



Projekttitle:

Optimierung obergäriger Hefestämme

Förderkennzeichen:

49VF150039

Name der Forschungsstelle(n):

Forschungsinstitut für Bier- und Getränkeproduktion (FIBGP)

Kontakt:

Dr.-Ing. Katrin Schreiber, k.schreiber@vlb-berlin.org

Bewilligungszeitraum:

1.5.2016 – 30.4.2018

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.: 49VF150039**Kurztitel: Optimierung obergäriger Hefestämme****Laufzeit: 01.05.2016- 30.04.2018**

Name und Anschrift des Zuwendungsempfängers
Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Seestraße 13, D-13353 Berlin

Kurzfassung (Zielstellung, Ergebnisse)

Ziele des beantragten Projekts sind die Erreichung der Verkürzung der Gär-, Reifungs- und Klärprozesse bei konventioneller Arbeitsweise (12 %mas.) und High Gravity (18 – 25 %mas.) durch Feststellung homogener oder heterogener Hefestämme, Feststellung der genetischen Stabilität, Isolierung einzelner Zellen für neue „Unterstämme“, Schaffung von Mutanten. Diese Ziele sollen unter Beibehaltung der ursprünglichen Geschmacksprofile erreicht werden. Die Testreihen erfolgen dabei sowohl im Labor- als auch im kleintechnischen Maßstab.

Ein Ansatzpunkt für die Bearbeitung des abgeschlossenen Forschungsprojektes bestand in der Annahme, dass viele Hefestämme zwar als Reinzuchthefen definiert werden, jedoch nach der Selektion einzelner Hefezellen aus den Stämmen Unterschiede hinsichtlich gärungsrelevanter Parameter bei den generierten „Töchterstämmen“ messbar waren. Dieses zeigt sich bei der Versuchsreihe mit einer Stammwürze von 12%mas. z. B. sehr deutlich bei dem Stamm H11, denn hier wies der Tochterstamm 14 eine schnellere und weitergehende Extraktabnahme und eine intensivere Diacetylreduktion, bei einem adäquaten sensorischen Profil, im Vergleich zum Originalstamm auf. Unter High-Gravity-Bedingungen (18%mas Stammwürze) zeigte z. B. bei dem Stamm H2 der Tochterstamm 13 in eine bessere Umwandlung der vergärbaren Kohlenhydrate auf. Bei allen anderen untersuchten Parametern gab es keine Abweichungen im Vergleich zum Originalstamm. Ein weiterer Schwerpunkt des abgeschlossenen Forschungsprojektes bestand darin, Mutanten zu generieren und diese hinsichtlich der aufgeführten Parameter zu prüfen. Die Mutanten wurden mit 2 Originalstämmen (H 8 und H10) verglichen. Dabei zeigten die Mutanten 9 und 10 einen schnelleren und weitergehenden Extraktabbau, eine geringe Bildung an Gesamtdiacetyl und eine intensivere Reduktion. Das sensorische Profil entsprach dem der Originalstämme.

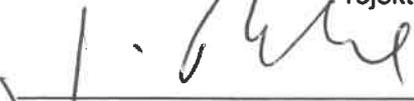
Abschließend ist zu resümieren, dass es mit beiden angewendeten Verfahren und den untersuchten Hefestämmen möglich ist, die Fermentationszeit, bei gleichbleibender Produktqualität, zu verkürzen und damit den Produktionsprozess zu optimieren. Gleichzeitig ist anzumerken, dass die gewonnenen Erkenntnisse sich lediglich auf die Versuche in den modifizierten EBC-Gärsäulen beziehen. In der betrieblichen Praxis gibt es hinsichtlich der Tankgeometrie unterschiedliche Fermentationsbehälter. Es ist deshalb sinnvoll, die generierten Ergebnisse in unterschiedlichen Gärtanks zu testen. Aus diesem Grund plant die VLB einen, sich an dieses Projekt, anschließenden Forschungsantrag einzureichen.

Veröffentlichungen
Patentanmeldungen

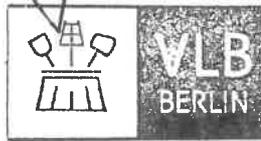
29.10.2018
Datum



Projektleiter



Rechtsverbindliche Unterschrift



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

Seestraße 13 / 13353 Berlin

Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

Reg.-Nr.:	49VF150039
FuE-Einrichtung:	Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.
Titel:	Optimierung obergäriger Hefestämme
Projektlaufzeit:	01.05.2016- 30.04.2018

Berlin, den 29.10.2018

Name und Telefonnummer des Projektleiters: Dr.-Ing. Katrin Schreiber, 030 450 80-168



**VLB
BERLIN**

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

Seestraße 13 / 13353 Berlin

Firmenstempel

Katrin Schreiber

Unterschrift des Projektleiters

[Handwritten signature]

Rechtsverbindliche Unterschrift

Gliederung des Sachberichtes

- 1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens**
- 2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse**
- 3. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages, Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit, Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**
- 4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten**
 - Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung, Anwendungspotential, Anwendungsbereiche in der mittelständischen Wirtschaft
 - Darlegung der Ergebnisverwertung (eigene Nutzung, Technologietransfer, Know-how-Verkäufe u.a.)
 - Darlegung der Applikationsmöglichkeiten für die mittelständische Industrie
 - Perspektive und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten
- 5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse**
- 6. Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen (Artikel in Zeitschriften, Seminare, Schulungen, Vorträge, Messen, Ausstellungen, Präsentationen)**

1. Zielstellung des Vorhabens

Das Forschungsvorhaben hat zum Ziel, den Brauereien nicht gentechnisch veränderte bzw. selektiv optimierte Hefestämme zur Verfügung zu stellen. Diese sollen wirtschaftlich effizientere Gärverfahren, wie auch Reifungs- und Klärungsverfahren ermöglichen, oder durch neue und interessante Geschmacksrichtungen charakterisiert sein. Zum Abschluss des Forschungsprojektes soll ein Verfahren etabliert sein, welches die Prüfung der Homo- bzw. Heterogenität von Brauhefen stammspezifisch ermöglicht.

Vor dem Hintergrund eines zunehmenden Wettbewerbes insbesondere mit den global operierenden Unternehmen spielt die Wirtschaftlichkeit des Produktionsprozesses in allen Betrieben eine zentrale Rolle. In diesem Zusammenhang kommt den in der Fermentation eingesetzten Hefen eine besondere Bedeutung zu. Die bisher verfügbaren Hefestämme resultieren zwar in der Herstellung qualitativ einwandfreier und vom Verbraucher angenommener Produkte, aber eine Effizienzsteigerung insbesondere durch den Einsatz von High Gravity Verfahren ist auf dieser Basis kaum möglich.

Das Evolutionary engineering bietet Möglichkeiten Hefen durch „natürliche“ Methoden zu modifizieren. Darunter zählen vor allem die natürliche Selektion unter einem Selektionsdruck, Mutation durch z. B. UV-Bestrahlung und Kreuzung von verschiedenen Stämmen. Durch diese Methoden können Hefestämme mit dem Ziel zur Optimierung der Fermentationseigenschaften modifiziert werden. Der besondere Fokus des Forschungsvorhabens liegt zunächst in einem Screening ausgewählter obergäriger Hefestämme. Es gilt zuerst die Hefen nach ihren Fermentationseigenschaften und ihrer genetischen Variabilität zu charakterisieren. Bei erfolgreichem Projektverlauf wird die VLB Berlin modifizierte und charakterisierte Hefestämme als reine Zelllinien in ihre Stammsammlung aufnehmen können. Auf Anforderung interessierter Brauereien werden diese Hefen in geeigneter Form zum Selbstkostenpreis abgegeben. In den Betrieben können solche Stämme dann vermehrt und in den Herstellungsprozess eingebracht werden. Dabei bleibt es den Brauereien freigestellt, den jeweiligen Stamm in einer eigenen Kultur zu bewahren oder regelmäßig auf die Stammsammlung der VLB zurückzugreifen. Zahlreiche Brauereien lagern sogar ihre eigenen Stämme in der Sammlung der VLB und fordern diese nach Bedarf als vorkultivierte Reinzucht an.

2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse

Arbeitspaket 1 – Vertiefte Recherche und Projektvorbereitungen

Arbeitspaket 2 – Screening von obergärigen Brauhefestämmen

Es wurden folgende Hefestämme untersucht.

- ⇒ H1 – H 5: Hefen für Weizenbier
- ⇒ H6: untergärige Brauhefe als Referenzstamm
- ⇒ H7 : Kölschhefe
- ⇒ H8 – H9: Hefen für Altbier
- ⇒ H10 – H12: Alehefen.

Alle ausgewählten Hefestämme waren in der Lage, sich auch unter High-Gravity-Bedingungen zu vermehren. Nach ca. 48 Stunden war die Zellzahlzunahme weitgehend abgeschlossen. Bei der Stammwürzekonzentration von 12%mas zeigten die Stämme H1 – H11 eine sehr gleichmäßige Zellzahlzunahme auf. Lediglich der Stamm H12 wies eine langsamere Vermehrungsrate auf. Bei 18%mas Stammwürze war der Verlauf der Zunahme der optischen Dichte bei den Stämme H1 – H5 und H7 – H11 wiederum sehr ähnlich. Die Stämme H6 und H12 wiesen eine verminderte Zellzahlzunahme auf, was auf eine nicht so hohe Osmotoleranz schließen ließ.

Parallel zu der Bestimmung der Vermehrungsrate wurde der Extraktabbau mit einem Handbiegeschwinger DMA 38 von der Fa. Anton Paar bestimmt. Der Zusammenhang zwischen der Zellzahlzunahme und dem Extraktabbau ist hinlänglich bekannt. Insgesamt betrachtet korrelieren die Kurvenverläufe der Stoffumwandlung mit denen der Vermehrungsrate. Bei der Stammwürzekonzentration 12%mas betrug der Restextrakt, mit Ausnahme der Stämme 11 und 12, ca. 3%mas. Die bereits genannten Stämme zeigten auch bei der Stammwürzekonzentration 18%mas eine verminderte Extraktabnahme, ebenso die Stämme 3 und 4. Hinsichtlich der Osmotoleranz zeigten sich bei der 30%-igen Stammwürze noch größere Unterschiede. Die Stämme 1, 2, 6, 9 und 10 waren durch einen zügigen Extraktabbau gekennzeichnet, und der Restextrakt lag bei 8 – 9 %mas. Die Stämme 7, 8, 11 und 12 wiesen eine etwas geringere Stoffumwandlung und der Restextrakt lag bei ca. 10%mas. Mit Restextrakten in Höhe von ca. 13%mas wiesen die Stämme 3 – 5 die geringste Verstoffwechselung auf.

Arbeitspaket 3 – Vereinzelung von Hefezellen zur Herstellung gentechnisch reiner Klone

Dieses Arbeitspaket befasste sich mit der Vereinzelung von Hefezellen zur Herstellung genetisch reiner Klone. Der Erfolg des Forschungsvorhabens hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit genetisch reiner Linien ab. Voraussetzung für die Herstellung reiner Linien ist es, einzelne Hefezellen als Startpunkt einer Population nutzen zu können. Ausgehend von verdünnten Hefe-Flüssigkulturen der in Arbeitspaket 2 ausgewählten Stämme wurden mit Hilfe eines Mikroskops geeignete Zellen selektiert. Diese zeichneten sich durch die für den jeweiligen Stamm typische Form aus, waren frei von bereits gebildeten Tochterzellen und lagen im mikroskopischen Bild in isolierter Position vor. Solche Einzelzellen wurden mittels Mikromanipulator behutsam angesaugt und umgehend auf ein festes Nährmedium auf Würzebasis überführt. Auf diese Weise wurden pro Hefestamm 20 Einzelzellen isoliert. Diese große Anzahl war erforderlich, da die jeweiligen Stämme bisher nicht auf das Vorhandensein und die Anzahl unabhängiger Linien untersucht wurden und auch keine theoretischen Überlegungen eine Einschränkung möglich machen würden. Die sich anschließende Vermehrungskultur bei 26°C wurde abgebrochen, wenn ausgehend von den transferierten Einzelzellen Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm entstanden sind. Die Lagerung erfolgte bei 0 – 4°C, um die Stoffwechsel- und Zellteilungsaktivität der isolierten Linien zu minimieren. Da zu einem späteren Zeitpunkt ggf. auf die ursprünglichen Linien wieder zurückgegriffen werden muss, werden die in diesem Arbeitspaket hergestellte Kollektion im Turnus von zwei Monaten auf frisches Medium überführt und zudem in zwei Kopien vorgehalten. Es wurden von den 12 Hefestämmen jeweils 4 selektierte „Töchterstämmen“ mit dem Originalstamm verglichen. Die Auswahl der „Unterstämmen“ erfolgte hinsichtlich vorhandener Abweichungen beim Extraktabbau und einer sensorischen Prüfung. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Hefestamm	Auffällige „Unterstämme“	Bemerkung	Homogenität
H1	1/3	Restextrakt fast 4 %mas	-
H2	2/8	Restextrakt fast 4%mas	-
H3	3/4	Restextrakt fast 4%mas	-
H4	Originalstamm	Restextrakt 4,3%mas	-
H5	5/13 und 5/14	Kaum Unterschiede	+
H6	6/5 und 6/8 6/7	Besser als Original Schlechter als Original	-
H7	-	Sehr homogen	+
H8	8/15	Fast 1% mehr Restextrakt	-
H9	-	Sehr homogen	+
H10	-	Sehr homogen	+
H11	11/1 und 11/13	Fast 1% mehr Restextrakt	-
H12	12/10	Fast 1% mehr Restextrakt	-

Tab. 1: Übersicht der potentiellen Unterschiede

Für die weiterführenden Versuche in den EBC-Gärsäulen wurden die folgenden Hefestämme (inklusive der „Unterstämme“) ausgewählt:

H1, H2, H4, H6, H7, H8, H11 und H12.

Arbeitspaket 4 – Molekularbiologische Identifizierung verschiedener Linien

Dieser Abschnitt dient der Feststellung der genetischen Variation innerhalb der ausgewählten verschiedenen obergärigen Brauhestämme.

Dabei wurden folgende Hefestämmen, gemäß Tabelle 2, verwendet:

Obergärige Brauhestämme	Bezeichnung
OBGH1	Hefe für Hefeweizen
OBGH2	Hefe für Hefeweizen
OBGH3	Hefe für Hefeweizen
OBGH4	Hefe für Hefeweizen
OBGH5	Hefe für Hefeweizen
OBGH7	Kölschbier-Hefe
OBGH8	Altbier-Hefe
OBGH9	Altbier-Hefe
OBGH10	Ale-Hefe
OBGH11	Ale-Hefe
OBGH12	Ale-Hefe

Tab. 2: Zuordnung der Hefestämme

PCR-basierter genetischer Fingerprint:

Mittels der PCR können gezielt DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Durch Primer wird der Start und Endpunkt des jeweiligen zu amplifizierenden Abschnittes festgelegt. Daher muss die Sequenz des zu amplifizierenden Bereiches bekannt sein. Bei einem genetischen Fingerprint kann die Charakterisierung ohne genaue Kenntnisse über die Genomsequenz erfolgen. Durch verschiedene Primer, welche sich an mehreren zufälligen Bereichen im Genom anlagern, werden unterschiedliche Fragmente gebildet. Diese werden anhand ihrer Größe elektrophoretisch getrennt und sichtbar gemacht. Man erhält so einen genetischen Fingerprint bestehend aus einem Bandenmuster mit DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Verschiedenste Primer wurden auf ihre Eignung zur Stammunterscheidung hin verwendet und verglichen ((GTG)₅, XD5, OPA11, Primer21 und Primer24). Der Primer (GTG)₅ zeigte keine eindeutige Unterscheidung. Der Primer XD5 dagegen zeigt teilweise eine Unterscheidungsmöglichkeit. Um eine detailliertere mögliche Unterscheidung zu erhalten, wurden weitere Primer ausgetestet. Dazu gehören Primer, die an die sog. δ -Elemente binden. Delta-Elemente sind DNA-Sequenzen von ca. 300 bp Länge, die das TY1 Retrotransposon flankieren. Sie kommen im Genom von *Saccharomyces*-Hefen in einer sehr hohen Kopiezahl vor. Durch die Verwendung der sog. δ -Primer werden Bereiche vervielfältigt, die zwischen den δ -Elementen liegen. Abhängig von der Anzahl und der Länge dieser Bereiche werden unterschiedliche Fragmente amplifiziert. Dazu können die Primer $\delta 1 / \delta 2$, $\delta 12 / \delta 21$ oder auch die Kombination $\delta 12 / \delta 2$ verwendet werden. Diese Primer liefern eine detailliertere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den einzelnen obergärigen Hefestämmen. Zwar kann nicht jeder einzelne Hefestamm differenziert werden, aber die Stämme für den gleichen Anwendungszweck (Hefen für die Herstellung von Hefeweizen, Kölsch/Alt und Ale-Bier) wiesen ähnliche Fingerprints auf. Die Verwendung weiteren Primeren wie ISSR, LTR1, URP und G20 lieferten auch keine weiteren Differenzierungen als mit den bereits getesteten Primern. Untergärige Hefen zeigten bei allen verwendeten Primern eine eindeutige Differenzierung zu den obergärigen Hefen. Abb. 1 zeigt ein Dendogramm des genetischen Fingerprints mit den Primern $\delta 12 / \delta 21$ von obergärigen Brauhefestämmen auch im Verhältnis zu untergärigen Brauhefen und *Saccharomyces cerevisiae* Laborhefestämmen. Der Fingerprint zeigt eine gute Unterscheidung der obergärigen Brauhefen und eine Differenzierung zu untergärigen Brauhefestämmen und zu Laborhefestämmen. Bei den obergärigen Hefen handelt es sich um *Saccharomyces cerevisiae*. Daher befinden sich auch die

entsprechenden Laborhefen im Clusterbereich der obergärigen Hefen, während die untergärigen Hefen (*Saccharomyces pastorianus*) eine höhere Distanz zu den obergärigen Hefen aufweisen.

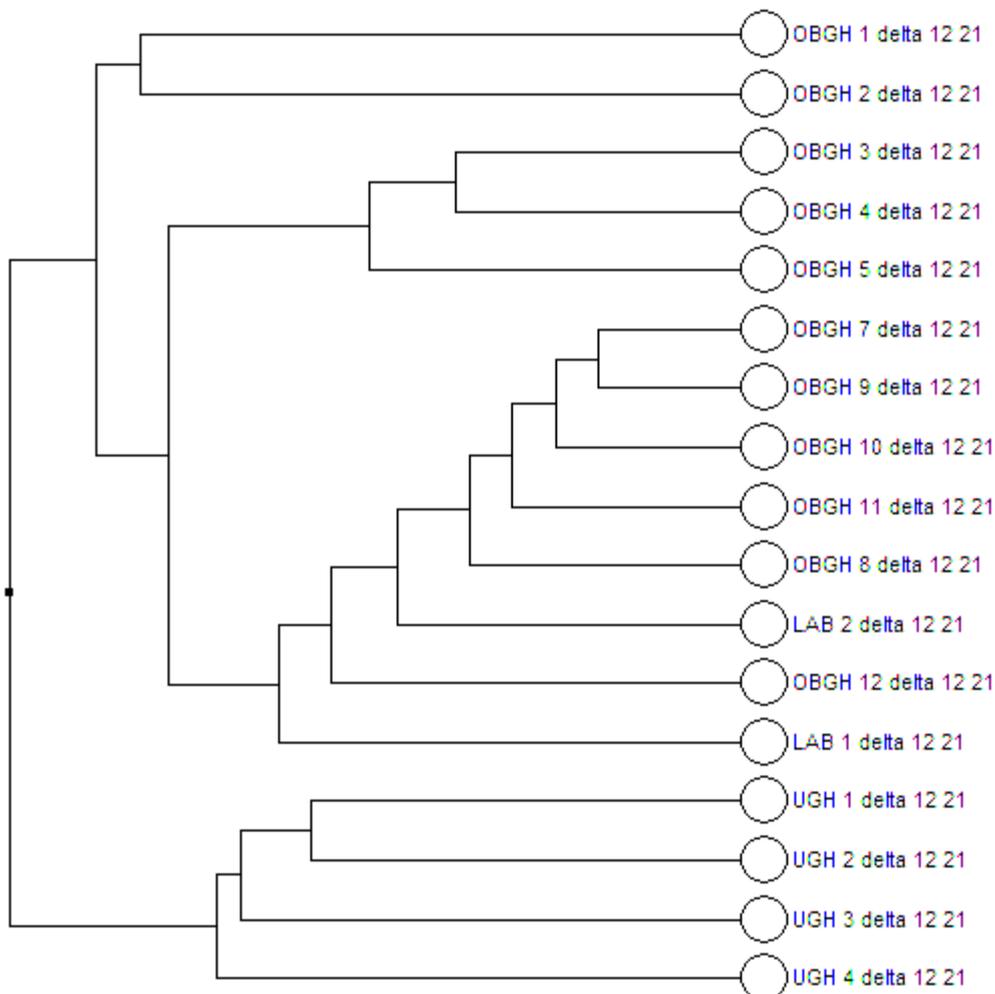


Abb. 1: Dendrogramm des genetischen Fingerprints zur Differenzierung der verwendeten obergärigen Brauefestämme (OBGH1, OBGH2, OBGH3, OBGH4, OBGH5, OBGH7, OBGH8, OBGH9, OBGH10, OBGH11, OBGH12) und *Saccharomyces cerevisiae* Laborstämmen (LAB1, LAB2) und untergärigen Brauefestämmen (UGH1, UGH2, UGH3, UGH4) mit den Primern δ_{12}/δ_{21}

Die Verwendung von delta-Primern liefert eine schnelle Möglichkeit zur Differenzierung von obergärigen Brauefestämmen, mindestens basierend auf ihrem Anwendungsgebiet (Hefestämme zur Herstellung von Hefeweizen, Alt, Kölsch oder Ale-Bier).

Genetischer Fingerprint basierend auf Restriktion mitochondrialer DNA:

Die mitochondriale DNA (mtDNA) von *Saccharomyces cerevisiae* ist ein kleines Molekül (65-80kb). Diese kann verwendet werden, um die Hefen auf Stammebene zu unterscheiden. Durch die Verwendung von Restriktionsenzymen kann die isolierte mtDNA fragmentiert werden, um einen genetischen Fingerprint der mtDNA zu erhalten. Restriktionsenzyme haben jeweils spezifische Schnittstellen, d. h. sie „schneiden“ DNA-Bereichen nur an bestimmten Sequenzen. Abhängig vom gewählten Restriktionsenzym kann man demnach unterschiedliche Fragmentmuster erhalten. Bei den bisherigen Versuchen wurde die Zuordnung eindeutiger Banden durch einen starken Hintergrundschlier auf dem Gelbild erschwert. Die erkennbaren Banden lieferten auch keine eindeutige Unterscheidung zwischen den einzelnen Hefestämmen. Zur Optimierung der Restriktionsanalysen der mtDNA wurde ein Kit zur Isolierung von mitochondrialer DNA aus Hefen verwendet („Mitochondrial DNA Isolation Kit“ von BioVision). Zur Optimierung der Isolierung wurden verschiedene Methoden zur Zerstörung der Zellwand ausgetestet (siehe Tabelle 3)

Tabelle 3: Methoden zur Zerstörung der Zellwand zur Isolierung der mitochondrialen DNA unter Verwendung des Mitochondrial DNA Isolation Kit

Ergebnis	Zerstörung der Zellwand ...		
	keine zusätzliche Zerstörung	enzymatisch mit Zymolyase	mechanisch durch Glasperlen
Farbe des Pellets	weißliches Pellet	kein Pellet erkennbar	bräunliches Pellet
C _{mtDNA} [ng/μl]	31	3,3	74

Die Restriktion der mtDNA zum Erhalt eines genetischen Fingerprints wurde mit den Enzymen AluI und RsaI durchgeführt. Die Variationen von eingesetzter DNA-Menge und Inkubationszeit lieferte keine auswertbaren Ergebnisse. Es konnte kein Schnittmuster detektiert werden. Die Isolierung der mtDNA konnte jedoch durch die Amplifizierung eines mtDNA spezifischen Gens, dem COX-II-Gen, nachgewiesen werden. Auch die Funktion der Restriktionsenzyme konnte anhand der Restriktion des amplifizierten COX-II-Gens gezeigt werden. Anhand der Sequenz des COX-II-Gens konnte ermittelt werden was für ein Schnittmuster zu erwarten war. Das Enzym AluI weist eine, RsaI zwei, potentielle Restriktionsstellen auf. Das Enzym EcoRI weist keine Schnittstellen auf dem Gen auf und wurde zum Vergleich mitverwendet. Durch die Inkubation mit EcoRI, blieb das Fragment wie zu erwarten war unbehandelt/ungeschnitten. Auch zeigten die früheren Restriktionsanalysen, wie

bereits erwähnt, bei denen ein starker Hintergrundschlier vorlag, keine eindeutige Unterscheidung der obergärigen Brauhefestämme. Daher wird die Verwendung des genetischen Fingerprints durch Restriktion der mitochondrialen DNA für die verwendeten Stämme als zu aufwendig und nicht geeignet eingestuft.

Next Generation Sequencing

Eine eindeutige Unterscheidung der Hefen sollte mittels detaillierter Genomanalyse durch eine Sequenzierung des gesamten Genoms möglich sein. Durch das Next Generation Sequencing (NGS) mit verschiedenen Methoden kann das gesamte Genom von *Saccharomyces cerevisiae* sequenziert werden. Für die Sequenzierung sind entsprechende Mengen an DNA nötig. Die Konzentration der DNA wurde mit dem DeNovix dsDNA Broad Range Assay Kit am DS-11 FX+ bestimmt. Nach der Isolierung der entsprechenden DNA-Menge wurden die Proben an eine externe Firma zur Sequenzierung verschickt. Bei den einzelnen Methoden zum wholeGenome NGS werden DNA-Fragmente sequenziert und durch bioinformatische Methoden zu der vollständigen Genomsequenz zusammengesetzt. Dabei sollen zwei Hefen mittels dem PacBio *de novo* Sequenziert werden. Mit dieser Methode werden lange DNA-Fragmente sequenziert, wodurch deren Zusammensetzung vereinfacht wird. Alle weiteren Stämme sollen mittels der HighSeq Methode resequenziert werden. Hier werden kurze Fragmente Sequenziert und gegen eine Vorlagen gemappt, um die einzelnen Fragmente zu der Gesamtsequenz zusammensetzen. Als Vorlage sollen die beiden Stämme, die *de novo* Sequenziert werden, genutzt werden. Während die Proben, welche anhand der der HighSeq Methode (Resequenzierung) sequenziert werden konnten, stellt die Aufarbeitung der DNA für die *de novo* Sequenzierung eine Herausforderung dar. Im Gegensatz zur Resequenzierung mittels Illumina, müssen die Proben komplett frei von RNA sein und eine Menge von 9 µg in 200 µl aufweisen. Bisherige Aufarbeitungen mit dem MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (epicentre) lieferte hohe RNA-Werte. Eine Behandlung der Proben mit RNase zur Reduzierung der RNA, verringerte zwar die RNA-Konzentration, jedoch verringerte sich ebenfalls die benötigte DNA-Menge, so dass eine *de novo* Sequenzierung mit der restlichen DNA-Menge nicht empfohlen wurde. Nach mehreren Versuchen eine angebrachte Konzentration an RNA-freier, aufgereinigter DNA mit diesem Kit zu erhalten, wurde das Precellys Bacterial/Fungal DNA Kit (peqlab/VWR) ausgetestet. Diese lieferte zwar eine RNA-freie aufgereinigte DNA, jedoch zeigte sich eine deutliche Degradation der DNA (Verschmierte Bande

auf dem Agarosegel). Des Weiteren war der 260/230 Wert der Nanodrop-Messung zu gering. Dadurch wurde keine *de novo* Sequenzierung empfohlen wurde.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurde die DNA-Isolierung für die *de novo* Sequenzierung mit einem weiteren Kit getestet.

Arbeitspaket 5 – Feststellung der genetischen Stabilität

Die isolierten Linien können nur dann eine Bedeutung als optimierte Kulturhefen erlangen, wenn ein hohes Maß an genetischer Stabilität gegeben ist. Hier wurden die in Arbeitsschritt 4 verwendeten und optimierten Methoden angewendet. Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden die Stämme H8 und H10 analysiert. Die Hefestämme wurde über 5 Fermentationen geführt mit einer Zwischenlagerung für 48 h bei 4 - 6°C. Unter dem Aspekt der Abnahme des scheinbaren Restextraktes waren keine Auffälligkeiten anzumerken. Die Analysenergebnisse deuten auf eine hohe genetische Stabilität hin. Nachfolgend ist der genetische Nachweis aufgeführt.

Auf der Grundlage, dass die delta-Primer die beste Unterscheidung zwischen den Hefen lieferte, wurden diese auch zur Überprüfung der genetischen Stabilität verwendet. Der genetische Fingerprint der Hefen 8 und 10 aus der 1. Gärführung wurde mit der jeweils letzten Gärführung verglichen. Dabei wurden auch die jeweiligen Isolate aus der Mikromanipulation analysiert.

Die jeweiligen genetischen Fingerprints zeigten zwischen den Führungen keine Veränderungen auf. Des Weiteren zeigten auch die isolierten Einzelzellen keine Unterscheidung zur Gesamtpopulation auf. Dies deutet, wie bereits physiologisch aufgezeigt, auf eine genetische Stabilität hin.

Arbeitspaket 6 – Versuche in den EBC-Gärsäulen mit Standardwürze (12%mas)

Für dieses Arbeitspaket wurden die Stämme H1, H2, H4, H5, H7, H8, H11 und H12 ausgewählt. Dazu wurden nach einer Voranzucht der jeweiligen Zelllinien und des Ausgangsstammes Fermentationen im 4 Liter Maßstab durchgeführt. Für dieses Forschungsprojekt standen 12 EBC-Gärsäulen aus Edelstahl zur Verfügung. So konnten bei jeder Überprüfung der Eigenschaften fünf unterschiedliche Zelllinien mit dem Ursprungstamm verglichen werden. Folgende Kriterien wurden berücksichtigt:

- Flokkulations-/Absetzverhalten der Hefe:
- Diacetylreduktion
- Gärgeschwindigkeit - Extraktabbau
- pH-Wert

- Raffinosekonzentration
- Konzentration von 4-Vinyl-Guajacol
- Isoamylacetat (3-Methylbutylacetat) und weitere Ester.

Im Rahmen dieses Sachberichtes erfolgt die Dokumentation der Ergebnisse beispielhaft mit dem Stamm H11.

Extraktabbau: Bei dem Tochterstamm H11-14 war eine weitergehende Abnahme des scheinbaren Restextraktes gegenüber dem Originalstamm messbar. Bei den anderen Töchterstämmen hingegen war diese nicht festzustellen.

pH-Wert: Bei den Töchterstämmen 14 und 15 ist eine schnellere und größere pH-Wertabnahme bis 48 Stunden anzumerken.

Gesamtdiacetyl: Bei der Bestimmung der Konzentration an Gesamtdiacetyl ist anzumerken, dass die Stämme 10 und 13 nach 48 Stunden eine deutliche Abweichung in der Konzentration an Gesamtdiacetyl aufwiesen und dass bei den Stämmen 14 und 15 die größte Diacetylreduktion zu messen war.

4-Vinylguajacol: Alle Messwerte lagen unter der Nachweisgrenze von 0,4 bzw. 0,2 mg/L.

Konzentration an Estern: Bei allen Töchterstämmen wurden geringe Konzentrationen an den analysierten Estern (Ethyl-, Isoamyl- und 2-Phenylethylacetat) gemessen, insbesondere bei dem Stamm 14.

Arbeitspaket 7 – Versuche in den EBC-Gärsäulen mit High-Gravity-Würze (18%mas)

Im diesem Arbeitspaket stand das Gärverhalten von Linien aus 6 Stämmen unter der Extrembedingung „High Gravity“ im Vordergrund. Die Versuche mit den Stämmen H2, H4, H5, H7, H8 und H11 wurden ebenfalls in EBC-Gärsäulen durchgeführt, und die Analytik analog zum Arbeitspaket 6. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt beispielhaft mit dem Stamm H2.

Extraktabbau: Der Tochterstamm 13 wies eine größere Abnahme des scheinbareren Restextraktes auf.

pH-Wert: Ein intensiverer Extraktabbau ist mit einer weiteren Stoffumwandlung verbunden. Dieses wurde durch die schnellere und größere Absenkung des pH-Wertes bei dem Stamm 13 bestätigt.

Gesamtdiacetyl: Im Rahmen dieser Analytik waren keine nennenswerten Auffälligkeiten anzumerken.

Konzentration an 4-Vinylguajacol: Auch hier sind keine nennenswerten Abweichungen anzumerken.

Konzentration an Estern: Bei den analysierten Estern sind ebenfalls keine deutlichen Unterschieden bei den bestimmten Konzentrationen zu nennen.

Alkoholkonzentration und scheinbarer Restextrakt: Es ist anzumerken, dass beide untersuchten Töchterstämme mehr Extrakt umgewandelt haben und demzufolge auch eine höhere Alkoholkonzentration gemessen worden ist (beim Stamm 13 ca. 0,6 %vol.)

Arbeitspaket 8 – Herstellung von Mutanten

Im Projekt sollten in ausgewählten Hefestämmen Mutationen basierend auf physikalischer Mutagenese mittels UV-Bestrahlung erzeugt werden. Die UV-Bestrahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm mit unterschiedlichen Einwirkzeiten. Es war drauf zu achten, dass die UV-Bestrahlung (Wellenlänge und Einwirkzeit) nicht komplett letal für die Hefepopulation wirkt. Die Hefezellen wurden zunächst in Flüssigkulturen angezogen und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen auf verschiedenen festen Nährböden (mit oder ohne Selektionsdruck) ausplattiert. Die Zellen auf der Agarplatte wurden sofort der UV-Bestrahlung ausgesetzt und anschließend inkubiert. Aufgrund des polyploiden genetischen Hintergrunds von industriellen Brauhefen, könnten eventuelle Mutationen durch vorhandene, von Mutationsvorgängen „verschonte“ Allele wieder ausgeglichen werden, so dass eventuelle Mutationen in den Fermentations-eigenschaften nicht auffallen. Daher wurde die UV-Bestrahlung von entsprechenden

sog. Ascosporen des jeweiligen Hefestammes durchgeführt. Neben der vegetativen Vermehrung durch Sprossung zur Erzeugung von Biomasse, sind die Hefezellen auch zur sexuellen Vermehrung in der Lage. Bei Ascosporen handelt es sich um die sexuellen Vermehrungsformen der Hefezellen, die einen halbierten Chromosomensatz im Gegensatz zur Ausgangszelle besitzen. Aufgrund des verringerten Chromosomensatzes könnten eventuelle Mutationen in Fermentationsprozessen aufgrund veränderter Eigenschaften besser auffallen.

Tabelle 4: Medien und Einwirkzeiten der UV-Bestrahlung bei 254 nm

Wachstum nach der UV-Bestrahlung: += Wachstum, -= kein Wachstum, / = nicht durchgeführt

Medien und Einwirkzeit für die UV-Bestrahlung (254 nm)	Hefestamm OBGH				
	2	8	10	8 (Ascospore)	10 (Ascospore)
YEPD; 2,5 min.	+	+	+	+	+
YEPD; 10 min.	/	+	+	/	/
Würze 35 °P; 10 min.	x	+	+	+	+
YEPD+20%EtOH; 2,5 min	+	+	+	+	+
2-DOG-Medium - 500 ppm; 2,5 min	-	-	-	/	/
2-DOG-Medium - 1000 ppm; 2,5 min	-	-	-	/	/

Die Mutationserfolge bzw. die Selektion von eventuellen Mutanten ist in Tabelle 4 dargestellt. Es konnten jeweils Mutanten von den Ausgangszellen als auch von den Ascosporen isoliert werden. Eine Mutation und somit Selektion von Zellen auf Medien mit einem Selektionsdruck von 20 % Ethanol zeigte sich ebenfalls als erfolgreich. Eine direkte Selektion auf diesem Medium ohne UV-Bestrahlung ist teilweise nicht möglich (siehe Arbeitspaket 9). Ausgewählte Mutanten wurden gegen den Ausgangsstamm mittels genetischen Fingerprint verglichen. Es zeigten sich jedoch, auch bei dem Vergleich mit verschiedenen Primern keine Unterschiede im Bandenmuster der jeweiligen Mutanten und auch nicht zum Mutterstamm. Detailliertere Untersuchungen werden im weiteren Verlauf des Projektes mittels NGS durchgeführt.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Extraktabbau.

Die erzeugten Ascosporen dienen, wie bereits erwähnt, der sexuellen Vermehrung von Hefezellen. Diese besitzen jeweils unterschiedliche Kreuzungstypen MATa oder MATα. Der Kreuzungstyp kann mittels PCR-Amplifizierung bestimmt werden. Eine sexuelle Vermehrung bedeutet die Hybridisierung/Fusion von zwei Ascosporen mit

entgegengesetzten Kreuzungstypen a und α .

Solch eine Hybridisierung vor allem von Ascosporen unterschiedlicher Hefestämme führt zu einer erhöhten genetischen Varianz innerhalb einer Species. Durch die Fusion von Hefezellen unterschiedlicher Stämme, können deren Eigenschaften vereint und somit zu einem eventuellen optimierten neuen Hefestamm führen.

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden daher die erzeugten Ascosporen auch zur Hybridisierung der verschiedenen obergärigen Brauhefestämme genutzt.

Die Schritte der Hybridisierung waren:

- A. Erzeugung von Ascosporen auf Kaliumacetat-Agar
- B. Isolierung von Sporen
- C. Bestimmung des Kreuzungstypes von isolierten Sporen mittels PCR
- D. Hybridisierung von Sporen unterschiedlicher Hefestämme mit unterschiedlichen Kreuzungstypen
- E. Überprüfung des Hybridisierungserfolges

Die Isolierung von Ascosporen mit einem stabilen Kreuzungstyp ist bei *Saccharomyces cerevisiae* Hefen eine Herausforderung, da diese einem sog Paarungstyp- Determinationswechsel (Mating-Type-Switch) unterliegen können. Dadurch können Zellen innerhalb einer Population einen unterschiedlichen Kreuzungstyp aufweisen. Dadurch weisen Hefepopulationen die solch einem Mating-Type-Switch unterlagen zwei Banden bei der PCR-Amplifizierung auf. Dies bedeutet, dass einzelne Zellen innerhalb einer Population unterschiedliche Kreuzungstypen aufweisen. Für die Hybridisierung ist es notwendig, dass die Population der jeweiligen Ascospore nur einen Kreuzungstypen aufweist. Daher müssen entsprechend viele Ascosporen eines Stammes isoliert und bestimmt werden. Nach der Kreuzung der Hefestämme, die in Flüssigkultur oder auf Platte erfolgen kann, müssen isolierte, potentielle Hybride überprüft werden. Dies erfolgt durch verschiedene Methoden:

1. Überprüfung des Kreuzungstypen: Hybride müssen wieder beide Kreuzungstypen a und α aufweisen
2. Hybride müssten wieder die Fähigkeit zu sporulieren besitzen
3. Ein genetischer Fingerprint des neuen Stammes sollte eine Kombination der genetischen Fingerprints der Ausgangsstämme aufzeigen.

Wenn die ersten beiden Punkte nach erfolgter Hybridisierung zutreffend waren, wurde der genetische Fingerprint des jeweiligen Hybrides mit denen der Ausgangsstämme verglichen. Aufgrund des potentiellen polyploiden genetischen Hintergrunds, könnte die Sporulationsfähigkeit der Hefestämme eingeschränkt sein. In Tabelle 5 ist die Sporulationsfähigkeit der jeweiligen Hefestämme dargestellt. Es zeichnete sich ab, dass die Hefestämme zur Herstellung von Hefeweizen keine Sporulationsfähigkeit besitzen, was auch als Charakterisierungsmerkmal genutzt werden könnte.

Tabelle 5: Sporulationsfähigkeit der ausgewählten Brauhefestämme
 Legende: - = keine Bildung von Ascosporen; +=Bildung von Ascosporen

Hefestamm	Sporulationsfähigkeit
OBGH2	-
OBGH4	-
OBGH5	-
OBGH7	+
OBGH8	+
OBGH9	+
OBGH10	+
OBGH11	+

Für die Hybridisierung wurden die Sporen der Hefestämme OBGH7, 8, 9 und 10 herangezogen. Die erfolgreiche Hybridisierung wurde durch die Überprüfung des Kreuzungstypes und der erneuten Sporulationsfähigkeit überprüft.

Es wurde der Extraktabbau während der Gärung in 12 %-iger Würze (Labormaßstab 100 ml) von den Hefestämmen OBG8 und OBGH10 im Vergleich zu ihren gemeinsamen Hybriden OBGH10-8d, OBGH10-8g und OBGH10-8j geprüft. Es zeigte sich, dass die Hybride einen etwas schnelleren Extraktabbau aufwiesen, was ebenfalls eine Hybridisierung bestätigt.

Arbeitspaket 9 – Etablierung und Anwendung eines Selektionsverfahrens zur Isolierung praxisrelevanter Mutanten

Das Ziel der Selektion ist der Erhalt von Hefestämmen mit angepassten bzw. optimierten Fermentationseigenschaften.

Ausgewählte Hefestämme wurden auf Medien unterschiedlichen Selektionsdrücken ausgesetzt. Dabei sollten Hefezellen aus einer Population selektiert werden, die sich an die gegebenen Selektionsbedingungen schnell anpassen können.

Aus der Tabelle 6 sind die Möglichkeiten der Selektion ausgewählter obergäriger Brauhefestämme dargestellt. Alle Hefestämme zeigten eine gute Anpassung an

hochkonzentrierte Würze (35 °P), was auf eine hohe Osmotoleranz deutet. Um Zellen mit einem schnelleren Extraktabbau zu selektieren, wurden die jeweiligen Stämme auf 2-Desoxy-Glucose-Medium (2-DOG), mit einer Konzentration von 500 ppm ausplattiert. Zellen, die auf diesem Medium wachsen können, weisen eventuell eine Glucose-Derepression auf. Dies bedeutet, dass sie in der Lage wären, in Anwesenheit von Glucose und Maltose diese nicht nacheinander (zuerst Glucose und dann Maltose) zu verstoffwechseln, sondern parallel. Dies würde den Extraktabbau in der Würze verschnellern. Es ist zu erkennen, dass unter diesem Selektionsdruck nur Zellen der Hefen OBGH8 und 10 isoliert werden konnten. Auf einem Medium mit 20 % Ethanol zur Steigerung der Ethanoltoleranz konnten keine Hefezellen isoliert werden. Dies wäre vor allem bei der Gärung bei hohen Würzekonzentrationen von Interesse. Um jedoch die jeweiligen Hefestämme an die entsprechenden Bedingungen besser anzupassen, wurde versucht den jeweiligen Stamm durch eine stufenweise Steigerung des jeweiligen Selektionsdrucks anzupassen (Adaptation). Die Hefezellen werden dabei nach einer bestimmten Inkubationszeit (2 - 4 d) unter der ersten, geringen Konzentration des jeweiligen Selektionsdrucks in ein Medium mit einer gesteigerten Konzentration des jeweiligen Selektionsdrucks überführt. Dies kann auf Agarplatten oder in Flüssigkulturen in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. In Tabelle 6 sind unter „Adaptation“ die jeweiligen Konzentrationen dargestellt, bis zu denen die jeweiligen Hefestämme angepasst werden konnten. Für die Anpassung an 2-DOG wurde mit einer Konzentration von 100 ppm gestartet und mit jeder Überführung um 100 ppm gesteigert. Die Ethanolkonzentration wurde beginnend bei 5 % stufenweise um 2,5 – 5 % gesteigert. Es zeigte sich, dass vor allem die Hefestämme OBGH2, OBGH4 und OBGH5, bei denen es sich um Stämme zur Herstellung von Hefeweizen handelt, sich sehr hohen Konzentrationen dieser Selektionsdrücke nicht anpassen können. Diese werden daher nicht weiter berücksichtigt. Die Hefestämme OBGH8 und OBGH10 konnten an sehr hohen Konzentrationen von 2-DOG adaptiert werden. Diese wurden auf dem entsprechenden Selektionsmedium als Agar-Platte ausgestrichen und ausgewählte Kolonien wurden auf eine Glucose-Derepression hin überprüft. Dies erfolgte in einem synthetischen Medium mit jeweils 25 g/l Glucose und Maltose. Eine Selektion auf 2-DOG bedeutet nicht zwangsläufig, dass in den Zellen eine eindeutige stabile Glucose-Derepression vorliegt. Dies zeigt das Potential eines schnelleren Extraktabbaues während eines Gärungsprozesses.

Im Labormaßstab (100 ml) konnte in 12%-iger Würze durch 2-DOG-Isolate des OBGH8 jedoch kein eindeutig schnellerer Extraktabbau festgestellt werden.

Tabelle 6: Selektions- und Adaptationserfolge unter verschiedenen Selektionsdrücken
 Legende: += Wachstum, -= kein Wachstum, (+)= schwaches Wachstum, / = nicht durchgeführt

Selektionsdruck	Hefestamm OBGH						
	2	4	5	8	9	10	11
	Selektion						
Würze 35 °P	+	+	+	+	+	+	+
2-DOG 500ppm	-	-	-	+	-	+	-
Ethanol 20 %	-	-	-	(+)	-	-	-
	Adaptation						
2-DOG [ppm]	200	200	200	2300	/	2300	2300
Ethanol [%]	15	15	15	20	20	20	20

Arbeitspaket 10 - Kleinfermentation III

Analog zu den Arbeitspaketen 6 und 7 wurden auch hier Versuchsfermentationen durchgeführt. Diese hatten das Ziel, die in den Arbeitspaketen 8 ausgewählten Mutanten auf ihre Fermentationseigenschaften hin zu testen. Hier wurden zwei Ausgangshefestämme als Referenz geführt, um diese mit den Gäreigenschaften der mutierten bzw. selektierten Zelllinien zu vergleichen.

In der Tabelle 7 sind die geprüften Hefestämme aufgeführt.

Nr.	Hefestamm
1	H 8 Orig.
2	H 10 Orig.
3	H8 35%Würze
4	H8 10 Min. UV, auf YEPD
5	H8 10 Min. UV, auf Würze
6	H8 20vol% Ethanol
7	H10 - 8g
8	H10 - 8j
9	F9
10	F11

Tab. 7: Übersicht der geprüften Hefestämme

Extraktabbau

Die Gärintensität eines Hefestammes ist ein wichtiges wirtschaftliches Kriterium. Die Stämme 3,4 und 6 wiesen einen langsameren Abbau auf, und bei dem Stamm 5 wurde eine deutlich langsamere und nicht so intensive Verstoffwechslung (Differenz bis zu 1,4%mas) der vergärbaren Kohlenhydrate festgestellt. Dem gegenüber zeigten die Stämme 9 und 10 einen weitergehenden Extraktabbau (Differenz bis zu 0,5%mas) im Vergleich zu den beiden Originalstämmen. Dieses ist unter dem Aspekt einer ungefähr gleichen Hefezellzahlkonzentration in der Anstellwürze und fast identischer fermentationstechnisch relevanter Parameter (Belüftung, Druck, Temperatur und Tankgeometrie) interessant. Erfahrungsgemäß sollte innerhalb von 7 Tagen ein scheinbarer Vergärungsgrad von 72 – 75 % erreicht sein, ansonsten liegt eine Gärstörung vor. Diese konnte durch die Bestimmung des Vergärungsgrades ausgeschlossen werden. Bei dem Stamm 5 handelt es sich um einen mutierten Stamm, welcher 10 Minuten einer UV-Bestrahlung ausgesetzt war.

pH-Wert

Bei einem störungsfreien Gärverlauf sinkt der pH-Wert der Anstellwürze von ca. 5,2 bei gesäuerten Würzen, z. B. durch die Bildung von organischen Säuren (Bernsteinsäure, Milchsäure und Essigsäure), auf einen Wert von ca. 4,4 im fertigen Bier ab. Mittels des pH-Wertes können auch Aussagen über die Bierqualität getroffen werden. Bei einem pH-Wert $< 4,1$ sollte eine Überprüfung hinsichtlich mikrobiologischer Kontaminationen erfolgen. Ein Anstieg des pH-Wertes um $> 0,1$ pH-Werteinheiten zum Ende der Fermentation deutet auf eine beginnende Autolyse der Hefe hin. Bei den Stämmen 3 – 8 war die pH-Wertabnahme, im Vergleich zu den beiden Originalstämmen, nicht so intensiv. Dieses kann damit begründet werden, dass bei einer weniger intensiven Stoffumsetzung eine dementsprechend geringere Konzentration an organischen Säuren vorliegt, bzw. auch die Bildung und Lösung von CO₂ nicht so hoch war. Die pH-Absenkung bei den Stämmen 9 und 10 lag im Bereich der Originalstämme.

Gesamtdiacetyl

Der Abbau vicinalen Diketone verläuft während des Reifungsprozesses parallel zu den anderen Reifungsvorgängen. Die Bildung der Vorstufen ist abhängig vom Hefestamm und der Hefegabe. Auf eine schnelle Umwandlung der Vorstufen wirken

sich eine rasche pH-Wertabsenkung auf pH 4,2...4,3, eine erhöhte Temperaturführung und die Zugabe von Sauerstoff positiv aus. Bei den Stämmen 3, 4 und 6 war eine, im Vergleich zu den Originalstämmen, langsamere Umwandlung festzustellen. Dagegen wiesen die Stämme 9 und 10 eine schnellere und auch weitergehende Umwandlung auf. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Extraktabbau und der pH-Wertabsenkung.

Ester

Diese Stoffgruppe ist für ein mehr oder wenig fruchtiges Aroma im Bier verantwortlich und stellt somit ein qualitatives Merkmal dar. Zu den aromabeeinflussenden Faktoren zählt neben, z. B. Würzebelüftung, höhere Gärtemperaturen, die Tankgeometrie oder den Einsatz von High Gravity Würzen, der verwendete Hefestamm. Bei beiden Originalstämmen entsteht im Verlauf der Gärung und Reifung kein ausgeprägtes gewürznelkenartiges Aroma. Die Konzentrationen von 4-Vinylguajacol und 4-Vinylphenol lagen unter der Nachweisgrenze von 0,4 bzw. 0,2 mg/L. Die Werte aller drei bestimmten Ester Ethyl-, Isoamyl- und 2-Phenylethylacetat) liegen zwischen den Konzentrationen der beiden Originalstämme.

Fazit

Insgesamt wurde mit acht mutierten bzw. hybriden Hefestämmen ein Fermentationstest durchgeführt. Die analysierten Parameter wurden mit den Werten der Originalstämme verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Stämme 9 und 10 hinsichtlich einiger fermentationstechnischer Faktoren im Vergleich zu den Originalstämmen ein Optimierungspotential aufwiesen. Die vergärbaren Kohlenhydrate wurden intensiver verstoffwechselt, was sich in einem geringeren scheinbaren Restextrakt widerspiegelt. Die schnellere und weitergehende pH-Wertabsenkung korreliert mit dem Extraktabbau und bedingt einen besseren Schutz gegen Kontaminationen. Die Reduktion des Gesamtdiacetylgehaltes erfolgte schneller und intensiver, so dass die Reifungsphase eher begonnen werden kann, was zu einer Einsparung von Energiekosten für die Kühlung führen kann.

3. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages, Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit, Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

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

Ein Ansatzpunkt für die Bearbeitung des abgeschlossenen Forschungsprojektes bestand in der Annahme, dass viele Hefestämme zwar als Reinzuchtheferen definiert werden, jedoch nach der Selektion einzelner Hefezellen aus den Stämmen Unterschiede hinsichtlich gärungsrelevanter Parameter bei den generierten „Töchterstämmen“ messbar waren (siehe Tab. 3). Dieses zeigt sich bei der Versuchsreihe mit einer Stammwürze von 12%mas. z. B. sehr deutlich bei dem Stamm H11, denn hier wies der Tochterstamm 14 eine schnellere und weitergehende Extraktabnahme und eine intensivere Diacetylreduktion, bei einem adäquaten sensorischen Profil, im Vergleich zum Originalstamm auf. Unter High-Gravity-Bedingungen (18%mas Stammwürze) war z. B. zeigte bei dem Stamm H2 der Tochterstamm 13 in eine bessere Umwandlung der vergärbaren Kohlenhydrate. Bei alle anderen untersuchten Parametern gab es keine Abweichungen im Vergleich zum Originalstamm. Ein weiterer Schwerpunkt des abgeschlossenen Forschungsprojektes bestand darin, Mutanten zu generieren und diese hinsichtlich der aufgeführten Parameter zu prüfen. Die Übersicht der Mutanten ist in der Tab. 7 aufgeführt. Die Mutanten wurden mit 2 Originalstämmen (H 8 und H10) verglichen. Dabei zeigten die Mutanten 9 und 10 einen schnelleren und weitergehenden Extraktabbau, eine geringe Bildung an Gesamtdiacetyl und eine intensivere Reduktion. Das sensorische Profil entsprach dem der Originalstämmen. Abschließend ist zu resümieren, dass es mit beiden angewendeten Verfahren und den untersuchten Hefestämmen möglich ist, die Fermentationszeit, bei gleichbleibender Produktqualität, zu verkürzen und damit den Produktionsprozess zu optimieren. Gleichzeitig ist anzumerken, dass die gewonnenen Erkenntnisse sich lediglich auf die Versuche in den modifizierten EBC-Gärsäulen beziehen.

3.2. Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das Projekt wurde durch drei wissenschaftliche Mitarbeiter (Qualifikation A) sowie einen Laboranten (Qualifikation C) der VLB Berlin bearbeitet. Je nach Intensität wurden bestimmte Arbeitspakete gleichzeitig durch alle Mitarbeiter parallel bearbeitet. Innerhalb der Laufzeit von 24 Monaten wurden insgesamt 44,40 Personenmonate (PM) an dem Projekt gearbeitet. Die geleistete Arbeit lag rund 11,60 % über der kalkulierten Kapazitätsplanung von 39,25 PM. Die eingesetzten Personalressourcen waren für die Durchführung dieses anspruchsvollen Projekts notwendig, die geleistete Arbeit der Zielstellung angemessen.

3.3. Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die für das Projekt eingeplanten Ausgaben sind mit geringen Abweichungen (Mehrausgaben) von +1,53 % so, wie ursprünglich geplant eingetreten.

3.3.1. Personalausgaben

Die tatsächlichen Ausgaben für das eingesetzte Personal lagen mit 168.060 € lagen rund 8,7 % über den ursprünglich geplanten Ausgaben. Dies lag vor allem daran, dass in unterschiedlichen Arbeitspaketen erheblich aufwendigere Tätigkeiten als zum Zeitpunkt der Antragstellung ersichtlich, geleistet werden mussten.

3.3.2. Allgemeine Ausgaben

Die Allgemeinen Ausgaben wurden wie geplant berücksichtigt. Die Vorkalkulation, für die pauschal 88 % der Personalkosten angesetzt wurden, stimmte mit den tatsächlichen Kosten gut überein (siehe zahlenmäßiger Nachweis).

3.3.3. Ausgaben für Material und Kleingeräte

Die tatsächlichen Ausgaben für Material und Kleingeräte lagen bei 21.270 € um rund 24% unter den geplanten Werten. Grund hierfür ist, dass bereits beim Zuwendungsempfänger vorhandenes Material, speziell Verbrauchsmaterial, teilweise eingesetzt werden konnte.

3.3.4. Ausgaben für Einzelgeräte

Die tatsächlichen Ausgaben für Einzelgeräte lagen bei 48.565 € und damit rund 7,5% unter den geplanten Werten. Grund hierfür war eine Preisreduktion bei dem Softwarepaket „BioNumerics“.

3.3.5 Ausgaben für weitere Zwecke

Die tatsächlichen sonstigen Ausgaben (Leistungen Dritter) lagen mit 50.990 € rund 12 % unter den geplanten Werten. Die Abweichung liegt in Minderausgaben für die Schutzrechtsberatung. Im Rahmen des durchgeführten Forschungsprojektes wurde dabei durch eine beauftragte Patentanwältin eine mögliche Anmeldung von Schutzrechten geprüft. Nach interner Diskussion wurde vorerst auf eine entsprechende Anmeldung durch die VLB verzichtet.

4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

Das Forschungsvorhaben hatte zum Ziel, den Brauereien nicht gentechnisch veränderte bzw. selektiv optimierte Hefestämme zur Verfügung zu stellen können, auf deren Basis wirtschaftlich effizientere Gärverfahren, wie auch Reifungs- und Klärungsverfahren möglich sind. Dadurch können die Produktionskosten gesenkt werden, z. B. durch Einsparung von Energie für die Kühlprozesse. Dabei steht im Fokus, dass das sensorische Profil nahezu unverändert bleibt. Insbesondere die KMU der Brauindustrie habe für derartige Versuchsserien weder das Equipment, noch das dafür notwendige qualifizierte Personal. Die in diesem Forschungsprojekt gewonnen Erkenntnisse und Ergebnisse stellen die Basis für eine kundenspezifische Optimierung der brauereieigenen Hefestämme dar. Der Wissenstransfer erfolgt über unterschiedliche Wege, mit denen das Optimierungspotential aufgezeigt wird. Nach aktuellem Kenntnisstand verfügen die KMU nicht über die notwendigen technischen Voraussetzungen, z. B. Mikromanipulator für die Selektion einzelner Hefezellen. Darüber hinaus ist spezielles molekularbiologisches Wissen notwendig, um durch Mutagenese oder Kreuzung neue Hefestämme generiert werden können. Mit den Interessenten der Brauindustrie werden dann auf den jeweiligen Kundenbedarf abgestimmte Strategien zur Zielerreichung definiert. Dabei muss durchaus darauf hingewiesen werden, dass sehr wahrscheinlich nicht bei allen kundeneigenen Hefestämmen eine Optimierung möglich ist.

In der betrieblichen Praxis gibt es hinsichtlich der Tankgeometrie unterschiedliche

Fermentationsbehälter. Es ist deshalb sinnvoll, die generierten Ergebnisse in unterschiedlichen Gärtanks (Verhältnis Durchmesser zur Höhe (statischer Druck) zu testen. Aus diesem Grund plant die VLB einen, sich an dieses Projekt, anschließenden Forschungsantrag einzureichen.

5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten

Im Rahmen des durchgeführten Forschungsprojektes wurde durch eine beauftragte Patentanwältin eine mögliche Anmeldung von Schutzrechten geprüft. Nach interner Diskussion wird vorerst auf eine entsprechende Anmeldung durch die VLB verzichtet.

6. Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen (Artikel in Zeitschriften, Seminare, Schulungen, Vorträge, Messen, Ausstellungen, Präsentationen)

Ziel ist es, die angestrebten Forschungsergebnisse und im Besonderen die daraus hervorgehenden optimierten Hefestämme der Brauindustrie zugänglich zu machen. Die Verbreitung der gewonnenen Erkenntnisse soll durch die vielfältigen Organe und Aktivitäten der Forschungsstelle erfolgen. Die VLB in Berlin wird durch ca. 400 Mitgliedsbrauereien und -mälzereien sowie durch weitere Förderer aus Industrie und Handel getragen. Der überwiegende Teil dieser Mitgliedsbetriebe ist mittelständischer Natur. Für diese Unternehmen verlegt die VLB eine eigene Fachzeitschrift (Brauerei Forum) und veranstaltet regelmäßig Kongresse, in denen über Forschungsergebnisse berichtet wird. Zusätzlich werden Arbeitsergebnisse auf der eigenen Homepage veröffentlicht. Die VLB unterhält für ihre Mitglieder verschiedene Fachgremien (z. B. Technisch – Wissenschaftliche Ausschüsse), in denen regelmäßig die Arbeitsergebnisse mit Experten der Industrie und des Handels diskutiert werden, um weitere Anregungen für die eigenen Forschungsarbeiten zu erhalten. Durch Publikationen in Fachzeitschriften auch für Bioethanolhersteller und durch Vorträge auf entsprechenden Fachtagungen soll über die Forschungsergebnisse berichtet werden. In der Tabelle 8 sind die geplanten Publikationen aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht geplanter Maßnahmen zum Transfer der Forschungsergebnisse in die Wirtschaft		
<i>Maßnahme</i>	<i>Ziel</i>	<i>Voraussichtlicher Zeitpunkt</i>
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	Oktober 2018
Veröffentlichung des Abschlussberichtes auf der Internetseite der VLB	Bereitstellung tiefer gehender Information im Internet	September 2018
Veröffentlichung der Ergebnisse des Forschungsprojektes in einer deutschsprachigen Fachzeitschrift, vorzugsweise Brauwelt, Brauereiindustrie oder Brauerei Forum und auf gängigen Hausbrauerei-Internet-Portalen	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 Forschungsergebnisse zur Einbindung in die Ausbildung von Brautechnologen an der Technischen Universität Berlin und an der VLB	Nach Veröffentlichung der Ergebnisse
Beratung von Unternehmen	Einbindung der Forschungsergebnisse in die Beratung von Unternehmen durch die VLB	Ab dem Zeitpunkt, zu dem umsetzbare Forschungsergebnisse erzielt wurden.