



Projekttitel:

Der Einsatz ionisierter Luft in der Belüftung aerober Fermentationsprozesse in der Biotechnologie und in der Brauindustrie

Förderkennzeichen:

49VF130040

Name der Forschungsstelle(n):

Forschungsinstitut für Bier- und Getränkeproduktion (FIBGP)

Kontakt:

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

Bewilligungszeitraum:

1.2.2014 – 30.4.2016

INNO-KOM

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.

Reg.-Nr.: VF130040

Kurztitel: Der Einsatz ionisierter Luft in der Belüftung aerober Fermentationsprozesse in der Biotechnologie und in der Brauindustrie

Laufzeit: 01.02.2014 bis 30.04.2016

Name und Anschrift des Zuwendungsempfängers

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V., Seestraße 13, 13353 Berlin

Kurzfassung (Zielstellung, Ergebnisse)

Ionisierter Luft (IL) werden hormetische Effekte, also vitalisierende Eigenschaften auf biologische Systeme zugesprochen. Im Forschungsprojekt wurde untersucht, inwiefern sich dieses Phänomen auf die Prozesse in der Brauerei und andere beispielhafte biotechnologische Prozesse übertragen lässt.

Dazu konnte erfolgreich eine Ionisationsanlage in den Hefepropagator als auch in einen Bypass des Fermentationssystemes integriert werden. Diese Anlage ermöglichte es die Ionisationsparameter Spannung, Frequenz und Wirkungsgrad stufenlos einzustellen. Mit Hilfe dieser Anlage konnte die Auswirkung eines Eintrages an ionisierter Luft auf verschiedenste Prozesse in Abhängigkeit des Ionisationsgrades geprüft werden.

Für die Dosierung der ionisierten Luft während der Hefepropagation in der Brauerei wurde das Modul für die Propagation modifiziert. Die Ionisationsröhre wurde dafür in die Umwälzleitung eingebaut. Die Versuchsreihen für die Propagation wurden sowohl mit untergärigen als auch obergärigen Hefestämmen durchgeführt. Anschließend wurde der jeweilige Hefesatz für die Vergärung von Vollwürze (Stammwürze 11,5%) und High-Gravity-Brewing (HGB)-Würze verwendet.

In Vorversuchen im Labormaßstab mit einem untergärigen Hefestamm zeigte sich, dass es eine positive Wirkung der IL geben könnte, wenn eine Hochspannung von 2000 – 3000 V angelegt wird. Das konnte jedoch nur partiell bestätigt werden. Die Ergebnisse waren sogar sehr widersprüchlich. Trotz mehrmaliger Wiederholungen konnten folgende Phänomene bei allen untersuchten Hefestämmen beobachtet werden:

- i) Tendenzial gesteigerte Vitalität und dadurch verkürzte Gärzeit um einen Tag
- ii) Vergleichbare Vitalität und gleiche Gärzeit
- iii) Vergleichbare Vitalität, aber längere Gärzeit und/oder sogar vorzeitige Flockulierung („steckenbleiben“)

Es scheint offensichtlich, dass die IL einen Effekt auf die Zellmembran hat. Der Einfluss ist jedoch sehr vielfältig und reicht von gesteigerte Vitalität und Veränderung des Flockulationsverhaltens. Die Vitalität der untergärigen Hefen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Methode konnte zwar im Großen und Ganzen etabliert werden, jedoch kann eine eindeutige Reproduzierbarkeit noch nicht ermittelt werden. Die Störfaktoren liegen v.a. in der Probenaufbereitung der Hefen und vorzunehmende Einstellungen am Flowcytometer. Die durchflusszytometrische Analyse von Trehalose und Glycogen in Hefe konnte im Berichtszeitraum nicht vollständig aufgebaut werden. Die durchflusszytometrische Analyse obergäriger Hefestämme stellte sich aufgrund der Zellverbände als sehr schwierig wenn nicht sogar unmöglich heraus. Außer bei den steckengebliebenen Gärungen, welche nicht in die Auswertung aufgenommen wurden, konnte kein Einfluss auf die Bierqualität festgestellt werden.

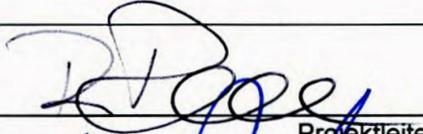
Im Fokus der biotechnologischen Fragestellungen standen hauptsächlich der Einfluss einer Ionisation auf die Milchsäurefermentation, die Bildung von Glutathion durch Hefen als auch die Kultivierung und Sporenbildung von *Bacillus subtilis*. Alle Fermentationen konnten durch die während des Projektes etablierte flowzytometrische Analytik ((z.B. zur Beurteilung der Viabilität, Vitalität und verschiedenster Stressfaktoren) umfassend begleitet werden. Durch den Eintrag ionisierter Luft konnte bei der Fermentation der Milchsäurebakterien, als auch der Hefe keine fördernde bzw. positive Beeinflussung erreicht werden. Bei der Untersuchung zur Auswirkung von Ionisation auf *Bacillus subtilis* konnten durch sukzessive Anpassung der Ionisationseinstellungen (Zeit, Spannung, Frequenz, Wirkungsgrad) sowohl eindeutig letale als auch NOEL-nahe (höchste Dosis bei der keine negativen Effekte beobachtet werden) Bedingungen ermittelt werden. Dies ermöglichte es gezielt Einfluss auf die Fermentation und die Sporenbildung der Kultur zu nehmen. Durch die Ionisation konnte eine erheblich höhere Sporenausbeute im Vergleich zu bisherigen Fermentationen erreicht werden. Die gezielte Beeinflussung der Wachstumsrate durch den Eintrag ionisierter Luft soll in weiterfolgenden Untersuchungen und Projekten zu Prozessoptimierungen führen, die eine Synchronisation der Kultur mit anschließender gezielter Sporeninduktion ermöglichen. Dies würde die Grundlage bilden um erstmals Sporensuspensionen, mit einheitlichen Resistenzeigenschaften, für Bioindikatoren herzustellen und somit aussagekräftigere und verlässlichere Beurteilungen von Desinfektionsmaßnahmen erlauben.

Veröffentlichungen
Patentanmeldungen

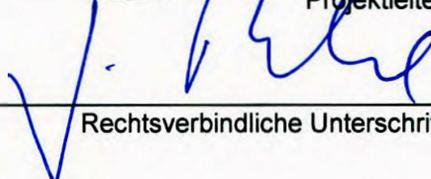
28. Okt. 2016

Datum





Projektleiter



Rechtsverbindliche Unterschrift

Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

Reg.-Nr.:	VF130040
FuE-Einrichtung:	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Titel:	Der Einsatz ionisierter Luft in der Belüftung aerober Fermentationsprozesse in der Biotechnologie und in der Brauindustrie
Projektlaufzeit:	01.02.2014 bis 30.04.2016

Berlin, den 28. Oktober 2016

Name und Telefonnummer des Projektleiters: Dr.-Ing. Roland Pahl (030 / 450 80 238)

Firmenstempel

Versuchs- und Lehranstalt
für Brauerei in Berlin

VLB

Seestraße 13 • D-13353 Berlin

Unterschrift des Projektleiters

Rechtsverbindliche Unterschrift

1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens

Ionisierter Luft werden hormetische Effekte, also vitalisierende Eigenschaften auf biologische Systeme zugesprochen. Im Forschungsprojekt wurde untersucht, inwiefern sich dieses Phänomen auf die Prozesse in der Brauerei und andere beispielhafte biotechnologische Prozesse übertragen lässt.

Es wird postuliert, dass die Luftionen einen positiven Effekt auf den Stoffwechsel der Hefen haben und somit auch stärkend auf den Zellwandaufbau wirken. Somit soll bereits in der Hefeherführung (Propagation) eine erhöhte Resistenz gegen osmotischen Stress entwickelt werden, was sich in erhöhten Trehalose- und Glycogengehalten auswirkt. Daraus folgend wurde geprüft werden ob sich durch eine Belüftung mit ionisierter Luft eine verbesserte Hefephysiologie ergibt, die sich in einer erhöhten Gärkraft zeigt. Von Interesse ist dies auch bei der Weiterführung der eingesetzten Hefe, da davon auszugehen ist, dass diese dann auch eine erhöhte Vitalität aufweist. Weiterhin galt es zu testen ob sich durch erneute Belüftung mit ionisierter Luft geeigneter Intensität eine stärkere Re-Vitalisierung der Erntehefe realisieren lässt. Insbesondere für das sogenannte High-Gravity-Brauverfahren (Brauen mit erhöhter Stammwürze) bedeutet dies, dass mit einer erhöhten Viabilität (Lebendzellzahl) zu rechnen ist und diese Erntehefe mehr als einmal unter Berücksichtigung einer gleichbleibenden Bierqualität wiederverwendet werden kann. Dies würde Zeit im Labor für die Hefeanzucht sowie Propagation im Herführtank sparen und somit auch Betriebskosten für Wasser und Energie (bspw. für die Reinigung) senken.

Da in jeder Brauerei ein Belüftungssystem für Hefetanks und Propagatoren vorhanden ist, stellt die Installation eines Ionisationsgenerators keinen einschneidenden Eingriff in das vorhandene System dar. Es ist somit einfach zu implementieren.

Die aerobe Fermentation spielt außerdem in zahlreichen weiteren biotechnologischen Prozessen eine wesentliche Rolle. Dabei findet die Kultivierung von Bakterien, Hefen oder Pilzen vor allem in der pharmazeutischen und spezialchemischen Industrie aber auch in der Produktion von Massenprodukten und der Lebensmittelherstellung Anwendung. Erzeugt werden können beispielsweise Antibiotika, Vitamine, Biopolymere oder organische Säuren.

Um effiziente und wirtschaftliche rentable Prozesse zu erhalten ist es sinnvoll die wichtigsten Parameter der aeroben Kultivierung zu optimieren. Eine wesentliche Rolle nimmt dabei die Begasung und die damit verbundene Sauerstoffeintragsrate ein. Diese sind ausschlaggebend für die Wachstumsrate und Biomassebildung der eingesetzten Mikroorganismen und für die Produktion von primären und sekundären Stoffwechselprodukten. Je nach Fermentationsphase kann es jedoch zu Limitierungen in der Sauerstoffversorgung kommen. Durch zahlreiche anlagen- und prozesstechnische Parameter soll diesem vorgebeugt und entgegengewirkt werden. Ansatzpunkte hierzu sind eine möglichst homogene und disperse Verteilung der Zuluft, der Zusatz von reinem Sauerstoff oder komplexe Steuerungen über den respiratorischen Quotienten (RQ). In den meisten Fällen kommt es jedoch zu einer Erhöhung der Herstellkosten oder des Sicherheitsrisikos. Im Projekt wurde untersucht inwiefern postulierte hormetischen Effekte von ionisierter Luft hier möglicherweise eine wirtschaftlich sinnvolle Alternative bieten. Dazu soll zunächst geprüft werden inwiefern die Belüftung oder teilweise Zufuhr mit ionisierter Luft Einfluss auf relevante Prozessparameter wie dem Gelöstsauerstoffgehalt und das Redoxpotential hat. Anschließend soll getestet werden, ob sich ionisierte Luft in verschiedenen beispielhaften Fermentationen zur Steigerung biotechnologischer Prozesse einsetzen lässt. Dabei liegt neben der Steigerung der Wachstumsrate der jeweiligen Mikroorganismen ein weiteres Hauptaugenmerk auf der Optimierung wirtschaftlich relevanter Produktbildungen.

2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse

Das Projekt war in ein brauereitechnologisches und in ein biotechnologisches Arbeitsfeld ausgerichtet. Die Arbeiten und Entwicklungen der einzelnen Arbeitsfelder erfolgten aber parallel und in enger Kooperation. Die Darstellung der Ergebnisse des Forschungsvorhabens wird zur besseren Übersicht in den folgenden Abschnitten nach den jeweils relevanten Arbeitspaketen aufgeschlüsselt.

In den ersten Schritten des Projektes wurden zunächst verschiedene Versuchsaufbauten zur Einbringung von ionisierter Luft in die jeweiligen Prozesse entworfen, geprüft und ausgetestet. Dazu wurden zwischen den beteiligten VLB internen Abteilungen neben einer erneuten intensiven Literaturrecherche, grundsätzliche Überlegungen und Planungen zum Design und zur Durchführung der Versuche, sowie benötigter Anpassungen der Anlagen angestellt. Anschließend erfolgte die geplante Prüfung zum Einfluss der ionisierten Luft auf die jeweiligen Brau- bzw. Fermentationsprozesse.

Arbeitspaket 1 Konstruktion/Implementierung des Versuchsaufbaus

IL für biotechnologische Anwendungen:

Zunächst wurde im Projekt mit einer Anlage mit eingebauten Isolatorröhren gearbeitet (siehe Abbildung 1). Mit diesen war es jedoch nur begrenzt möglich Änderungen an der Ionisationsleistung vorzunehmen. Weiterhin zeigte sich im Laufe der Versuche, dass keine reproduzierbaren Ergebnisse erzeugt werden konnten und sich eine Weiterleitung erzeugter Luftionen in die Fermentationsaufbauten, aufgrund der Kurzlebigkeit der Ionen, als nicht praktikabel erwies. Daher wurde das Konzept überdacht und eine neue Anlage zum Einbringen ionisierter Luft in das Fermentationssystem verwendet (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dies ermöglichte es die Ionisationssonde in einen Bypass zu integrieren. Die Fermentationsflüssigkeit (Medium und Mikroorganismen) wurde durch den Bypass geführt und stand somit in direkten Kontakt mit der erzeugten ionisierten Luft. Somit konnte ein Einbringen in die Flüssigkeit direkt am Entstehungsort der der ionisierten Luft gewährleistet werden. Die Anlage erlaubte weiterhin die stufenlose Variation der Einstellungen Hochspannung, Frequenz und Wirkungsgrad.

IL für brauereitechnologische Anwendungen:

Für die Vorversuche im Labormaßstab wurde eine Apparatur gemäß Abbildung 1 verwendet. Die Hochspannung für die Ionisation konnte stufenweise von 1000 V bis 3000 V eingestellt werden. In den Kasten wurden Agar-Platten gestellt, welche mit einer definierten Hefesuspension beimpft wurden. Nach der Bebrütung wurden die kolonie-bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Empirisch ausgewertet, konnte man sehen, dass mehr KBE wuchsen, wenn eine Hochspannung zwischen 2200 und 3000 V angelegt wurde. Wie oben bereits erwähnt, brachte dieser Aufbau keine reproduzierbaren Ergebnisse. Des Weiteren würde das Volumen der gewachsenen Kolonien nicht für Fermentationsversuche ausreichen. Diese Konstruktion sollte auch lediglich für die Vorversuche genutzt werden.

Für die Hauptversuche im Pilotmaßstab wurde der vorhandene Hefepropagator für die Dosierung der IL modifiziert. Das Belüftungs-/Ionisationsmodul wurde in einen Bypass eingebaut, so dass auch das Verfahrensprinzip der Hefepropagation in ein Umwälzverfahren geändert wurde (Abbildung 16). Dazu wurde eine Kreiselpumpe mit angeschlossenem Frequenzumformer in die Umwälzleitung eingebaut, um den Volumenstrom stufenlos regulieren zu können. Das Belüftungsmodul wurde zwischen Druckseite der Pumpe und Propagatoreinlauf installiert. Die Parameter Hochspannung und Frequenz für die Ionisation konnten jeweils stufenlos eingestellt werden. Bei ausgeschaltetem Transformator konnte das Ionisationsmodul ohne Umbaumaßnahmen für Referenzversuche (Belüftung ohne IL) verwendet werden. Der Transformator für die Ionisation war mit der Zeitschaltuhr für die Belüftungsintervalle gekoppelt, so dass beide Elemente gleichzeitig an- sowie ausgeschaltet wurden und ein Dauerbetrieb der Ionisationsröhre ohne Luftzufuhr vermieden wurde (Gefahr der

Ozonbildung).

Das gesamte System Hefepropagator und Ionisationsmodul wurden während des gesamten Berichtszeitraumes kontinuierlich weiterentwickelt. Als Beispiele sind zu nennen:

- Verwendung von hitze- und chemikalienresistenten, lebensmittelkonformen Materialien für die Ionisationsröhre
- Umbau der Befestigung für die Installation Ionisationsröhre (Schweißerarbeiten)
- Umbau der Probenahmestellen und -ventile in der Umwälzleitung
- Modifizierung der Einlaufleitung für eine optimierte Durchmischung im Hefepropagator

Aufgrund aufgetretener Biofilme und Kontaminationen mit Fremdhefen und Bakterien im Gesamtsystem waren diese Maßnahmen von Nöten. Insbesondere wurde das Hygienic Design der Ionisationsröhre optimiert.

Arbeitspaket 2 Erfassung des Einflusses auf geeignete Fermentationsparameter

Um erste Beurteilungen eines Einflusses ionisierter Luft auf die Fermentation treffen zu können wurden in der Anlage 1 sowohl Ionenkonzentrationen (mittels Ionometer IM 806) als auch entstehendes Ozon (mittels Ozonanalysators APOA-370) analysiert. Die Messung der Ionenkonzentration gestaltete sich schwierig und schwankte zwischen einzelnen Tagen aber auch innerhalb eines Tages erheblich. Bei einer Spannung von 1,75 kV lag die mittlere Kationenkonzentration zwischen 186094 Ionen/cm³ und 239923 Ionen/cm³. Die Anionenkonzentration schwankte zwischen 126255 Ionen/cm³ und 190894 Ionen/cm³ (Abbildung 3). Die Ozonkonzentrationen lagen direkt in der Behandlungskammer in einem Bereich zwischen 1,04 ppm und 2 ppm. Die Versuche zum Eintrag der Ionen mittels Leitungen in den Fermenter zeigten sich als nicht realisierbar. Daher wurde ein neuer Aufbau mit Anlage 2 etabliert. Hier konnte die Bestimmung der Ionenkonzentrationen als auch der Ozonwerte nur direkt an der Abluft erfolgen. Generell zeigten sich sehr schwankende Werte, die für eine Bewertung nur schwer herangezogen werden können. Es zeigte sich bei den Versuchen jedoch, die Tendenz, dass im Medium wesentlich weniger Ionen als in Wasser aufgefangen werden konnten. Dies spricht für eine schnelle Abreaktion der entstandenen Ionen mit Medienbestandteilen. Generell war ein leichter Anstieg im Redoxwert zu beobachten, eine eindeutige Veränderung des pH-Wertes konnte nicht aufgezeigt werden. Die ermittelten Ozonwerte bleiben bei den gewählten Einstellungen in der Abluft unter 0,1 ppm. Um weitere Einschätzungen der Wirkung durch einen Eintrag von ionisierter Luft zu bekommen wurde eine Vitamin C-Lösung mit unterschiedlichen Ionisationseinstellungen behandelt und deren antioxidative Kapazität mittels Photochemolumineszenz bestimmt. Dabei verringerten sich die antioxidativen Eigenschaften der Lösung in den Versuchsreihen mit zunehmendem Ionisationsgrad, also mit zunehmender Spannung und Frequenz (Abbildung 4). Dies spricht für eine Abreaktion mit den entstehenden und eingetragenen Ionen. Unter den gewählten Einstellungen wurden bei den Messungen der Ozonkonzentrationen direkt in der Abluft teils sehr hohe Werte, bis zum Maximum der Messgrenze (2 ppm) festgestellt. Dies deutet auf einen zu hoch eingestellten Wirkungsgrad hin, der in den Fermentationen entsprechend angepasst wurde.

Arbeitspaket 3 Ermittlung einer geeigneten Ionenkonzentration

Die Bestimmung geeigneter Ionenkonzentrationen für die Fermentationen wurde zunächst auf Nährbodenplatten mit der Anlage 1 (Abbildung 1) durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Methoden geprüft. Zunächst wurde mittels eines Spotttestes versucht die Ionenkonzentration einzugrenzen. Hier konnten erste Aussagen über Hemmkonzentrationen und Einwirkzeiten getroffen werden (Abbildung 5A). Anschließend wurde versucht eine quantitative Aussage über Hemmungen bei den ermittelten Einstellungen zu ziehen (Abbildung 5B). Ein Kontrollansatz ohne Ionisation diente als Referenz. In den Versuchen zeigten sich jedoch in Abhängigkeit der eingestellten Hochspannung zum Teil erhebliche Abweichungen und Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit. Weiterhin war es nicht möglich die ermittelten Werte auf die Fermentation in Flüssigmedium zu übertragen. Die Anlage 1

wurde daher nicht mehr für die Fermentationsversuche verwendet. Alternativ wurde Anlage 2 (Abbildung 2 und Abbildung 16) mit der Möglichkeit der stufenlosen Einstellung der Ionisationsparameter in einen Bypass integriert und für die weiteren Fermentationsversuche genutzt.

Für die brautechnologischen Untersuchungen wurden die Ionisationseinstellungen aus den Laborvorversuchen übernommen. So wurden für die ersten Vorversuche mit IL im Pilotmaßstab die Hochspannung von 2400 V und Frequenz von 50 Hz gewählt. Es konnte festgestellt werden, dass die Hefezellzahl (HZZ) und der intrazellulärer pH-Wert (ICP) tendenziell höher war als bei den Referenzversuchen ohne IL (nicht dargestellt). Bei einer Erhöhung der Hochspannung von mehr als 3000 V sowie einer Steigerung der Frequenz größer als 50 Hz wurde eine verzögerte Propagation des Hefesatzes um 2-3 Tage beobachtet (nicht dargestellt), was sich auch in der HZZ und Vitalität zeigte (ICP). Diese Erkenntnisse sollten auf die Hauptversuche übertragen werden.

Arbeitspaket 4.1 – 4.8

Die Versuche mit Ionisation während der Belüftung wurden mit 2400 V und 3000 V durchgeführt.

Aufgrund der ersten generierten Ergebnisse während der brauereitechnologischen Untersuchungen mit untergäriger Brauhefe (ug-Hefe, Stamm „VLB Nr.42“) wurde bereits in der ersten Phase des Forschungsvorhabens etwas vom ursprünglichen Plan abgewichen. Die Begründung lag darin, dass nach den ersten Wiederholungsversuchen, die Ergebnisse sowohl für Hefezellzahl (HZZ) nach Propagation bzw. während der Gärung, Fermentationsdauer (Gärtage) sowie intrazellulärer pH-Wert (ICP) der Hefesuspensionen sehr schwankten resp. variierten. Wiederholungen der Versuche sollten reproduzierbare Ergebnisse bringen. Jedoch konnten auch die Wiederholungsversuchen Propagation der Hefe und anschließendes Anstellen eines Gärtanks für die Vergärung von Vollwürze mit einer Stammwürze (Stw.) von 11,5 % keine neuen und v.a. eindeutigen Ergebnisse hervorbringen. Im Gegensatz wurde die Streuung sogar bestätigt. Dieses Phänomen zog sich wie ein roter Faden durch alle durchgeführten Versuchsreihen mit untergäriger (ug-Hefe) und obergäriger (og-Hefe) Brauhefe welche in Vollwürze propagiert und anschließend in Vollwürze oder High-Gravity-Brewing (HGB)-Würze mit einer Stammwürze von 18% angestellt wurde.

Bevor die einzelnen Ergebnisse besprochen werden, soll im Folgenden das Fazit, welches durchaus als Phänomen betrachtet werden kann, genannt werden:

- i) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell gesteigerte Vitalitäten auf, was wiederum zu einer verkürzten Fermentationsdauer führte.
- ii) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell weder gesteigerte noch reduzierte Vitalitäten auf, was wiederum auch zu keiner verkürzten Fermentationsdauer führte. Die Gärzeit war vergleichbar mit der Referenz.
- iii) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell reduzierte Vitalitäten auf, was wiederum auch zu einer verkürzten Fermentationsdauer führte. Im Extremfall „blieb sogar die Gärung stecken“, d.h. die Hefen setzten sich bei einem Vergärungsgrad von 50-60 % frühzeitig ab (flockulieren), so dass keine vollständige Extraktabnahme mehr möglich war. Es könnte somit sein, dass die IL Einfluss auf das Flockulationsverhalten der Hefe hatte.

Ab Abbildung 17 sind die Ergebnisse aus den brauereitechnologischen Untersuchungen dargestellt. Die in den Diagrammen gezeigten Fehlerbalken geben den Minimum- und Maximumwert an, um die Streuung zu verdeutlichen. Es wurden im Minimum sechs Versuche bzw. Neuansätze mit frischer Laborhefe durchgeführt. Die Parameter während aller Versuche waren gleich:

- Beimpfen des Propagator mit einer HZZ von $10\text{-}15 \times 10^6/\text{ml}$ in Vollwürze (Stw.11,5%), $T = 16^\circ\text{C}$
- Ende der Propagation / Ernte des Propagators nach Erreichen des Endvergärungsgrades (EVG)
- Belüftungsintervalle: 10 min Pause / 10 min Belüftung
- Anstellen des Gärtanks (ZKT) mit ug-Hefe $15\text{-}20 \times 10^6/\text{ml}$ in Vollwürze, $T = 14^\circ\text{C}$

- Anstellen des Gärtanks (ZKT) mit ug-Hefe $25\text{-}30 \times 10^6/\text{ml}$ in HGB-Würze, $T = 14^\circ\text{C}$
- Anstellen des Gärtanks (ZKT) mit og-Hefe $10\text{-}15 \times 10^6/\text{ml}$ in Vollwürze, $T = 22^\circ\text{C}$
- Anstellen des Gärtanks (ZKT) mit og-Hefe $25\text{-}30 \times 10^6/\text{ml}$ in HGB-Würze, $T = 22^\circ\text{C}$
- Ende der Gärung bei Erreichen des Endvergärungsgrades (EVG)

Die HZZ nach der Propagation der ug-Hefe ist in Abbildung 18 und der og-Hefe ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Mittelwerte waren jeweils im vergleichbaren nicht signifikanten Bereich von $220 - 240 \times 10^6/\text{ml}$ sowie $180\text{-}190 \times 10^6/\text{ml}$. Die größte Streuung wurde bei der Propagation mit IL bei 2400 V beobachtet. Der Maximalwert lag bei $350 \times 10^6/\text{ml}$ und war damit um ca. $80 \times 10^6/\text{ml}$ höher als beim Referenzversuch. Die erreichten Minimalwerte für die HZZ nach der Propagation lagen im vergleichbaren Bereich bei $180\text{-}190 \times 10^6/\text{ml}$. Ebenso stark variierend waren die dazugehörigen ICP-Werte (Abbildung 17) der jeweiligen Hefesuspensionen. Wie erwünscht, waren die Mittelwerte im vergleichbaren Bereich mit 6,2 -6,3, was als sehr gut und sehr vital beurteilt werden kann. Betrachtet man jedoch die Streuung, wurden ICP-Werte bis 6,5 und 5,6 bei mit 2400 V und 3000 V IL-behandelter Propagation gemessen. Die Streuung bei der Referenz-Hefe war nicht so stark (ICP 5,9-6,5). Wie angesprochen, wirkten sich die Ergebnisse für HZZ und ICP auch auf die Fermentationsdauer (Abbildung 19, Abbildung 21) aus. So wurde jeweils mit vitalerer Hefe durch IL-Behandlung bei 2400 V die Dauer um einen Gärtag verkürzt werden. Mit weniger vitaler Hefe hingegen dauerte Gärung 3-4 Tage länger in Vollwürze und sogar 7-9 Tage länger in HGB-Würze. Es muss aber auch erwähnt werden, dass mit IL-Behandelte Hefesätze sogar „stecken blieben“ und nicht bis zum EVG vergären konnten. Diese Versuche wurden abgebrochen.

Die Analysenergebnisse der Biere, welche mit ug-Hefe hergestellt wurden, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 5, Tabelle 6) egal wie lange die Fermentationsdauer war.

Bezüglich der og-Hefe (Stamm og68) schien die IL einen etwas größeren negativen Einfluss auf die Hefequalität gehabt zu haben. Zwar konnten auch hier die genannten drei Phänomene beobachtet werden, jedoch waren HZZ und Fermentationsdauer tendenziell schlechter als bei den Versuchen mit der Referenzhefe, bei denen die Streuungen weniger stark auftraten. Die Fermentationsdauer in Vollwürze betrug im Mittel 4 – 5 Tage bei der Referenz und 3 bis 6 Tage bei IL-behandelter Hefe. Größer waren die Unterschiede in der Vergärung von HGB-Würze. Nichtbehandelte Hefe brauchte 6-8 Tage und IL-behandelte Hefe 7-15 Tage (Abbildung 24, Abbildung 25). Auch im Falle der og-Hefe, welche mit IL-vermehrt und in HGB-Würze angestellt wurde, konnten „stecken gebliebene Gärungen“ verzeichnet werden. Die hergestellten Biere unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 7, Tabelle 8).

Im Zuge dieser Versuchsreihen mit og-Hefe wurde versucht, eine durchflusszytometrische Hefeanalytik analog der ug-Hefe aufzubauen. Als Vorlage diente die Arbeit von Hutter (Hutter, K.J.; Flusszytometrische Prozesskontrolle obergäriger Betriebshefen, Mschr. f. Brauerei 2001, Nr. 3/4, 48-54). Dieses Vorhaben gestaltete sich als sehr schwierig. Oberstes Ziel musste es sein, die Zellsprossverbände, welche bei der og-Hefe durch Proteine verbunden sind, aufzulösen. Dieses Vorhaben konnte im Berichtszeitraum nicht verwirklicht werden.

Arbeitspaket 5 Einsatz in der Milchsäurefermentation

Um mögliche positive Einflüsse von ionisierter Luft auf den Fermentationsverlauf und Stoffwechsel von Milchsäurebakterien zu prüfen wurde während der logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde die Ionisation im Bypass angestellt. Als Referenz diente eine Fermentation bei der gleiche Bedingungen eingehalten wurden, aber keine Ionisation angestellt wurde. Die Begasung erfolgte aber für den identischen Zeitraum über den Bypass. Für die gewählten Einstellungen zeigten sich keine Unterschiede im Wachstumsverlauf (OD und Gesamtzellzahl über Coulter Counter) zwischen Fermentation mit Ionisation und der Referenzfermentation ohne Ionisation (Abbildung 6). Ebenso verliefen der Zuckerverbrauch und die Milchsäurebildung vergleichbar (

Abbildung 7). Die elektrooptischen Messungen mittels Elotrace, zur Bestimmung von Zellaktivität, Stresslevel, Zellgröße und morphologischen Änderungen, zeigten keine Unterscheide durch die Ionisationseinwirkung im Vergleich zur Referenzfermentation. Nach dem Arbeitspaket Strategieentwicklung zur Prozessanpassung (Arbeitspaket 8) wurde weiterhin eine eventuell

verbesserte Lagerstabilität, hervorgerufen durch eine mögliche Stressantwort durch Ionisation, getestet. Dazu wurden nach den Fermentationen Lyophilisate durch Gefriertrocknung hergestellt und zu relevanten Prozessschritten sowie Lagerzeitpunkten die Lebendzellzahlen bestimmt und miteinander verglichen. Durch die Behandlung mit ionisierter Luft konnte keine Verbesserung der Lagerstabilität im Vergleich zur Referenz erreicht werden (

Tabelle 2).

Arbeitspaket 6 Einsatz zur kontrollierten Sporeinduktion

Da *Bacillus subtilis* zu einem der bedeutendsten industriellen Produktionsstämmen zählt, ist das Interesse an optimierten Herstellverfahren hier besonders groß. Im Arbeitspaket sollte daher geprüft werden inwiefern sich die Belüftung mit ionisierter Luft einsetzen lässt um auf den Fermentationsprozess und die Sporenbildung von *Bacillus*-Kulturen Einfluss zu nehmen. Die Versuche zeigten erste Hinweise auf eine Beeinflussung der Wachstumsrate und Sporenbildung in Abhängigkeit der angelegten Ionisationsstärke. Bei Belüftungen mit ionisierter Luft bei angelegter Spannung zwischen 3,0 bis 3,6 kV wurden, im Vergleich zur Referenzfermentation ohne Ionisation, keine Auswirkungen auf die Wachstumsverläufe festgestellt. Bei den entsprechenden Kulturen waren jedoch im Laufe der Zeit nur intrazellulär gebildete Sporen mit fehlender Sporenfreisetzung festzustellen. Bei der kurzfristigen Belüftung mit höherer angelegter Spannung von 4,8 kV zeigten sich Anzeichen für eine Hemmung im Wachstumsverlauf (Abbildung 8). Diese Hemmung war jedoch nicht vollständig und führte nicht zum vollständigen Absterben der Kulturen. Nach Beendigung der Behandlung mit ionisierter Luft und gewisser Regenerationszeit war anschließend wieder ein Anstieg in der Zellzahl zu beobachten. Bei einer länger anhaltenden Belüftung mit ionisierter Luft bei 4,8 kV zeigten sich Hinweise auf eine komplette Abtötung der Kulturen und ein Ausbleiben der Sporulation. Da sich somit deutliche Hinweise auf eine mögliche gezielte Beeinflussung der Fermentation, insbesondere Wachstumsverlauf, von *Bacillus subtilis* zeigten wurden nach dem Arbeitspaket 8 (Strategieentwicklung zur Prozessanpassung) weitere Versuche zur Beeinflussung von *Bacillus subtilis* und zugehöriger Sporenbildung durchgeführt (Arbeitspaket 9). Dabei wurden die Ionisationswirkung, durch Anpassung der Einstellungen Wirkungsgrad, Spannung und Frequenz weiter variiert und deren Auswirkung betrachtet. Eine Zusammenfassung gibt Tabelle 3. Bei zu hoher Ionisation wurden eindeutig letale Wirkungen festgestellt. Dies zeigte sich sowohl in der Partikelzahl, als auch im ausbleibenden Stoffwechsel (Glucoseverbrauch) (Abbildung 9) aber auch in den flowzytometrischen Messungen mittels Propidiumiodid und fluoreszenzmikroskopischen Betrachtungen (Abbildung 10, Abbildung 11). Eine Schädigung der Zellen mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte dagegen nicht aufgezeigt werden (Abbildung 12). Um die letalen Auswirkungen zu verhindern wurden die Ionisationseinstellungen weiter angepasst und die Ionisationswirkung reduziert. Es konnten so Einstellungen ermittelt werden, die eine Beeinflussung der Wachstumsphase zuließen. So konnte das Wachstum und der Stoffwechsel der Kultur hinausgezögert werden (Abbildung 13). Es konnte nicht vollständig geklärt werden ob der Effekt durch eine gewisse Abtötung an Zellen erreicht wurde oder die Kultur nur stressbedingt in ihrem Wachstumsverlauf gehemmt wurde. Bei allen Fermentationen mit Behandlung von ionisierter Luft, in denen sich keine letale Wirkung zeigte, konnte eine höhere Sporenausbeute im Vergleich zur Referenzfermentation ohne Einwirkung von ionisierter Luft erreicht werden (Abbildung 14). Im Vergleich zur Referenzfermentation konnten dabei eine achtfach höhere Sporenkonzentration nach 25 Stunden nachgewiesen werden. Die aus den jeweiligen Fermentationen gewonnenen Sporensuspensionen wiesen keine erhöhte Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid auf (verweis).

Arbeitspaket 7 Wirkung auf die Bildung von Gluthation

Ziel des Arbeitspaketes war die Untersuchung der Wirkung von ionisierter Luft auf die Gluthation-Synthese der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurden entsprechende Fermentationen bei verschiedenen Spannungen im Bereich von 3,6 kV bis 4,2 kV und variablen Frequenzen durchgeführt. Zum Vergleich erfolgte eine Fermentation ohne ionisierte Luft (Referenz). Gleichzeitig wurden verschiedene Methoden etabliert, um die Auswirkungen der ionisierten Luft während der Fermentationen quantifizieren zu können. So wurden flowzytometrische Methoden zur Bestimmung

der Viabilität (Pi,DiBac(4)) und Stressfaktoren (DHE) bzw. mitochondrialer Aktivität (Rh123) ausgearbeitet. Weiterhin wurde ein Assay zur Quantifizierung von Glutathion etabliert um Aussagen über oxidative Schutzmechanismen treffen zu können. Bei den untersuchten Ionisationsgraden zwischen 3,6 kV und 4,2 kV sowie variablen Frequenzen und Begasungsraten zeigten sich im Vergleich zur Referenz um 16 bis 43% niedrigere Glutathiongehalte (Abbildung 15). Dies lässt auf eine Reaktion des antioxidativen Schutzmechanismus der Hefe mit Glutathion als antioxidativer Schutzsubstanz schließen. Weiterhin wurde je nach Stärke der Ionisation variierende Wachstumsverläufe (hemmend als auch fördernde) beobachtet.

Arbeitspaket 8 Strategieentwicklung zur Prozessanpassung

Aufgrund der aufgetretenen Probleme der reproduzierbaren Belüftung mit ionisierter Luft wurde zunächst die technische Umsetzung der Belüftungszufuhr mit der Ionisationssonde optimiert um im weiteren Verlauf zuverlässige Versuchsabläufe garantieren zu können. Weiterhin wurden die bisherigen Ergebnisse der vorangegangenen Arbeitspakete zusammengefasst und auf ihre prozessbeeinflussende sowie wirtschaftliche Bedeutung bewertet. Dabei wurden, für die abschließenden Arbeiten und Optimierungen, die Applikationen ausgewählt, die eine gute und sinnvolle Einflussnahme der Fermentationsprozesse erwarten ließen (siehe nächstes Arbeitspaket).

Arbeitspaket 9 Fermentationsoptimierung mit ionisierter Luft

In die Ausarbeitung der Strategie zur Optimierung der Fermentationsprozesse wurden daher die Anpassungen zur Beeinflussung der Milchsäurebakterien aufgenommen und die geplanten Ziele erweitert. So werden Versuche zur Untersuchungen einer eventuell verbesserten Lagerstabilität, hervorgerufen durch eine mögliche Stressantwort durch Ionisation, berücksichtigt (Ergebnisse im Abschnitt Arbeitspaket 5 integriert). Aufgrund der vielversprechenden Beeinflussung der ionisierten Luft auf die Bacilluskultivierung und Sporenbildung wurden auch in diesem Bereich weitere Optimierungen vorgenommen. Ziel war es die bisherigen aufgewiesenen Effekte genauer aufzuklären und konkrete Verfahren zur Beeinflussung und Steuerung der Biomassebildung von *Bacillus subtilis* aufzuzeigen. Eine mögliche gezielte Steuerung und Synchronisierung der Kulturen durch ionisierte Luft, sowie damit zusammenhängende Beeinflussung zur Sporenbildung, standen dabei im Vordergrund (Ergebnisse im Abschnitt Arbeitspaket 6 integriert).

Arbeitspaket 10 Abschlussbericht

Während der Projektlaufzeit wurde kontinuierlich der wissenschaftliche Fortschritt dokumentiert. Dies geschah in Form von Einzelberichten, angepasst an die einzelnen Arbeitsschritte. In diesen wurden Ergebnisse, Änderungen, Versuchsanordnungen etc. exakt dargestellt, erörtert und diskutiert. Gegen Projektende wurde ein ausführlicher Abschlussbericht aller Einzeldokumente inklusiver aller gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst. Die weitere Vorgehensweise nach Projektabschluss wurde ebenfalls erarbeitet.

3. Bewertung der erzielten Ergebnisse

3.1 Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages

Biotechnologische Untersuchungen

Die Integration einer Anlage zum Eintrag ionisierter Luft in Fermentationsprozesse gestaltet sich zu Beginn des Projektes aufwendiger als angedacht. Zunächst wurde mit einem Ionisationssystem mit eingebauter Isolatorröhre gearbeitet, dass jedoch mit sehr schwankenden Werten an Ionenkonzentrationen und teils sehr hohen Ozonwerten einhergingen. Weiterhin waren die Einstellmöglichkeiten der Ionisationsparameter (Spannung) nur sehr begrenzt und die Weiterleitung der ionisierten Luft über Leitungen nicht vielversprechend. Mit einer neuen Anlage gelang es nach einigem Optimierungsbedarf (Hygienic Design, Luftzufuhr) schließlich die Ionisationssonde in einem Bypass des Fermenters zu integrieren. Dies ermöglichte es auch wie vorgesehen zu beurteilen ob bzw. welche Fermentationsparameter durch eine Behandlung mit ionisierter Luft gegebenenfalls beeinflusst werden. Durch die Verzögerungen und anfänglichen technischen Probleme konnte das Ziel des Arbeitspaketes zur Ermittlung einer geeigneten Ionenkonzentration für weitere Fermentationen nicht vollständig erreicht werden. In diesem sollten für weitere Stämme *E. Coli*, *Cupriavidus necator*, *Gluconobacter oxydans* möglichst geeignete Ionenbehandlungen ausgearbeitet werden. Dies war im Rahmen des Projektes jedoch nicht möglich, so dass der Focus auf die hauptsächlich relevantesten Arbeitspakete und Mikroorganismen (Milchsäurebakterien, Bacillus, Hefe mit erhöhter Glutathionbildung) gelegt wurde. So konnte ein Einfluss auf die Fermentation von Milchsäurebakterien durch ionisierte Luft wie vorgesehen geprüft werden. Eine Förderung an Biomasse- bzw. Milchsäurebildung wurde zunächst nicht festgestellt. Die ursprünglich vorgesehenen Fragestellungen wurden erweitert und sollten eine mögliche Verbesserung der Überlebensraten während Gefriertrocknungsprozessen bzw. anschließender Lagerung aufgrund einer möglichen Stressantwort nach Behandlung mit ionisierter Luft klären. Die vergleichenden Stabilitätsstudien ergaben unter den getesteten Versuchsbedingungen jedoch keine Veränderungen bzw. Optimierungen des verwendeten Lactobacillus. Denkbar ist es, dass in den Versuchen noch nicht mit den optimalsten Ionisationseinstellungen gearbeitet wurde. Bei den Untersuchungen zur Wirkung auf die Bildung von Glutathion konnte, wie vorgesehen, durch eine Reihe an Versuchen aufgezeigt werden, dass die Redoxbalance der Hefe in den Fermentationen mit ionisierter Luft beeinflusst wurde. Es wurden bei Behandlung mit Ionisation durchgehend niedrige Glutathionkonzentrationen nachgewiesen. Dies deutete darauf hin, dass diese Substanz wesentlich zum Oxidationsschutz der Hefe beiträgt. Eine Erhöhung der Glutathionkonzentration mittels milden Stresses konnte durch ionisierte Luft entsprechend nicht aufgezeigt werden. Bei der Untersuchung zur Auswirkung von Ionisation auf *Bacillus subtilis* konnten durch sukzessive Anpassung der Ionisationseinstellungen (Zeit, Spannung, Frequenz, Wirkungsgrad) sowohl eindeutig letale als auch NOEL-nahe (höchste Dosis bei der keine negativen Effekte beobachtet werden) Bedingungen ermittelt werden. Dies ermöglichte es wie geplant Einfluss auf die Fermentation und die Sporenbildung der Kultur zu nehmen. Alle Fermentationen konnten durch die während des Projektes etablierte Analytik umfassend begleitet werden. Dabei zeigten sich vor allem die zahlreichen zusätzlich durchgeführten flowzytometrischen Messungen verschiedener Parameter als zielführend. Die wesentlichen vorgegebenen Zielstellungen konnten somit im Projekt erreicht werden.

Brauereitechnologische Untersuchungen

Für die Integration des Ionisationsmoduls sowie dessen Optimierung des Hygienic Designs und Anpassung des Propagationsverfahrens wurde mitunter der größte Aufwand betrieben. Entscheidend war, dass die Kontaminationsquellen ausfindig gemacht wurden und mit dem Projektpartner EmTec GmbH eine optimierte Anlage geschaffen wurde insbesondere in Bezug auf die Reinigbarkeit.

Die erste Versuchsreihe deutete bereits das erhoffte Ergebnis an, nämlich dass mit IL-belüftete Hefe bei einer Spannung von 2400 V und Frequenz 50 Hz die Vitalität und dadurch die Gärleistung gesteigert werden könnte. Jedoch nach den ersten Wiederholungsversuchen der gleichen

Versuchsreihe wurden divergierende und widersprüchliche Ergebnisse erzeugt. Diese sollen hier, wie bereits unter Punkt 2 (Arbeitspakete 4.1-4.8) aufgelistet, nochmals gezeigt werden:

- i) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell gesteigerte Vitalitäten auf, was wiederum zu einer verkürzten Fermentationsdauer führte.
- ii) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell weder gesteigerte noch reduzierte Vitalitäten auf, was wiederum auch zu keiner verkürzten Fermentationsdauer führte. Die Gärzeit war vergleichbar mit der Referenz.
- iii) Die Hefen, die während der Propagation mit IL belüftet wurden, wiesen nach der Propagation tendenziell reduzierte Vitalitäten auf, was wiederum auch zu einer verkürzten Fermentationsdauer führte. Im Extremfall „blieb sogar die Gärung stecken“, d.h. die Hefen setzten sich bei einem Vergärungsgrad von 50-60 % frühzeitig ab (flockulieren), so dass keine vollständige Extraktabnahme mehr möglich war. Es könnte somit sein, dass die IL Einfluss auf das Flockulationsverhalten der Hefe hatte.

Anfangs wurde noch von individuellen Fehlern während der Versuchsdurchführung ausgegangen. Daher wurden mehrere Wiederholungen durchgeführt. In Minimum wurden 6 und bei „stecken gebliebener Gärung“ 8-9 Versuche Wiederholungen mit frischer Laborhefe vorgenommen. Jedoch bestätigten sich diese „drei Phänomene“.

Durch die oftmals angesetzten Versuchswiederholungen mit der ersten Hefeführung und den unterschiedlich langen Fermentationszeiten kam es zu Überschneidungen in der Belegung des Propagators für die Erntehefebehandlung sowie bei den Belegungszeiten der Gärtanks, was die Kapazitäten bzgl. des vorhandenen Equipments an der VLB überstieg.

Daher wurde im folgenden Projektverlauf der Fokus auf die Propagationshefe und die erste Führung gelegt. Neben regelmäßiger Erfassung der HZZ, Extraktabnahme, pH-Wert konnten insbesondere die die Proben untergäriger Brauhefe durchflusszytometrisch analysiert werden. Hervorzuheben ist die Analyse des ICP. Jedoch muss auch erwähnt werden, dass diese Methode noch sehr viele Störfaktoren beinhaltet, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Im speziellen muss die Probenaufbereitung der Hefesuspension und nötige Variationen der Einstellungen am Durchflusszytometer (z.B. Detektorspannung, Einteilung der Region u.a.) genannt werden. Des Weiteren sollten die Hefe-Zellinhaltsstoffe Glycogen und Trehalose analysiert werden. Eine qualitative aber nicht quantitative Bestimmung mittels Durchflusszytometrie wurde mit den Analysen-Sets der Firma Sysmex-partec durchgeführt. Reproduzierbare Ergebnisse konnten jedoch nicht generiert werden, womit eine Etablierung dieser Methoden im Berichtszeitraum nicht erfolgen konnte. Ebenso verhält es sich mit der durchflusszytometrischen Analyse obergäriger Brauhefen. Größte Herausforderung war und ist die Vereinzelung der Zellsprossverbände. Das konnte im Berichtszeitraum nicht erreicht werden, was somit eine durchflusszytometrische Analyse schier unmöglich machte.

Als Fazit kann gesagt werden, dass die Propagationsversuche mit ionisierter Luft (2400 V, 50 Hz) sehr vielversprechend waren. Die gegensätzlichen Ergebnisse bieten sehr viel Raum für weitere Untersuchungen in Hinblick auf die Optimierung des Propagationsverfahrens (Variation der Belüftungsintervalle u.a.), Ionisatoreinstellung sowie durchflusszytometrische Hefeanalytik. Tendenziell wurde das angestrebte erreicht.

3.2 Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

An dem abgeschlossenen Projekt wirkte neben dem Antrag stellenden Forschungsinstitut für Bier- und Getränketechnologie (FIGBP) das Forschungsinstitut für Biotechnologie und Wasser (FIBW) mit.

Die Projektleitung lag für die brautechnischen Versuche beim FIGBP und für die biotechnologischen Versuche beim FIBW und wurde von wissenschaftlichem Personal mit akademischem Abschluss (Dr.-Ing.) und bzw. Diplom-Ingenieure der Institute geleistet. Darüber hinaus waren weitere Diplomingenieure sowie eine Laborfachkraft am Projekt beteiligt.

Die Projektleiter waren neben ihrer betreuenden und beratenden Funktion im Verlauf des gesamten Projektes von besonderer Bedeutung auf Grund ihrer guten Vernetzung innerhalb der Brau-, Getränke- und Zulieferindustrie sowie zu wissenschaftlichen Gremien im In- und Ausland. Den Projektleitern oblag, das laufende Vorhaben bereits während der Durchführung in den entsprechenden Netzwerken bekannt zu machen. So wurden Veröffentlichungsgelegenheiten organisiert und wertvolle Mitarbeit und Unterstützung bei der Erarbeitung von Vorträgen, Berichten und Präsentationen geleistet. Ohne diese Beiträge im erfolgten Umfang wären die Durchführung des Vorhabens und ein Wissenstransfer in dieser Weise nicht möglich gewesen.

Die Projektleitung war mit der Gesamtkoordination aller Aspekte rund um die einzelnen Arbeitspakete betraut. Insbesondere die Planung und Abwicklung der durchgeführten Versuche sowie die Beschaffung vorhabenbezogener Geräte, Materialien oder Dienstleistungen wurde so organisiert. Darüber hinaus war sie unter anderem für die projektbegleitenden Berichte verantwortlich, erstellte vorhabenbezogene Präsentationen und hielt Vorträge.

Am arbeitsintensivsten war generell die Durchführung der verschiedensten Versuche zur Ermittlung geeigneter Ionisationseinstellungen in den brautechnischen und biotechnologischen Bereichen und den jeweiligen Durchführungen der Gäransätze bzw. Fermentationen. An der Durchführung der Vielzahl an Messreihen und zu analysierenden Parametern waren vor allem die Diplomingenieure und die Laborfachkraft beteiligt.

Die geleistete Arbeit war in Umfang und Form notwendig für einen erfolgreichen Abschluss des Projekts.

3.3 Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Personalausgaben als größte Position des zahlenmäßigen Nachweises ergeben sich aus den oben aufgeführten Tätigkeiten und waren gemäß der Zielsetzung des Antrages erforderlich.

Das benötigte Material wurde entsprechend dem tatsächlichen Verbrauch im Projekt beschafft.

Als Einzelgeräte, die projektbezogen angeschafft wurden, sind das Durchflusszytometer und der Laborfermenter zu nennen. Die Investition des Durchflusszytometers ermöglichte die Entwicklung verschiedener Methoden zur schnellen Beurteilung und Quantifizierung der Wirkung von ionisierter Luft in den entsprechenden Prozessen. Mit Hilfe dieser projektbegleitenden Off-Line Analytik konnte die Bearbeitung des Projektes sichergestellt werden. Mit Hilfe des Laborfermenters konnten die zahlreichen zielführenden Gärversuche und Fermentationen durchgeführt werden, ohne auf die schon an der Kapazitätsgrenze laufenden Betriebsmittel (bisher in Kooperation mit TU Berlin) zurückgreifen zu müssen. Ohne die betrieblichen Abläufe zu beeinträchtigen konnten die angestrebten Projektziele so fristgerecht erreicht werden.

4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

4.1 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung, Anwendungspotenzial, Anwendungsbereiche in der mittelständigen Wirtschaft

Wissenschaftlich

Die wissenschaftliche Bedeutung des Forschungsvorhabens lag zum einen in der Erlangung von neuen Erkenntnissen zum Einsatz von ionisierter Luft in brauerei- und biotechnologischen Anwendungen. Dabei wurde sowohl bei den Gäransätzen als auch bei unterschiedlichsten Fermentationen die Auswirkung bei variierendem Eintrag an ionisierter Luft miteinander verglichen. Auch die Etablierung der begleitenden flowzytometrischen Messungen (Viabilität, Vitalität, Stressfaktoren) ist hier zu erwähnen. Die Daten erlauben es je nach Anforderung auf die unterschiedlichen Methoden zurückzugreifen. Ein Know-how-Gewinn konnte ebenfalls durch die verschiedenen untersuchten Mikroorganismen und deren unterschiedlicher Reaktion bei verschiedenen Ionisationseinstellungen erlangt werden. Ein interessanter Focus, der sich im Zuge des Projektes ergab, ist vor allem bei der Beeinflussung der Fermentationen von Bacillus-Kulturen und deren Sporenbildung zu sehen. Hier wurden erstmals neue Ansätze zu einer möglichen Synchronisierung und Sporenbildung durch ionisierte Luft aufgezeigt. Vor diesem Hintergrund stellen sich hier neue wissenschaftliche Herausforderungen und Fragestellungen. Die entwickelten Methoden, bearbeiteten Arbeitspakete als auch die erhaltenen Daten bieten somit Grundlagen für neue Forschungsansätze.

Des Weiteren konnte in Einzelversuchen gezeigt werden, dass der Einsatz der IL in der Hefepropagation in der Brauerei auch einen positiven Effekt auf die Vitalität der Hefe haben kann und zu einer beschleunigten Vergärung der Brauerei-Würzen führt. Interessant hingegen sind die Ergebnisse aus den Wiederholungsansätzen. Hier konnte ein verändertes Flockulationsverhalten festgestellt werden. Ein neuer Forschungsansatz wäre zum einen die Untersuchung der Hefezellmembran und Zellinhaltsstoffe nach Behandlung mit IL und zum anderen eine optimierte Parametereinstellung der Belüftung mit IL während der Propagation (Hochspannung, Frequenz, Belüftungsintervalle).

Wirtschaftlich

Im Projekt wurde aufgezeigt, dass es für verschiedene Projekte durchaus denkbar ist durch eine Behandlung mit ionisierter Luft wichtige Parameter der aeroben Kultivierung zu optimieren und so effiziente und wirtschaftlich rentable Prozesse zu erhalten. Vor allem die Beeinflussung von Bacillus-Fermentationen führte zu höheren Sporenausbeuten. Dies könnte für eine erhöhte Produktion von Sporen, die unter anderem als Indikator für Desinfektionsmaßnahmen eingesetzt werden, dienen.

Eine verkürzte Fermentationsdauer in der Brauerei ohne Qualitätseinbußen beim Bier ist in der Praxis von großer Bedeutung. Kapazitätserhöhung und Energieeinsparungen wären die Folge. Jedoch aufgrund der doch sehr widersprüchlichen Ergebnisse trotz vieler Wiederholungen kann dieses Verfahren noch nicht in die Praxis umgesetzt werden. Hierzu bedarf es noch viele Optimierungsmaßnahmen und Untersuchungen.

Im Zuge des Projektes wurden auch letale Auswirkungen aufgezeigt, so dass es vorstellbar ist ionisierte Luft zukünftig auch zu Desinfektionszwecken effektiver einzusetzen und somit bisher teure und Maßnahmen (z.B. Biozideinsatz) zu reduzieren.

4.2 Darlegung der Ergebnisverwertung (eigene Nutzung, Technologietransfer, Know-how-Verkäufe u.a.)

Die Forschungsergebnisse bieten eine wertvolle Grundlage für neue Forschungsansätze und Applikationsmöglichkeiten seitens der VLB Berlin. Das generierte Wissen zur Wirkung von ionisierter Luft in den Gäransätzen, sowie das erweiterte Wissen zu möglichen hormetischen Effekten auf unterschiedlichste Mikroorganismen und Fermentationsprozessen wird daher in weiteren Vorhaben der VLB genutzt. Schon zum jetzigen Zeitpunkt wurden einige Inhalte des Projektes in Artikeln und

Vorträgen veröffentlicht. Dabei wurden die zahlreichen Kanäle der VLB Berlin im In- und Ausland genutzt, um entsprechende Informationen, bzw. Ergebnisse zu transferieren. An dieser Stelle ist das große Interesse hervorzuheben, welches die Veröffentlichungen hervorriefen. Die Vorhabenergebnisse werden auch in Zukunft durch die der VLB gegebenen Möglichkeiten des Technologietransfers publiziert. Beispielhaft sind hier Seminare, Fachartikel, Beratungstätigkeiten und universitäre Lehrstühle zu nennen.

4.3 Perspektiven und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten

Durch die aufgewiesene desinfizierende Wirkung erscheint es sinnvoll die Ionisationsanlage weiter zu entwickeln um alternative Desinfektionsmaßnahmen in wässrigen Systemen zu entwerfen und zu etablieren. Hierbei sollte der Fokus auch auf dem Einbau einer automatischen Regelung der Ionisationseinstellungen liegen. Im Projekt wurden erste Ansätze zur gezielten Steuerung des Wachstums einer Bacillus-Kultur und deren Sporenbildung aufgewiesen. Hieraus ergeben sich interessante Ansätze, die weiter verfolgt werden sollten. Von Interesse ist hier vor allem die Frage ob sich der Eintrag ionisierter Luft eignet um eine Synchronisierung der Kultur herbeizuführen. Dies würde dazu führen, dass sich alle Zellen möglichst im gleichen Stadium und Zustand befinden und eine gezielte gleichzeitige Sporenduktion ausgelöst werden kann. Dies könnte die bisherigen Schwankungen der Resistenzeigenschaften in verschiedenen Chargen von Sporenpräparaten verhindern. Auch wenn im Projekt durch ionisierte Luft keine Verbesserung der Resistenzeigenschaften der gewonnenen Sporensuspensionen gegenüber Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden konnte, sollten Resistenzen gegenüber anderen Faktoren (z.B. Hitze) als auch das Auskeimverhalten genauer geprüft werden.

Generell erscheint es sinnvoll den Einsatz ionisierter Luft zur Herbeiführung hormetischer Effekte bzw. Stressreaktionen in anderen biotechnologischen Anwendungen und für andere relevante Mikroorganismen zu prüfen.

Wie bereits erwähnt, scheint der Einsatz der IL in der Hefepropagation auch durchaus positiven Einfluss auf die Hefequalität zu haben. In weiteren Versuchen zur Optimierung des Verfahrens durch variierte Parametereinstellung könnten reproduzierbare Ergebnisse generiert werden.

5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabens- ergebnisse

Es wurden keine Patente oder Schutzrechte angemeldet.

6. Zusammenstellung aller erfolgten, bzw. geplanten Veröffentlichungen

Vorträge:	VLB-Oktobertagung 2015: Pahl, R.; Einsatz ionisierter Luft in Mälzerei und Brauerei VLB-Veranstaltungen 2017 geplant (Frühjahrstagung oder Oktobertagung)
Zeitschriftenbeiträge:	ein Artikel in einer deutschen Fachzeitschrift 2017 geplant (VLB Forum, Brauwelt, Brauindustrie)
Posterbeiträge:	nicht geplant

7. Danksagung

Die Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei (VLB) in Berlin e.V., Seestraße 13, 13353 Berlin, möchte sich ganz herzlich bei der EURONORM mit dem Förderprogramm Inno-Kom-Ost und bei dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Bewilligung und Finanzierung des Forschungsvorhabens VF130040 bedanken.

Besonders herzlich bedanken möchten wir uns bei unserem Projektpartner für die tatkräftige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und unzählige Ratschläge zum Thema und Wirken der Luftionisation:

- EmTec Emmerich Technologie (Lutherstadt Wittenberg) für die Bereitstellung der Ionisationsmodule für die brau- und biotechnologischen Untersuchungen

Dipl.-Ing. Steffen Emmerich (Geschäftsführer)

Insbesondere möchten wir uns bei allen beteiligten Personen danken. Namentlich zu nennen sind:

Thomas Gieche (VLB Berlin; FIBGP) und Dr.-Ing. Martin Hageböck (VLB Berlin, FIBW) für die Betreuung der Versuche.

Die Masteranden, Bacheloranden und Praktikanten: Claudia Rolle (Beuth HS, Berlin), Fabian Bürger (Beuth HS, Berlin), Nicola Schaller (Beuth HS, Berlin), Adina Meyer (HTW Berlin), Olga Spagin (HTW Berlin) und Jun Kubota (Asahi Breweries, Tokio, Japan)

Dr.-Ing. Roland Pahl Leiter als Leiter des VLB-Forschungsinstitutes für Bier- & Getränkeproduktion (FIBGP).

Dr.-Ing. Katrin Schreiber als Leiterin des VLB-Forschungsinstitutes für Biotechnologie & Wasser (FIBW).

8. Anhang

Konstruktion/Implementierung des Versuchsaufbaus

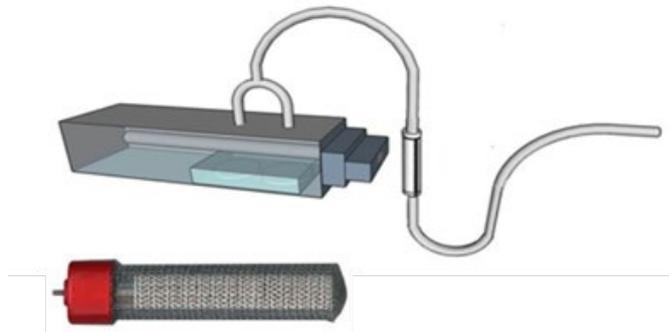
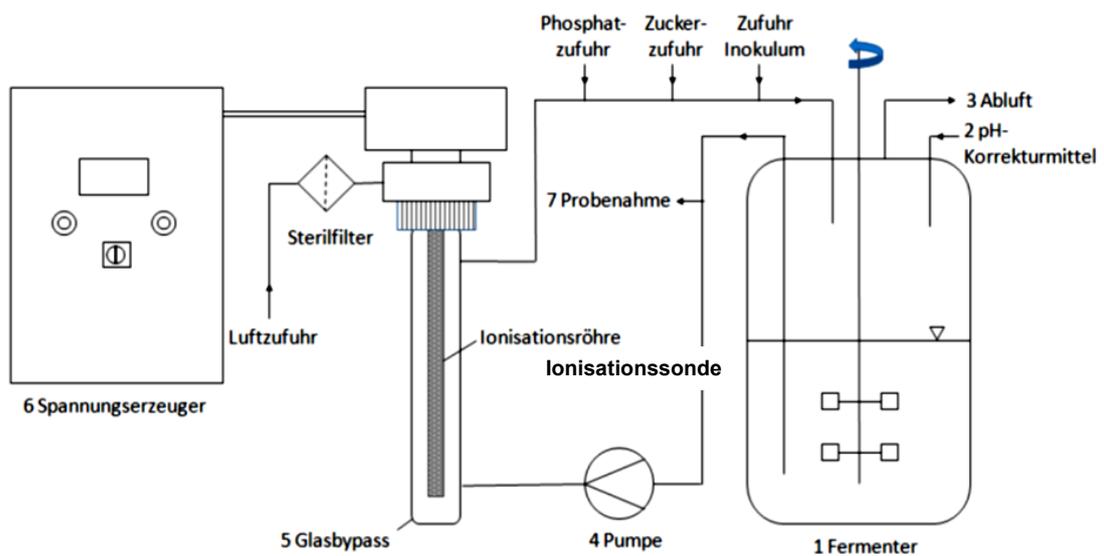


Abbildung 1: schematische Darstellung des Moduls zur Behandlung von Mikroorganismen auf Nährbodenplatten mit ionisierter Luft (Anlage 1)

Biotechnologische Anwendungen



in
Fermentationsprozesse mit 1 Fermenter; 2 pH-Korrekturmittel; 3 Abluft; 4 Pumpe; 5 Glasbypass; 6 Spannungserzeuger; 7 Probenahme

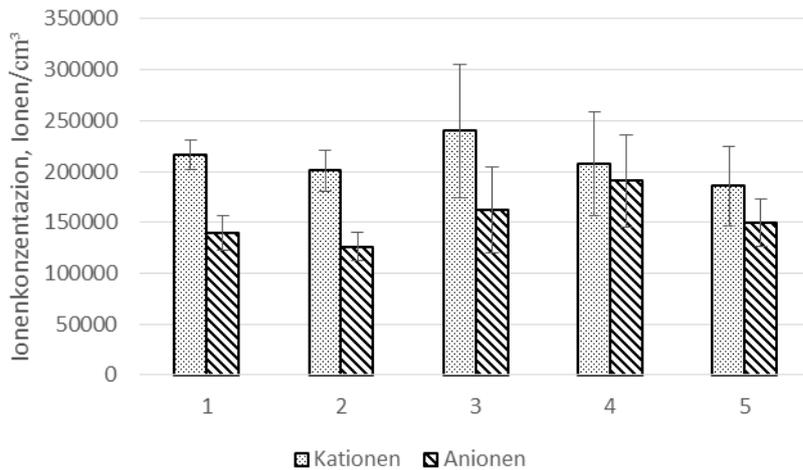
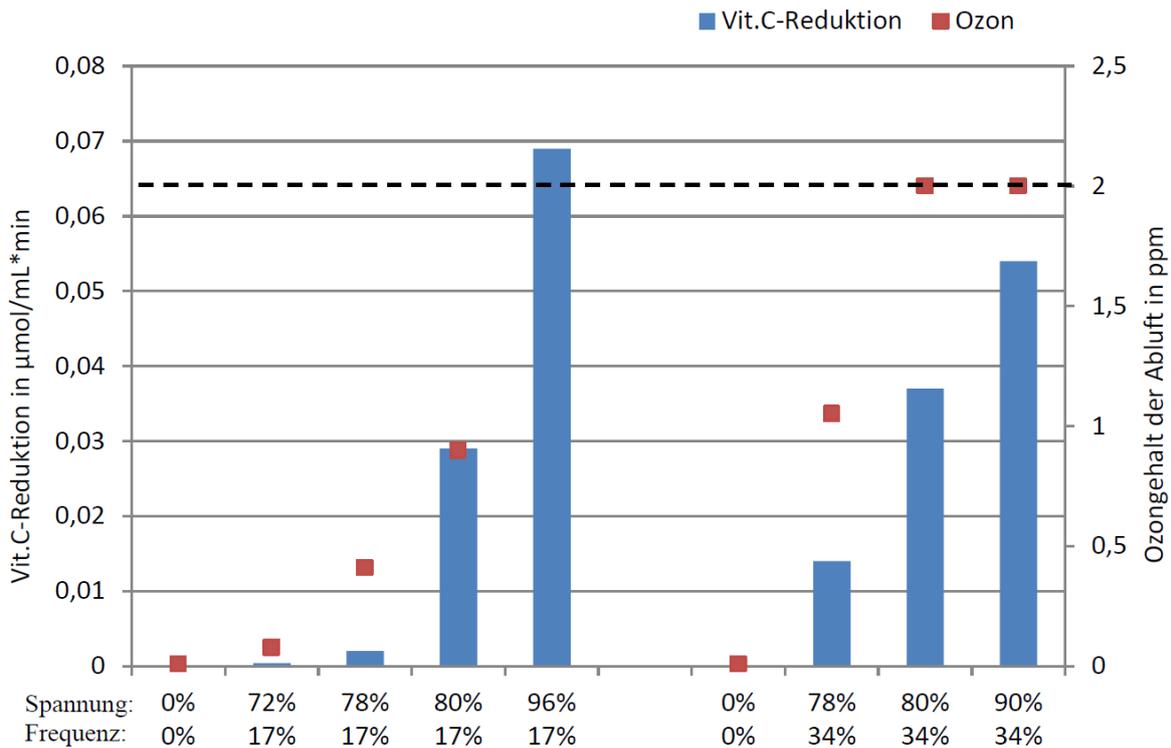


Abbildung 3: ermittelte Ionenkonzentrationen an 5 verschiedenen Messtagen bei Betrieb der Anlage 1 bei eingestellter Spannungsstufe 3 (1,75 kV)

Tabelle 1: ermittelte Parameter zur Beurteilung des Einflusses ionisierter Luft auf Fermentationsprozesse (Anlage 2)

Füllvolumen 1,5 L Wasser							
Tag	Spannung [V]	Frequenz [Hz]	Redox [mV]	pH-Wert	O3 [ppm]	pos Ionen /cm ³	neg Ionen /cm ³
1	0	0	212	5,72	0,0066	-	-
	100	50	267	6,02	0,0068	12500	19500
	100	300	279	6,02	0,0058	15950	13000
	150	50	295	5,98	0,0198	846	9000
	150	300	329	6	0,0951	9500	8500
2	0	0	282	5,2	0,0025	-	-
	100	50	219	5,3	0,0018	157000000	134500000
	100	300	280	5,32	0,0018	105000000	277000000
Füllvolumen 1,5 L 3xCDSM-Medium							
Tag	Spannung [V]	Frequenz [Hz]	Redox [mV]	pH-Wert	O3 [ppm]	pos Ionen /cm ³	neg Ionen /cm ³
1	0	0	274	7,08	0,0026	-	-
	100	50	274	7,04	0,0027	6500	12500
	100	300	276	6,99	0,0028	80000	-
	150	50	284	6,98	0,02814	187500	-
	150	300	311	6,98	0,0189	5000	450
2	0	0	147	6,81	0,0033	-	-
	100	50	174	6,86	0,0043	115000	-
	100	300	199	6,92	0,0015	450000	2600000
	150	50	202	6,93	0,0015	487500	2300000
	150	300	208	6,93	0,0015	2600000	3400000



$$\eta = I$$

Abbildung 4: Abnahme der antioxidativen Kapazität einer Vitamin C-Lösung sowie in der Abluft detektiertes Ozon in Abhängigkeit der eingestellten Spannung und Frequenz der Ionisationsanlage (als prozentuale Darstellung der maximal wählbaren Einstellungen an Anlage 2), gestrichelte Linie maximale Messgrenze des Ozonmessgerätes

Ermittlung einer geeigneten Ionenkonz. (Fermentation)

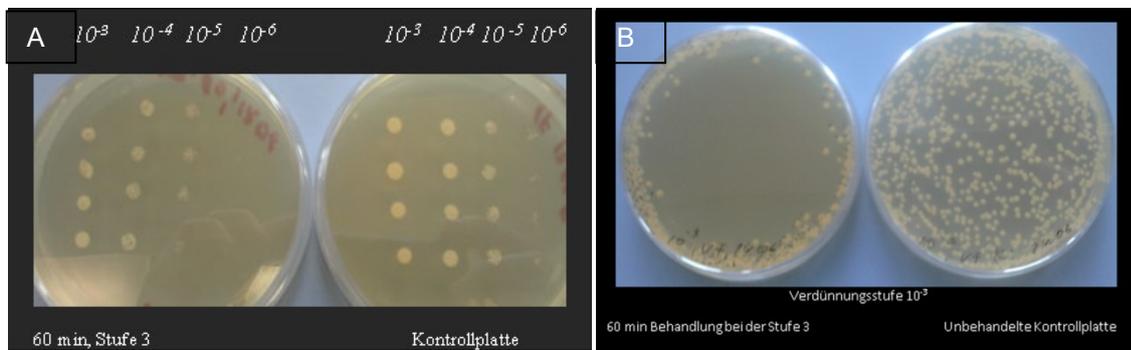


Abbildung 5: Auswirkung ionisierter Luft auf die Kultivierung von *S. cerevisiae* im Vergleich zur Kontrolle ohne Ionisation A Spotttest bei 1,75 kV 60 min Belüftung, B Versuch zur Quantifizierung der Hemmung bei Stufe: 3 1,75 kV 60 min Belüftung

Einsatz in der Milchsäurefermentation

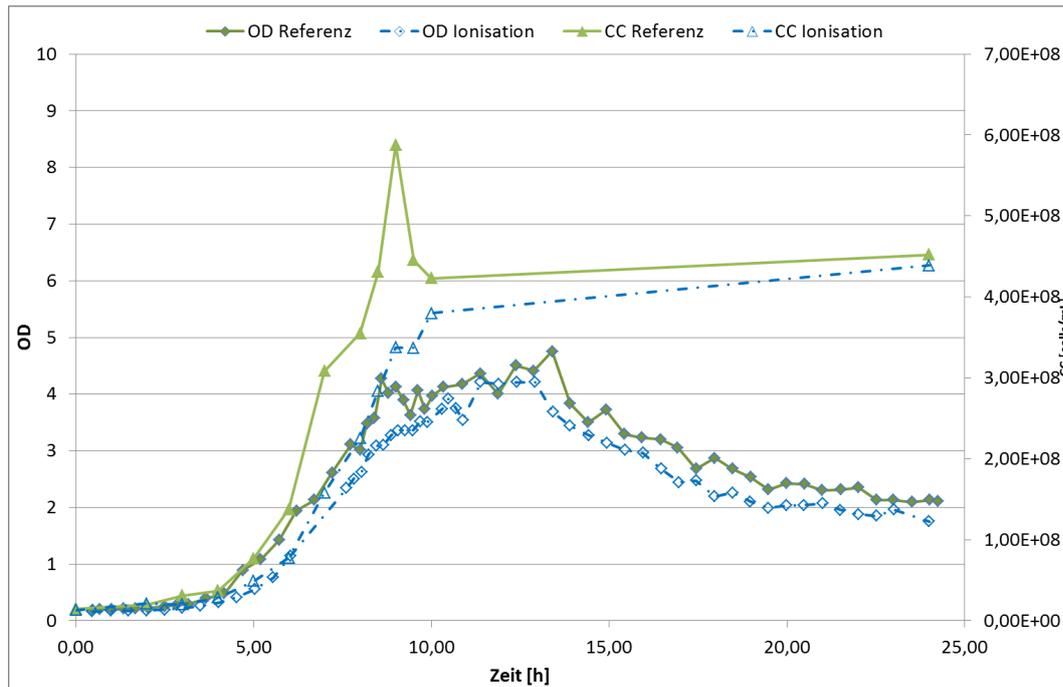


Abbildung 6: Verläufe der Gesamtkeimzahl (bestimmt über Coulter Counter) und optischer Dichte bei 600 nm bei Referenzfermentation und Fermentation mit Ionisation (37°C, 80 rpm, Start der Ionisation bzw. Begasung für 1 h bei Stunde 8)

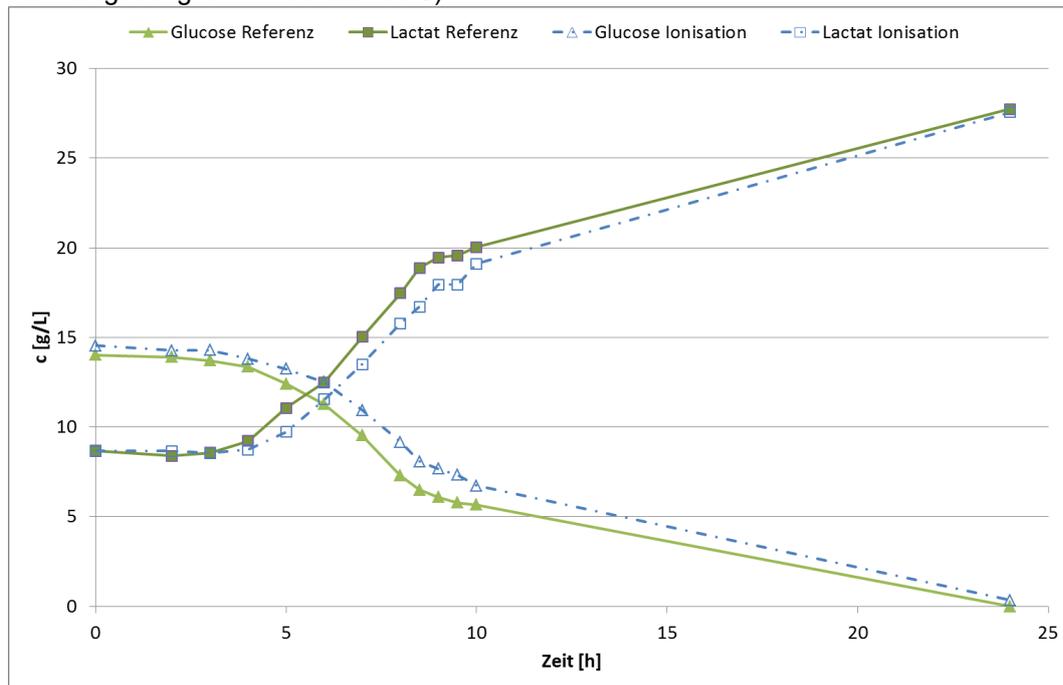


Abbildung 7: Verläufe der Glucose- und Milchsäurekonzentration bei Referenzfermentation und Fermentation mit Ionisation (37°C, 80 rpm, Start der Ionisation bzw. Begasung für 1 h bei Stunde 8)

Tabelle 2: Vergleich der prozentualen Überlebensraten gefriergetrockneter Proben (direkt nach Gefriertrocknung und nach Lagerung) hergestellt aus Referenzfermentation und Fermentation mit Ionisation

	Referenz		Ionisation	
Gefriertrocknung	116%	± 18%	98%	± 27%
Lagerung 26°C 6Wochen	0,03%	± 0,01%	0,03%	± 0,004%

Einsatz zur kontrollierten Sporeninduktion

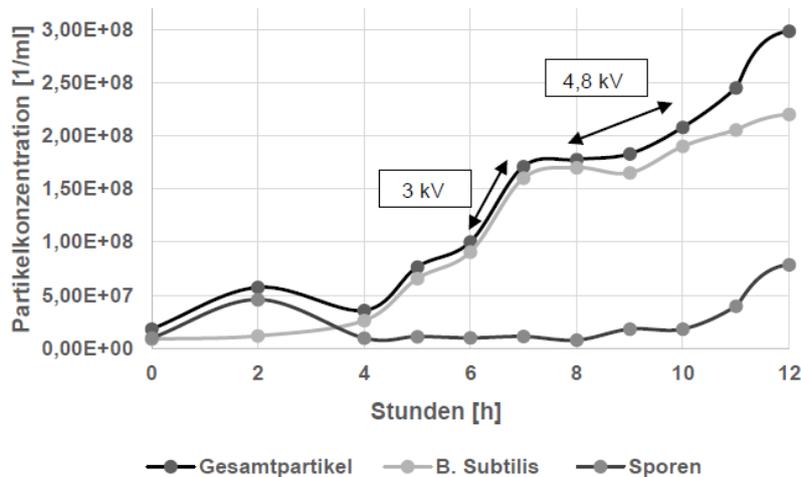


Abbildung 8: Verlauf von Gesamtpartikelanzahl, *B. subtilis* und auskeimfähiger Sporen unter dem Einfluss verschiedener Ionisationseinstellungen

Tabelle 3: Übersicht über Fermentationen von *Bacillus subtilis* mit variierenden Ionisationseinstellungen

Fermentations-kürzel	Ionisationseinstellung					Einfluss auf Zellviabilität (Flowzytometer)
	Ionisation	η	Spannung/ % vom Maximum	Frequenz/ % vom Maximum	Zeit/min	
R3	-	-	-	-	-	nein
F3	1	I	90	17	30	nein
	2	I	90	34	75	nein
F4	1	I	96	50	30	nein
	2	I	96	66	90	nein
F5	1	I	100	100	30	nein
	2	II	100	100	15	nein
	3	III	100	100	45	nein
F6	1	IV	100	100	60	ja
F7	1	IV	80	100	20	ja
	2	IV	60	100	20	evtl.*
F8	1	IV	40	100	40	evtl.*
	2	IV	50	100	30	evtl.*

*Verstopfung der Flowcytometerkanüle → eindeutige Aussage nicht möglich

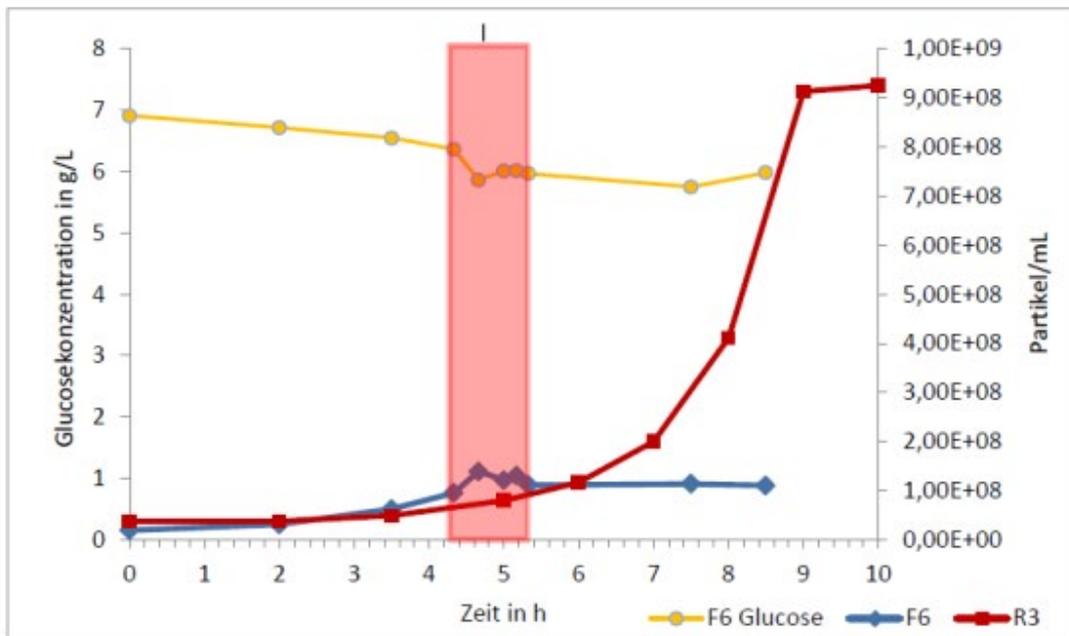


Abbildung 9: Verlauf von Glucosekonzentration und Gesamtpartikelanzahl einer Fermentation von *Bacillus subtilis* mit Einwirkung von ionisierter Luft (Einwirkung rot dargestellt, $\eta=IV$, $U=100\%$, $f=100\%$, $t=60$ min) im Vergleich zur Gesamtpartikelanzahl einer Referenzfermentation ohne Ionisation

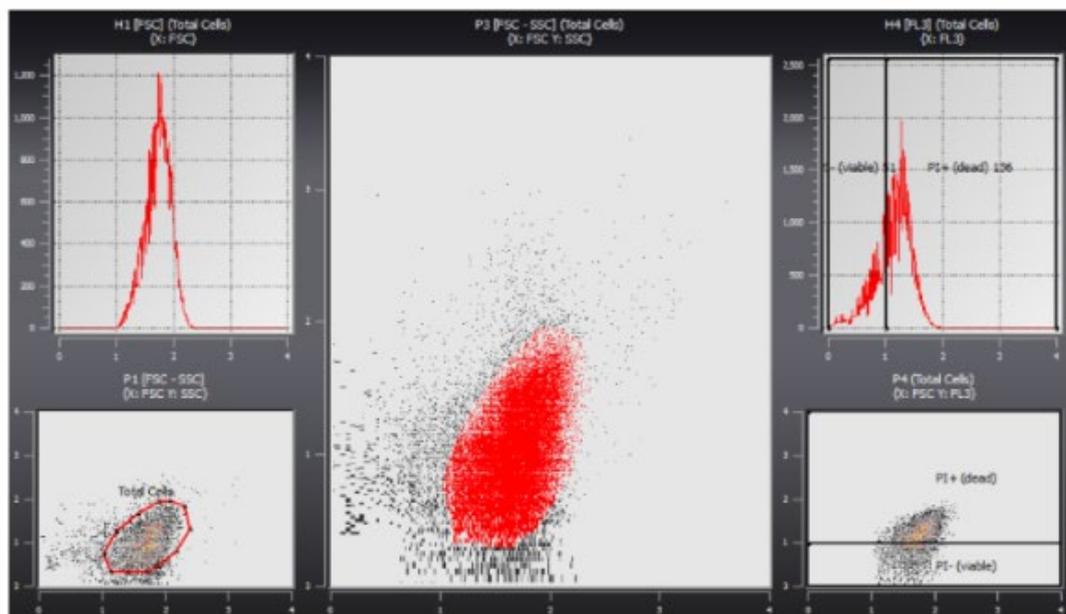


Abbildung 10: beispielhafte flowzytometrische Messung bei einer Fermentation von *Bacillus subtilis* unter letalen Einwirkungen von ionisierter Luft ($\eta=IV$, $U=100\%$, $f=100\%$, $t=60$ min)

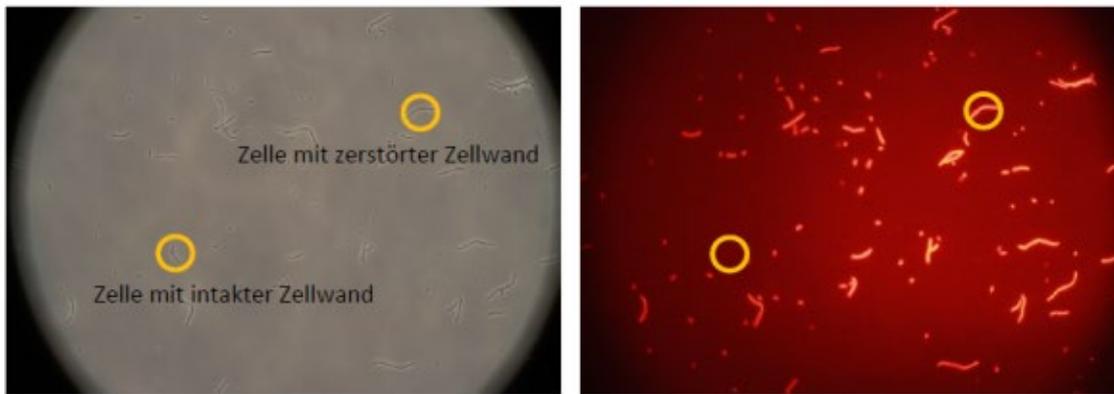


Abbildung 11: Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von *Bacillus subtilis* (Propidiumiodid gefärbt) nach Einwirkung von ionisierter Luft ($\eta=IV$, $U=100\%$, $f=100\%$, $t=60$ min)

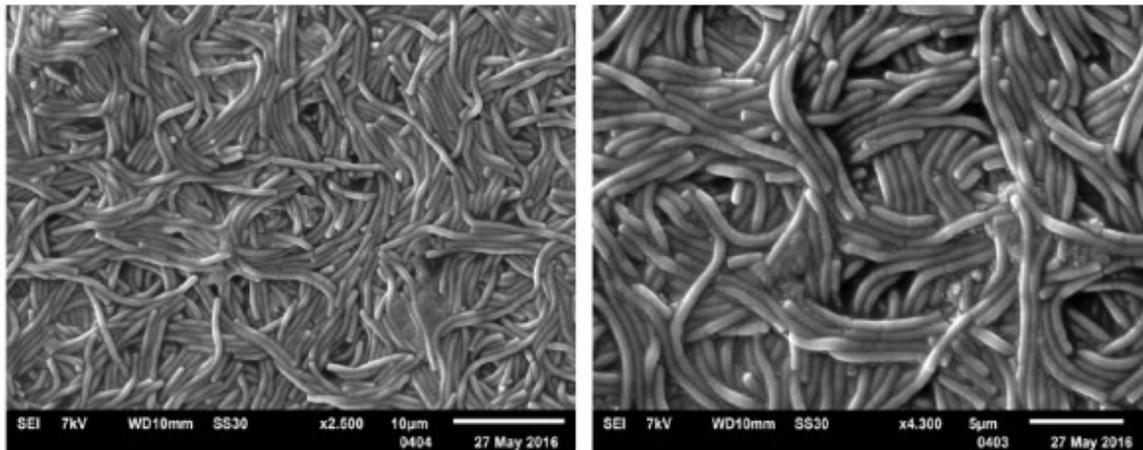


Abbildung 12: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Bacillus subtilis* vor (links) und nach (rechts) Ionisation ($\eta=IV$, $U=100\%$, $f=100\%$, $t=60$ min)

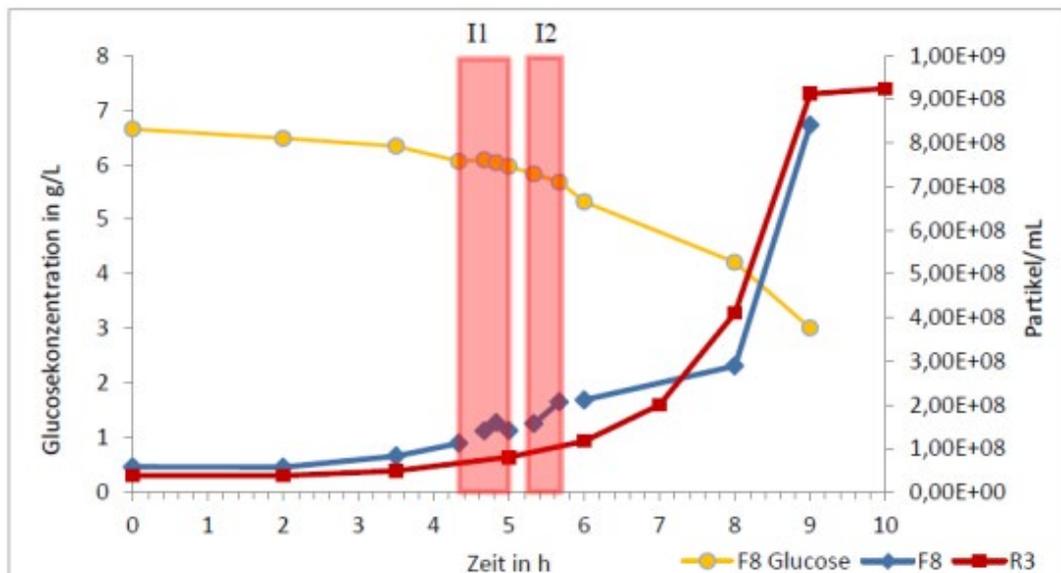


Abbildung 13: Verlauf von Glucosekonzentration und Gesamtpartikelanzahl einer Fermentation von *Bacillus subtilis* mit Einwirkung von ionisierter Luft (Einwirkung rot dargestellt, I1: $\eta=IV$, $U=40\%$, $f=100\%$, $t=40$ min und I2: $\eta=IV$, $U=50\%$, $f=100\%$, $t=30$ min) im Vergleich zur Gesamtpartikelanzahl einer Referenzfermentation ohne Ionisation

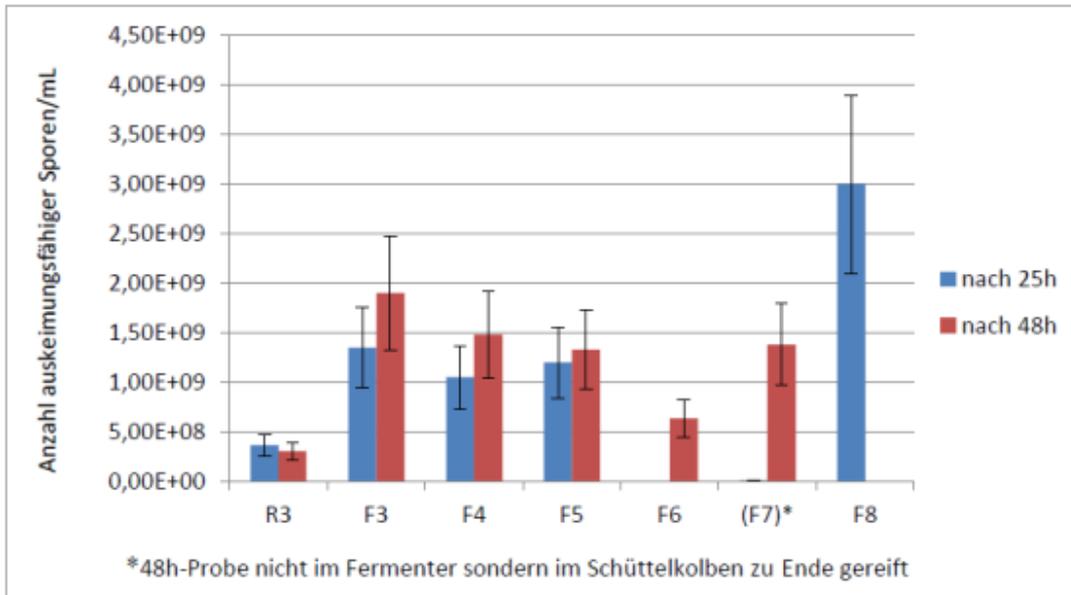


Abbildung 14: Vergleich der Sporenkonzentrationen bei Fermentationen mit unterschiedlicher Einwirkung ionisierter Luft (F3-F5 keine Auswirkungen im Wachstum erkennbar, F6-F7 letale Wirkungen erkennbar, F8 verzögernde Wachstumsverläufe erkennbar) im Vergleich zur Referenzfermentation (R3) ohne Einwirkung ionisierter Luft

Tabelle 4: Übersicht der Sporenresistenz gegenüber 5 % Wasserstoffperoxid

Sporenernte nach	D-Wert in s						
	R3	F3	F4	F5	F6	(F7)*	F8
25 h	106+/-8	81+/-6	88+/-6	85+/-6	-	-	107+/-8
48 h	117+/-8	89+/-6	105+/-7	92+/-6	83+/-6	84+/-6	-

Wirkung auf die Bildung von Gluthation

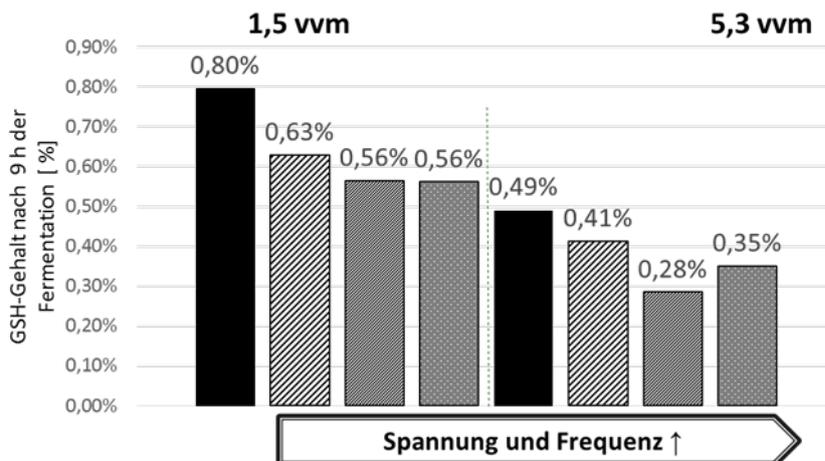


Abbildung 15: ermittelte Gluthationkonzentrationen in *S. cerevisiae* in Abhängigkeit der Ionisationseinstellungen Spannung und Frequenz

Ergebnisse der Brauereitechnologischen Anwendungen der IL

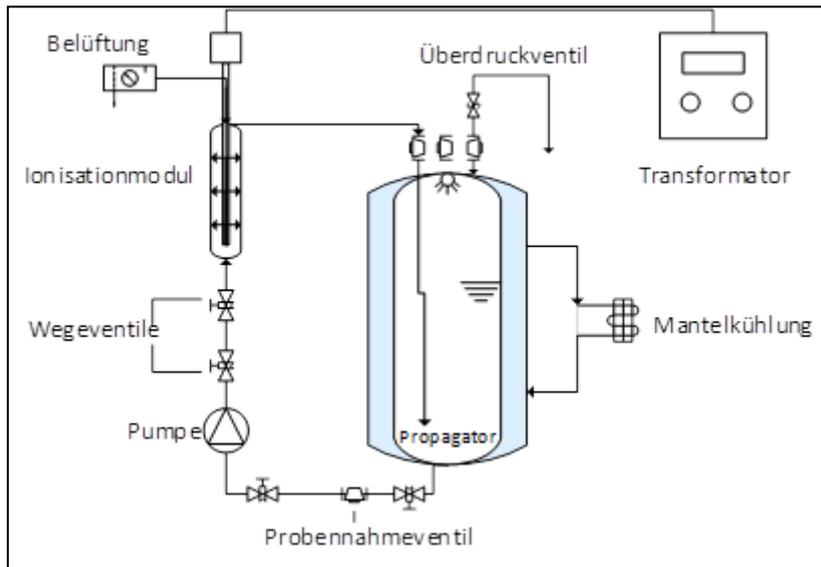


Abbildung 16 Skizze Aufbau des Hefepropagators mit Belüftungs-/Ionisationsmodul

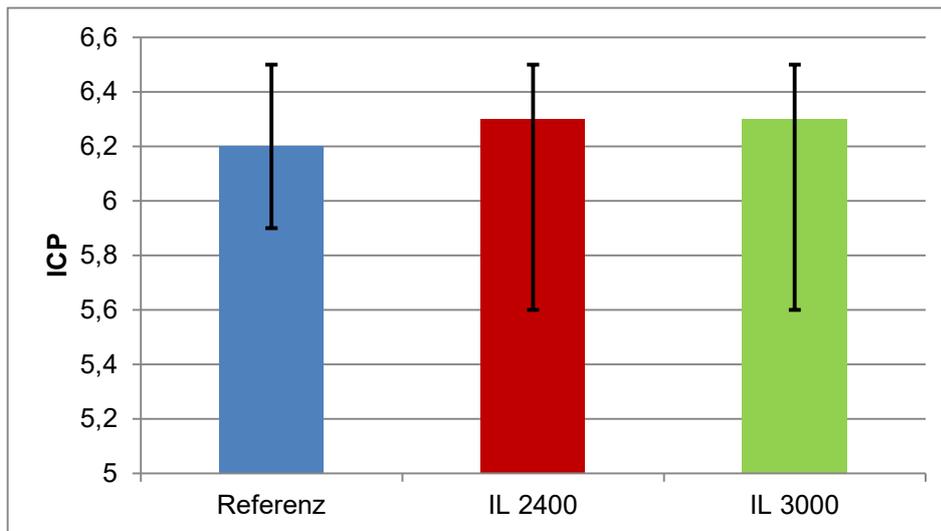


Abbildung 17 ICP nach Propagation ug-Hefe (VLB 42)

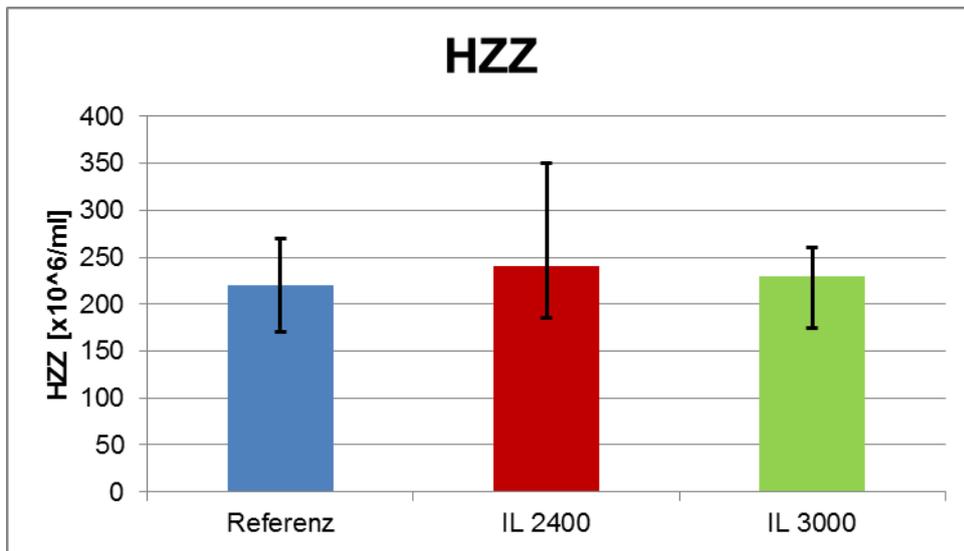


Abbildung 18 Hefezellzahl nach Propagation ug-Hefe (VLB 42)

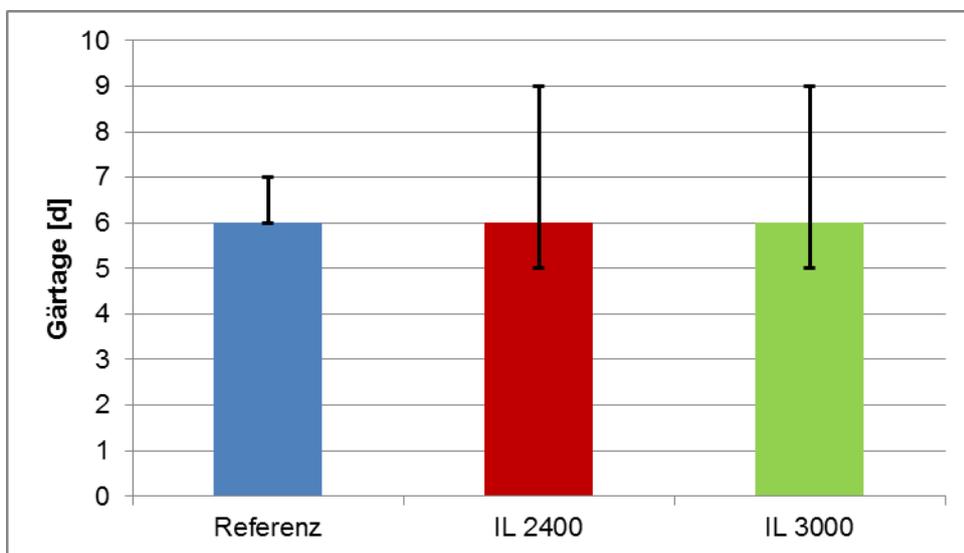


Abbildung 19 Fermentationsdauer nach Vergärung von Vollwürze (Stw. 11,5%) mit ug-Hefe

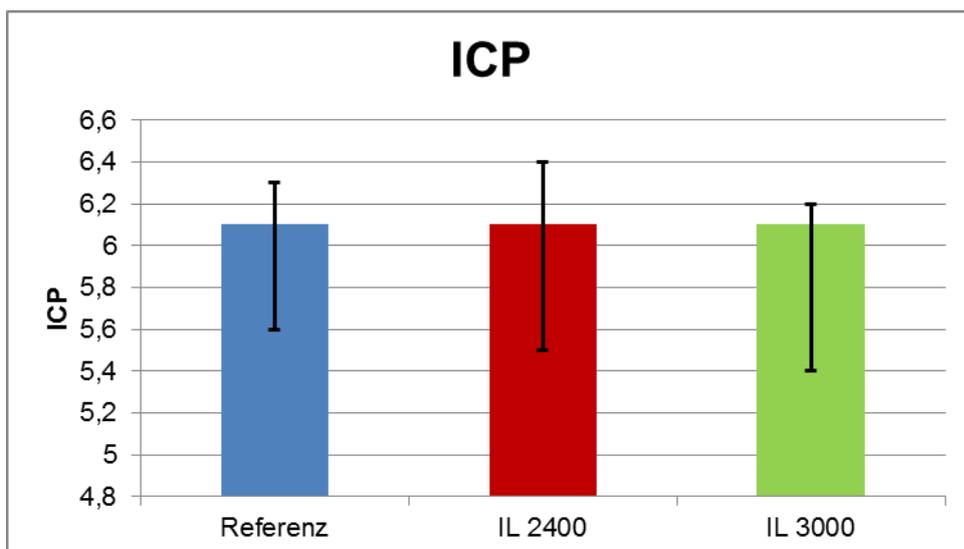


Abbildung 20 ICP der Erntehefe (ug-Hefe) 1. Führung nach Vergärung von Vollwürze (Stw. 11,5%) mit ug-Hefe

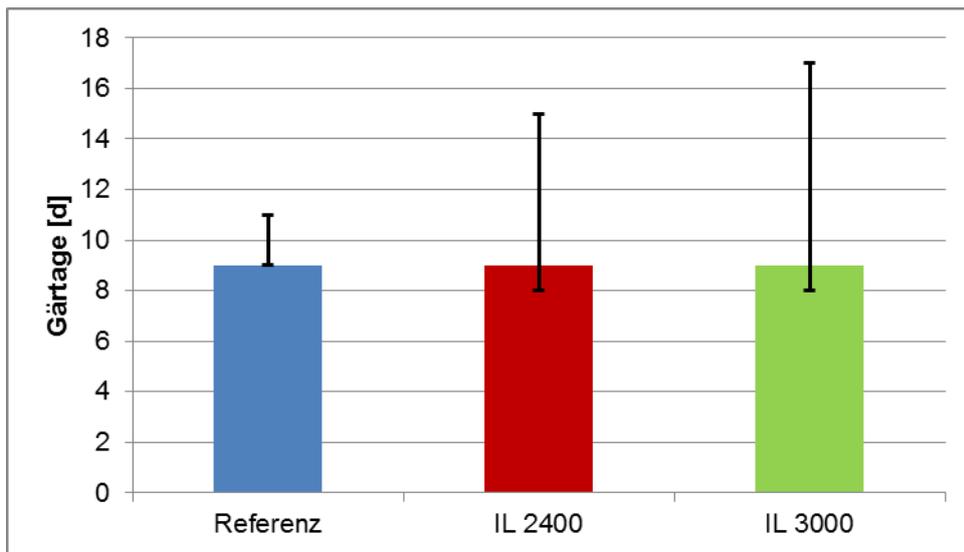


Abbildung 21 Fermentationsdauer nach Vergärung von High-Gravity-Brewing-Würze (Stw. 18%) mit ug-Hefe

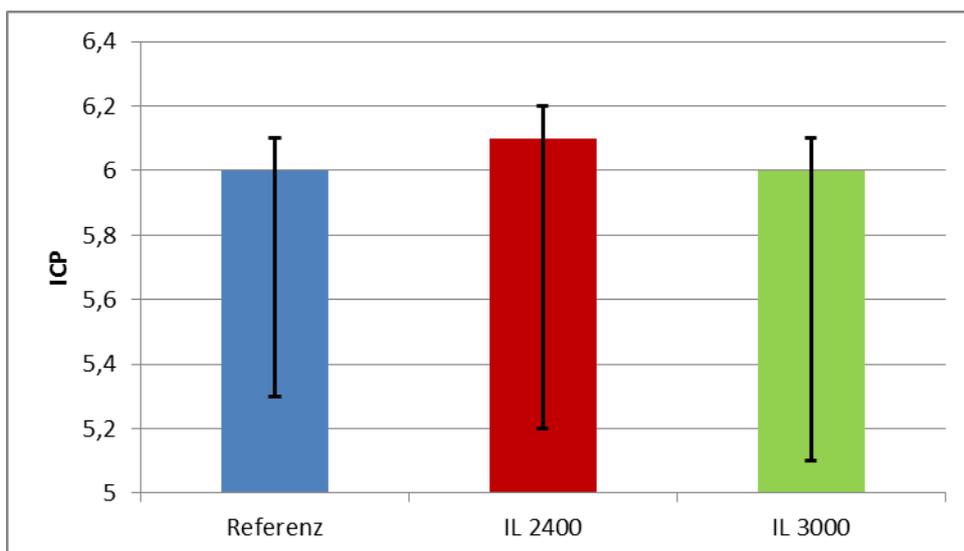


Abbildung 22 ICP der Erntehefe 1. Führung nach Vergärung von High-Gravity-Brewing-Würze (Stw. 18%) mit ug-Hefe

Tabelle 5 Bieranalyse aus Vollwürze (ug-Hefe)

		Referenz	IL 2400	IL 3000
Stammwürze	[%]	11,44	11,59	11,64
Alkohol	[vol%]	5,03	5,13	5,05
scheinb. Extrakt	[%]	1,94	1,91	2,12
scheinb. Vergärungsgrad	[%]	83	83,5	81,8
Bittereinheiten	[BE]	24	25	24
Farbe	[EBC]	6	7	7
pH		4,28	4,33	4,38

Tabelle 6 Bieranalyse aus HGB-Würze nach Blending (ug-Hefe)

		Referenz	IL 2400	IL 3000
Stammwürze	[%]	12,1	12,15	12,04
Alkohol	[vol%]	5,31	5,45	5,33
scheinb. Extrakt	[%]	2,11	1,89	2,01
scheinb. Vergärungsgrad	[%]	82,5	84,5	83,3
Bittereinheiten	[BE]	24	24	23
Farbe	[EBC]	10	11	10
pH		4,41	4,42	4,37

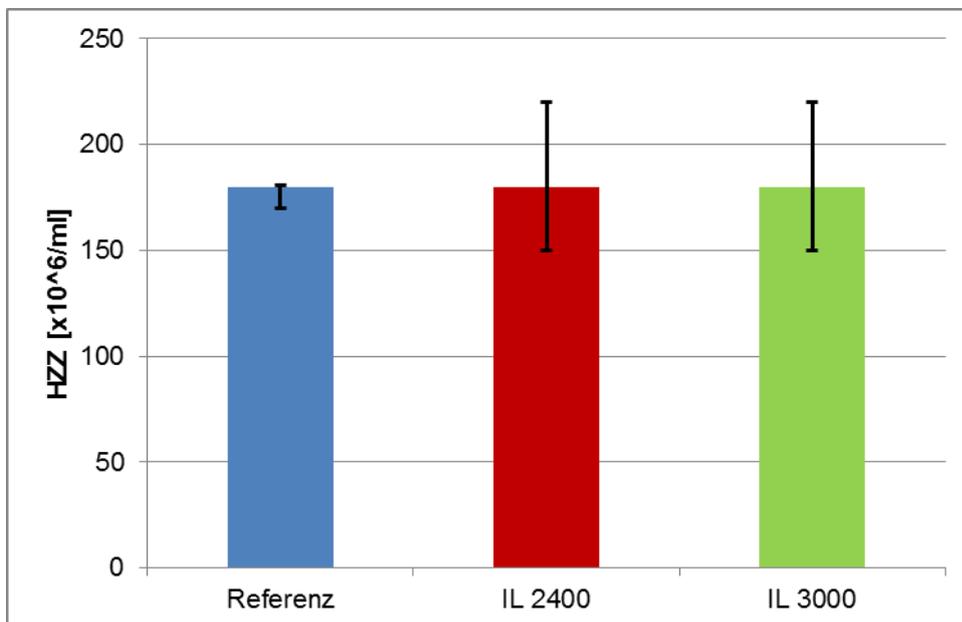


Abbildung 23 Hefezellzahl nach Propagation der og-Hefe

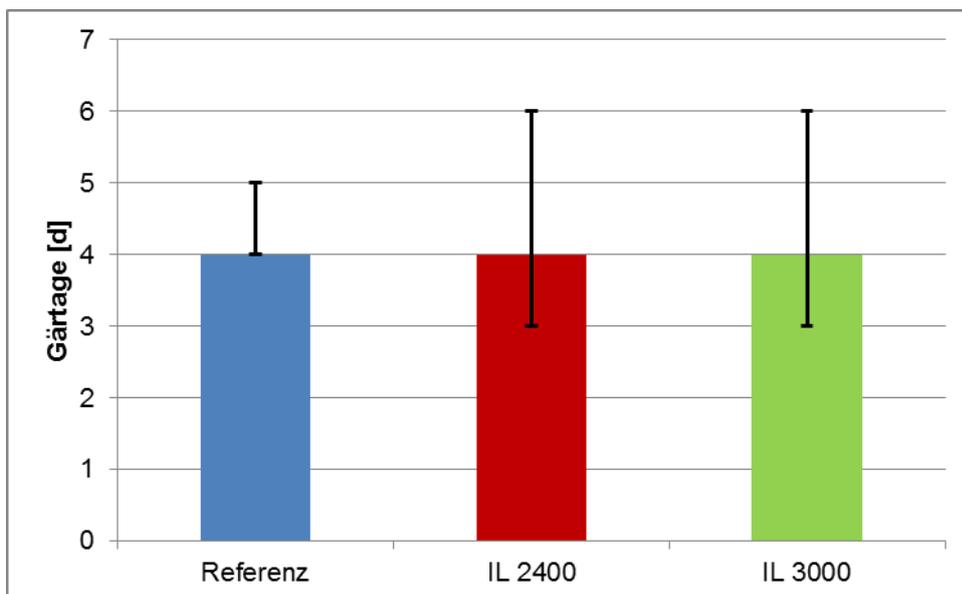


Abbildung 24 Fermentationsdauer nach Vergärung von Vollwürze (Stw. 11,5%) mit og-Hefe

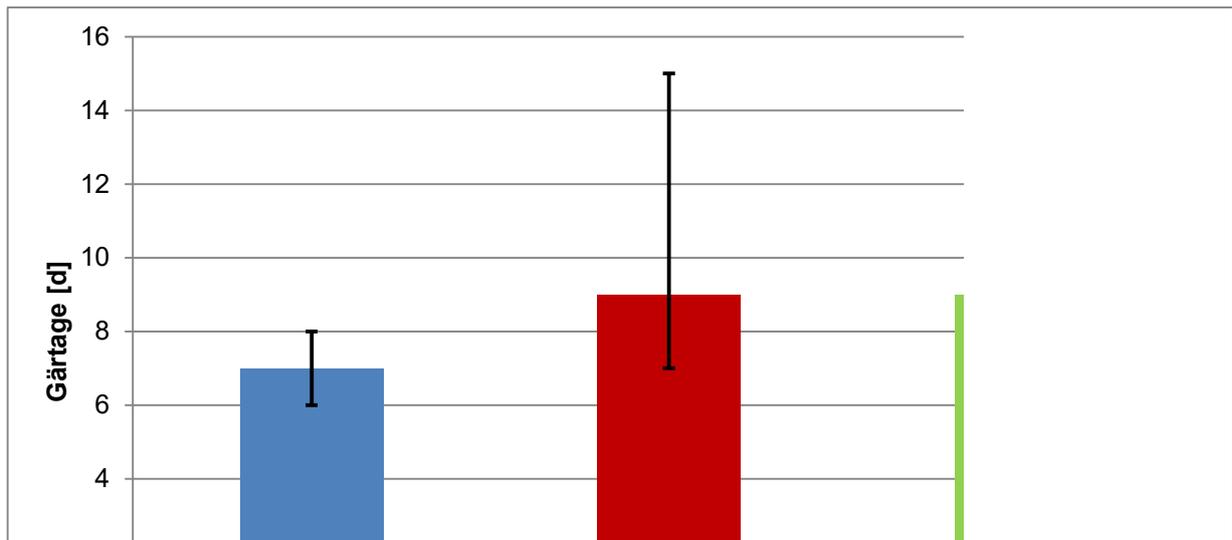


Abbildung 25 Fermentationsdauer nach Vergärung von High-Gravity-Brewing-Würze (Stw. 18%) mit og-Hefe

Tabelle 7 Bieranalyse aus Vollwürze (og-Hefe)

		Referenz	IL 2400	IL 3000
Stammwürze	[%]	11,41	11,45	11,57
Alkohol	[vol%]	4,88	4,88	5,00
scheinb. Extrakt	[%]	2,19	2,24	2,22
scheinb. Vergärungsgrad	[%]	80,8	80,4	81,6
Bittereinheiten	[BE]	25	27	25
Farbe	[EBC]	7	7,9	6,8
pH		4,28	4,27	4,26

Tabelle 8 Bieranalyse aus HGB-Würze nach Blending (og-Hefe)

		Referenz	IL 2400	IL 3000
Stammwürze	[%]	11,9	12,04	12,09
Alkohol	[vol%]	5,34	5,24	5,17
scheinb. Extrakt	[%]	1,84	2,19	2,36
scheinb. Vergärungsgrad	[%]	84,6	81,9	80,5
Bittereinheiten	[BE]	24	23	24
Farbe	[EBC]	11	12	11
pH		4,42	4,42	4,39