufnahme der Hefen verbessert werden.

Dieser Test wurde mit den Hefen 10 und 13 sowie mit dem Referenzstamm 34 durchgeführt. Hefen wurden auf 2-Desoxyglukose-Medium ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden isoliert und auf ein neues 2-Desoxyglukose-Medium und Würze-Medium überführt. Die Überführung auf Würze-Agar diente der Überprüfung, ob die Glukose-Derepression stabil bleibt.

Die Zuckerverwertung der isolierten Klone der Hefe 13 sowie des Referenzstammes 34 unterschieden sich nicht von der des Originalstammes. Wachstum auf dem 2-Desoxy-Glukose-Agar bedeutet dementsprechend nicht zwingend, dass die Glukose-Derepression in Anwesenheit von verschiedenen Zuckern neben Glukose aktiv ist bzw. bleibt. Einige Isolate vom 2-Desoxy-Glukose-Agar der Hefe 10 zeigten jedoch die gewünschte Glukose-Derepression. Der Nachweis auf Glukose-Derepression erfolgte durch eine Inkubation der gewählten Isolate in einem definierten Medium mit Hefeextrakt und gleichen Anteilen an Glukose und Maltose (25 g/l Maltose und 25 g/l Glukose). Der Verlauf der Zuckerkonzentrationen wurde durch eine enge Beprobung beobachtet. Die Zuckerverwertung der Hefe 10 und ihrer 2-Desoxy-Glukose-Isolate (10-I, 10-II und 10-III) ist in Abbildung 4 (A, B, C und D) dargestellt. Dabei wurde der Klon 10-III durch eine zusätzliche UV-Bestrahlung auf 2-Desoxy-Glukose-Agar gewonnen. Ein paralleler Kurvenverlauf von Glukose und Maltose zeigt die Glukose-Derepression. Jedoch konnte diese Glukose-Derepression im Wachstum in Würze nicht eindeutig bestätigt werden (siehe Abbildung 5).

Die selektierten Hefen wurden dennoch in HG-Würze mit dem Originalstamm verglichen (siehe 2.5).

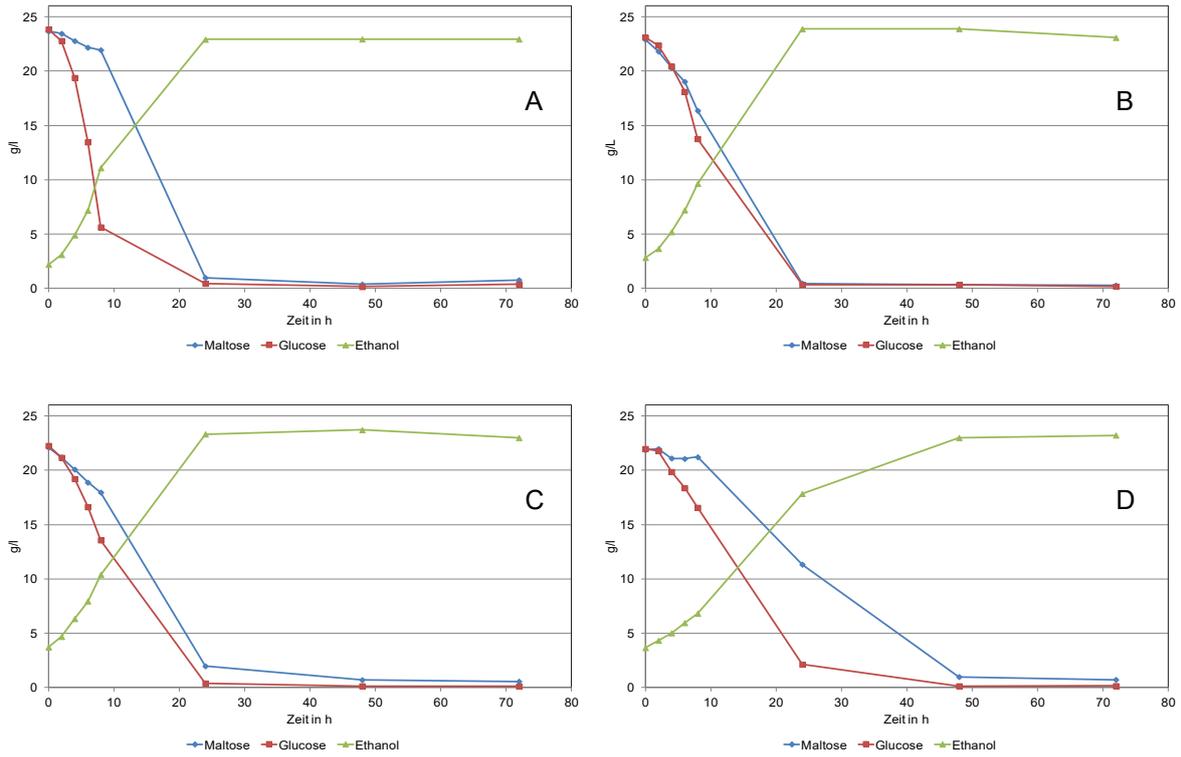


Abbildung 4: 2-Desoxy-Glucose-Mutanten der Hefe 10. Hefen isoliert auf 2-Desoxy-Agar und überpickt auf Würze-Agar. Test auf Glukose-Derepression in YE-Medium mit 25 g/l Maltose und 25 g/l Glucose, 26 °C. A: original Hefe 10, B: 10-I Klon, C: 10-II Klon, D: 10-III Klon

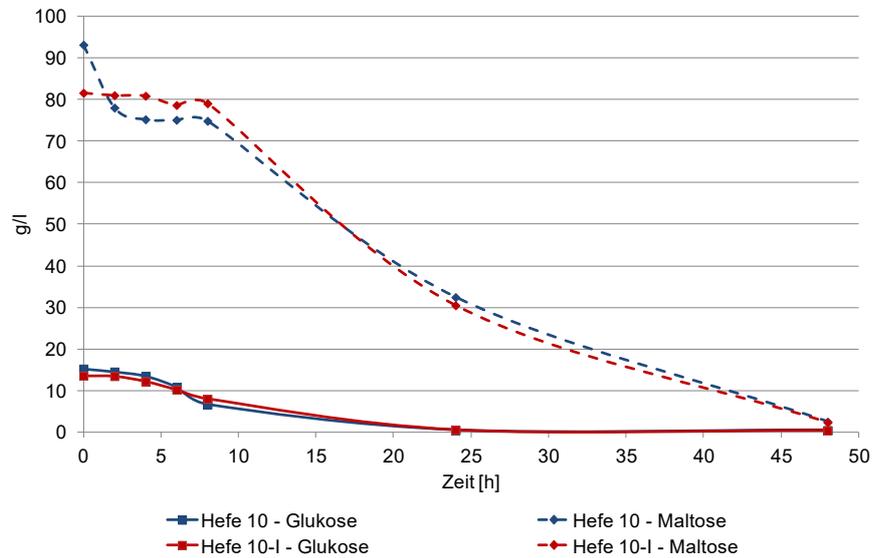


Abbildung 5: Hefe 10 und 2-Desoxy-Klon 10-I in 18 °P Würze, 26 °C

2.4 Mutagenese

Da der Einsatz von gentechnisch modifizierten Hefen für die industrielle Produktion von Bier in Deutschland nicht erlaubt ist, kann das genetische Potential der Hefe durch induzierte Mutagenese verändert werden. Dadurch könnte eine Veränderung der Fermentationseigenschaften erreicht werden. Dabei können sowohl physikalische als auch chemische Faktoren eine mutagene Wirkung auf Hefezellen haben. Hefezellen werden gewöhnlich hierfür mit ultraviolettem (UV) Licht oder Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt [Winston, 2008]. Am intensivsten ist die Wirkung von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm, da hier die größte Eigenabsorption der DNA liegt. Die Strahlung verursacht die Bildung anormaler Pyrimidindimere, insbesondere Thymindimere, zwischen benachbarten Basen in der DNA. Es kommt zur Ausbildung eines Cyclobutanrings, welcher zur Aufhebung der Basenpaarung mit dem komplementären DNA-Strang führen kann. Dimere führen zu Störungen während der DNA-Replikation, da die Polymerase in ihrer Funktion blockiert wird [Ikehata and Ono, 2011]. Neben der Mutagenese durch Strahlung können Veränderungen der DNA auch durch chemische Substanzen wie EMS, welches zu den Alkylierenden Agenzien gehört, ausgelöst werden. EMS ruft zufällige Mutationen in DNA-Doppelsträngen hervor, z.B. die Alkylierung von Guanin (Punktmutation). Guanin kann anschließend nicht mehr drei, sondern nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden. Infolge dessen paart sich Guanin bei der Replikation nicht mehr mit Cytosin, sondern mit Thymin. In der darauffolgenden Replikationsrunde wird die Mutation gefestigt, indem sich Thymin mit Adenin paart, d. h. aus G/C wird A/T [Winston, 2008].

Physikalische Mutation: UV-Strahlen bei 254 nm

Für die UV-Mutagenese wurden der Referenzstamm 34 und die Hefen 10 und 13 verwendet. Aus einer Flüssigkultur wurde eine dekadische Verdünnungsreihe angelegt (10^0 - 10^{-7}), welche auf den jeweiligen zu bestrahlenden Platten ausplattiert wurde. Danach wurden die geöffneten Petrischalen unter die UV-Lampe gestellt und mit einer Wellenlänge von 254 nm, für 1,5 und 2,5 min bestrahlt (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: UV-Bestrahlung von Hefezellen auf Agar-Platten

Tabelle 2: KBE vom Referenzstamm 34, UV-Bestrahlung (254 nm); Kontrolle ohne UV-Bestrahlung, in der zweiten Zeile stehen die jeweiligen Selektions- bzw. Inkubationsbedingungen.

Legende: / Platte nicht angesetzt; - kein Wachstum; VF: Verdünnungsfaktor, TNTC = Too Numerus To Count, KBE: Koloniebildende Einheit

VF	KBE																	
	Würzeagar, 26 °C						Würzeagar, 14 °C						Würzeagar+ 20% EtOH, 26 °C					
	Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min	
10 ⁻¹	/	/	50	13	2	40	/	/	10	24	5	6	-	-	-	-	-	-
10 ⁻²	/	/	-	9	-	13	/	/	1	-	-	6	-	-	-	-	-	-
10 ⁻³	/	/	/	/	/	/	TNTC		/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁴	/	/	/	/	/	/	TNTC		/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁵	310	299	/	/	/	/	241	268	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁶	33	32	/	/	/	/	18	28	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁷	1	6	/	/	/	/	4	5	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/

Tabelle 3: KBE von der Hefe 13, UV-Bestrahlung (254 nm); Kontrolle ohne UV-Bestrahlung, in der zweiten Zeile stehen die jeweiligen Selektions- bzw. Inkubationsbedingungen.

Legende: / Platte nicht angesetzt; - kein Wachstum; VF: Verdünnungsfaktor, TNTC = Too Numerus To Count, KBE: Koloniebildende Einheit

VF	KBE																	
	Würzeagar 26°C						Würzeagar 14°C						Würzeagar+EtOH, 26°C					
	Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min	
10 ⁻¹	/	/	TNTC		13	29	/	/	66	93	1	8	-	-	TNTC		11	37
10 ⁻²	/	/	68	104	1	18	/	/	-	-	1	-	-	-	143	127	4	-
10 ⁻³	/	/	/	/	/	/	15	27	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁴	/	/	/	/	/	/	1	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁵	1	1	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁶	-	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁷	1	1	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/

In Tabelle 2 - Tabelle 4 sind die Ergebnisse der UV-Mutagenese dargestellt. Wie man erkennen kann, hat die UV-Bestrahlung einen letalen Effekt auf die Zellen, welcher bei

längerer Bestrahlung verstärkt wird. Generell ist der letale Effekt sehr willkürlich. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten verringert sich drastisch. Bei den überlebenden Zellen gilt es zu überprüfen, ob diese eine Veränderung aufweisen. In Tabelle 2 ist auch zu erkennen, dass 20 % Ethanol für die untergärige Brauhefe einen letalen Effekt hat. Bei der Kontrolle konnten keine koloniebildenden Einheiten festgestellt werden. Auch zeigten sich keine Mutanten nach der UV-Bestrahlung, die diesem letalen Effekt entgegenwirken konnten. Bei den Weinhefen hingegen (Tabelle 3 und Tabelle 4), die ebenfalls durch 20% Ethanol in ihrem Wachstum gehemmt wurden, konnten durch die UV-Mutagenese Mutanten erzeugt werden, die anscheinend nicht durch 20% Ethanol in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Diese könnten näher untersucht werden.

Tabelle 4: KBE von der Hefe 10, UV-Bestrahlung (254 nm); Kontrolle ohne UV-Bestrahlung, in der zweiten Zeile stehen die jeweiligen Selektions- bzw. Inkubationsbedingungen.
 Legende: / Platte nicht angesetzt; - kein Wachstum; VF: Verdünnungsfaktor, TNTC = Too Numerus To Count, KBE: Koloniebildende Einheit

VF	KBE																	
	Würzeagar 26°C						Würzeagar 14°C						Würzeagar+EtOH, 26°C					
	Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min		Kontrolle		1,5 min		2,5 min	
10 ⁻¹	/	/	TNTC		TNTC		/	/	TNTC		TNTC		-	-	TNTC		83	189
10 ⁻²	/	/	TNTC		31	57	/	/	66	70	1	7	-	-	42	77	26	32
10 ⁻³	/	/	/	/	/	/	TNTC		/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁴	/	/	/	/	/	/	425	383	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁵	119	192	/	/	/	/	49	57	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁶	15	12	/	/	/	/	5	4	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/
10 ⁻⁷	4	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	/	/	/	/

Chemische Behandlung: Einsatz von Ethylmethansulfat (EMS)

Die Behandlung der Hefestämme erfolgte nach der modifizierten Variante von Winston (2001). Die jeweiligen Hefen wurden in Natriumacetatpuffer gewaschen und mit 4,5% EMS versetzt. Die Probe wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das EMS mit 10 %-iger Natriumthioisulfatlösung inaktiviert. Die Hefen wurden in einer dekadischen Verdünnungsreihe auf die jeweiligen Agar-Platten ausplattiert. In Tabelle 5 sind die EMS-Mutationen mit den Hefen 10 und 13 sowie dem Referenzstamm 34 dargestellt. Der Effekt wird verglichen mit der Koloniezahl der unbehandelten Hefezel-

len. Es ist zu erkennen, dass das EMS keinen so letalen Effekt auf die Hefezellen hat, wie die UV-Strahlung.

Tabelle 5: KBE der Hefen 34, 10 und 13 vor (Kontrolle) und nach der EMS-Behandlung, ausplattiert auf Würzeagar, Inkubation bei 26 °C

Legende: / Platte nicht angesetzt; - kein Wachstum; VF: Verdünnungsfaktor, TNTC = Too Numerus To Count, KBE: Koloniebildende Einheit

VF	KBE											
	34 – Kontrolle		34 – EMS		10 – Kontrolle		10 – EMS		13 – Kontrolle		13 – EMS	
10 ⁻²	/	/	TNTC		/	/	TNTC		/	/	TNTC	
10 ⁻³	/	/	TNTC		/	/	592	554	/	/	760	635
10 ⁻⁴	/	/	602	604	/	/	114	113	/	/	101	63
10 ⁻⁵	195	212	67	93	30	33	13	13	96	92	12	7
10 ⁻⁶	35	33	12	9	8	5	3	2	6	6	-	2
10 ⁻⁷	4	3	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5 Gärversuche auf EBC-Gärsäulen

- **Gärungen mit den gescreenten „High-Gravity“ Hefen**

Für die Untersuchung der Stammeigenschaften wurden Fermentationen in EBC-Glas-Gärsäulen durchgeführt (Abbildung 7). Diese haben durch ihre Dimensionierung den Vorteil gegenüber Fermentationen im Labormaßstab, dass sie bei geringem Volumen von lediglich zwei Litern eine Flüssigkeitssäule von einem Meter haben. Dies führt dazu, dass sowohl eine gewisse Sedimentationshöhe für die Hefe zum Ende der Gärung wie auch ein statischer Druck simuliert werden. Derartige Verhältnisse kommen der realen Fermentation im Brauereibetrieb näher als ein normales Laborgefäß. Jedoch kann keine Druckgärung simuliert werden. In den Glas-EBC-Säulen wurden selektierte Hefen aus den vorangehenden Arbeitsschritten (siehe Tabelle 1) in jeder Versuchsreihe mit dem Referenzstamm 34, eine untergärige Brauhefe, verglichen.

Eine repräsentative Probenahme wurde erst nach minimal 24 Stunden genommen, denn in diesem Zeitraum erfolgte die deutliche Angärung und die damit verbundene CO₂-Bildung, die zu einer Durchmischung in den Gärrohren sorgte. Schließlich wurden alle weiteren 24 Stunden eine Probe genommen. Hierbei wurden die Hefen auf ihre brautechnologischen Eigenschaften (OD-Zunahme, Flockulation, Extraktabbau) hin untersucht. Der Extraktabbau stellt vor allem die Gärintensität eines Hefestammes dar,

welcher ein wichtiger wirtschaftlicher Parameter ist. Lange Belegzeiten der Tanks können Folge einer geringen Gärintensität sein und stellen eine unnötige Kapitalbindung dar.

Für die Gärung ist zunächst eine geeignete Propagation der Hefen, die nicht unbedingt eine wie von der Brauhefe bekannte Wachstumskurve zeigen, nötig. Dafür wurden die Hefen stufenweise an die jeweiligen Substratbedingungen angepasst. Eine erste Inkubation erfolgte in 25 ml 12 °P Würze für zwei Tage bei 26 °C. Diese wurden anschließend in 400 ml 18 °P Würze in einer 1 l Laborflasche überführt und für weitere zwei Tage bei 26 °C inkubiert. Mit 60% Luftraum erhielt man unter ständigem Rühren nach zwei Tagen eine ausreichend hohe Zellkonzentration. Die Vorkultur wurde in 2 l 25 °P Stammwürze gegeben und in den EBC-Säulen fermentiert. Die Hefen wurden jeweils zweimal geführt. Nach der ersten Gärung wurden die Hefen geerntet und für die zweite Führung verwendet. Dafür wurden diese vorher für max. 24 h bei 4 °C gelagert.



Abbildung 7: EBC-Gärsäulen

Abbildung 8 zeigt die Gärung mit der jeweiligen zweiten Führung der Hefen 10, 13, und 14 sowie des Referenzstammes 34. In dieser Abbildung 8 sind in verschiedenen Diagrammen die verschiedenen Gärparameter dargestellt. Die Gärung wurde in 25 %-iger Würze bei 26 °C durchgeführt. Die ersten Versuche wurden bei 26 °C durchgeführt, um optimale Wachstumsbedingungen für die Weinhefen zu liefern. Die Herstellung von Wein erfolgt meist über 20 °C. Die jeweiligen Startzellzahlen können der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Zellkonzentrationen der jeweiligen Hefen zum Start der jeweiligen Gärungen in den EBC-Glassäulen (Bestimmt mittels NucleoCounter)

Hefen	Zellen/ml erste Führung	Zellen/ml zweite Führung
34	1,24E+06	8,76E+06
10	1,29E+06	1,99E+07
10	1,22E+06	1,48E+07
14	8,22E+05	7,81E+06
14	9,61E+05	7,17E+06
15	4,82E+05	5,00E+05
15	8,34E+05	5,20E+05

Während der Fermentation nimmt der pH-Wert ab, der Extrakt wird abgebaut und die Zelldichte (OD_{600}) steigt. Die vorkommenden Zuckerarten in der Würze werden von der Hefezelle metabolisiert. Durch die Aufnahme der Zucker fällt der Extrakt und der pH-Wert sinkt. Der pH-Abfall beruht auf der Freisetzung von H^+ -Ionen durch die Zuckeraufnahme sowie der Bildung von organischen Säuren.

Wie aus den Diagrammen in Abbildung 8 zu entnehmen ist, zeigt die Hefe 14 einen zunächst schnellen Extraktabbau und erreicht ein Plateau der Extraktkonzentration bei ca. 7 – 6,5 °P. Die beiden anderen Weinhefen zeigen einen langsameren Extraktabbau, hören jedoch auch bei einem Extrakt von ca. 7 °P mit der Gärung auf. Der Referenzstamm 34 (eine untergärige Brauhefe) zeigte eine bessere Fermentationsperformance als die Weinhefen, die generell an High-Gravity-Bedingungen angepasst sein sollten. Dies äußerte sich in einem höheren Fermentationsgrad (RDF) und einem geringeren Restextraktgehalt von ca. 4 °P. Dementsprechend wurde auch eine höhere Ethanolproduktion bei der untergärigen Brauhefe detektiert (8,25 %). Des Weiteren überzeugten die Weinhefen auch sensorisch nicht für den Einsatz zur Bierherstellung. Diese hatten eher fruchtige Aromen und erzeugten auch nur für das Bier typische geringe Bittere (siehe

Tabelle 7 und Abbildung 10A). Dabei waren die parallelen Ansätze der jeweiligen Hefen jeweils vergleichbar in den Fermentations-eigenschaften.

Nach Ende der Gärung (keine Extraktabnahme mehr zu beobachten) wurden die abgesetzten Hefen geerntet und für eine zweite Führung verwendet. Dafür wurden die Hefen für max. 24 h bei 4 °C gelagert und dann in eine Gärung mit 25 °P-Würze bei 26 °C gegeben. Außer der Hefe 10 zeigten die anderen Hefen eine langsamere

Extraktabnahme als bei der ersten Führung. Hier könnte schon eine Verringerung der Vitalität angenommen werden.

Abbildung 9 zeigt die Fermentationsperformance der weiteren gescreenten Hefen 9, 16, 17, 18, 22, 31 sowie des Referenzstammes 34. Hier zeigte die Hefe 31 trotz einer geringen OD-Zunahme und auch einer schnellen Flockulation und dementsprechend einer langsamen Extraktabnahme einen hohen Fermentationsgrad zum Ende der Gärung. Der Restextrakt betrug bei dieser Hefe 3,75 °P, die Referenzhefe 34 hatte einen Restextrakt von 4,11. Jedoch waren die sensorischen Eigenschaften der Hefe 31 nicht vorteilhaft (siehe Abbildung 10B). Alle weiteren Hefen zeigten auch wie die Hefen 10, 14 und 15 keinen so hohen Fermentationsgrad im Vergleich zum Referenzstamm. Auch wie in der ersten Versuchsreihe, bildeten diese Hefen immer sehr fruchtige (auch sektartige) Aromen.

Da die Weinhefen keinen Endvergärungsgrad aufwiesen bzw. die Brauhefe immer einen höheren Fermentationsgrad aufwies (siehe Abbildung 11: Zusammenfassung

Abbildung 12: Maltotriose am Ende der Extraktabnahmen und RDF der gescreenten Gärung mit 25%-iger Würze, 26 °C Hefen in 25 %-iger Würze bei 26 °C

) kam die Überlegung auf, ob Weinhefen Maltotriose verwerten können. Bei der Fähigkeit der Zuckeraufnahme unterscheidet sich die Weinhefe von der Bierhefe. In reifen Trauben treten vermehrt Glucose und Fructose als Monosaccharide auf, die in einer Menge von 120-250 g/l Bestandteil der Traube sind. Daneben gibt es eine Vielzahl von anderen Zuckerarten, wobei ihre Vorkommen jeweils unter 1 g/l liegen. In der Bierwürze liegt der Gehalt an Maltose bei 65,5 %. Die Verwertung von Maltose bei den eingesetzten Hefen wurde schon im Screening nachgewiesen. In Most kommt jedoch auch keine Maltotriose vor. Daher sollte überprüft werden, ob die Weinhefen Maltotriose verwerten können. Dafür wurde von den zwei ausgesuchten Hefen 17 und 22 die Maltotriosekonzentration in der Würze am Ende der Gärung analysiert. Die Hefen wurden nach ihrem RDF ausgewählt. Die Hefe 22 hat einen höheren RDF als die Hefe 17. Als Referenz wurde auch die Maltotriosekonzentration von der Gärung der Hefe 34 bestimmt. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, zeigen beide Weinhefen eine höhere Konzentration an Maltotriose in der Würze auf als der Referenzstamm 34. Dies deutet darauf hin, dass Weinhefen Maltotriose nicht bzw. nur sehr langsam/schlecht verwerten können. Daher wurden einige der bereits gescreenten Hefen (siehe Tabelle

1) und noch weitere neue Hefen (wie Backhefen) auf ihre Fähigkeit Maltotriose zu vergären hin untersucht. Dazu wurden die ausgewählten Hefen in einem chemisch definierten Medium mit Maltotriose als einzige C-Quelle inkubiert. Des Weiteren enthält das Medium den Indikator Bromkresolgrün, der bei einem pH Wert von 3,8 gelb und bei 5,4 türkis erscheint. Die anaeroben Bedingungen wurden mittels Überschichten mit Paraffin erreicht. Ein positives Ergebnis äußert sich durch eine Trübung, einen Farbumschlag und eine Steigung des Paraffins im Reagenzröhrchen. Die Trübung beruht auf der Vermehrung der Hefezellen. Der Farbumschlag wird durch eine pH-Absenkung, ausgelöst durch die stoffwechselbedingte Verwertung des Zuckers, hervorgerufenen. Maltotriose wird in Glucose und Maltose gespalten. Bei der Aufnahme der Maltose muss die Hefezelle vermehrt Inhaltsstoffe und H^+ -Ionen aus der Zelle schleusen. Durch die Sekretion von H^+ -Ionen fällt der pH-Wert ab. Durch die Abdichtung des Mediums mit Paraffin kann kein weiterer Sauerstoff mehr ins Medium gelangen, sodass die Hefe ohne Sauerstoff Gärung betreibt. Durch die Gärung der Hefe entsteht CO_2 , wodurch das Paraffin nach oben gedrückt wird. Zeigte sich eine Trübung bzw. ein Farbumschlag, wurden die Hefen als maltotrioseverwertende Hefen identifiziert. Dieses Screening ist in

Tabelle 8 dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind die Hefen 12, 13, 10, 11, 19, 20 und 29 nicht in der Lage, Maltotriose zu verwerten. Dies könnte auch den geringen Fermentationsgrad der Hefen 10, 13 und 18 erklären. Die Hefen 9, 14 und 17 zeigten eine verspätete Maltotrioseverwertung. Die Hefe 22 z. B. zeigt eine gute

Maltotrioseverwertung, die sich auch in einem höheren RDF im Vergleich zur Hefe 17 widerspiegelte. Jedoch können die maltotrioseverwertenden Hefen die Maltotriose anscheinend nicht so gut verwerten wie der Referenzstamm 34. Vermutlich sind die Bedingungen für Weinhefen während des High-Gravity-Brewing für eine gute Maltotrioseverwertung nicht optimal.

Im Maltosescreening wurden auch neue Hefen getestet. Dabei handelte es sich um Destillierhefen (Hefen 53 und 54) sowie um Backhefen (55, 57 und 58). Diese zeigten eine sehr gute Maltotrioseverwertung. Maltotriosepositive Hefen wurden für weitere Gärungen in 25 %-iger Würze verwendet. (siehe Abschnitt „Gärung mit den neu gescreenten maltotrioseverwertenden Hefen“).

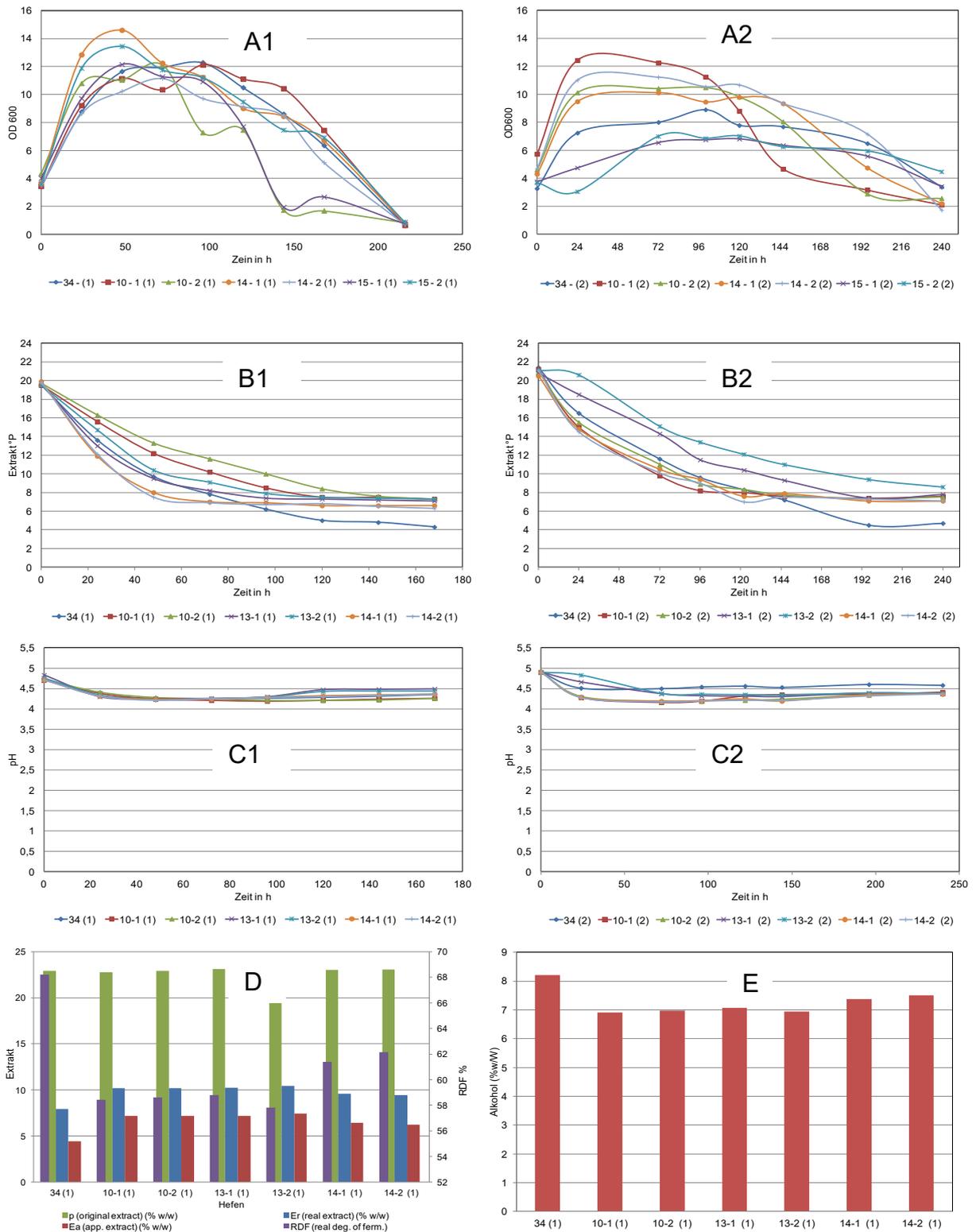


Abbildung 8: Gärung mit den Hefen 10, 14, 15 (jeweils doppelter Ansatz) sowie dem Referenzstamm 34 in den EBC-Glassäulen. Dabei handelt es sich bei der 1 um die erste Führung und bei der 2 um die zweite Führung der jeweiligen Hefen. Außer dem Referenzstamm 34 wurden die Hefen in Doppelbestimmung geführt. Dabei steht in der Legende der Hefebezeichnungen -1 bzw. -2 für die jeweiligen Einzelbestimmungen. (1) bzw. (2) steht für die Anzahl der Führungen
A: OD-Verlauf, B: Extraktabnahme, C: pH-Wert-Verlauf, D: Extraktbestimmungen am Ende der ersten Führung, E: Alkoholgehalte am Ende der ersten Führung

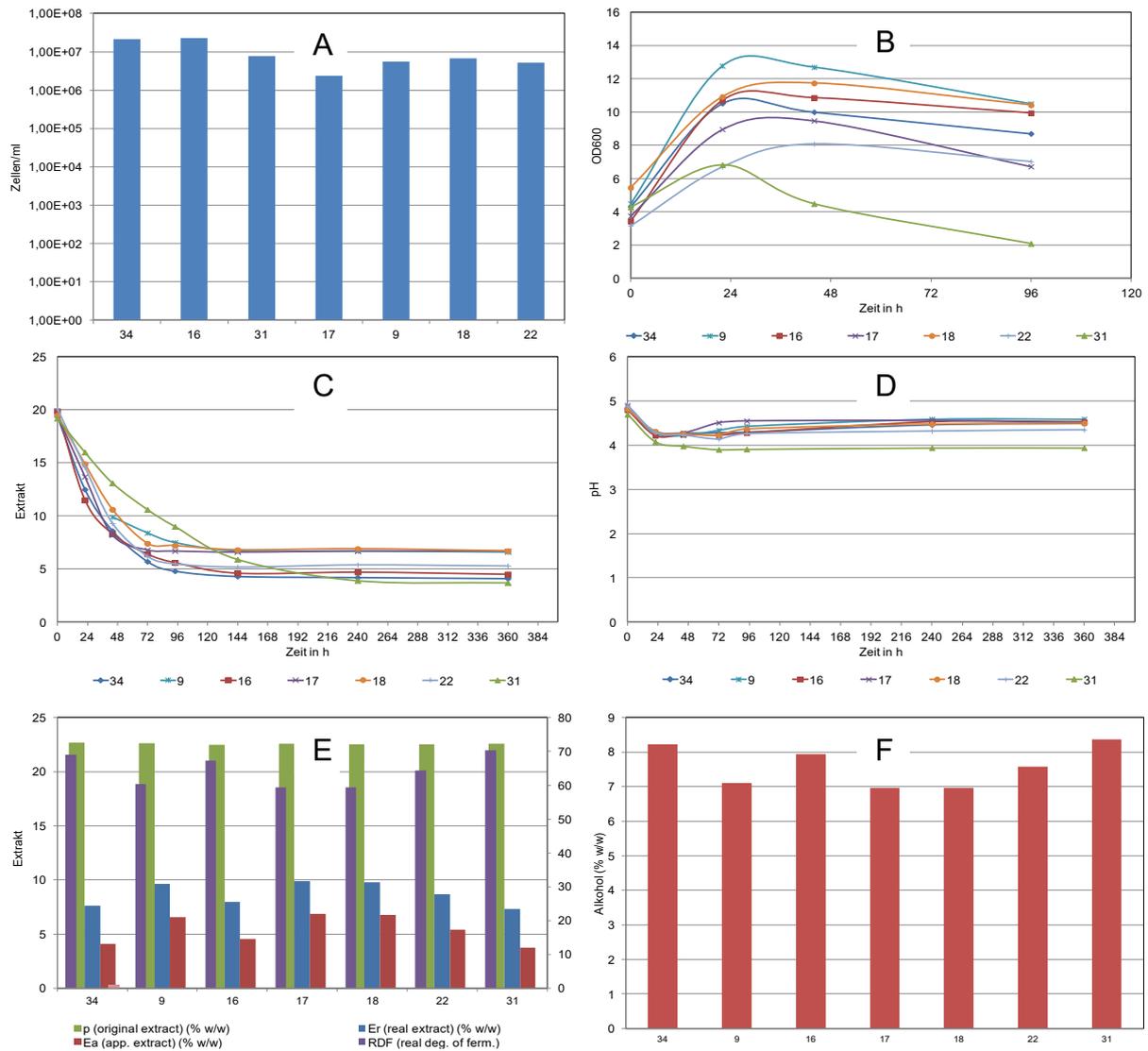


Abbildung 9: Gärung der ersten Führung mit den Hefen 9, 16, 17, 18, 22, 31 sowie dem Referenzstamm 34 in den EBC-Glassäulen
 A: Start Zellkonzentrationen der jeweiligen Hefen, B: OD-Verlauf, C: Extraktabnahme, D: pH-Wert-Verlauf, E: Extraktbestimmungen am Ende der ersten Führung, F: Alkoholgehalte am Ende der ersten Führung

Tabelle 7: Sensorische Eindrücke nach der Gärung mit den Hefen 34, 10, 15, 14 in 25 %-iger Würze

Probe	Geruch	Geschmack
34	Typisch Bier, ethanolisch, fruchtig, spritzig	Spritzig, herb, bitter, kaum Restsüße, malz-aromatisch
10	Muffig, schwefelig, Honig, Zimt, Nelke	Starke Nelkennote, Restsüße, Bittere nicht da
15	Geruch nach Sekt, apfelig, Acetaldehyd, trocken	Gar kein Biereindruck, apfelig, frisch, fruchtig, geringe Restsüße, Bittere nicht da
14	Muffig, fleischig, schwefelig, bittrig, fauliger Geruch	Geschmack nicht so schlimm wie Geruch, kaum Geschmack, buttrig, Restsüße

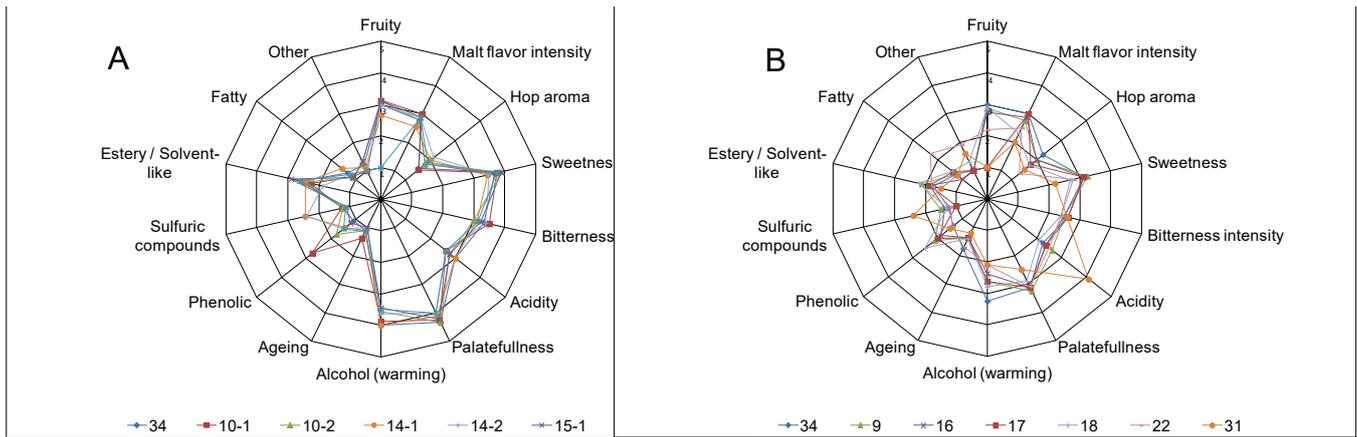


Abbildung 10: Verkostungsanalyse der Gärungen in 25 °P Würze, 26 °C

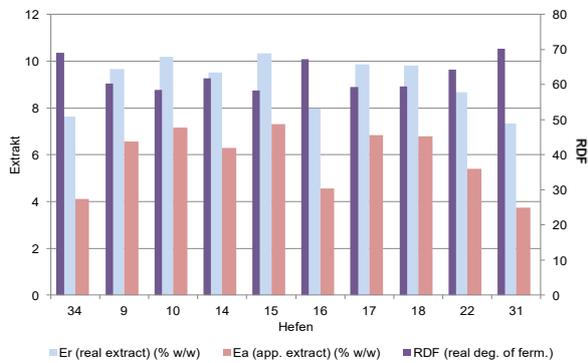


Abbildung 11: Zusammenfassung der Extraktabnahmen und RDF der gescreenten Hefen in 25 %-iger Würze bei 26 °C

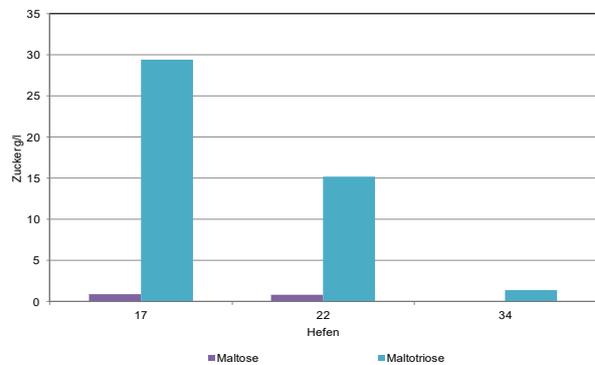


Abbildung 12: Maltotriose am Ende Gärung mit 25%-iger Würze, 26 °C

Tabelle 8: Screening nach Maltotriose positive Hefen (-: keine Trübung, +: leichte Trübung, ++: starke Trübung)

Nr.	Stamm-Typ	Trübung nach 1 Tag	Trübung nach 5 Tagen	Nr.	Stamm-Typ	Trübung nach 1 Tag	Trübung nach 5 Tagen
4	Weinhefe	-	++	22	Weinhefe	+	++
6	Weinhefe	+	++	23	Weinhefe	++	++
7	Weinhefe	++	++	24	Weinhefe	-	(+)
9	Weinhefe	-	++	25	Weinhefe	++	++
10	Weinhefe	-	-	26	Weinhefe	+	++
11	Weinhefe	-	-	27	Weinhefe	+	++
12	Weinhefe	-	-	28	Weinhefe	-	++
13	Weinhefe	-	-	29	Weinhefe	-	-
14	Weinhefe	-	++	45	Bäckerhefe	+	++
15	Weinhefe	-	++	53	Destillierhefe	+	++
17	Weinhefe	-	++	54	Destillierhefe	+	++
18	Weinhefe	-	-	55	Bäckerhefe	+	++
19	Weinhefe	-	-	57	Bäckerhefe	+	++
20	Weinhefe	-	-	56	Bäckerhefe	+	++
21	Weinhefe	-	++	59	Weinhefe	+	++

Die folgenden Gärungen wurden in den modifizierten Gärsäulen aus Edelstahl durchgeführt. Diese bieten den Vorteil, Druckgärungen durchzuführen. Ihre Beschaffenheit und Dimensionen entsprechen den in Brauereien verwendeten Gärtanks und sind damit für Gärversuche gut geeignet. Damit sind auch praxisnähere Bedingungen gegeben.



Abbildung 13: modifizierte EBC Säulen der VLB-Berlin

- **Gärung der Hefen aus der Mutagenese**

Für die Fermentationen von Mutanten im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm wurden UV-Mutanten verwendet. Aus der Mutagenese wurden die in

Tabelle 9 dargestellten Mutanten isoliert. Die blau markierten Mutanten wurden für Fermentationsversuche verwendet. Die Gärungen wurden jeweils mit dem Originalstamm verglichen.

Während der Gärung wurden alle 24 Stunden Proben genommen und auf ihren Extraktgehalt, optische Dichte, pH-Wert, Zuckergehalt und Alkoholgehalt überprüft.

Tabelle 9: Isolierte Mutanten der Hefen 13 und 10 sowie des Referenzstammes 34 (grün unterlegte Hefen wurden für Gärversuche verwendet)

Mutanten Hefe 34	Behandlungsform	Mutanten Hefe 13	Behandlungsform	Mutanten Hefe 10	Behandlungsform
1	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C	21	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze+20%EtOH, 14 °C	31	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C
2	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C	22	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze+20%EtOH, 14 °C	32	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C
3	Kontrolle (10^{-5} Z/ml), Würze, 14 °C	23	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 26 °C	33	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C
4	Kontrolle (10^{-5} Z/ml), Würze, 14 °C	24	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 26 °C	34	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C
5	1,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C	25	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	35	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C
6	1,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 14 °C	26	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	36	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C
7	1,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 26 °C	27	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	37	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C
8	1,5 min (10^0 Z/ml), Würze, 26 °C	28	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	38	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze+20%EtOH, 26 °C
9	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	29	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze+20%EtOH, 26 °C	39	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze+20%EtOH, 26 °C
10	2,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze, 26 °C	30	2,5 min (10^0 Z/ml), Würze+20%EtOH, 26 °C	40	1,5 min (10^{-1} Z/ml), Würze+20%EtOH, 26 °C

- **Gärung mit dem Referenzstamm 34 und seinen Mutanten**

Der Verlauf der Fermentationsparameter ist in Abbildung 14 für den Referenzstamm und die ausgewählten Mutanten dargestellt. In den Diagrammen sind der Verlauf des pH-Wertes, die Zelldichte (optische Dichte), die Extraktabnahme, die Glukose- und Maltoseabnahme sowie die Ethanolzunahme dargestellt. Die Gärung wurde bei der

praxisrelevanten Temperatur von 14 °C durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass die Referenzhefe, welche eine untergärige Brauhefe ist, bei 14 °C keinen so guten Extraktabbau aufweist, wie bei 26 °C. Anhand der Fermentationsparameter die in Abbildung 14 dargestellt sind, wird deutlich, dass auch keine Mutante der untergärigen Bierhefen eine bessere Fermentationsperformance als der Originalstamm aufwies.

Da die Mutagenese sehr ungerichtet ist, müssten vielmehr Mutanten gegen den Originalstamm verglichen werden, um einen signifikant veränderten Mutanten eventuell zu finden.

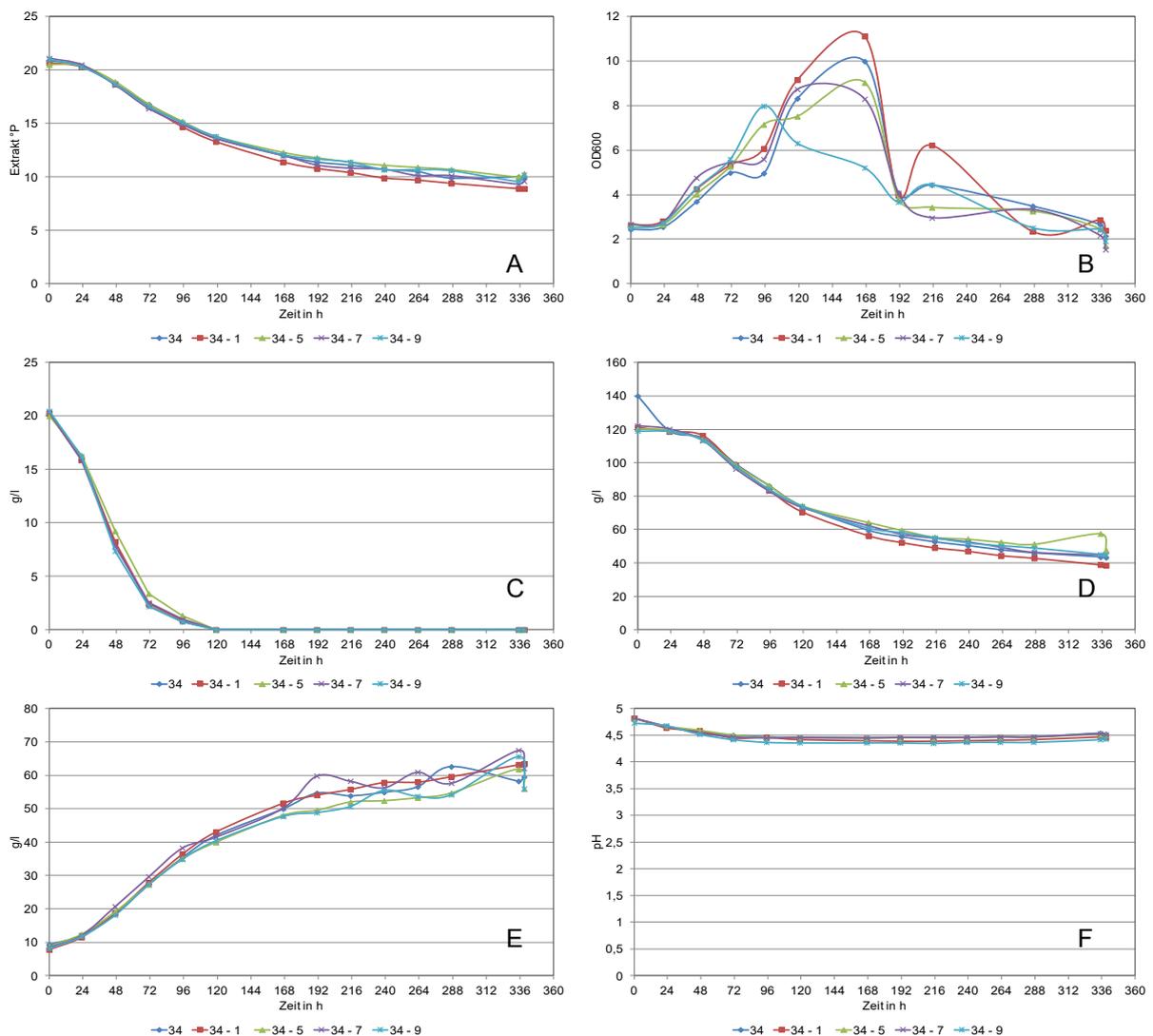


Abbildung 14: Referenzstamm 34 und die jeweiligen Mutanten 1, 5, 7 und 9. 25 °P Würze, 14 °C in den modifizierten EBC-Gärsäulen

A: Abnahme des Extraktgehaltes [°Plato], B: Verlauf der Zelldichte OD [600 nm], C: Abnahme der Glukosekonzentration [g/l], D: Abnahme der Maltosekonzentration [g/l], E: Zunahme des Ethanolgehaltes [g/l], F: Verlauf des pH-Wertes

- **Gärung der Hefe 10 und 13 und ihrer Mutanten**

Der Verlauf der Fermentationsparameter der jeweiligen Hefe mit ihren Mutanten ist in der Abbildung 15 für die Hefe 10 und in Abbildung 16 für die Hefe 13 dargestellt.

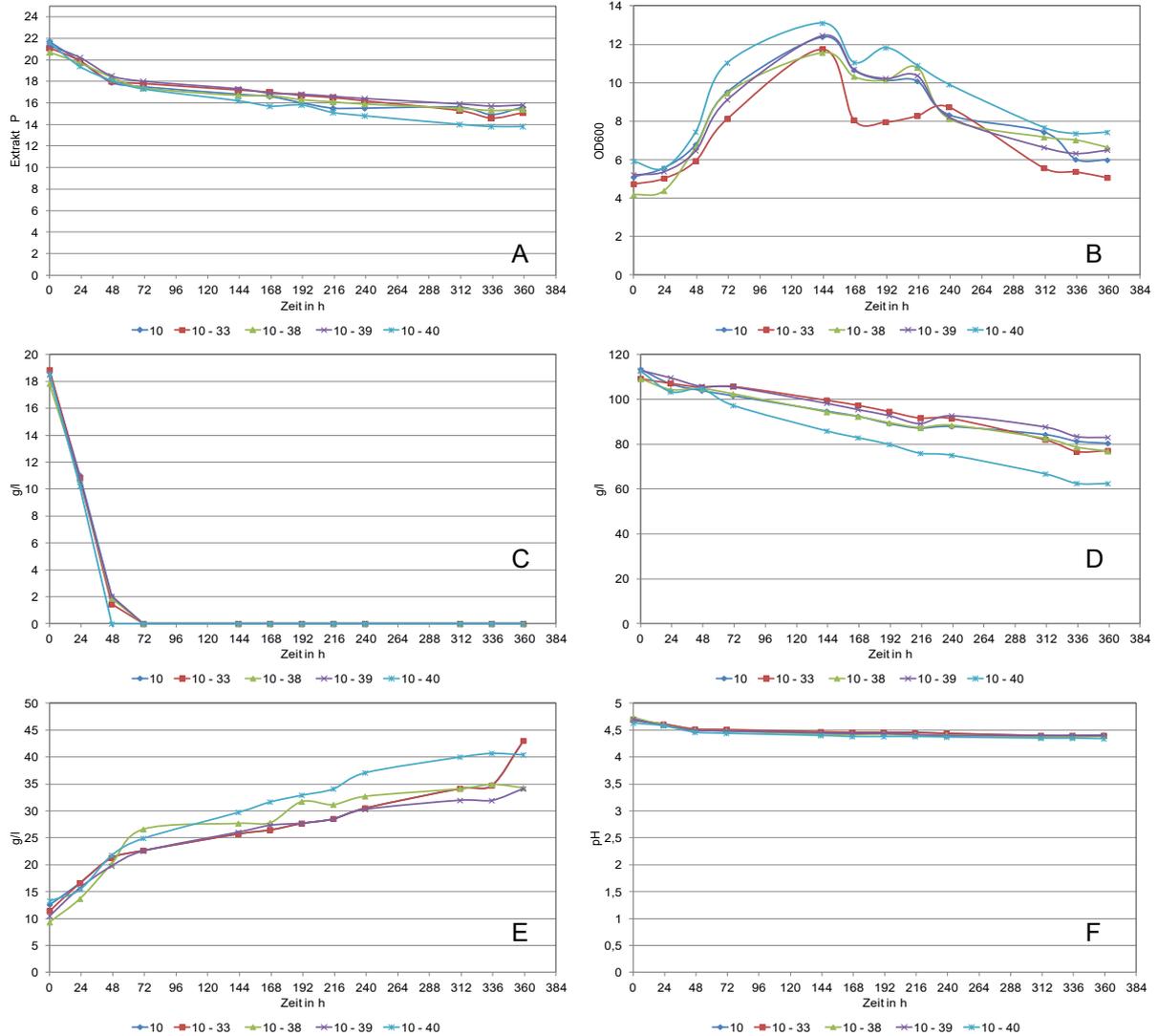


Abbildung 15: Hefe 10 und die jeweiligen Mutanten 33, 38, 39 und 40. 25 °P Würze, 14 °C in den modifizierten EBC-Gärsäulen
 A: Abnahme des Extraktgehaltes [°Plato], B: Verlauf der Zelldichte OD [600 nm], C: Abnahme der Glukosekonzentration [g/l], D: Abnahme der Maltosekonzentration [g/l], E: Zunahme des Ethanolgehaltes [g/l], F: Verlauf des pH-Wertes

In der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die Fermentationsverläufe des Originalstammes und der Mutanten anfänglich recht parallel verlaufen. Die Mutante 40 zeigt jedoch einen etwas schnelleren Extraktabbau und hat ca. 1,5 °P mehr Extrakt abgebaut am Ende der Gärung als der Originalstamm (Abbildung 15 A). Dies ist auf die bessere Maltoseverwertung zurückzuführen (Abbildung 15 D). Aufgrund der besseren Maltoseverwertung wird auch mehr Ethanol produziert. Hier ist zu sehen, dass zwar keine hoch signifikante Verbesserung der Fermentationseigenschaften zu beobachten ist, jedoch das Potential besteht, durch ungerichtete Mutagenese die Fermentationsperformance dieser Weinhefe zu verbessern.

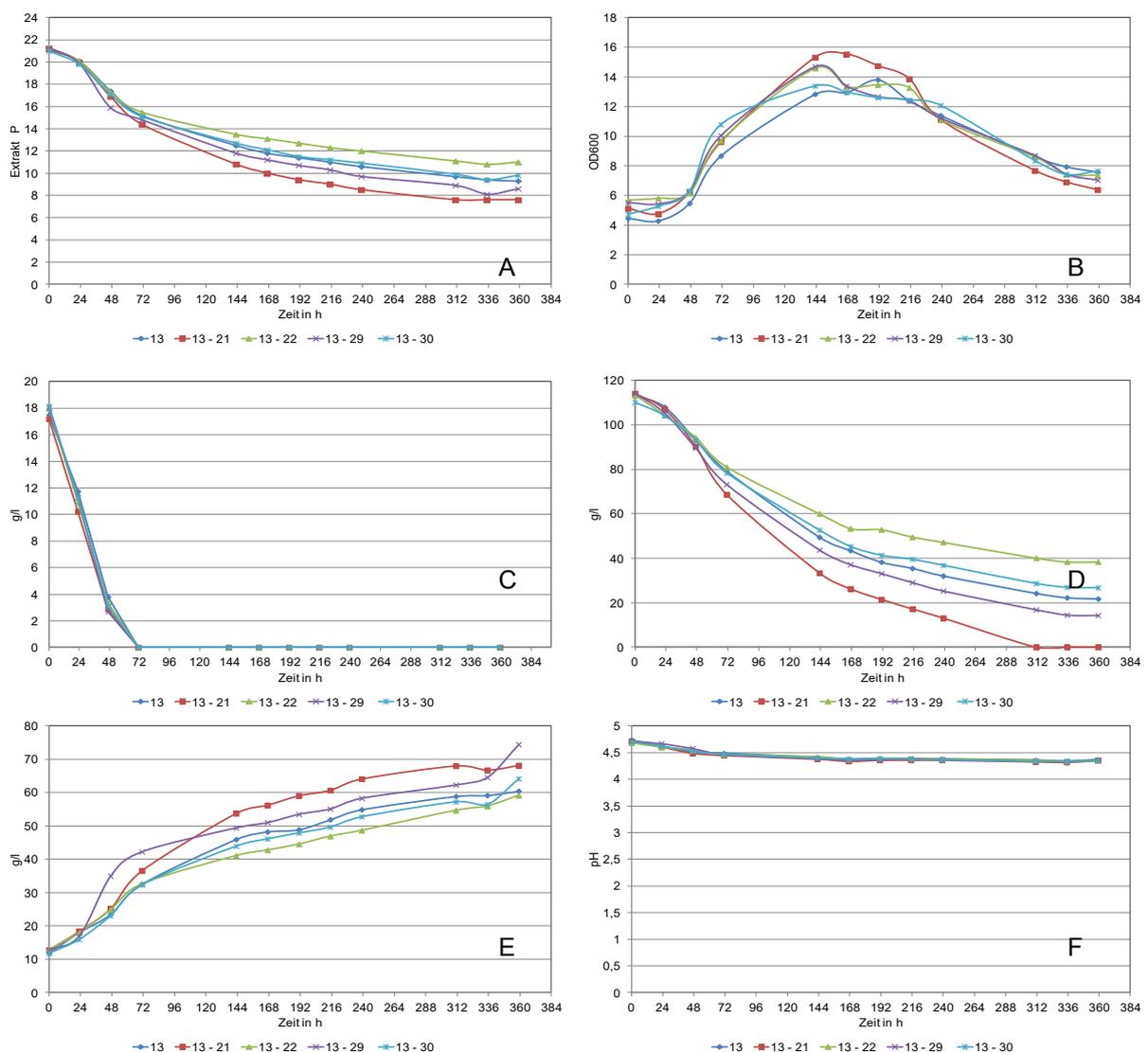


Abbildung 16: Hefe 13 und die jeweiligen Mutanten 21, 22, 29 und 30. 25 °P Würze, 14 °C in den modifizierten EBC-Gärsäulen

A: Abnahme des Extraktgehaltes [°Plato], B: Verlauf der Zelldichte OD [600 nm], C: Abnahme der Glukosekonzentration [g/l], D: Abnahme der Maltosekonzentration [g/l], E: Zunahme des Ethanolgehaltes [g/l], F: Verlauf des pH-Wertes

In Abbildung 16 ist das Fermentationsverhalten der Hefe 13 mit den jeweiligen Mutanten dargestellt. Anfänglich in den ersten drei Fermentationstagen verlaufen die Gäreigenschaften des Originalstammes mit den Mutanten recht parallel. Danach sind kleine Unterschiede zu beobachten. Die Mutanten 29 und 21 zeigen einen etwas schnelleren Fermentationsverlauf und erreichen am Ende der Gärung einen um 1 – 1,7 °P geringeren Restextrakt als der Originalstamm, was sich auch in der Maltoseverwertung bemerkbar macht (Abbildung 16 A und D). Anders zeigt sich Mutante 22, die langsamer vergärt und am Ende der Gärung einen um ca. 2 °P höheren Restextrakt aufweist als der Originalstamm. Die unterschiedliche Extraktabnahme macht sich auch in unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol am Ende der Gärung bemerkbar.

Auch bei dieser Weinhefe ist zu erkennen, dass sich die Fermentationseigenschaften durch ungerichtete Mutagenese etwas verbessern. Jedoch zeigt sich auch, dass ein negativer Effekt durch die Mutagenese hervorgerufen werden kann.

Der unterschiedliche Verlauf der beiden Hefen 10 und 13 bezüglich des Extraktabbaus könnte in ihrem Ursprung liegen. Bei der Hefe 13 handelt es sich um eine Weißweihefe und bei der Hefe 10 um eine Rotweihefe. Da Weißwein bei einer Temperatur von unter 20 °C hergestellt wird, ist diese Hefe 13 vermutlich besser an niedrige Temperaturen angepasst als die Rotweihefe 10. Rotwein wird bei Temperaturen von 20-24 °C hergestellt.

Wie aus den Fermentationen der Mutanten aus der Mutagenese im Vergleich zu ihrem Originalstamm zu erkennen ist, ist die Mutagenese eine sehr ungerichtete und willkürliche Veränderung des Erbgutes. Doch kann nicht vorher gesagt werden, welche Mutation das UV-Licht auslöst. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, zeigt die Mutagenese bei den getesteten Mutanten der Brauhefe keinen Effekt auf die analysierten Fermentationseigenschaften. Dies bedeutet jedoch nicht, dass das Genom nicht verändert worden sein könnte. Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Fermentationsperformance der Mutanten der Weinhefen. Hier sind geringe Unterschiede in der Fermentationsperformance der Mutanten im Vergleich zum Originalstamm zu erkennen. Diese Unterschiede sind jedoch nicht nur positiv, sondern können auch negativ sein wie bspw. ein langsamerer Extraktabbau.

Dies zeigt, dass deutlich mehr Mutanten analysiert werden müssten, um Kandidaten mit den erwünschten positiven Eigenschaften zu detektieren. Daher ist die Mutagenese eine zwar mögliche Methode, um die Eigenschaften der Hefen zu verändern, jedoch sehr aufwendig und ungerichtet.

Des Weiteren sind die Eigenschaften in der DNA über einen degenerierten Code verschlüsselt. D.h., es muss nicht jede Mutation zwingend eine Änderung der Eigenschaften bewirken. Der genetische Code wird durch ein Triplet der Nucleotide bestimmt. Dabei können verschiedene Triplets der Nucleotide die gleiche Aminosäure codieren. Mit den Aminosäuren werden Proteine/Enzyme aufgebaut, die die Eigenschaften bestimmen. Daraus folgt, dass eine Veränderung des Triplets nicht zwingend die Eigenschaft verändert.

- **Gärung mit den 2-Desoxy-Glucose-Klonen der Hefe 10**

In Abbildung 17 ist der Fermentationsverlauf der Weinhefe 10 mit ihren auf 2-Desoxy-Glucose isolierten Klonen dargestellt. Die Isolate 10–I und 10–II waren in der Lage, Maltose und Glucose (in einem Medium mit gleichen Anteilen der jeweiligen Zucker) parallel zu verwerten, d. h. die Glukoserepression war aufgehoben. In dem Klon 10–III konnte dies nicht nachgewiesen werden. Inwiefern sich dies auf ihre Fermentationseigenschaften auswirkt, sollte hier überprüft werden. Dazu wurde die Fermentation in 18 °P Würze durchgeführt. Abbildung 17 A zeigt den Fermentationsverlauf des Originalstammes mit den jeweiligen 2-Desoxy-Isolaten. Es ist zu erkennen, dass auch der Originalstamm 10 (im Vergleich zu vorherigen Gärungen bei 25 °P, 14 °C) eine gute Fermentationsperformance aufweist. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass hier 18 °P Würze verwendet wurde, was einen verringerten Stressfaktor für die Hefe darstellt.

Verglichen mit dem Originalstamm zeigten die 2-Desoxyklone in der 18 °P Würze eine etwas verbesserte Fermentationsperformance. Dies machte sich in einem schnelleren Extraktabfall z. B. bei der Hefe 10–I bemerkbar, was vermutlich auf die bessere Glucose und Maltoseaufnahme zurückzuführen ist. Der Restextrakt am Ende der Gärung ist jedoch nicht signifikant geringer. Diese Unterschiede belaufen sich auf ca. 1,3 °P (Abbildung 17 D). Die Zelldichte, gemessen über die optische Dichte, der Weinhefeklone nahm im Vergleich zum Originalstamm nur sehr wenig zu (Abbildung 17 B).

Trotz der geringeren Zelldichte erfolgte ein effektiver Extraktabbau und eine zu den anderen Kulturen vergleichbare Ethanolproduktion, was ebenfalls durch eine bessere Zuckeraufnahme begründet sein könnte.

In Abbildung 17 E ist der Verlauf vom Gesamtdiacetylgehalt der Hefen zum Ende der Gärung dargestellt. Diacetyl wird während der Gärung von der Hefe produziert und ausgeschleust und zum Ende der Gärung, wie auch in den vorliegenden Ergebnissen, wieder abgebaut. Diacetyl in Bier ist insofern interessant, da es einen Einfluss auf die Sensorik hat. Der Schwellenwert für Bier liegt bei 0,15 ppm. Die Hefe 10-I zeigt einen leicht erhöhten Wert auf, wohingegen die Werte der restlichen Klone innerhalb des Schwellenwertes liegen.

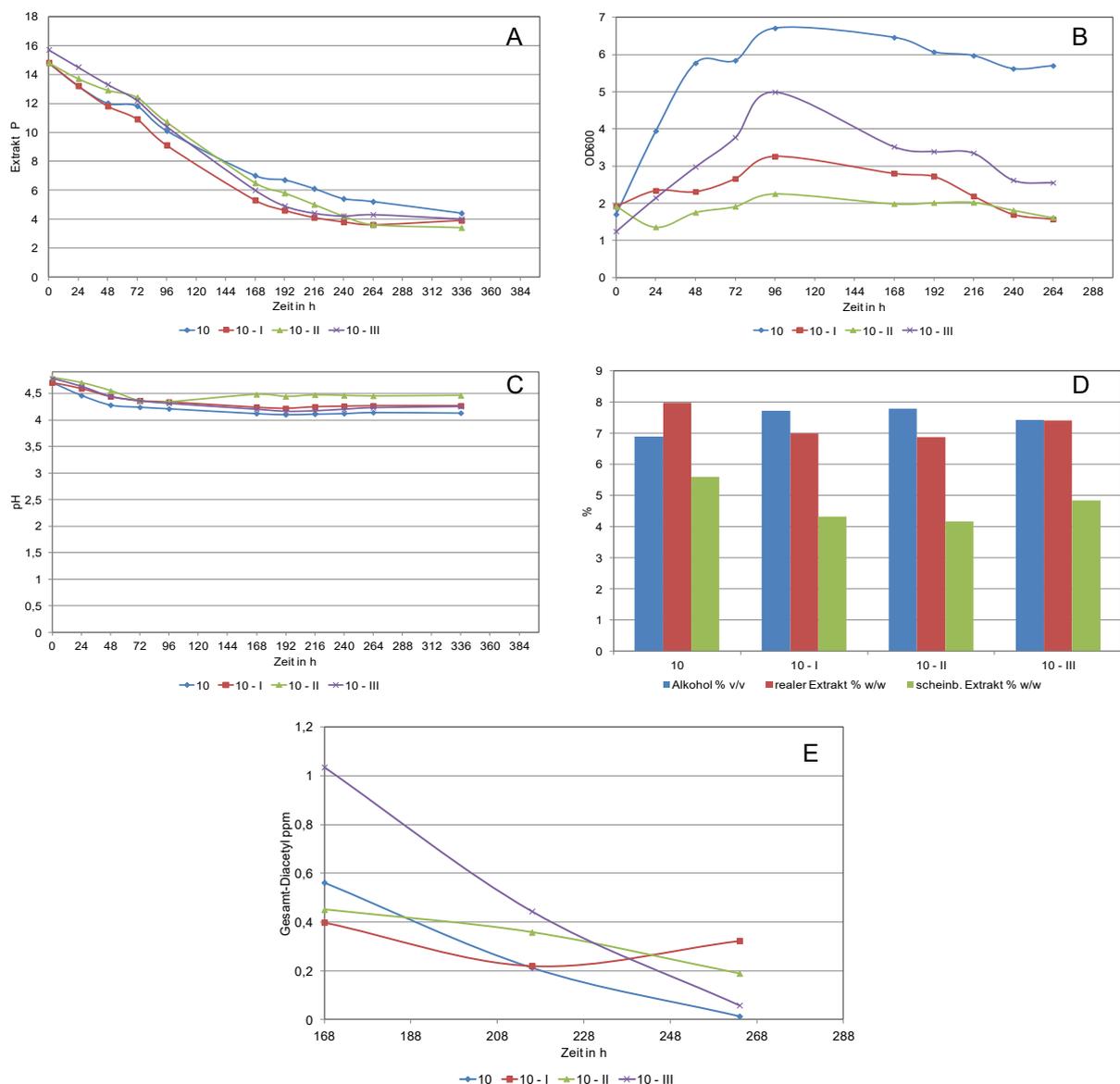


Abbildung 17: Fermentation der Hefe 10 mit den 2-Desoxy-Mutanten. 18 °P, 14 °C.

- **Gärung mit den neu gescreenten maltotrioseverwertenden Hefen**

In Tabelle 8 ist der Test auf Verwertung von Maltotriose durch die gescreenten Hefen dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass nicht alle Hefen in der Lage sind, Maltotriose zu verwerten, was sich auch in den Fermentationsgraden bemerkbar machte. Die maltotriose-positiven Hefen 6, 7, 23, 25, 27, 45, 54, 55, 57 und 58 wurden für Gärversuche im Vergleich zum Referenzstamm herangezogen. Die Versuche wurden in den modifizierten EBC-Säulen durchgeführt. In Abbildung 18 ist der Extraktabbau der jeweiligen Hefen bei 26 °C (A) und 14 °C (B) dargestellt. Wieder zeigte die Referenzhefe 34 bei 26 °C den höchsten Extraktabbau, d.h. den geringsten Restextrakt am Ende der Gärung. Die Hefen 55, 57, 23, 25 und 45 zeigten zwar eine schnelle Angärung, haben jedoch nach ca. 72 Stunden keine weitere signifikante Extraktveränderung aufgewiesen. Da in den Brauereien die Gärungstemperatur für untergärige Biere bei 12-14 °C liegt, wurde auch getestet, wie das Gärungsverhalten von diesen ausgewählten Hefen bei einer Temperatur von 14 °C verläuft. In Abbildung 18 B ist der Extraktabbau der jeweiligen Hefen bei 14 °C dargestellt. Hier zeigte diesmal die Referenzhefe 34 eine stockende Gärung bzw. den geringsten Vergärungsgrad. Alle anderen Hefen bauten den Extrakt besser ab. Dabei sind besonders hervorzuheben wieder die Hefen 55, 57, 23, 25 und 45. Die Gärgeschwindigkeit ist, wie zu erwarten war, zwar deutlich geringer als bei 26 °C, jedoch erreichten die Hefen einen Restextrakt <10 °P, während die Referenzhefe 34 nur ca. 15 °P erreichte. Die Hefe 55 erreichte sogar den gleichen Restextrakt wie bei 26 °C. Dies ist für eine bessere Veranschaulichung in Abbildung 19 dargestellt.

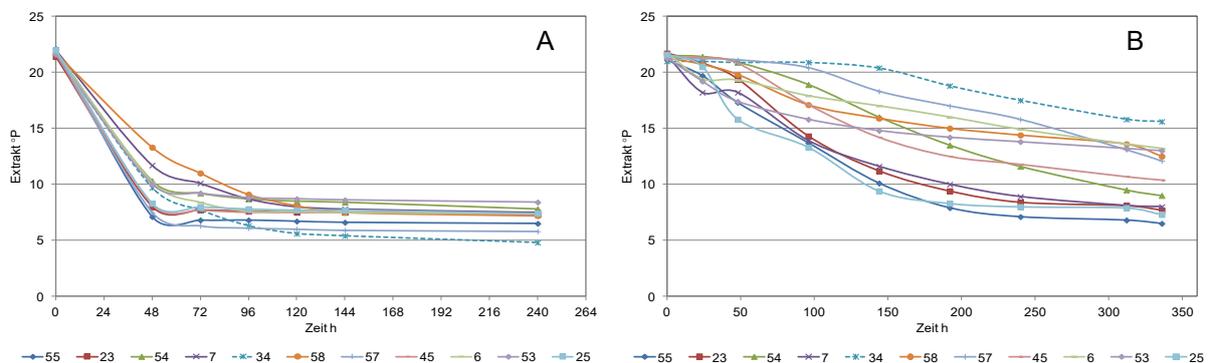


Abbildung 18: Extraktabbau der Hefen 55, 23, 54, 7, 58, 57, 45, 6, 53, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von A: 26 °C und B: 14 °C

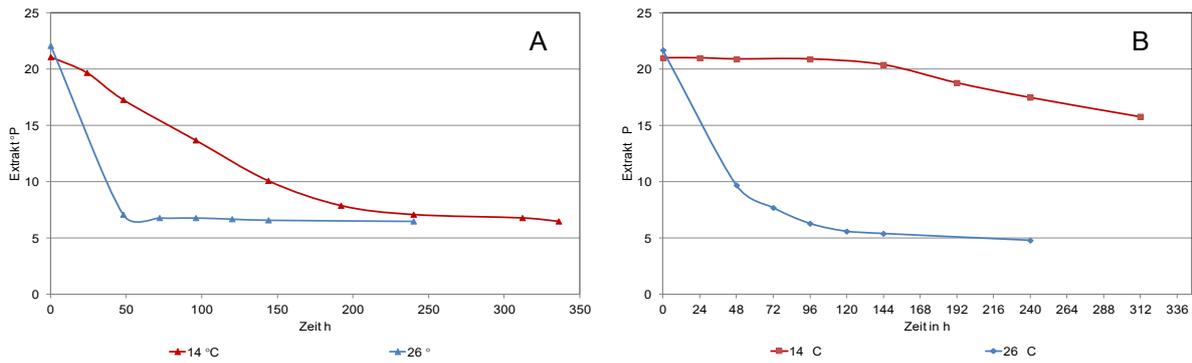


Abbildung 19: Veranschaulichung der Fermentationsperformance der Hefe 55 (A) und des Referenzstammes 34 (B) bei 26 °C und 14 °C

Die Fermentationsperformance der jeweiligen Hefen bei den unterschiedlichen Temperaturen in 25 °P Würze macht sich auch im Alkoholgehalt und dem Fermentationsgrad am Ende der jeweiligen Gärung bemerkbar (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Während der Alkoholgehalt und der Fermentationsgrad bei 26 °C bei allen Hefen sehr hoch sind, erreichen sie bei 14 °C unterschiedliche Niveaus. Vor allem die Hefen 55 und 25 erreichen einen sehr hohen Fermentationsgrad am Ende der Fermentation.

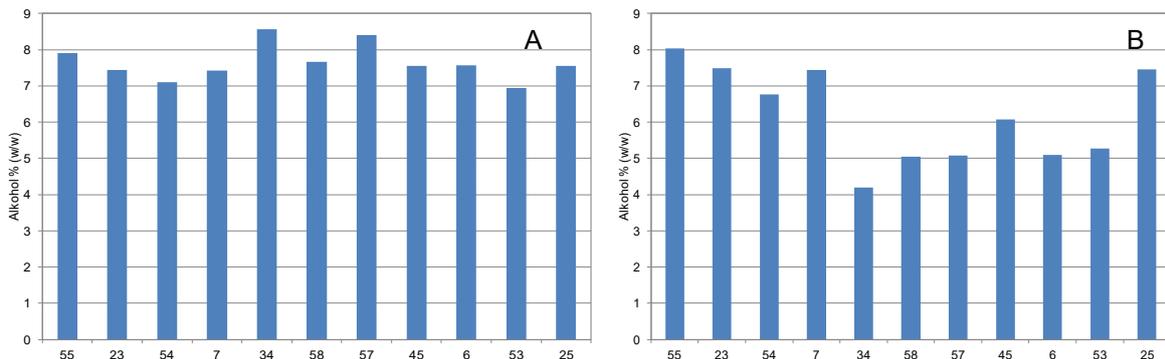


Abbildung 20: Alkoholgehalt am Ende der Fermentation in 25 °P Würze bei A: 26 °C und B: 14 °C mit den Hefen 55, 23, 54, 7, 58, 57, 45, 6, 53, 25 sowie dem Referenzstamm 34

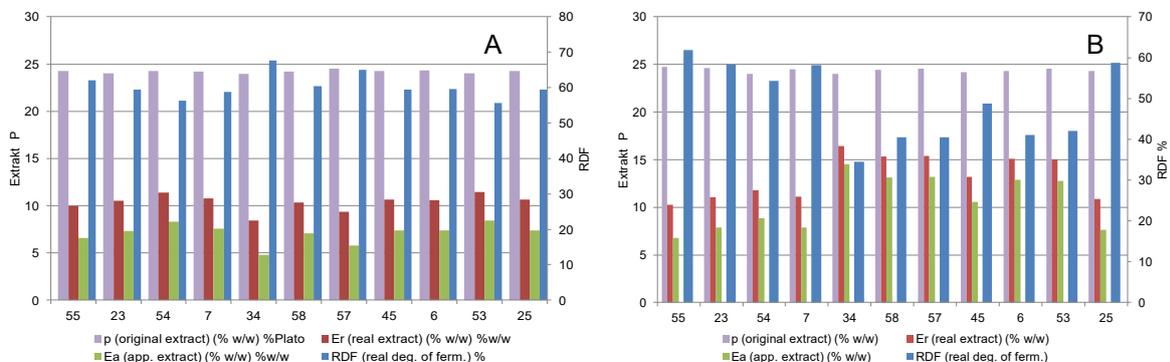


Abbildung 21: Extraktgehalt und Endvergärungsgrad am Ende der Fermentation in 25 °P Würze bei A: 26 °C und B: 14 °C mit den Hefen 55, 23, 54, 7, 58, 57, 45, 6, 53, 25 sowie dem Referenzstamm 34

Aufgrund der guten Fermentationsperformance vor allem bei 14 °C wurden die Hefen 55, 57, 45, 23 und 25 für weitere Fermentationen verwendet.

In Abbildung 22 ist der Extraktabbau der Hefen 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 dargestellt. Die Ansätze wurden zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit in Doppelansätzen geführt. Die jeweiligen parallelen Ansätze zeigen bei den Hefen 55, 23 und 25 einen nahezu identischen Verlauf. Die Hefe 45 zeigt nur geringfügige Schwankungen auf. Die Hefe 57 zeigte interessanterweise hier keine so gute Performance wie in Abbildung 18. Dies könnte auf eine eventuell nicht so sehr vitale Hefe in der Vorkultur zurückzuführen sein. Die schlechte Fermentationsperformance vom Referenzstamm 34 bei 14 °C in 25 °P Würze bestätigte sich auch hier wieder. Die jeweilige Fermentationsperformance der Hefen spiegelt sich auch in der Abnahme des pH-Wertes bzw. der Zunahme der OD-Werte wider (siehe Abbildung 23 A und B). Je besser die Vergärung ist, umso schneller und tiefer sinkt der pH-Wert und umso höher steigt die optische Dichte. Bei dem Referenzstamm 34 und bei der Hefe 57 ist kaum eine Zunahme der OD zu beobachten. Dies macht sich auch im Alkoholgehalt und am Endfermentationsgrad bemerkbar (siehe Abbildung 24).

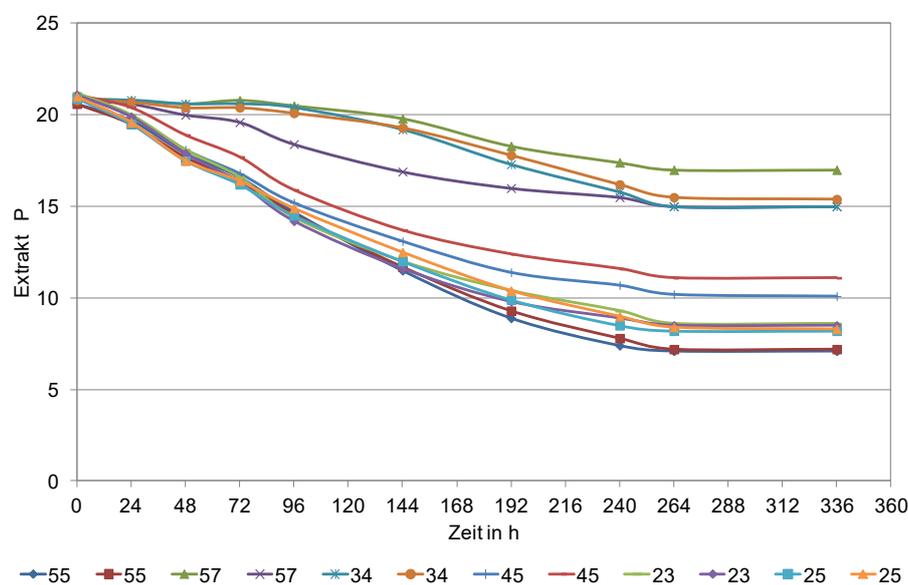


Abbildung 22: Extraktabbau der Hefen 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 14 °C

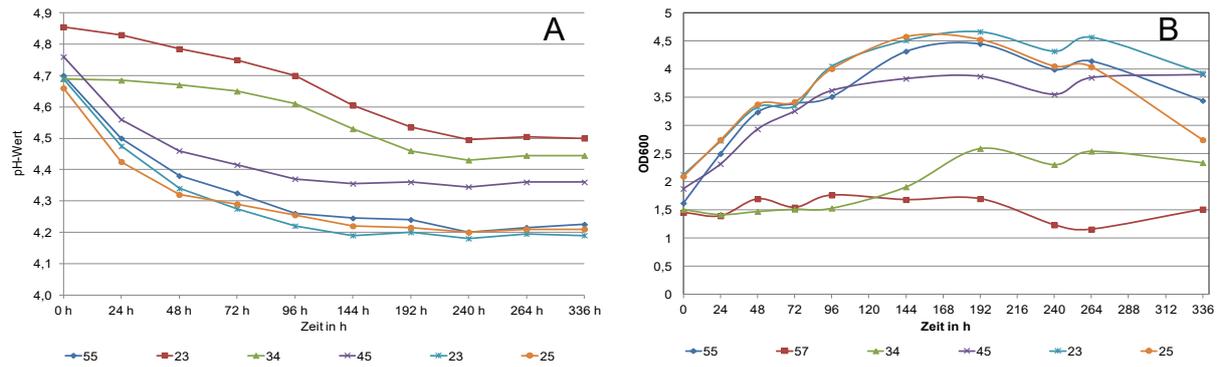


Abbildung 23: A: pH-Wert-Verlauf und B: OD-Verlauf während der Fermentation der Hefen 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 14 °C

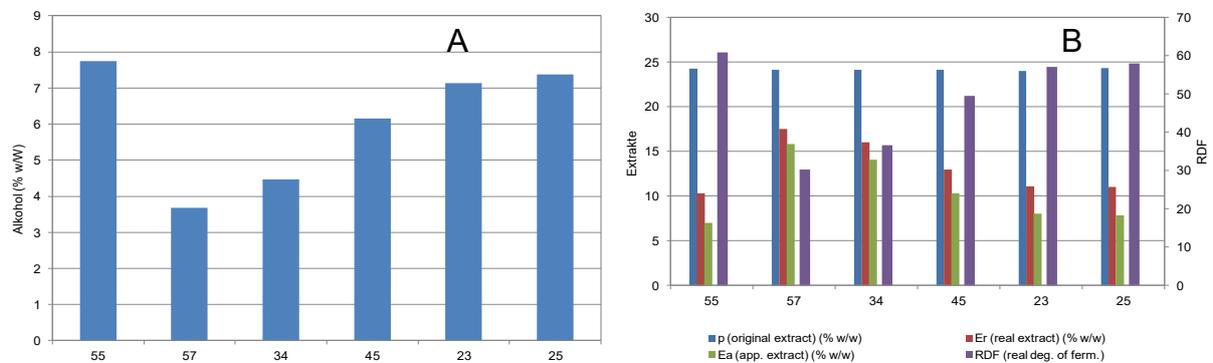


Abbildung 24: Alkoholgehalt (A) und Extraktwerte sowie der Fermentationsgrad (B) während der Fermentation der Hefen 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 14 °C

In Abbildung 25 ist der Extraktabbau von den jeweiligen Hefen nach einer Überführung in die nächste Gärung bei 25 °P und 14 °C dargestellt. Die Hefe 55 stellt nach wie vor den schnellsten und höchsten Extraktabbau dar, jedoch langsamer als in der 1. Führung (siehe Abbildung 22). Auch nimmt die Zelldichte nicht mehr so sehr zu (Abbildung 26). Auch hier zeigt sich wie in den Gärungen zuvor, dass die Weinhefen bei einer Überführung in eine zweite Fermentation eine schwächere, langsamere Gärung zeigen.

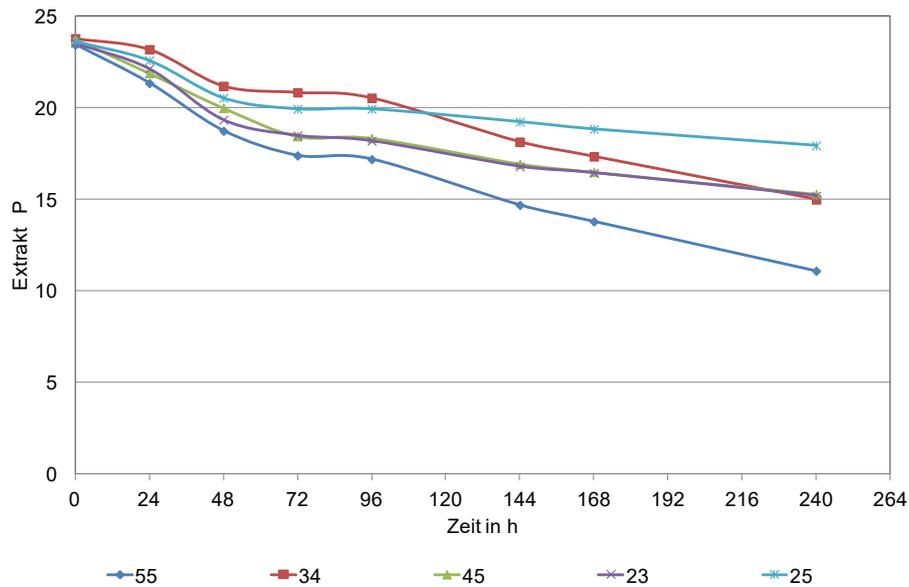


Abbildung 25: Extraktabbau der Hefen 55, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 14 °C, 1. Repitch

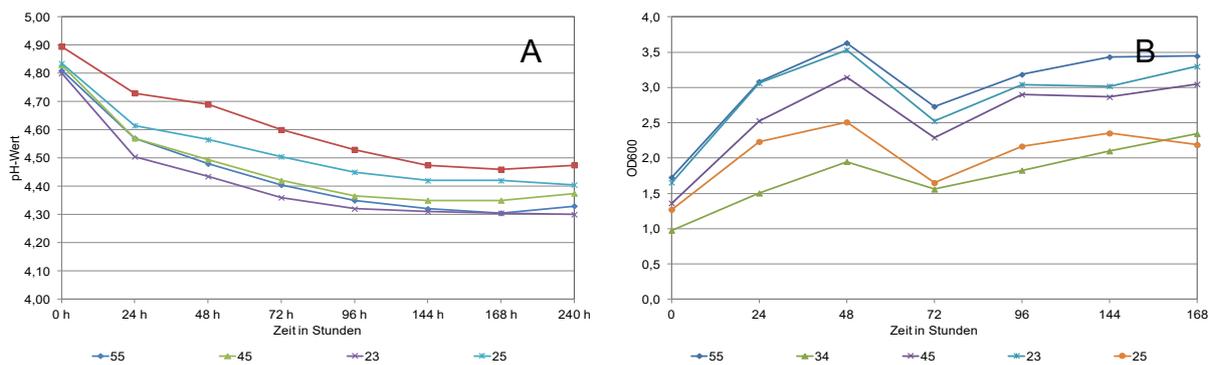


Abbildung 26: A: pH-Wert-Verlauf und B: OD-Verlauf während der Fermentation der Hefen 55, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 14 °C, 1. Repitch

Abbildung 27 zeigt die Vergärung der 25 °P Würze bei 26 °C. Alle Hefen zeigen einen guten Extraktabbau, wobei der Referenzstamm 34 wieder den geringsten Restextrakt aufweist, was vermutlich auf die bessere Verwertung von Maltotriose zurückzuführen ist.

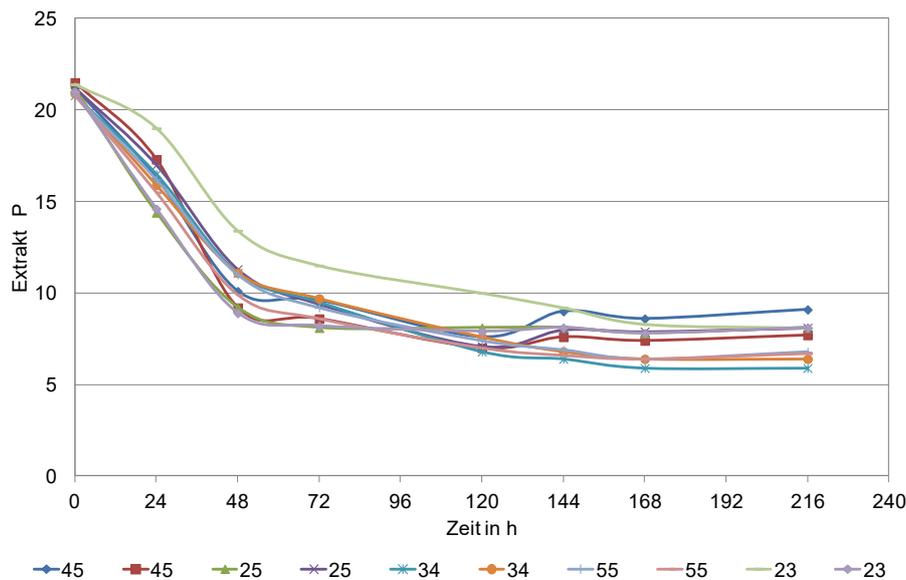


Abbildung 27: Extraktabbau der Hefen 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 in 25 °P Würze bei einer Temperatur von 26 °C

Der Charakter eines Bieres wird neben dem Restextrakt über das Zusammenspiel verschiedener Aromen bestimmt. Während der Gärung werden viele Gärungsnebenprodukte gebildet, in erster Linie höhere Alkohole, Ester, organische Säuren, vicinale Diketone und Schwefelverbindungen [Geiger]. Den größten Einfluss auf die Geruchs- und Geschmacksbildung haben die höheren Alkohole und die Ester. Die Schwellen- bzw. Referenzwerte für die jeweiligen Substanzen in Bier sind in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Der Auf- und Abbau von Gärungsnebenprodukten stellt eine entscheidende Komponente der Fermentation von Bierwürze dar. Unterschiede, welche verschiedene Hefestämme aufweisen, sind oft sehr stark ausgeprägt und haben entscheidenden Anteil am sensorischen Charakter des resultierenden Bieres. [Wagner, 2002] Bei der Beurteilung und Auswahl von Hefestämmen ist daher immer auch der Gehalt an Gärungsnebenprodukten am Ende der Gärung ein wichtiges Kriterium. [Verstrepen, 2003 und 2004]. Der Diacetylabbau ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium bei der Hefewahl. Der Schwellenwert liegt bei ca. 0,15 ppm. Bei den Gärungen der Hefen in 25 °P bei 14 °C zeigte die Hefe 55 den geringsten Diacetylgehalt. Bei 26 °C wird allerdings mehr Diacetyl gebildet. Es wird auch schnell wieder abgebaut, benötigt jedoch eine längere Zeit als bei 14 °C (siehe Abbildung 28). Auch werden bei 26 °C höhere Werte an Gärungsnebenprodukten detektiert (siehe Abbildung 29).

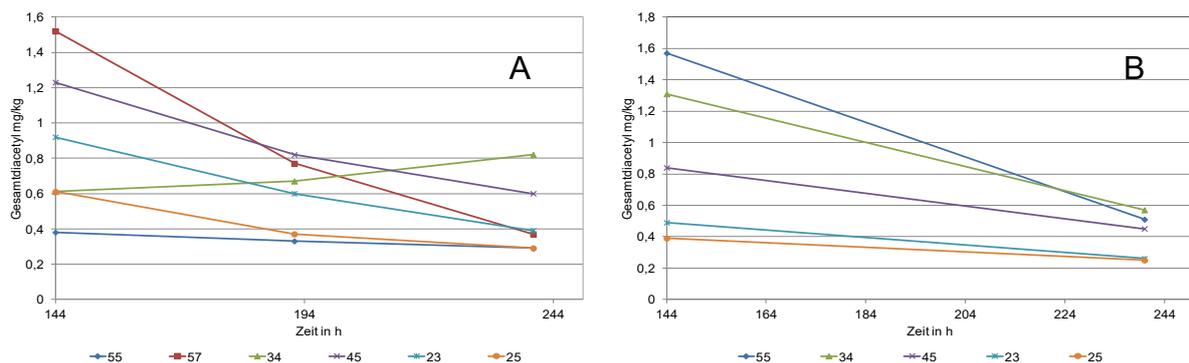


Abbildung 28: Diacetylgehalt bzw. -abbau während der Gärung mit A: den Hefen 55, 57, 45, 23 und 25 sowie dem Referenzstamm 34 und B: den Hefen 55, 45, 23, und 25 sowie dem Referenzstamm 34 in 25 °P bei 26 °C

Erfahrungsgemäß bewirken eine hohe Würzekonzentration, eine intensive Würzebelüftung oder höhere Gärtemperaturen eine Erhöhung der Esterbildung [Herrmann et al., 2003; Younis et al., 1999]. Acetaldehyd entsteht durch die Decarboxylierung von Pyruvat als normales Zwischenprodukt bei der alkoholischen Gärung im Jungbier.

Hohe Konzentrationen an 3-Methyl-1-Butanol und insbesondere 2-Phenylethanol weisen auf hohe Gärtemperaturen hin [Jacob, 2004]. Dies konnte auch bei den Gärungen mit den jeweiligen Hefen bei unterschiedlichen Temperaturen bestätigt werden (siehe Abbildung 29). Dagegen deutet eine hohe Konzentration an Hexansäureethylester auf eine schlechte Belüftung hin, oder bei einer starken Hefevermehrung steigen die Konzentrationen an Essigsäureethylester, Essigsäureisobutylester oder Essigsäureisoamylester [Jacob, 2004]. Dies ist vor allem bei 26 °C der Fall. Die Konzentration der Höheren Alkohole (z. B. Isoamylalkohol oder Isobutanol) wird durch den Aminosäurestoffwechsel bestimmt, während die Zusammensetzung der Ester (z. B. Ethylacetat oder Isoamylacetat) durch den Energiestoffwechsel der Hefe beeinflusst wird.

Durch die verschiedenen Stoffwechselprozesse der Hefe werden auch unterschiedliche organische Säuren gebildet, welche als Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung, dem Aminosäure- und Fettstoffwechsel entstehen. In der Literatur werden ca. 80 Säuren beschrieben [Suomalainen, 1971]. Die Hefe bildet eine Reihe von α -Ketosäuren, deren wichtigste Säure das Pyruvat ist [Rosculet, 1971]. Die Bildung der organischen Säuren erfolgt hauptsächlich in den ersten 4 Tagen der Hauptgärung und

in der Lagerphase finden kaum noch Veränderungen hinsichtlich der Zusammensetzung statt.

Generell ist festzuhalten, dass bei hohen Temperaturen vermehrt Gärungsnebenprodukte gebildet werden, die sich negativ auf den typischen Biergeschmack auswirken würden. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass alle aufgeführten Werte sich auf eine Stammwürze von 25 °P beziehen und sich bei Umrechnung bzw. einem Vergleich mit einer Stammwürze von 12 °P um ca. die Hälfte verringern. Dies bedeutet, dass sich die hohen Werte der hohen Stammwürze bei einer Rückverdünnung wieder relativieren und die Werte der jeweiligen Komponenten wieder im Referenzbereich liegen würden. Dies gilt vor allem für die Gärung bei der praxisrelevanten Temperatur von 14 °C.

Tabelle 10: Referenzwerte für die Höhere Alkohole, Ester und organische Säuren in Bier [MEBAK 2012].

	Referenzwerte mg/l
Höhere Alkohole und Ester	
HAA	70 – 90
Acetaldehyd	2 – 10
Essigsäureethylester	10 – 40
Essigsäure-3-methylbutylester	0,5 – 3
Essigsäure-2-phenylethylester	0,1 – 2
1-Propanol	5 – 20
2-Methyl-1-propanol	5 – 20
2-Methyl-1-butanol	8 – 30
3-Methyl-1-butanol	30 – 70
2-Phenylethanol	8 – 40
Organische Säuren	
Ameisensäure	5 – 20
Oxalsäure	10 – 20
Malat	50 – 100
Pyruvat	50 – 100
Citrat	100 – 200
Acetat	<100
Lactat	5 – 250
Gesamt-Diacetyl	0,15

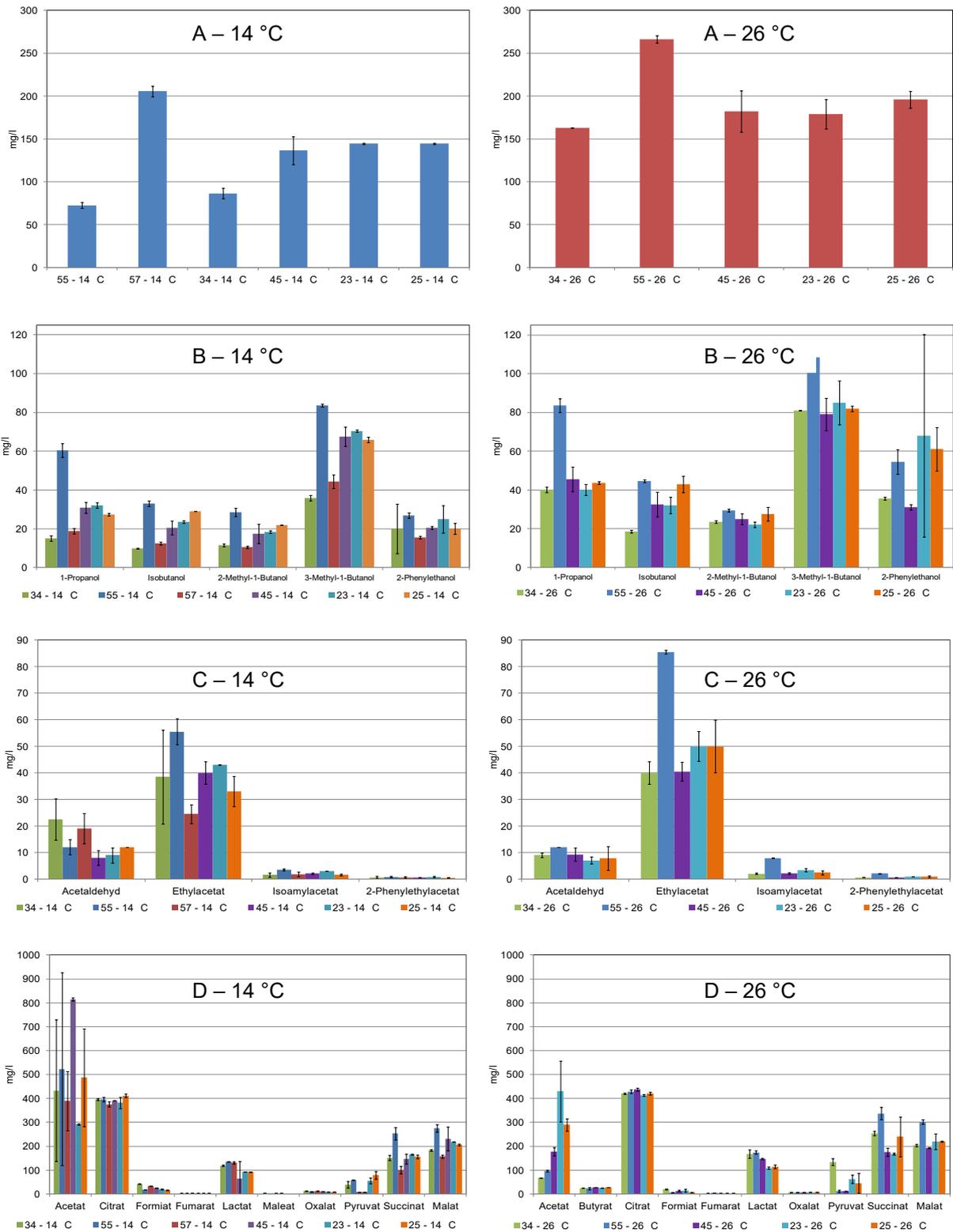


Abbildung 29: Gärungsnebenprodukte der Hefestämme 55, 57, 45, 23, 25 sowie des Referenzstammes 34 bei Gärungen mit unterschiedlichen Temperaturen (14°C und 26 °C). Die Mittelwerte wurden aus zwei parallel laufenden Gärungen ermittelt
 A: gesamt HAA, B: HAA, C: Ester, D: organische Säuren

Aromakomponenten bilden den typischen Geruch und Geschmack jedes Bieres, einerseits durch das Zusammenwirken aller vorhandenen Verbindungen als auch durch das Fehlen einzelner Substanzen. Treten Aromastoffe in überhöhten Konzentrationen auf, kann eine negative Beurteilung der Getränkequalität die Folge sein. Mittels der sensorischen Prüfung können und wurden Unterschiede hinsichtlich des Aromaprofils detektiert, die nicht unmittelbar Bestandteile der Analytik waren. In Abbildung 30 A und B sind jeweils die sensorischen Beurteilungen der Gärungen mit den Hefen bei 14 ° (A) und 26 °C (B) dargestellt. Dabei ist vor allem zu erkennen, dass bei 26 °C die Aromen und die Gärungsnebenprodukte stärker gebildet und dementsprechend wahrgenommen werden als bei 14 °C. Besonders das fruchtige Aroma ist bei 26 °C stärker ausgeprägt als bei 14 °C. Daher ist die Anwendung bei 14 °C von Vorteil, damit ein nicht so fruchtiges Aromaprofil gebildet wird.

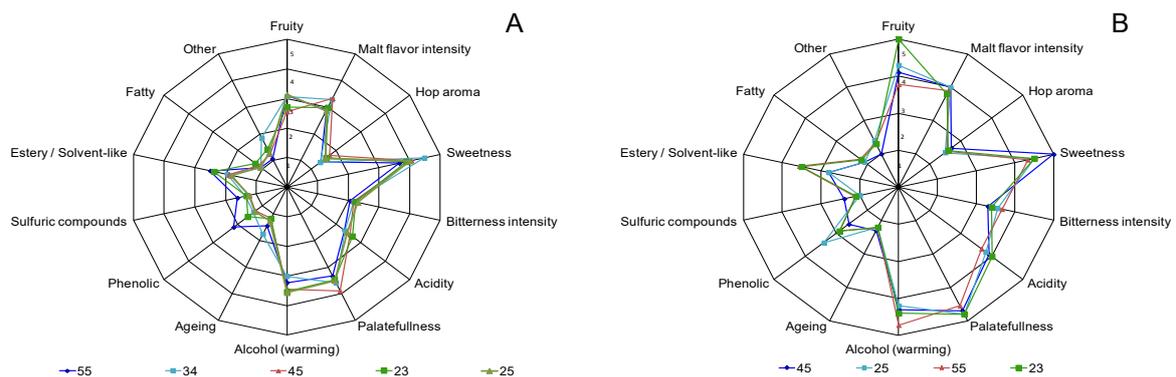


Abbildung 30: Verkostungsanalyse der Gärungen in 25 °P Würze bei A: 14 °C und B: 26 °C

Viabilität/Vitalität

Die Hefe ist während des Brauprozesses verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Während der Fermentation wirken oxidativer und osmotischer Stress, Inhibition durch Ethanol und Nährstoffmangel auf die Hefen ein. Diese schädigen die Zelle und reduzieren Vitalität und Viabilität. Während die Vitalität den physiologischen Zustand der Zelle beschreibt, wird über die Viabilität das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen beschrieben (hier meist in % angegeben).

Für die Bestimmung der Vitalität von Hefezellen wurde die Messung des ICP (intrazellulärer pH-Wert) mittels des Durchflusszytometers etabliert. Für schnelle Analysen von Mikroorganismen findet in der Mikrobiologie das Durchflusszytometer immer mehr

Anwendung. Unter anderem kann die Durchflusszytometrie nach entsprechender Markierung mittels Fluoreszenzsonden für die Bestimmung der Viabilität und Vitalität von Hefen eingesetzt werden. Nach einer anfänglichen Etablierung einer Methode zur Vitalitätsbestimmung wurde die Vitalität der Hefen mit 5,6-Carboxyfluorescein analysiert. Für die Vitalitätsbestimmung wurden die Hefezellen mit dem nicht fluoreszierenden 5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat versetzt. Zelleigene Esterasen hydrolysieren die Esterform zu 5,6 Carboxyfluorescein. Da die Fluoreszenzeigenschaften von diesem Farbstoff pH-Wert abhängig sind, kann dadurch auf den intrazellulären pH-Wert geschlossen werden. Um einen hohen intrazellulären pH-Wert aufrechtzuerhalten, muss die Hefezelle bei einem niedrigeren extrazellulären pH-Wert Protonen gegen den Gradienten aus der Zelle pumpen. Zu dieser Aktivität sind nur vitale Zellen in der Lage. Die Umsetzung des Farbstoffs erfolgt durch vitale und weniger vitale Zellen.

Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz des Farbstoffs 5,6-Carboxyfluorescein ist in Abbildung 31 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität von 5,6-Carboxyfluorescein ist in Abhängigkeit zum pH-Wert dargestellt. Je geringer der pH-Wert ist, umso geringer ist die Fluoreszenzintensität. Da der interne pH-Wert einer Hefezelle ihre Aktivität bzw. Vitalität bestimmt, kann dieser Farbstoff zur Bestimmung der Vitalität herangezogen werden. Ein hoher pH-Wert deutet auf eine vitale Hefezelle.

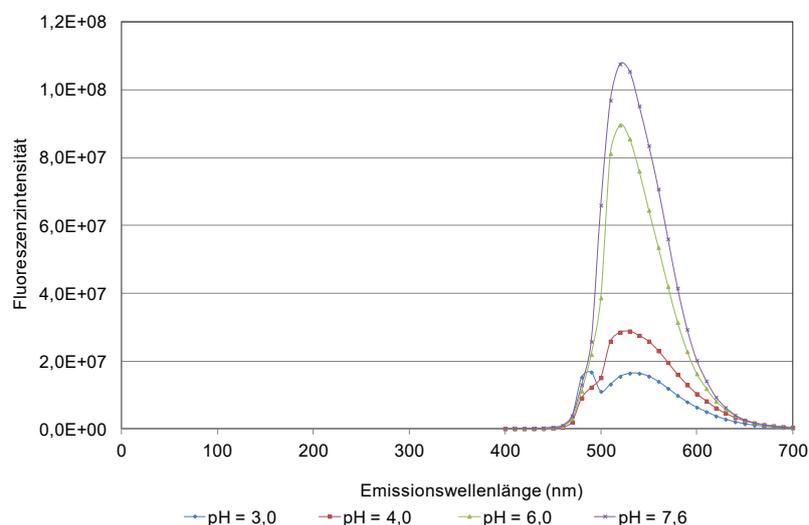


Abbildung 31: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von 5,6-Carboxyfluorescein (CF) bei den pH-Werten: 3,0; 4,0; 6,0 und 7,6 (Exzitation 441 nm und 488 nm; Emission 518 nm)

Die Abhängigkeit vom pH-Wert wurde auch von Weigert nachgewiesen [Weigert, 2010]. Die komplexen Gründe für die pH-Wert-Abhängigkeit von Fluorescein wurde von Martin et al. untersucht [Martin et al. 1975]. Fluorescein gehört zu der Farbstoff-

gruppe der Phthaleine, welche strukturell nahe mit den Triphenylmethanfarbstoffen verwandt sind. Phthaleine sind Indikatorfarbstoffe, diese können ihre Molekülstruktur durch Aufnahme bzw. Abspaltung von Protonen ändern. Aufgrund der veränderten Mesomerieverhältnisse resultieren verschiedene Färbungen [Wittke, 1992].

Die Hefe 55 wurde im Labormaßstab auf ihre Vitalität und Viabilität hin im Vergleich zur Brauhefe durch mehrmalige Überführungen der Hefe nach jeder Fermentation in die nächste im High-Gravity-Brewing bei 14 °C und 26 °C analysiert. Die Hefe wurde in einen neuen Fermentationsansatz überführt, wenn die Änderung des Extrakts zum Vortag kleiner 0,5 °P betrug. Am Tag der Überführung wurde die Viabilität und Vitalität der Hefen bestimmt. Die Vitalität wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, die Viabilität mittels NucleoCounter. In Abbildung 33 ist die Viabilität und in Abbildung 34 die Vitalität der einzelnen Hefen vor der jeweiligen Überführung dargestellt.

Die vitalste Brauhefe vor der fünften Überführung konnte bei der High-Gravity-Fermentation bei 14 °C festgestellt werden. Die geringste Vitalität der Brauhefen lag bei 6,7 bei der High-Gravity-Fermentation mit einer Temperatur von 26 °C. Die Viabilitäten der Brauhefe betragen 95,25 % (14 °C) und 95,70 % (26 °C). Mit 5,8 (2. Überführung) war die Hefe 55 bei der High-Gravity-Fermentation bei 26 °C die Hefe, die die geringste Vitalität aller Ansätze aufwies. Die Viabilitäten der Hefen dieser Ansätze lagen bei 99,41 % (12 °P; 14 °C) und 96,64 % (25 °P; 26 °C).

Eine Abnahme der Viabilität während der Repitching-Versuche konnte beobachtet werden. Dabei lag die Viabilität der Referenzhefe 34 mit ca. 95 % niedriger als bei der Hefe 55. Bezüglich der Viabilität ist die Hefe 55 gegenüber dem Referenzstamm besser für 25 °P Würze mit mehrmaligen Überführungen geeignet. Eine kontinuierliche Abnahme der Vitalität während der Repitching-Versuche konnte nicht beobachtet werden. Es konnten eher Schwankungen festgestellt werden, sowohl bei der Hefe 55 als auch dem Referenzstamm 34. Es waren Verschlechterungen zu beobachten, und im nächsten Lauf bzw. Überführung eine Verbesserung der Vitalität.

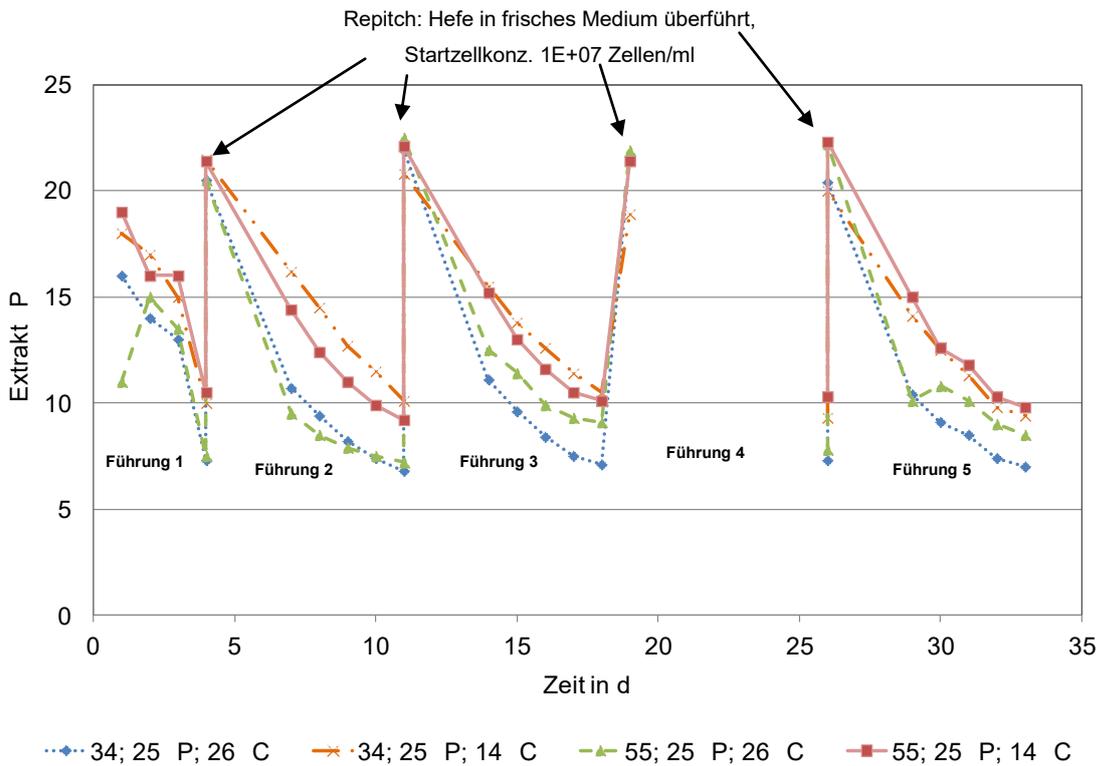


Abbildung 32: Extraktverlauf während hintereinander geführter Fermentationen in 25 °P Würze bei 14 °C und 26 °C mit der Hefe 55 und dem Referenzstamm 34

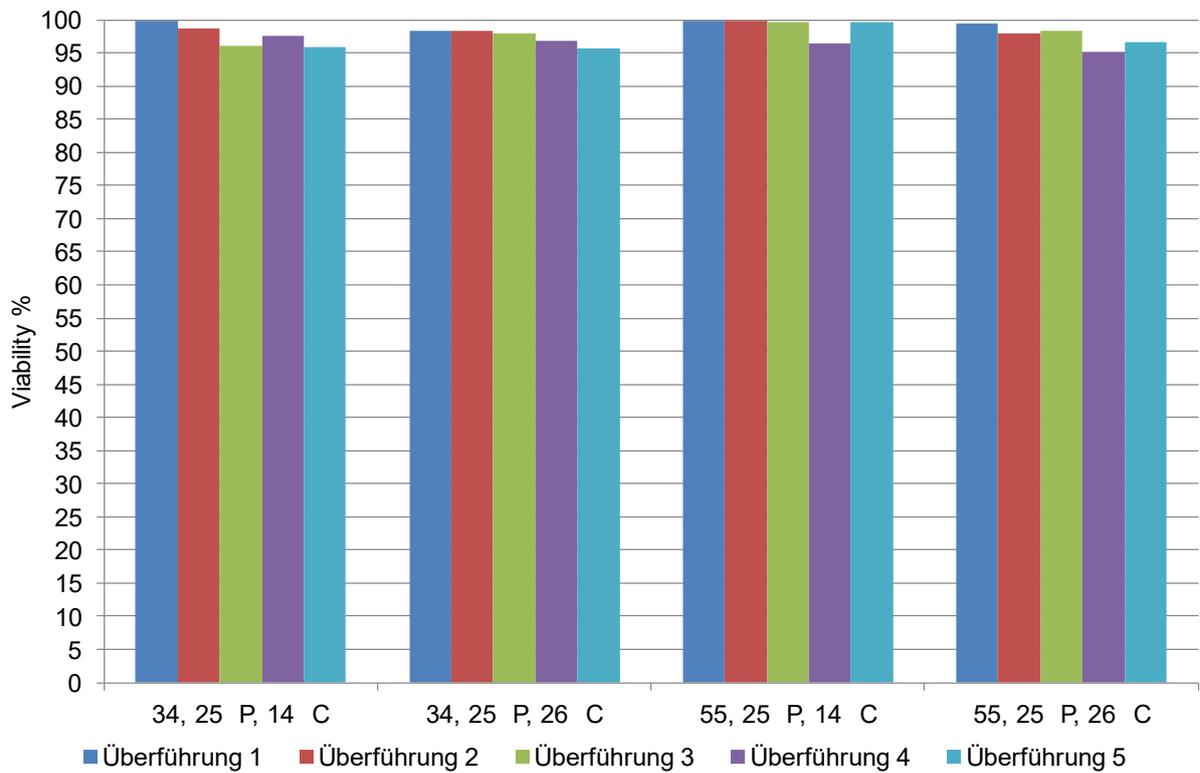


Abbildung 33: Viabilität der Hefe 55 und des Referenzstammes 34 nach den jeweiligen Überführungen in 25 °P Würze bei unterschiedlichen Temperaturen (gemessen mittels NucleoCounter)

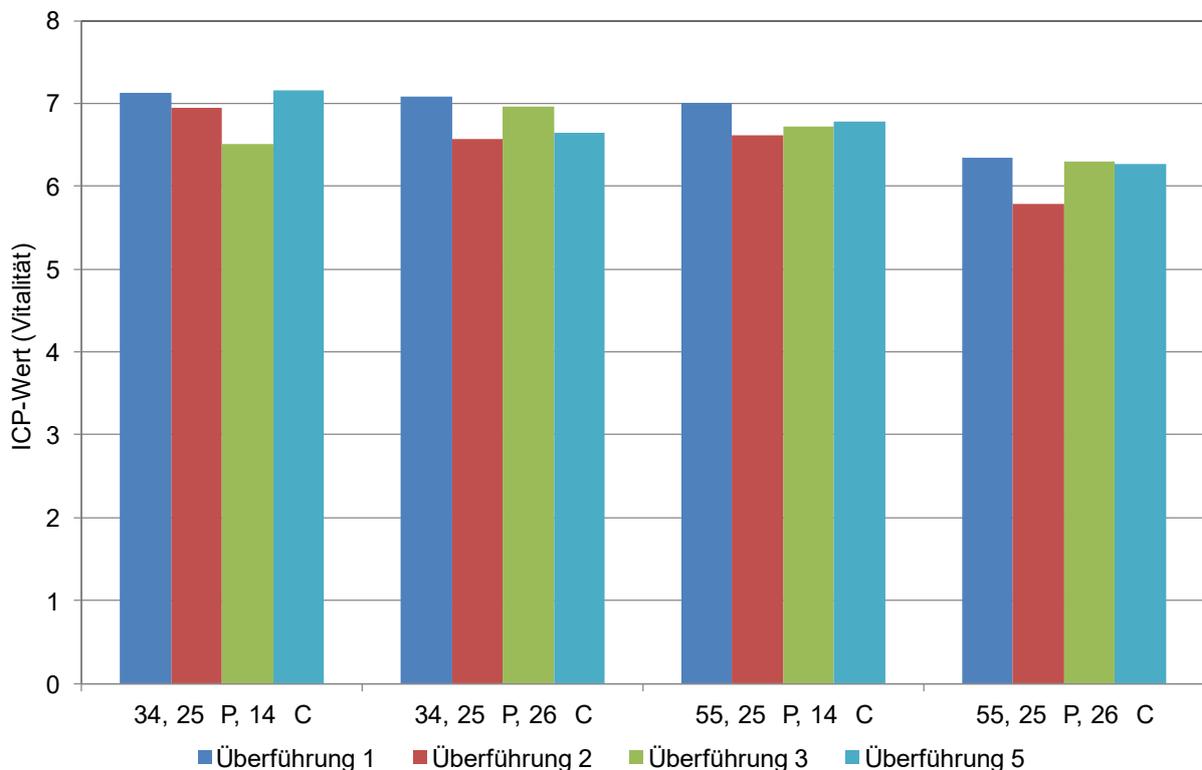


Abbildung 34: Vitalität (ICP) der Hefe 55 und des Referenzstammes 34 nach den jeweiligen Überführungen in 25 °P Würze bei unterschiedlichen Temperaturen (gemessen mittels Durchflusszytometrie)

In der Arbeit von Guido et al. wurde eine starke Zunahme der Vitalität bei zwei von vier Hefen nach einer achttägigen Fermentation nachgewiesen. Die Viabilität nahm bei allen vier Hefen zu. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Hefe in der Lage ist, sich von Stressfaktoren zu erholen [Guido, 2004].

In der Hefe *Saccharomyces* existieren zwei Stoffwechselwege als Reaktion auf Stress: zum einen die Hitzeschock-Reaktion (heat shock response (HSR)) und die generelle oder globale Stressreaktion (general or global response (GSR)). HSR wird nach Hitze-stress durch einen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor durchgeführt. Stress durch Umweltbedingungen wie oxidativer Stress, Veränderungen des pH-Wertes, Hitze und osmotischer Stress aktivieren den GSR. Der GSR reguliert bis zu 200 Gene und die entsprechenden Proteine [Gibson et al., 2007]. Proteine, die durch HSR oder GSR produziert werden beschützen oder reparieren die Zelle nach der Aussetzung von Stress [Mager et al., 1993]. Dies beinhaltet die Produktion von Trehalose und Glycerol, Stopp

des Zellteilungszykluses, Veränderung der Membranstruktur oder Mutationen [Walker, 2012].

Die Überführung der Hefen nach einer Fermentation in die nächste zeigte sich auch schon in den vorherigen Versuchen in den Gärsäulen als ungeeignet, was sich vor allem im Extraktabbau bemerkbar macht. Um eine Reproduzierbarkeit der jeweiligen Gärungen zu gewährleisten, sollte die Hefe immer von gleicher Viabilität und Vitalität sein, was durch die Verwendung von neu propagierten Hefen erreicht wird. Für die Weinherstellung werden die Hefen auch jeweils nur einmal geführt.

2.6 Genetische Stabilität

Um die genetische Stabilität der Hefen während wiederholtem Einsatz für die Bierproduktion zu überprüfen, ist es notwendig, geeignete Primer für den genetischen Fingerabdruck auszuwählen. Anhand des genetischen Fingerprints kann eine Hefe eindeutig zugeordnet werden. Idealerweise sollten die verwendeten Primer so selektiv sein, dass man mit ihnen Hefen auf Stammebene charakterisieren kann. Solche Primer würden womöglich eine Stammveränderung am ehesten aufzeigen. Verschiedene RAPD-Primer (Random amplified polymorphic DNA) wurden miteinander verglichen. Unspezifische ca. 10 Basenpaare lange Primer binden an verschiedenen Stellen im Genom und ergeben ein spezifisches Bandenmuster entsprechend der jeweiligen Hefe nach der jeweiligen PCR. Solche Primer könnten eventuell geeignet sein, um eventuelle Mutationen, die durch die Mutagenese hervorgerufen wurden, zu visualisieren.

Diese Sonderform der Standard-PCR wurde erstmals 1990 von Williams et al. veröffentlicht. Aufgrund der geringen Länge des Primers ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass komplementäre Sequenzen in der zu untersuchenden DNA vorhanden sind. Wenn es dann in ausreichender Entfernung zur Anlagerung zweier Primer in aufeinander zuweisender Richtung kommt, wird dieser DNA-Abschnitt vervielfältigt. Es wird also nicht gezielt ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert, sondern die durch zufällige Anlagerung der Primer im Genom entstehenden Fragmente vervielfältigt und interpretiert. Aufgrund unterschiedlich entstehender Bandenmuster (genetischer Fingerprint) können genetische Vielfalt zwischen verschiedenen Spezies aber auch innerhalb einer Spezies ermittelt werden (Williams *et al.*, 1990; Baleiras Couto *et al.*, 1996; Legras & Karst, 2003).

Für die Unterscheidung auf Stammebene innerhalb einer Spezies eignen sich die sog. Delta-Primer. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass die Hefe repetitive DNA-Sequenzen besitzt. Repetitive DNA-Sequenzen sind immer wiederkehrende DNA-Abschnitte im Genom. In der Hefe wurden Delta (δ)-Sequenzen gefunden, die eine Größe von 334 Basenpaare besitzen. Diese δ -Sequenzen flankieren die Retrotransposons in der *S. cerevisiae*.

Für die Analyse des genetischen Fingerprints mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden 10 Mutanten aus der Ultraviolett-Licht (UV)- und EMS-Mutagenese mit ihrem Ausgangsstamm mit verschiedenen Primern verglichen.

Der genetische Fingerprint wurde mit dem Primerpaar δ 12/ 21, (GTG)₅, M13 und Primer 15 durchgeführt. Unterschiede zwischen den Originalstämmen und den Mutanten sollten so sichtbar gemacht werden. In Abbildung 35 ist der genetische Fingerprint der Hefen 13 und 10 (A) sowie vom Referenzstamm 34 (B) und deren jeweilige UV-Mutanten mit dem Primer M13 dargestellt. Die Originalhefen untereinander und auch die Mutanten konnten mit diesem Primer nicht unterschieden werden. Das Gleiche gilt auch für die Primer (GTG)₅ (

Abbildung 36) und Primer 15 (Abbildung 38). Auch zeigen die EMS-Mutanten keine Veränderung am genetischen Fingerprint mit den Primern (GTG)₅ (Abbildung 37).

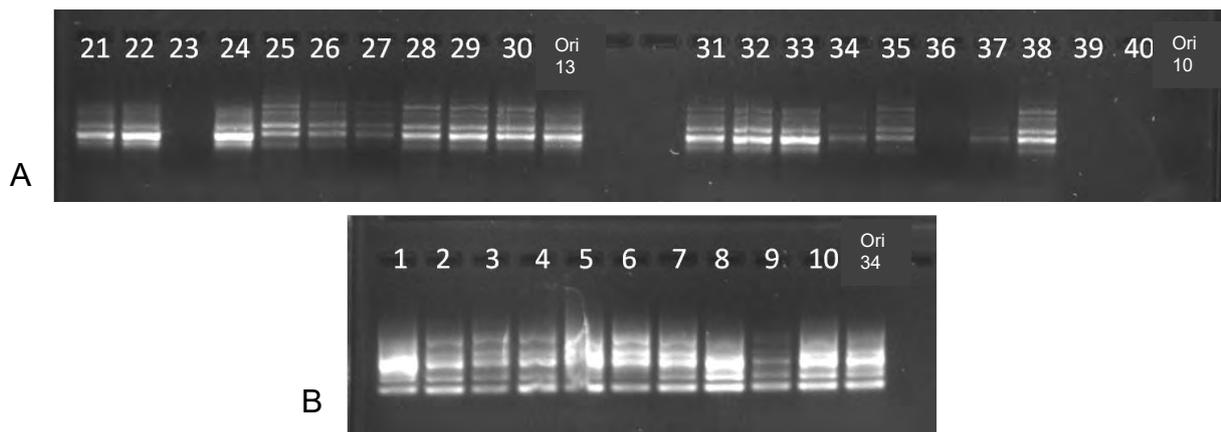


Abbildung 35: Fingerprint mit dem RAPD-Primer M13 der Hefen 13 und 10 sowie ihrer Mutanten (A) und des Referenzstammes mit seinen Mutanten (B) (UV-Bestrahlung, siehe Tabelle 9)

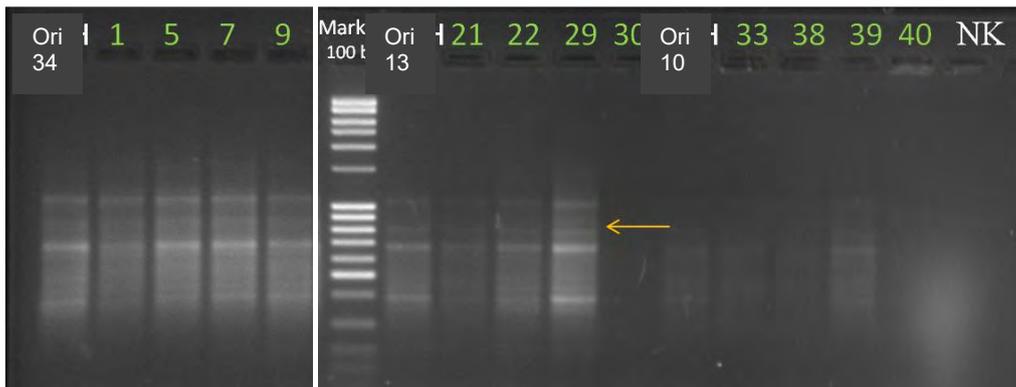


Abbildung 36: Fingerprint mit dem RAPD-Primer GTG des Referenzstammes 34, der Hefen 13 und 10 sowie ihrer Mutanten, die für die Fermentation verwendet wurden. (UV-Bestrahlung, grün markiert in Tabelle 9)

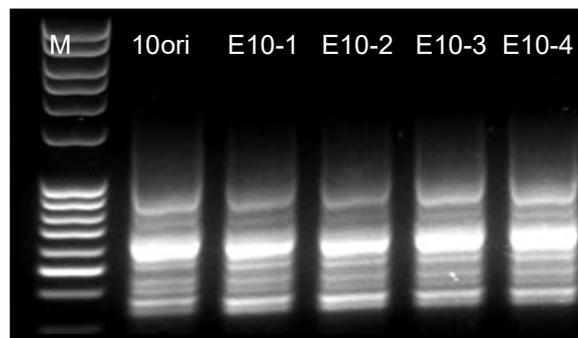


Abbildung 37: Fingerprint mit den RAPD-Primer $(GTG)_5$ der Hefe 10 und ihren EMS-Mutanten (E10-1 – E10-4)



Abbildung 38: Fingerprint mit dem RAPD-Primer 15 des Referenzstammes 34, der Hefen 13 und 10 sowie ihrer Mutanten, die für die Fermentation verwendet wurden. (UV-Bestrahlung, grün markiert in Tabelle 9)

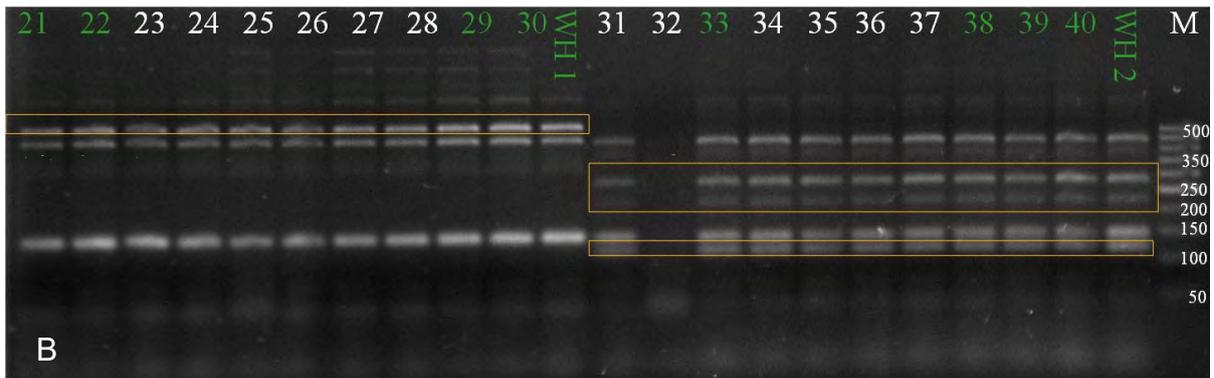
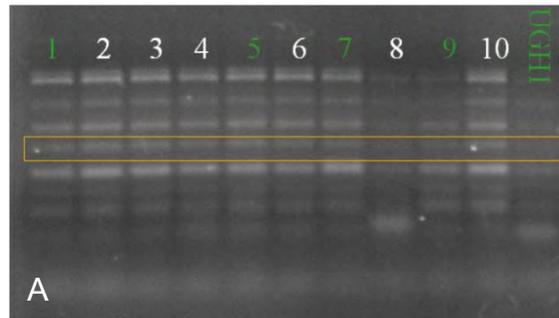


Abbildung 39: Fingerprint mit dem Primerpaar δ 12/ 21 des A: Referenzstammes 34 (UGH1) und B: der Hefen 13 (WH1) und 10 (WH2) sowie ihrer Mutanten, die für die Fermentation verwendet wurden. (UV-Bestrahlung, siehe Tabelle 9, grün markierte Mutanten wurden für die Fermentationen verwendet)

Mit den Primern δ 12/21 können zwar die einzelnen Originalstämme untereinander differenziert werden, jedoch zeigen die Mutanten wieder jeweils den gleichen Fingerprint, wie ihre jeweiligen Originalstämme (Abbildung 39 A und B). Auch konnten die EMS-Mutanten anhand dieser Primer nicht von den Originalstämmen unterschieden werden.

Wie in Abbildung 40 zu sehen ist, unterscheiden sich die 2-Desoxy-Glucose-Mutanten der Hefe 10 weder untereinander noch vom Originalstamm in ihrem genetischen Fingerprint mit den δ 12/21 Primern. Obwohl sie andere Eigenschaften im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm haben, konnten sie nicht von diesem differenziert werden.

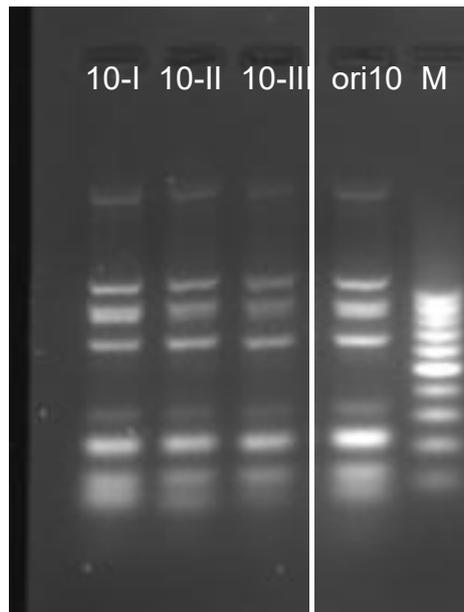


Abbildung 40: Fingerprint $\delta 12/21$ der 2-Desoxy-Glukose-Klonen (10-I, 10-II, 10-III) der Hefe 10 (M=Marker)

Mit den Primern wurde auch die genetische Stabilität der Hefen nach mehrmaliger Überführung in Fermentationen überprüft. Auch hier zeigte sich, dass sich der genetische Fingerprint nicht verändert. Die möglichen Variationen innerhalb der Fermentationen könnten daher aufgrund von Inhibierungsreaktionen (Inhibierung von Genexpressionen) herrühren. Der stabile genetische Fingerprint der Hefen nach mehrmaligem Repitching zeigt auf, dass eine Hefe anhand dieser genetischen Fingerprints auch nach mehrmaligem Repitching, als die Ursprungshefe identifiziert werden kann.

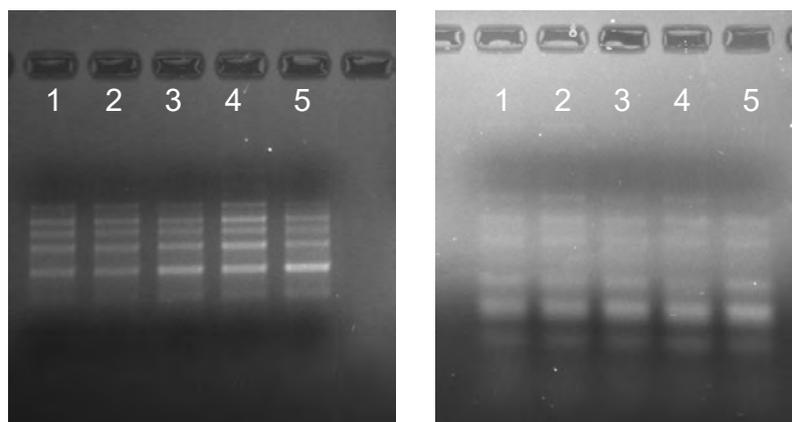


Abbildung 41: Fingerprint mit den A: Primern M13 und B: Primer $\delta 12/21$ der Hefe 55 nach mehrmaligem Repitching (5 Überführungen) in 12 °P bei 14 °C (1) und 26 °C (2) und bei 25 °P bei 14 °C (3) und 26 °C (4), (5) Ausgangsstamm

In Abbildung 42 ist die genetische Stabilität nach zehnfacher Überführung der Hefen 34, 25, 23, 57 und 55 dargestellt. Die Ausgangshefe 25 zeigt eine zusätzliche Bande, die nach zehnfacher Überführung nicht so intensiv zu sehen ist. Alle weiteren Hefen zeigen nach zehnfacher Überführung keine signifikanten Unterschiede zu ihrem Originalstamm.

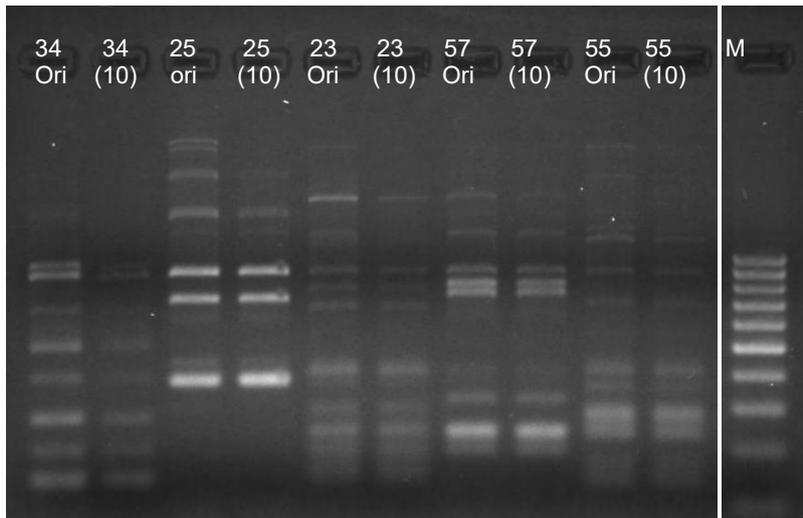


Abbildung 42: Fingerprint mit den Primer $\delta 12/21$ der Hefe 34, 166, 123, 57 und 55 nach mehrmaligem Repitching (10 Überführungen) in 25 °P bei 26 °C (M: Marker, ori: Ausgangsstamm)

Der genetische Hintergrund der Hefezellen der jeweiligen Überführungen für die Hefen 25 und 55 ist in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach den jeweiligen Überführungen sich der genetische Hintergrund nicht verändert. Unterschiedliche Intensitäten der Banden, vor allem Banden von geringer Größe, könnten eventuell auf Proteine in der DNA-Probe zurückzuführen sein. Proben, die aus der 25 °P isoliert wurden, hatten nicht so reine DNA. Da sich bei einem genetischen Fingerprint die Primer an verschiedenste Stellen im Genom anlagern, können Verunreinigungen zu unterschiedliche Intensitäten der jeweiligen Banden führen.

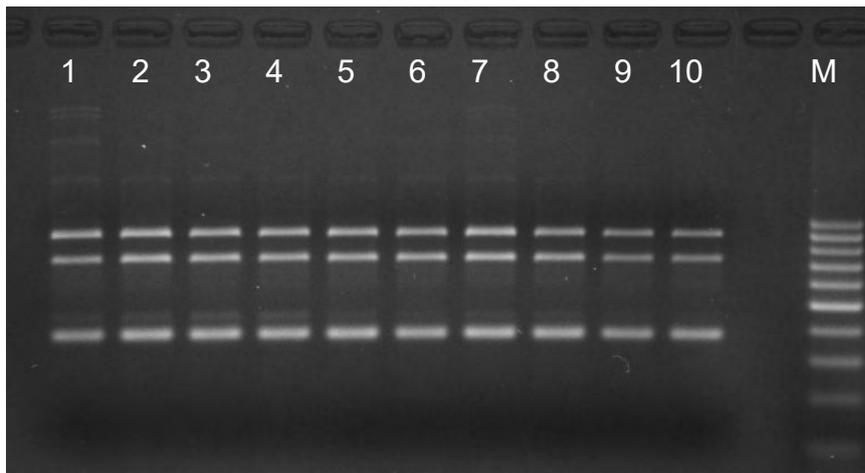


Abbildung 43: Fingerprint mit dem Primer $\delta 12/21$ der Hefe 25 nach mehrmaligem Repitching (10 Überführungen) in 25 °P bei 26 °C (M: Marker; Kammer 1: Ausgangsstamm; Kammer 2-10: Anzahl der jeweiligen Überführungen)

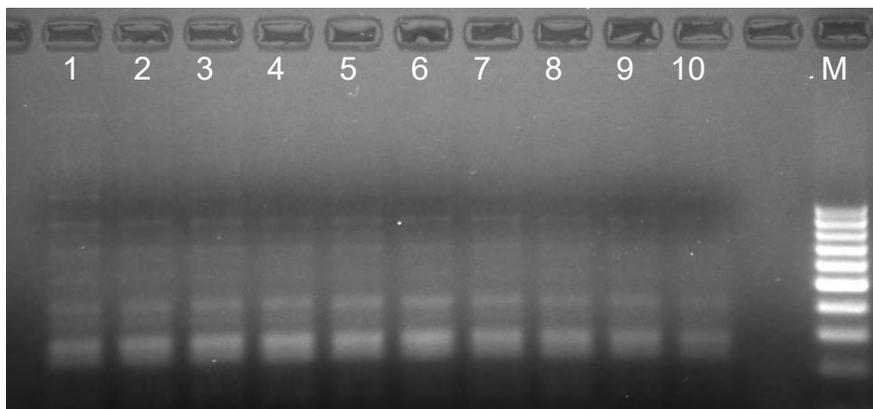


Abbildung 44: Fingerprint mit dem Primer $\delta 12/21$ der Hefe 55 nach mehrmaligem Repitching (10 Überführungen) in 25 °P bei 26 °C (M: Marker; Kammer 1: Ausgangsstamm; Kammer 2-10: Anzahl der jeweiligen Überführungen)

Mit den verwendeten Primern konnte weder nach der Mutagenese, noch nach der 2-Desoxy-Glucose-Klon-Isolation eine Variation im genetischen Hintergrund festgestellt werden. Die Bindung der Primer ist daher anscheinend nicht sensitiv genug, um kleine Variationen im Genom festzustellen. Verschiedene Stämme innerhalb einer Spezies konnten mit den Primern $(GTG)_5$ und M13 schon nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die Primer $\delta 12/21$, welche sich zur Stammunterscheidung eignen, auch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten, bei denen eine genetische Variation erwartet wurde. Die Verwendung des genetischen Fingerprints mit den verwendeten Primern ist anscheinend nicht sensitiv genug, um in diesen Fällen Variationen im genetischen Fingerprint widerzuspiegeln.

Um genetische Unterschiede sicher feststellen zu können, vor allem nach einer Mutagenese, müssen sensiblere Methoden, die detailliertere Informationen liefern, verwendet werden. Eindeutige Ergebnisse könnte man durch die Sequenzierung des gesamten Hefegenoms der jeweiligen Stämme bzw. Mutanten durch das sog. Next Generation Sequencing erreichen. Hier wird anhand der Erstellung einer Genomlibrary jeder einzelne Abschnitt im Genom sequenziert und zusammengesetzt. Die Sequenzen der einzelnen Stämme bzw. Mutanten können dann gegeneinander verglichen werden. Unterschiede bzw. Veränderungen im Genom können so eindeutig festgestellt werden. Einzelne Mutationen im Genom bedeuten jedoch nicht zwingend eine Veränderung im Phänotyp, da die DNA über einen degenerierten Code verschlüsselt ist, d. h. der genetische Code weist eine gewisse Fehlertoleranz auf. Eine Aminosäure kann durch verschiedene Kombinationen der Nukleotide codiert werden. Diese Unterschiede können jedoch mit dem Next Generation Sequencing sicher festgestellt werden, um detaillierte Informationen über den genetischen Hintergrund zur jeweiligen Veränderung der Zellen zu erhalten.

In weiterführenden Projekten ist die Untersuchung bzw. Unterscheidung von Hefestämmen mittels Next Generation Sequencing angestrebt.

2.7 Scale up

Für den industriellen Einsatz der Hefen für die Herstellung des gewünschten Produktes muss das Verfahren mit der jeweiligen Hefe auf einen größeren Maßstab übertragbar sein. Diese Anwendung sollte in der Studienbrauerei überprüft werden. Da Scale up-Studien in verschiedenen Stufen mit unterschiedlichen Skalen durchgeführt werden sollten, sollte der Scale up stufenweise überprüft werden. Dazu wurde zuerst der Scale up auf einen zylindrokonischen Gärtank mit 40 l übertragen. In den gleichen Verhältnissen wie in den EBC-Säulen wurden die Hefen beimpft und fermentiert. Für die Fermentation wurde die Hefe 55 sowie der Referenzstamm 34 verwendet.

Der Referenzstamm 34 zeigte unerwarteter Weise nicht die gleiche Fermentationsperformance wie in den EBC-Säulen. Auch mit einer doppelten Zellkonzentration wurde nicht der Endextrakt wie in den EBC-Säulen beobachtet. Die Startzellkonzentrationen und der Gärverlauf sind in den jeweiligen Diagrammen der Abbildung 45 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Hefe 55 zwar wieder einen höheren Endvergärungsgrad

aufweist als der Referenzstamm 34 (eine untergärige Brauhefe), jedoch erreicht sie hier nur ca. 40 %. Im kleineren 4 l Maßstab zeigte sie ein Endvergärungsgrad von ca. 61 % auf. Eine Erhöhung der Startzellkonzentration auf das doppelte erreichte auch nur einen Endvergärungsgrad von ca. 50 %. Es zeigten sich zwar Temperaturschwankungen zwischen 12-14 °C während der Gärung, die jedoch nicht so einen gravierenden Einfluss haben sollten. Eine Verringerung der Viabilität während der Gärung konnte auch durch die Bestimmung des Tot-Zellen-Anteiles ausgeschlossen werden. Die Viabilitäten lagen jeweils um 99 % (siehe Tabelle 11).

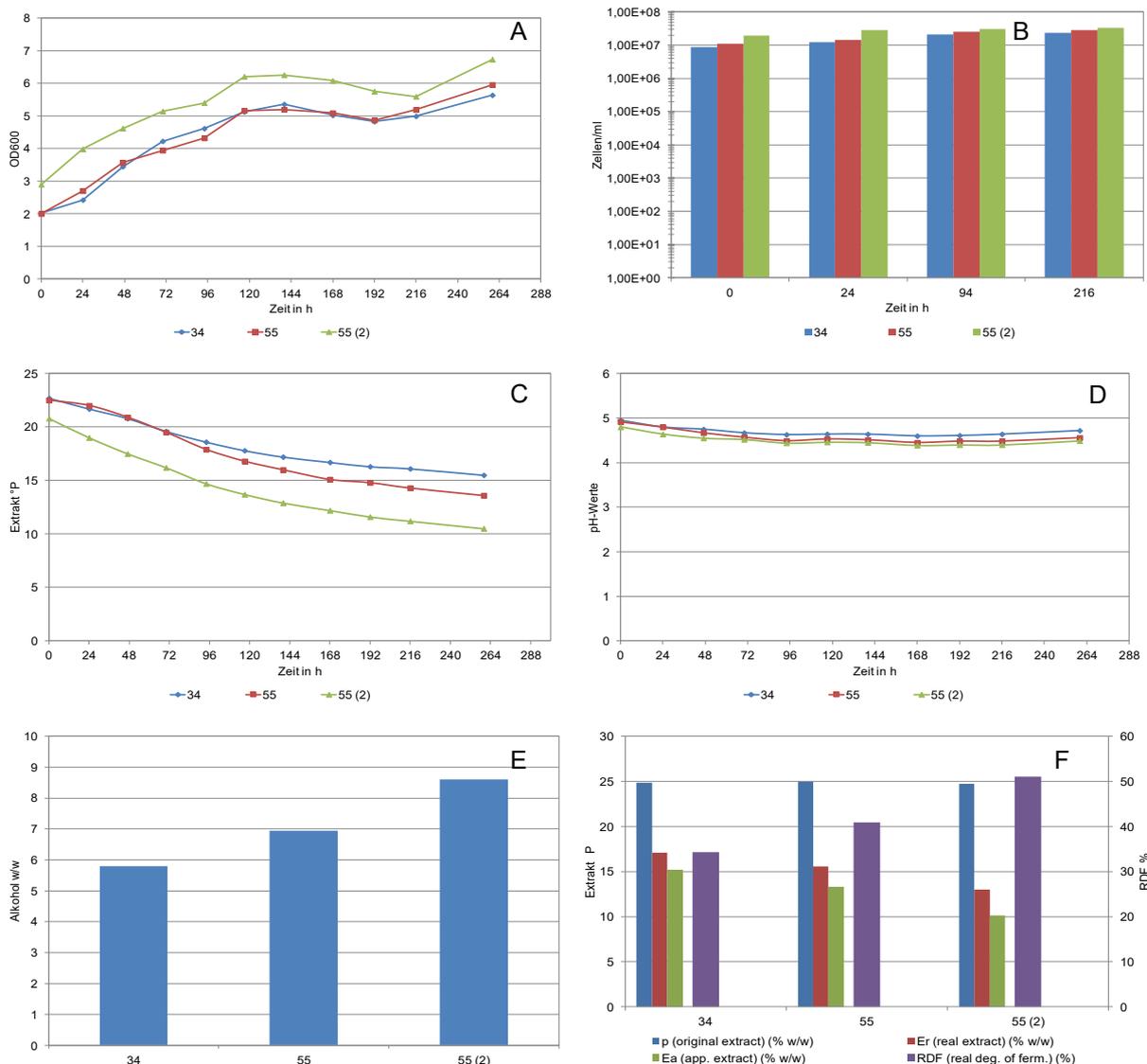


Abbildung 45: Gärungsverlauf der Hefen 34 und 55 in 40 l ZKT bei 12-14 °C. (55 (2) hat die doppelte Startzellzahl wie 55)
 A: OD600 Verlauf; B: Zellkonzentrationen; C: Extraktabbau; D: pH-Verlauf; E: Alkoholkonzentration am Ende der Gärung nach 260 h; F: Ausgangsextraktgehalt und Extrakte sowie Fermentationsgrad nach 260 h

Tabelle 11: Viabilität der Hefen 34 und 55 während der Fermentation in den 40 l ZKT (siehe Abbildung 45)

Hefestamm	Viabilität % (nach 216 h)
34	99,23
55	99,21
55 (2)	98,97

Eine Wiederholung der Gärung zeigte keine Reproduzierbarkeit des Gärverhaltens. Diese kann den Diagrammen in Abbildung 46 entnommen werden. Es zeigte sich bei den gleichen Bedingungen eine stärkere Zunahme der Zellkonzentration, was sich auch im Anstieg der optischen Dichte bemerkbar machte. Demzufolge war zwar auch ein höherer Endvergärungsgrad zu beobachten, jedoch lag auch dieser für die Hefe 55 nur bei ca. 50 %. Bei einer doppelten Startzellkonzentration war sie sogar etwas geringer (siehe Abbildung 46 F).

Auch zeigte die Hefe 25 eine wesentlich schlechtere Fermentationsperformance als in dem 4 Liter Maßstab (siehe Abbildung 46). In den EBC-Säulen zeigte sie einen Endvergärungsgrad von ca. 58 % auf, während im 40 l Maßstab ein Endvergärungsgrad von nur ca. 40 % nachgewiesen werden konnte. Auch wurde ein sehr schwefeliger Geruch wahrgenommen. Auch konnte hier eine Verringerung der Viabilität ausgeschlossen werden (siehe **Tabelle 12**). Die Zellen wiesen eine Viabilität von 99 % auf.

Eine Ursache für das unterschiedliche Fermentationsverhalten der Hefen könnte evtl. in der Maßstabsvergrößerung selbst und der jeweiligen Geometrie der Fermentationsbehälter liegen. Die damit verbundenen Unterschiede in den Gärtanks, bspw. leichte Unterschiede in dem hydrostatischen Druck, könnten zu Unterschieden im Gärverhalten führen.

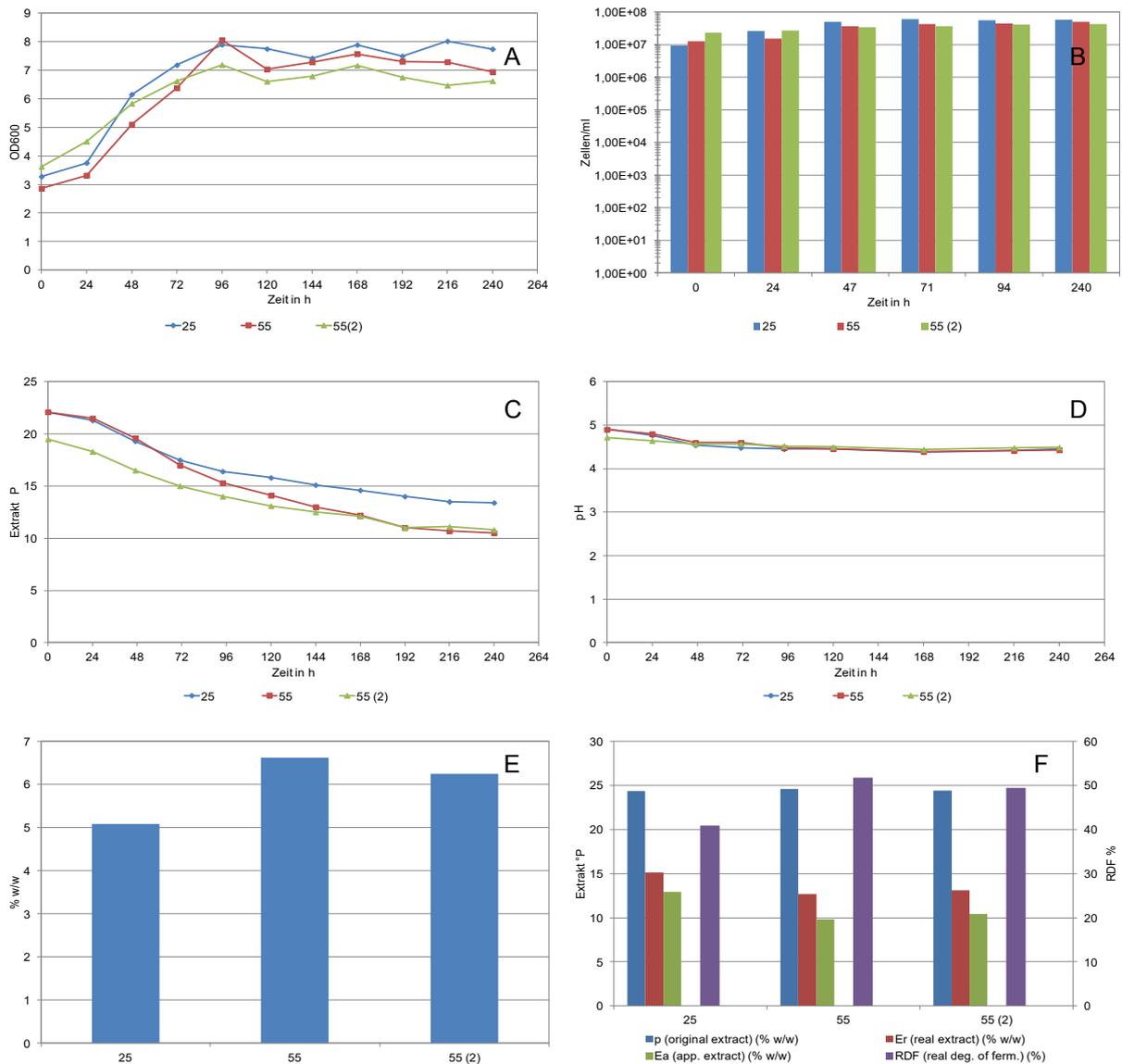


Abbildung 46: Gärungsverlauf der Hefen 25 und 55 in 40 I ZKT bei 12-14 °C. (55 (2) hat die doppelte Startzellzahl wie 55)
 A: OD600 Verlauf; B: Zellkonzentrationen; C: Extraktabbau; D: pH-Verlauf; E: Alkoholkonzentration am Ende der Gärung nach 260 h; F: Ausgangsextraktgehalt und Extrakte sowie Fermentationsgrad nach 260 h

Tabelle 12: Viabilität der Zellen in den 40 I ZKT's, Gärung in 25 P Würze, 12-14 °C

Hefestamm	Viabilität % (nach 240 h)
25	99,84
55	98,94
55 (2)	99,44

Für ein optimales Scale up des High-Gravity-Brewing-Prozesses mit geeigneten Hefen wird es angestrebt, ein weiterführendes ZIM-Projekt mit einem Kooperationspartner durchzuführen und zu optimieren.

Weitere Entwicklungen zur Optimierung der Hefe könnten in der Hybridisierung von zwei Hefestämmen liegen. So wäre es eventuell möglich, positive Eigenschaften der jeweiligen Hefen in einer Hefe zu vereinen. Es gilt dann zu überprüfen, ob sich die jeweiligen positiven Eigenschaften (z. B. Gärdauer, Endvergärungsgrad, Ethanolproduktion, Aromaprofil) in einer Hefe ergänzen. Erste Versuche diesbezüglich konnten bereits im Rahmen dieses Projektes durchgeführt werden (siehe Abschnitt 2.8)

2.8 Hybridisierung von Hefestämmen

Für die Optimierung von Brauhefestämmen ist die Anwendung von gentechnischen Methoden zu gezielten Veränderungen von Genen bzw. Eigenschaften bei industriell eingesetzten Mikroorganismen nicht erlaubt. Durch die Mutagenese können zwar industriell zugelassene Hefeoptimierungen durchgeführt werden, diese sind jedoch sehr willkürlich und ungerichtet. Es erfordert einen hohen Aufwand die „richtige“ Hefe zu finden. Dadurch erschwert sich die Vereinigung vieler positiver Eigenschaften in einer Hefe. Eine weitere zugelassene Methode wäre das Kreuzen bzw. Hybridisieren von zwei Hefestämmen. Stämme mit den jeweiligen positiven Eigenschaften könnten gekreuzt werden. Eventuell erhält man so einen in seinen Fermentationseigenschaften aufgewerteten Stamm. Die jeweiligen optimalen Eigenschaften der jeweiligen Hefen, könnten eventuell so in einer Hefe vereint werden.

Die Hybridisierung von Wein- und Brauhefen könnte daher eine mögliche Option zur Stammoptimierung darstellen. Bei den für das High-Gravity-Brewing gescreenten Hefen handelte es sich hauptsächlich um Weinhefen. Einige von diesen Hefen waren für das High-Gravity-Brewing vor allem bei 14 °C besser geeignet als der verwendete Referenzstamm (untergärrige Brauhefe). Da es sich jedoch um Weinhefen handelte, war das Aromaspektrum des entstandenen Produktes nicht typisch für Bier. Die könnte eventuell durch die Kreuzung mit einer Brauhefe optimiert werden.

Durch die Hybridisierung der Weinhefe mit der Brauhefe könnten verbesserte Fermentationseigenschaften wie die Gärung bei 14 °C bei 25 °P durch die Weinhefe und ein verbessertes Bieraroma durch die Bierhefe vereint werden.

Erste Schritte wurden im Rahmen des Projektes schon durchgeführt. Dazu müssten erst einmal Sporen der jeweiligen zu kreuzenden Hefen erzeugt werden. Da untergärrige Brauhefe schon Hybride mit einem allopoloiden Chromosomensatz sind, erweist sich die Sporenbildung als schwierig bzw. langwierig. Erste Versuche konnten hier schon mit verschiedenen aus der Literatur entnommenen Medien durchgeführt werden.

Weinhefen sporulierten schon nach 2 – 3 Tagen auf den jeweiligen Medien, so dass eine Massensporenisolation durchgeführt werden konnte. Untergärrige Brauhefen zeigten erst nach ca. 28 Tagen vereinzelte Sporulationen. Da die Sporen hier nur vereinzelt auftraten, mussten diese mit einem Mikromanipulator isoliert werden. Nach erfolgreicher Isolation müssen die Sporen auf ihren verringerten Chromosomensatz und ihren Kreuzungstyp (a oder α) hin überprüft werden.

Die Kreuzungstypen können durch den Kreuzungslocus MAT mittels PCR bestimmt werden. Solch eine PCR ist in Abbildung 47 dargestellt. Die Originalstämme (welche ursprünglich aus einer Kreuzung entstanden sind) weisen aufgrund ihres mehrfachen Chromosomensatzes beide Kreuzungstypen auf. Die Sporen sollten nur einen Kreuzungstyp, a oder α , und demnach nur eine Bande aufweisen. In der Abbildung 47 ist jedoch zu erkennen, dass auch die Sporen beide Paarungstypen aufweisen können. Die Ursache hierfür liegt in einem Paarungstyp-Determinationswechsel. Der zentrale, einzig aktive Locus ist MAT, auch Paarungstyplocus genannt, der von den Loci HML α und HMRA umgeben wird (Kassettenmodell). Das aktive Gen am MATlocus kann herausgeschnitten und durch eine neue synthetisierte Kopie des stummen Locus, der den neuen Paarungstyp bestimmt, ersetzt werden. Obwohl das ursprüngliche Gen am MATlocus herausgeschnitten wurde, verbleibt eine stumme Kopie im Genom und macht den Wechsel dadurch reversibel [Alberts et al., 2011; Passarge, 2008]. Daher können die Zellen, die aus einer Spore entstanden sind und demnach nur einen Kreuzungstyp besitzen sollten, innerhalb einer Kolonie verschiedene Kreuzungstypen aufweisen. Dies macht sich durch zwei Banden nach der PCR bemerkbar. Daher müssen die Sporen vor der Hybridisierung auf einen einzelnen aktiven Paarungstyp hin überprüft werden.

Ob es sich bei einem doppelten Paarungstyp trotzdem um eine Spore handelt, kann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Der Chromosomensatz bzw. der DNA-Gehalt einer Hefezelle kann mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Die Zellen bzw. die DNA werden mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt. Die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Originalzellen bzw. der Sporen können so miteinander verglichen werden. Die Sporen sollten einen geringen DNA-Gehalt aufgrund des halbierten Chromosomensatzes besitzen. Demnach ist ihre Fluoreszenzintensität geringer (siehe Abbildung 48).



Abbildung 47: MATlocus PCR zur Bestimmung des Kreuzungstyps einer Hefe. Aufgetragen ist der Ausgangsstamm (Ori), der beide Kreuzungstypen besitzt und die jeweiligen isolierten Sporen (1-10). Die Bande um 500bp stellt den Kreuzungstyp a dar, während die Bande um 400 bp den Kreuzungstyp α darstellt.

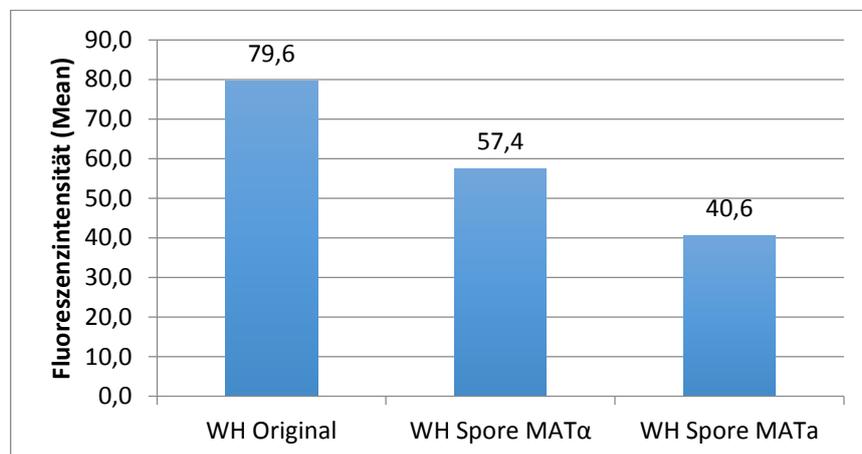


Abbildung 48: Analyse des DNA-Gehalts der Weinhefe und ihrer jeweiligen Sporen a und α mittels Durchflusszytometrie.

Erste Kreuzungsversuche wurden durchgeführt, deren Erfolg jedoch noch überprüft werden muss. In weiterführenden Forschungsprojekten zur Optimierung von Hefestämmen soll dieser Ansatz weiterhin verfolgt werden.

3 Zusammenfassung

Für die Gärung des High-Gravity-Brewing werden angepasste Hefen benötigt. Dabei ist vor allem auch der Endvergärungsgrad von Interesse. In diesem Projekt wurden Hefen, die ursprünglich nicht in der Brauerei verwendet werden, auf ihre Eignung fürs High-Gravity-Brewing hin untersucht. Dazu zählen nicht-*Saccharomyces*-Hefen wie z. B. *Schizosaccharomyces* und *Saccharomyces*-Hefen wie Weinhefen, Brennereihefen und Backhefen. Ein anfängliches Screening hatte vornehmlich die Verwertung von hohen Maltosekonzentrationen im Focus. Die Gärversuche deuteten darauf hin, dass für die Gärung von High-Gravity-Würze auch eine untergärige Brauhefe bei einer Gärung bei 26 °C geeignet ist und sogar einen geringeren Restextrakt erreicht als die gescreenten Weinhefen, welche eigentlich aufgrund ihres Ursprungs an Substrate mit hohem Extraktgehalt gewohnt sind. Da sie aber an unterschiedliche Zucker adaptiert sind, zeigt die Brauhefe trotz der hochkonzentrierten Würze bei hohen Temperaturen eine gute Gärperformance. Es stellte sich heraus, dass auch die Fähigkeit auf Maltotrioseverwertung mit berücksichtigt werden sollte, da Weinhefen nicht zwingend in der Lage sind, Maltotriose zu verwerten. Schließlich konnten maltotrioseverwertende Hefen gescreent und eingesetzt werden. Dabei stellte sich heraus, dass ihre Fermentationsperformance in 25 °P Würze bei 14 °C durchaus besser war, als die einer untergärigen Brauhefe.

Weiterhin wurden Optimierungsversuche von Hefestämmen mittels Mutagenese durchgeführt. Gezielt gentechnisch veränderte Hefen dürfen in Deutschland für den industriellen Einsatz nicht verwendet werden. Hefen, deren genetischer Hintergrund durch Mutagenese verändert wurde, können jedoch eingesetzt werden. Die Mutagenese ist allerdings sehr willkürlich und aufwändig in der Findung der richtigen Mutante. Da die Mutationen in diesen Fällen ungerichtet sind, könnten zwar positive Aufwertungen der jeweiligen Mutante beobachtet werden, die Eigenschaften können sich aber auch für den Prozess verschlechtern. Mutanten mit geringfügig verbesserten Eigenschaften im Vergleich zum Ausgangsstamm konnten gefunden werden, es besteht jedoch noch Potential, durch umfassendere Studien mit mehr erzeugten Mutanten Kandidaten zu detektieren, deren brauereirelevanten Eigenschaften intensiver verbessert werden.

Für die gezielte Optimierung der Gärgeschwindigkeit bzw. des Endvergärungsgrades können 2-Desoxy-Glucose-Klone isoliert werden. Diese können Maltose und Glucose parallel verwerten und verbrauchen. Dies bedeutet, dass sie die sog. Glucose-Repression nicht aufweisen, durch die in Anwesenheit von mehreren Zuckern immer zuerst Glucose verwertet wird. Bei einer Glukose-Derepression werden Zucker parallel abgebaut, wodurch die vorhandenen Zucker schneller abgebaut werden können. Es konnten erfolgreich solche Klone isoliert werden, die den Extrakt etwas mehr und schneller abbauten als der Ausgangsstamm. Jedoch ist auch hier die Isolierung recht willkürlich, denn auch hier bedeutet nicht jede Isolierung auf dem jeweiligen 2-Desoxy-Glukose-Medium zwangsläufig, dass die isolierten Hefen eine Glukose-Derepression aufweisen.

Ein Scale up der Fermentationen mit den isolierten (Maltotriose positiven) Hefen erwies sich als schwierig, da sie nicht die gleiche Fermentationsperformance wie in den EBC-Säulen zeigten. Die Hefen zeigten im Vergleich zu dem kleineren Maßstab geringere Endvergärungsgrade auf. Weitere ZIM-Forschungsprojekte mit Kooperationspartnern diesbezüglich sind weiterhin angestrebt.

Da bei der Optimierung von Hefestämmen durch ungerichtete Mutagenese die jeweiligen Mutanten nicht nur verbesserte, sondern auch verschlechterte Eigenschaften aufweisen können, wäre eine Alternative zu den ungerichteten Optimierungen eine Kreuzung von zwei verschiedenen Hefestämmen, um positive Eigenschaften in einer Hefezelle zu vereinen. Hier würde sich z. B. die Kreuzung von einer Weinhefe mit einer Brauhefe anbieten. Dabei könnte vor allem das Aromaspektrum für die Bierherstellung optimiert werden, da Weinhefen alleine hauptsächlich ein fruchtiges Aroma erzeugen. Dazu müssen zuerst von den jeweils zu kreuzenden Hefen Sporen isoliert werden. Da die Brauhefe jedoch einen allopoliploiden Chromosomensatz aufweist, stellt diese bei der Gewinnung von Sporen, eine Herausforderung dar. Erste Versuche diesbezüglich konnten im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführt werden. In weiterführenden Forschungsprojekten soll dieses Ziel weiterhin verfolgt werden.

4 Literaturverzeichnis

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; and Walter, P. (2011). Molekularbiologie der Zelle, Weinheim
- Back, W. (2008). Mikrobiologie der Lebensmittel- Band 5: Getränke, Hamburg
- Bahrim, G. and Bleoanca, I. (2003). Overview on Brewing Yeast Stress Factors. Romanian Biotechnological Letters, 18 (5): 8559- 8572
- Baleiras Couto, M.; Eijmsa, B.; Hofstra, H.; Huis in't Veld, J. and van der Vossen, J. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. Applied and Environmental Microbiology 62, 41–46.
- Blieck, L.; Toye, G.; Dumortier, F.; Verstrepen, K. J.; Delvaux, F. R.; Thevelein, M. J. and van Dijcki, P. (2007). Isolation and Characterization of Brewer's Yeast Variants with Improved Fermentation Performance under High-Gravity Conditions. Applied and environmental microbiology, 73 (3): 815- 824
- Bouix, M.; and Leaveau, J.-Y. (2001). Rapid Assessment of Yeast Viability and Yeast Vitality During Alcoholic Fermentation. Journal of the Institute of Brewing, 107(4): 217-225
- Canetta, E.; Adya, A. K. and Walker, G. M. (2006). Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. FEMS, Microbiology Letters, 255(2): 308-315
- Casey, G. P.; Magnus, C. A. and Ingledew, W. M. (1984). High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production. Applied and environmental microbiology, 48 (3): 639- 646
- D'amore, T.; Panchal, C. J.; Russell, I. and Stewart, G. G. (1989). A study of ethanol tolerance in yeast. Research department, 9 (4): 284- 304
- Esperanza Casas, Maria Jose Valderrama, and Jose M. Peinado (1998). Sorbate Detoxification by Spoilage Yeasts Isolated from Marzipan Products. Food technol. biotechnol. 1998, 87-91.
- Geiger, E., Praxishandbuch der Brauerei, Grundwerk, 7-8

-
- Gibson, B. G.; Lawrence, S. J.; Leclaire, J. P. R.; Powell, C. D. and Smart, K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 535– 569
- Guido, L. (2004). The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. In: *Food Chemistry* 87 (2), S. 187–193.
- Herrmann, M., Back, W., Sacher, B. und Krottentaler, M., Möglichkeiten zur technologischen Beeinflussung der Bieraromastoffe, *Monatszeitschrift für Brauwissenschaft*, Heft 5/6, 2003, S. 99 – 103
- Huuskonen, A.; Markkula, T.; Vidgren, V.; Lima, L.; Mulder, L.; Geurts, W.; Walsh, M. and Londesborough J. (2010). Selection from Industrial Lager Yeast Strains of Variants with Improved Fermentation Performance in Very-High-Gravity Worts. *Applied and environmental microbiology*, 76 (5): 1563- 1573
- Ikehata, H and Ono, T. (2011). The Mechanisms of UV Mutagenesis. *JRR* 52, 115-125.
- Jacob, F., Praxiserfahrungen aus dem Hefemanagement, 2. Weihenstephaner Hefesymposium, 2004
- Latterich, M. and Watson, M.D. (1993). Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 191(3): 1111-1117
- Lee, H.- Y.; Chou, J.- Y.; Cheong, L.; Chang, N.- H.; Yang, S.- Y. and Leu, J.- Y. (2008). Incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes causes hybrid sterility between two yeast species. *Cell*, 135: 1065–1073
- Legras, J.-L. and Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2): 249-255
- Lodolo, E. J.; Kock, J. L. F.; Axcell, B. C. and Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res*, 8: 1018– 1036
- Mager, W. H. and Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. In: *Biochemistry Journal* (290), S. 1–13.

-
- Mansure, J. J. C.; Panek, A. D.; Crowe, L. M. and Crowe, J. H. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1191(2): 309-16
- Martin, M. M. and Lindqvist, L. (1975). The pH dependence of Fluorescein Fluorescence. In: *Journal of Luminescence* 10, S. 381–390.
- Marvin, G.E. (1928). The Occurrence and Characteristics of Certain Yeasts Found in Fermented Honey. *Journal of Economic Entomology* 1928, 363-370.
- MEBAK: Würze, Bier, Biermischgetränke. Herausgegeben vom Vorsitzenden Dr. Fritz Kacob, 2012
- Meyerhoff, C. and Bischof, F. (2010). *Wissenschaft im Kochtopf: Küchengeheimnisse wissenschaftlich erklärt*, Norderstedt
- Mochaba, F. M.; O'Connor-Cox, E. S. C. and Axcell, B. C. (1997). A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(2): 99-102
- Pascual, C.; Alonso, A.; Garcia, I. and Romay, C. (1987). Effect of Ethanol on Glucose Transport, Key Glycolytic Enzymes, and Proton Extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(3): 374-378
- Passarge, E. (2008). *Taschenatlas Humangenetik*, Stuttgart
- Puligundla, P.; Smogrovicoca, D.; Obulam, V. S. R. and Ko, S. (2011). Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 1133– 1144
- Rosculet, G.: Aroma and Flavour of Beer; Part II. The Origin and Nature of Less-Volatile and Non-Volatile Components of Beer, *The Brewers Digest – June 1971*, S. 68 – 98
- Saerens, S. M. G.; Duong, C. T. and Nevoigt, E. (2010). Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86: 1195–1212
- Shinitzky, M. (1984). Membrane Fluidity and Receptor Function. *Membrane Fluidity-Biomembranes*, 12: 585- 601

-
- Sipiczki, M. 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2079-2083.
- Suomalainen, H. u. M Lehtonen: The production of Aroma Compounds by Yeast, *J. Inst. Brewing* 85 (1979) 2, S. 328
- Verstrepen, K. J., Ester in beer, part I, II and III, *Cerevisia* 28 (3&4) 2003 und 29 (1) 2004
- Wagner, D., Einfluss des Hefestammes auf die Bierqualität, *Brauwelt* Nr. 44 (2002), S. 1596
- Walker, G. M. (2012). Yeast Vitality and Stress Responses: Novel Investigative Approaches. In: *Yeast flocculation, vitality, and viability: proceedings of the 2 nd Internat Master Brewers Association of the Americans 2012*, S. 85–95.
- Weigert, Claudia (2010). Erhöhung der Zelldichte während der Propagation von Bierhefe. Dissertation. TU Berlin, Berlin. Fakultät III - Prozesswissenschaften.
- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531–6535.
- Winston, F. (2001). EMS and UV Mutagenesis in Yeast. In *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc).
- Wittke, Georg (1992). *Studienbücher // Farbstoffchemie*. 3. Aufl. Frankfurt am Main: Diesterweg Sauerländer; Diesterweg.
- Younis, O and Stewart, G., Effect of Malt Wort, Very-High-Gravity Malt Wort and Very-High-Gravity Adjunct Wort on volatile Production in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the ASBC*, 57 (2), 1999, p. 39 – 45

5 Veröffentlichungen

Vorträge:

4th Iberoamerican VLB Symposium - Brewing and Filling Technology, 2013: Very high gravity brewing: "Strategies for yeast selection", Thomas Tyrell

Beitrag im Rahmen des Technisch-Wissenschaftlichen Ausschusses (TWA) auf der 101. Oktobertagung der VLB, 2014: "Selection of yeast for High Gravity Brewing", Prof. U. Stahl

Poster-Präsentation:

European Brewery Convention, 2015: "New workers in the brewery - Selection of new yeast to improve High Gravity Brewing", Cöllü, I.; Uhde, C.; Lorenz, E.; Stahl, U.; Pahl, R.; Bilge, D.

6 Verwendung der Zuwendung

Die Zuwendung wurde wie folgt verwendet:

a. Wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

Forschungsstelle 1: BBSA/FIGBP

Arbeitsschritt	Eingesetzte Personenmonate
Arbeitsschritt 1	2
Arbeitsschritt 2	2,4
Arbeitsschritt 3	2,8
Arbeitsschritt 4	2,1
Arbeitsschritt 5	2,7
Arbeitsschritt 6	3,5
Arbeitsschritt 7	5,4
Dokumentation	1

Forschungsstelle 2: Mikrobiologie

Arbeitsschritt	Eingesetzte Personenmonate
Arbeitsschritt 1	2
Arbeitsschritt 2	1
Arbeitsschritt 3	0,5
Arbeitsschritt 4	2,35
Arbeitsschritt 5	4,15
Arbeitsschritt 6	4,5
Arbeitsschritt 7	4
Dokumentation	1

b. Übriges Fachpersonal (Einzelansatz A.2 des Finanzierungsplans)

Forschungsstelle 1: FIGBP

Arbeitsschritt	Eingesetzte Personenmonate
Arbeitsschritt 1	0,7
Arbeitsschritt 2	0,3
Arbeitsschritt 3	0
Arbeitsschritt 4	1
Arbeitsschritt 5	5,25
Arbeitsschritt 6	3,4
Arbeitsschritt 7	2,4
Dokumentation	0

Forschungsstelle 2: Mikrobiologie

Arbeitsschritt	Eingesetzte Personenmonate
Arbeitsschritt 1	2,5
Arbeitsschritt 2	3,5
Arbeitsschritt 3	4
Arbeitsschritt 4	3,75
Arbeitsschritt 5	5,5
Arbeitsschritt 6	5,05
Arbeitsschritt 7	3,3
Dokumentation	0

7 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ergebnisse und der dargestellte Aufwand entsprechen dem begutachteten und bewilligten Antrag. Die abgerufenen Mittel sind als angemessen zu betrachten.

8 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

<i>Maßnahme</i>	<i>Ziel</i>	<i>Zeitpunkt</i>
Treffen des Projektbegleitenden Ausschusses	Information über das Forschungsvorhaben und dessen Ergebnisse	- Messe BrauBeviale 2014, Nürnberg - intern: April, Aug. 14
Veröffentlichung der Ergebnisse der Literaturrecherche in einer deutschsprachigen Fachzeitschrift	Schaffung einer Referenzquelle für alle interessierten Unternehmen	Brauwelt 6/2014, 130-133 - Nächste VÖ geplant III/2015
Vortrag über das Forschungsprojekt auf einer Fachtagung der VLB, vorzugsweise auf der seit über 100 Jahren jährlichen stattfindenden Oktobertagung	Information eines großen Fachpublikums: 200 – 300 Zuhörer	Innerhalb eines Jahres nach Ende des Projektes
Veröffentlichung des Abschlussberichtes auf der Internetseite der VLB	Bereitstellung tiefer gehender Information im Internet	Innerhalb eines halben Jahres nach Ende des Projektes
Veröffentlichung der Ergebnisse des Forschungsprojektes in einer deutschsprachigen Fachzeitschrift, vorzugsweise Brauwelt, Brauereiindustrie oder Brauerei Forum	Information eines größeren Fachpublikums Schaffung einer der Allgemeinheit zugänglichen wissenschaftlichen Referenzquelle	Innerhalb eines Jahres nach Ende des Projektes
Übernahme der Ergebnisse in die Lehre	Weitergabe präsentationsfähiger Forschungs-	Nach Veröffentlichung der Ergebnisse

ergebnisse zur Einbindung in die Ausbildung von Brautechnologen an der Technischen Universität Berlin und an der VLB

Beratung von Unternehmen

Einbindung der Forschungsergebnisse in die Beratung von Unternehmen durch die VLB

Ab dem Zeitpunkt zu dem umsetzbare Forschungsergebnisse erzielt wurden.

9 Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Mit den Ergebnissen des Forschungsvorhabens können klein- und mittelständische Brauereien bei der Anwendung von High Gravity Brauverfahren, insbesondere unter Verwendung brauuntypischer Hefestämme wie Nicht-Saccharomyces Spezies sowie Wein- und Destillierhefen, unterstützt werden.

Die Forschungsergebnisse konnten die Schwierigkeiten aufzeigen, tendenziell osmotolerante Hefen auf dem Substrat Würze gären zu lassen, wenn diese nicht an die optimale Verwertung der Kohlenhydrate adaptiert sind. Durch strukturierte Studien konnte dabei dargestellt werden, dass der Einfluss des Substrates eine übergeordnete Rolle bei Hefe-Fermentationsprozessen mit dem Ziel einer hohen Alkoholausbeute, besitzt.

Gerade kleine und mittelständische Brauereien, welche aufgrund beschränkter finanzieller Möglichkeiten keine eigenen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zum High Gravity Prozess leisten können, werden dadurch in die Lage versetzt, bei Prozess- und Produktentwicklungen mit neuartigen Rohstoffen oder innovativen Hefen auf die hier erzielten Kenntnisse zurückgreifen zu können, wodurch in der Praxis entstehende Fehlentscheidungen und damit nachteilige finanzielle Folgen vermieden werden können.

Weiter wurden Ansätze für potentielle Weiterentwicklungen, so z.B. die gezielte Kreuzung von Brau- mit Weinhefen zur verbesserten Anpassung an den Brauprozess mit Würze, aufgezeigt. Durch Realisierung solcher Ansätze können Nischen für kleine und mittelständische Brauereien entstehen, die mit dem anhaltenden Trend unkonventioneller Brauprozesse konform sind.

Im Rahmen des Forschungsprojektes konnten zudem vielversprechende Ergebnisse mit Nicht-Brauhefen, welche Maltotriose verwerten können, erzielt werden. Die dabei vielversprechendsten Fermentationsleistungen unter Verwendung einer 25 °P Würze und einer Temperatur von 14 °C bieten Ansatzmöglichkeiten für eine Implementierung neuartiger Brauprozesse, die ebenfalls eine interessante Nische für gerade kleineren Brauereien liefern könnte.

10 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzepts

Erste Schritte zum Ergebnistransfer sind während der Projektlaufzeit durchgeführt worden. Weitere Maßnahmen zur Verwertung und Verbreitung der Projektergebnisse sind im Anschluss an das Projekt vorgesehen. Über den Austausch zwischen Forschungsstellen und Unternehmen des projektbegleitenden Ausschusses sowie weiteren interessierten Unternehmen hat bereits ein Wissenstransfer stattgefunden.

Nach Einschätzung der Forschungsstellen ist die Einbringung von aktuell nicht in der Brauerei eingesetzten Hefen zur Optimierung von High-Gravity-Brewing in heutigen Systemen umsetzbar. Die Ansprache potenziell interessierter Unternehmen erscheint daher sinnvoll und realisierbar.

Die Veröffentlichung der Ergebnisse der Literaturrecherche in einer deutschsprachigen Fachzeitschrift soll im Zusammenhang mit der Veröffentlichung der Ergebnisse in einer Fachzeitschrift innerhalb eines Jahres nach Projektabschluss erfolgen.

Vorstellung des Forschungsvorhabens im Technisch Wissenschaftlichen Ausschuss der VLB wurde realisiert als Beitrag im Rahmen des Technisch-Wissenschaftlichen Ausschusses (TWA) auf der 101. Oktobertagung der VLB, 2014: "Selection of yeast for High Gravity Brewing", gehalten von Prof. Dr. U. Stahl.

Weitere Inhalte des Forschungsprojektes werden am 6. Oktober 2015 auf der Oktobertagung der VLB präsentiert.

Die Veröffentlichung des Abschlussberichtes auf der Internetseite der VLB wird im 4. Quartal 2015 realisiert.

Die Veröffentlichung der Ergebnisse des Forschungsprojektes in einer deutschsprachigen Fachzeitschrift, vorzugweise Brauwelt, Brauereiindustrie oder Brauerei Forum findet innerhalb eines Jahres nach Projektabschluss statt.

Die Übernahme der Ergebnisse in die Lehre ist erfolgt. Die Ergebnisse werden in den laufenden Seminaren und Ausbildungsgängen der VLB e.V. als Lerninhalt vermittelt.

Die Ergebnisse des Projekts werden bei der Beratung von Unternehmen, die durch die VLB e.V. weltweit durchgeführt werden, einbezogen und tragen dazu bei, die wissen-

schaftlich-technische Qualität der Beratungen auf einem anerkannt hohen Level zu halten.

Insgesamt erscheint das Konzept zum Transfer der Projektergebnisse als realisierbar und wird von den Forschungsstellen wie geplant verfolgt.

11 Angaben über gewerbliche Schutzrechte

Im Rahmen des Projekts wurden durch die VLB e.V. keine gewerblichen Schutzrechte angemeldet.

12 Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben 16713N der Forschungsvereinigung „Brauerei“ wurde über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Für die Förderung wird von der VLB e.V. an dieser Stelle gedankt.