

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

Der physiologische Zustand und der Sauerstoffbedarf von Bierhefen  
unter brautechnologischen Bedingungen

Optimierung der Propagations- und Anstelltechnologie in Hinblick auf die  
Gäreigenschaften und die Bierqualität

Sven Schönenberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

Doktor - Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Becker

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Back (i. R.)
2. Univ.-Prof. Dr. F.-J. Methner (Technische Universität Berlin)
3. Univ.-Prof. Dr. H.-Chr. Langowski

Die Dissertation wurde am 31.05.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 23.09.2010 angenommen.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner geliebten Frau Inken für ihre volle, fast aufopfernde Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich meinen Eltern Sigrid und Gernot, meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets die notwendige Unterstützung zu Teil werden ließen.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing Werner Back, der ohne Zögern die Obhut über meine Arbeit für den erkrankten Univ.-Prof. Dr.-Ing E. Geiger übernommen hat und mir als Doktorvater zur Seite stand.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr.-Ing. Christoph Tenge und Herrn Dr.-Ing Urs Wellhoener bedanken, die mir beim Einstieg in mein Forschungsthema halfen und mich in ihrer verblieben Zeit am Lehrstuhl unterstützten.

Mein Dank gilt auch den übrigen Mitarbeitern des ehemaligen Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II sowie den Kollegen des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei I und des Forschungszentrum Weihenstephans für Brau- und Lebensmittelqualität für Rat, Tat und Analysen. Hier möchte ich mich vor allem bei Susan Illing, Christl Volkhart, Dr.-Ing. Fritz Jacob und Hubert Walter für ihre Unterstützung bedanken.

Ein weiterer Dank gilt meinem „Leidensgenossen“ Mathias Hutzler, der nicht wenige Abende und Nächte im benachbarten Büro zugebracht hat und somit frei nach dem Motto „Geteiltes Leid ist halbes Leid“ die Zeiten des Zusammenschreibens erträglicher gestaltet hat.

Nicht zu Letzt möchte ich mich bei meinen Diplomanten, Semesterarbeitern und Hiwis Thomas Hoppe, Hannes Enders, Christian Walcher, Matthias Eickerling, Sebastian Kleespies, Hubertus Schneiderbanger, Matthias Stodal, Roland Novy, Stephan Niebauer und Andreas Mühlbacher bedanken, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Jochen Martin, der mir bei der Korrektur dieser Arbeit zur Seite stand.

## Vielen Dank

Ein Großteil der hier zusammengefassten Forschungsergebnisse wurde durch die Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. im Rahmen des Forschungsvorhaben B90 unterstützt. Damit gilt mein Dank ebenfalls allen Brauerinnen und Brauern die daran beteiligt waren.

*Ich widme diese Arbeit meiner Frau Inken und meinen Kindern Marlene, Sara und Linus*

## **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|
| Abkürzungsverzeichnis .....                                                   | VI   |
| Abbildungsverzeichnis .....                                                   | VIII |
| Tabellenverzeichnis .....                                                     | XIV  |
| Formelverzeichnis .....                                                       | XVII |
| 1 Einleitung .....                                                            | 1    |
| 2 Stand des Wissens .....                                                     | 3    |
| 2.1 Die Geschichte der Hefeforschung .....                                    | 3    |
| 2.2 Für die Hefeernährung relevante Würzeinhaltsstoffe .....                  | 8    |
| 2.3 Biochemische Grundlagen der Enzyme .....                                  | 12   |
| 2.4 Der Hefemetabolismus .....                                                | 17   |
| 2.4.1 Kohlenhydratabbau unter optimalen Bedingungen .....                     | 19   |
| 2.4.2 Brautechnologisch relevante Stoffwechselphänomene .....                 | 23   |
| 2.4.3 Die Alkoholische Gärung .....                                           | 25   |
| 2.4.4 Der Stickstoffstoffwechsel .....                                        | 28   |
| 2.4.5 Der Lipidstoffwechsel und die Bedeutung des PDH-Bypasses .....          | 34   |
| 2.4.6 Die Proliferation der Hefe .....                                        | 37   |
| 2.4.7 Synthese und Bedeutung von Glykogen, Trehalose und Neutrallipiden ..... | 39   |
| 2.4.8 Bildung der Gärungsnebenprodukte .....                                  | 42   |
| 2.5 Bedeutung des Sauerstoffs für die Hefe .....                              | 49   |
| 2.5.1 Einfluss von Sauerstoff auf die Genexpression der Hefe .....            | 49   |
| 2.5.2 Oxidativer Stress der Hefe .....                                        | 50   |
| 2.5.3 Sauerstoffbedarf der Hefe in der Brauerei .....                         | 51   |
| 2.6 Anforderungen und Erfassung der Hefephysiologie .....                     | 54   |
| 2.7 Hefemanagement und Hefetechnologie in der Brauerei .....                  | 57   |
| 2.8 Die Bieralterung .....                                                    | 64   |
| 2.8.1 Bedeutung der Geschmacksstabilität .....                                | 64   |
| 2.8.2 Bildung der Alterungskomponenten .....                                  | 66   |
| 3 Material und Methoden .....                                                 | 69   |
| 3.1 Material .....                                                            | 69   |
| 3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....                                             | 69   |
| 3.1.2 Hefestämme und Fermentationsmedien .....                                | 70   |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.3 Propagatoren und Gärtanks.....                                                                                                     | 71  |
| 3.1.4 Sonstige Geräte.....                                                                                                               | 71  |
| 3.2 Methoden .....                                                                                                                       | 73  |
| 3.2.1 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität .....                                                                                   | 73  |
| 3.2.2 Flusszytometrische Analysen .....                                                                                                  | 76  |
| 3.2.3 Sonstige brautechnische Analysen .....                                                                                             | 79  |
| 3.2.4 Hinweise zur Berechnung des Vergärungsgrades und der Gärleistung .....                                                             | 80  |
| 3.3 Versuchsplanungen und Versuchsdurchführungen .....                                                                                   | 81  |
| 3.3.1 Versuche zur Ermittlung der oxidativen Belastung der Würze und der Sauerstoffzehrung der Hefe.....                                 | 81  |
| 3.3.1 Propagations- und Gärversuche zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs und des physiologischen Zustands der Hefe in der Brauerei ..... | 83  |
| 3.3.2 Weitere Gärversuche zur Erfassung des physiologischen Zustandes und Sauerstoffbedarfs der Hefe.....                                | 87  |
| 4 Ergebnisse .....                                                                                                                       | 90  |
| 4.1 Die O <sub>2</sub> -Verfügbarkeit und O <sub>2</sub> -Zehrung durch die Hefe während des Anstellens .....                            | 90  |
| 4.1.1 Die Sauerstoffzehrung der Hefe und oxidative Belastung der Würze.....                                                              | 90  |
| 4.1.2 Vergleich der Zehrungsintensität zwischen Ernte- und Propagationshefen .....                                                       | 94  |
| 4.1.3 Einfluss der Hefelagerung auf die Sauerstoffzehrung der Hefe .....                                                                 | 95  |
| 4.1.4 Sauerstoffverfügbarkeit in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren.....                                         | 96  |
| 4.2 Implementierung der Enzymaktivitätsmessung des PDH-Bypasses .....                                                                    | 100 |
| 4.2.1 Aktivität und Bedeutung der ACS für die Physiologie und das Wachstum der Hefe .....                                                | 100 |
| 4.2.2 Die Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsel während der Gärung .....                                     | 102 |
| 4.3 Der physiologische Zustand der Hefe bei der Propagation.....                                                                         | 105 |
| 4.3.1 Einfluss der spezifischen Belüftungsrate bei der Propagation auf den physiologischen Zustand der Hefe.....                         | 105 |
| 4.3.2 Die Belüftung der Propagation als Steuerungsinstrument der Hefephysiologie ..                                                      | 110 |
| 4.3.3 Die Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe bei der Propagation .....                                                              | 119 |
| 4.4 Der physiologische Zustand der Hefe in der Gärung.....                                                                               | 126 |
| 4.4.1 Vergleich der Gärverhalten und Enzymaktivitäten verschiedener Hefestämme..                                                         | 126 |

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.2 Veränderungen des vermehrungs- und gärungsphysiologischen Zustandes über die Anzahl der Führungen.....                                                | 131 |
| 4.4.3 Bedeutung des Sudrhythmus auf den physiologischen Zustand der Hefe.....                                                                               | 136 |
| 4.5 Der physiologische Zustand und das Gärverhalten der Hefe in Abhängigkeit des Propagationsprozesses und der Würzebelüftung .....                         | 139 |
| 4.5.1 Einfluss der Belüftungsstrategie bei der Propagation auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in der 1. Führung .....            | 139 |
| 4.5.2 Einfluss der Belüftungsstrategie bei der Propagation auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in der 4. Führung.....             | 157 |
| 4.5.3 Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in Abhängigkeit der Würzebelüftung .....       | 172 |
| 4.6 Die Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe während der Gärung.....                                                                                     | 178 |
| 4.6.1 Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren.....                                                                 | 178 |
| 4.6.2 Veränderungen der Aminosäureaufnahme der Hefe über die Führungen in Abhängigkeit der Anstelltechnologie.....                                          | 183 |
| 4.6.3 Aufnahme der Aminosäuren durch eine intensiv propagierte Hefe bei der Gärung im Drauflassverfahren.....                                               | 185 |
| 4.7 Einfluss der Hefephysiologie und der Steuerungsparameter auf das GNP-Spektrum, die Bierqualität und Bialterung .....                                    | 189 |
| 4.7.1 Einfluss verschiedener Hefestämme auf das GNP-Spektrum der Biere .....                                                                                | 189 |
| 4.7.2 Einfluss des Hefestammes auf die Bierqualität und Bialterung .....                                                                                    | 192 |
| 4.7.3 Die Bedeutung des Propagationsprozesses für das GNP Spektrum des Bieres in Anhängigkeit der Würzebelüftung.....                                       | 194 |
| 4.7.4 Die Bierqualität und Bialterung in Abhängigkeit der Hefepropagation und Würzebelüftung .....                                                          | 202 |
| 5 Diskussion.....                                                                                                                                           | 213 |
| 5.1 Die O <sub>2</sub> -Verfügbarkeit und O <sub>2</sub> -Zehrung während des Anstellens als Grundlage für optimale Gäreigenschaften und Bierqualität ..... | 213 |
| 5.2 Die Bedeutung des Knotenpunkts Acetaldehyd für den Hefemetabolismus und die Erfassung des PDH-Bypasses mittels Enzymaktivitätsmessung.....              | 217 |
| 5.3 Die Propagation als Schlüssel zur Ausrichtung der Hefephysiologie und die Aminosäureverwertung unter aeroben Wachstumsbedingungen .....                 | 219 |
| 5.4 Der physiologische Zustand der Hefe unter Gärungsbedingungen in Abhängigkeit der Würzebelüftung.....                                                    | 225 |

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5 Die Aminosäureverwertung unter anaeroben Wachstumsbedingungen in Abhängigkeit der Hefephysiologie.....              | 232 |
| 5.6 Einfluss der Hefephysiologie und der Prozessbedingungen auf die resultierende Bierqualität und Bierstabilität ..... | 236 |
| 6 Zusammenfassung.....                                                                                                  | 240 |
| Literaturverzeichnis.....                                                                                               | 243 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                  |                                                       |
|------------------|-------------------------------------------------------|
| ACS              | Acetyl-Coenzym A Synthase                             |
| ADH              | Alkoholdehydrogenase                                  |
| ALDH             | Acetaldehyddehydrogenase                              |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                   |
| AVG              | Ausstoßvergärungsgrad                                 |
| BSA              | Bovin Serum Albumin                                   |
| DAPI             | 4,6-Diamidino-2-phenylindol                           |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                                |
| EBC              | European Brewery Convention                           |
| EVG              | Endvergärungsgrad                                     |
| FAD <sup>+</sup> | Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)            |
| FAN              | Freier Amino-Stickstoff                               |
| GL               | Gärleistung                                           |
| GNP              | Gärungsnebenprodukte                                  |
| GVG              | Gärkellervergärungsgrad                               |
| K <sub>M</sub>   | Michaelis-Menten Konstante                            |
| MAL              | Maltase                                               |
| MEBAK            | Mitteleuropäische Brautechnische<br>Analysekommission |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)       |
| o.g.             | obergärig                                             |
| PDC              | Pyruvatdecarboxylase                                  |
| PDH              | Pyruvatdehydrogenase                                  |
| PMSF             | Phenylmethansulfonylfluorid                           |
| PNPG             | p-Nitrophenyl- $\alpha$ -Glucopyranosid               |

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| TCA         | Trichloressigsäure                   |
| Tris        | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan     |
| U           | Units [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ] |
| UDP-Glucose | Uridin-Diphosphat-Glucose            |
| u.g.        | untergärig                           |
| VDK         | vicinale Diketone                    |
| VG          | Vergärungsgrad                       |
| ZiS         | Zellen in Schwebe                    |
| ZKG         | Zylindrokonischer Gärtank            |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: $K_M$ -Wert Ermittlung eines Enzyms .....                                                                                                                                                                                               | 14 |
| Abbildung 2: Die relevanten Stoffwechselwege der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen.....                                                                                                                                                     | 18 |
| Abbildung 3: Umwandlung der Hexose in 2 Moleküle Triosephosphat während der Glykolyse .....                                                                                                                                                          | 20 |
| Abbildung 4: Die Substratkettenphosphorylierung während der Glykolyse .....                                                                                                                                                                          | 21 |
| Abbildung 5: Die Pyruvatbildung zum Ende der Glykolyse .....                                                                                                                                                                                         | 21 |
| Abbildung 6: Umsetzung des Pyruvats über den Citratzyklus und die Atmungskette .....                                                                                                                                                                 | 22 |
| Abbildung 7: Die relevanten Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus.....                                                                                                                                                                       | 26 |
| Abbildung 8: Der Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel der Hefe .....                                                                                                                                                                                 | 31 |
| Abbildung 9: Die relevanten Stoffwechselwege des Fettsäuremetabolismus .....                                                                                                                                                                         | 35 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung des PDH-Bypasses .....                                                                                                                                                                                        | 36 |
| Abbildung 11: Zellzyklus der Hefe bei der Sprossung ( <i>Hengst, 2003</i> ) .....                                                                                                                                                                    | 38 |
| Abbildung 12: Synthesewege von Glykogen und Trehalose .....                                                                                                                                                                                          | 40 |
| Abbildung 13: Die relevanten Stoffwechselwege bei der Bildung der Gärungsnebenprodukte .....                                                                                                                                                         | 44 |
| Abbildung 14: Grundlage des Hefemanagements in der Brauerei .....                                                                                                                                                                                    | 57 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers .....                                                                                                                                                                  | 76 |
| Abbildung 16: Graphische Darstellung der DNA-Verteilung einer u.g. Hefepopulation .....                                                                                                                                                              | 77 |
| Abbildung 17: DNA-Färbung zur flusszytometrischen Messung.....                                                                                                                                                                                       | 78 |
| Abbildung 18: Glykogenfärbung zur flusszytometrischen Messung.....                                                                                                                                                                                   | 78 |
| Abbildung 19: Neutrallipidfärbung zur flusszytometrischen Messung.....                                                                                                                                                                               | 79 |
| Abbildung 20: Versuchsreihen (VR) zum Einfluss des Propagationsprozesses auf den physiologischen Zustand der Hefe, sowie deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität in Abhängigkeit der Würzebelüftung .....                          | 83 |
| Abbildung 21: Versuchsaufbau zum Einfluss einer intensiven Hefepropagation auf den physiologischen Zustand und die Gäreigenschaften der Hefe sowie die resultierende Bierqualität in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren..... | 87 |
| Abbildung 22: Versuchsaufbau des Kräusenverfahrens zum Einfluss des Sudrhythmus auf die Hefephysiologie.....                                                                                                                                         | 88 |
| Abbildung 23: Versuchsaufbau zu möglichen Veränderungen in der Hefephysiologie im Drauflassverfahren über vier Führungen .....                                                                                                                       | 89 |
| Abbildung 24: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Gärtank während der Angärung und die resultierende $O_2$ -Zehrung der Hefe und oxidative Belastung der Würze beim Anstellen. 90                                                                 |    |
| Abbildung 25: Die $O_2$ -Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der spezifischen Belüftungsrate der Würze .....                                                                                                                                            | 91 |
| Abbildung 26: Die durchschnittliche $O_2$ -Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Anstelltemperatur.....                                                                                                                                               | 93 |
| Abbildung 27: Vergleich der $O_2$ -Zehrung von Ernte- und Propagationshefe.....                                                                                                                                                                      | 94 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 28: Veränderung der O <sub>2</sub> -Aufnahme durch die Hefe in Abhängigkeit der Lagerzeit                                                                                                                                                                | 95  |
| Abbildung 29: O <sub>2</sub> -Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Lagerzeit.....                                                                                                                                                                                  | 96  |
| Abbildung 30: Die O <sub>2</sub> -Konzentration im Gärtank bei verschiedenen Drauflassverfahren im Gärtank.....                                                                                                                                                    | 97  |
| Abbildung 31: Vergleich der O <sub>2</sub> -Konzentrationen im Gärtank bei forcierter spezifischer Belüftungsrate.....                                                                                                                                             | 98  |
| Abbildung 32: Verlauf der O <sub>2</sub> -Konzentration bei einer auf den O <sub>2</sub> -Gehalt im Gärtank abgestimmten Belüftung des gesamten Tankinhalts im Vergleich zu einem herkömmlichen Drauflassverfahren.....                                            | 99  |
| Abbildung 33: Die spezifische Enzymaktivität der PDH und ACS der Hefe während der Gärung .....                                                                                                                                                                     | 101 |
| Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der ACS-Aktivität der Hefe und dem Wachstum während der Gärung .....                                                                                                                                                           | 102 |
| Abbildung 35: Die spezifische Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels der Hefe während der Gärung .....                                                                                                                                 | 103 |
| Abbildung 36: Hefezellzahlentwicklung, Extraktabbau und pH-Verlauf bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                              | 105 |
| Abbildung 37: PDH-, ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                                            | 106 |
| Abbildung 38: PDC- und ADH-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                                                   | 107 |
| Abbildung 39: DNA-Verteilung der Hefepopulation zum Ende der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                                            | 107 |
| Abbildung 40: Entwicklung des Trehalosegehaltes der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                                        | 108 |
| Abbildung 41: Entwicklung des Neutrallipidgehalts der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l.....                                                                                                      | 109 |
| Abbildung 42: Vergleich der Enzymaktivitäten des PDH-Bypasses der Hefe bei Propagation und Gärung.....                                                                                                                                                             | 110 |
| Abbildung 43: Einfluss von Belüftungswechseln im Propagationsprozess auf die DNA-Verteilung der Hefepopulation .....                                                                                                                                               | 111 |
| Abbildung 44: ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit 8stündigem Belüftungsintervallen.....                                                                                                                                                       | 112 |
| Abbildung 45: Vergleich der Hefezellzahlentwicklung und des Extraktabbau bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses ..... | 113 |
| Abbildung 46: Vergleich der Zellzyklusanalyse der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses.....                    | 114 |
| Abbildung 47: PDC-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses .....                                     | 116 |

|                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 48: ADH-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses .....          | 117 |
| Abbildung 49: ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses..... | 118 |
| Abbildung 50: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l .....                                               | 119 |
| Abbildung 51: Aminosäuren mit unmittelbarer und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l ..                                            | 120 |
| Abbildung 52: Aminosäuren mit schwacher Repressionsphase und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l .....                            | 121 |
| Abbildung 53: Aminosäuren mit ausgeprägter Repressionsphase und vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l .....                               | 121 |
| Abbildung 54: Aminosäuren mit Repressionsphase und sinkender Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l .....                                                | 122 |
| Abbildung 55: Aminosäuren mit ausgeprägter Repressionsphase und geringer Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l .....                                    | 123 |
| Abbildung 56: Aufnahme der Aminosäuren während der Propagation in Abhängigkeit der Hefezellkonzentration .....                                                                                                                          | 124 |
| Abbildung 57: Hefezellzahlentwicklung verschiedener Hefestämme während der Gärung.                                                                                                                                                      | 126 |
| Abbildung 58: Extraktabnahme während der Gärung mit verschiedenen Hefestämme .....                                                                                                                                                      | 127 |
| Abbildung 59: Resultierende Gärleistung verschiedener Hefestämme während der Gärung .....                                                                                                                                               | 128 |
| Abbildung 60: PDC- und ADH-Aktivität verschiedener Hefestämme während der Gärung..                                                                                                                                                      | 129 |
| Abbildung 61: ALDH- und ACS-Aktivität verschiedener Hefestämme während der Gärung.                                                                                                                                                      | 130 |
| Abbildung 62: Extraktabnahme und Hefezellzahlentwicklung während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung .....                                                                                                                         | 131 |
| Abbildung 63: Entwicklung der PDC-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung .....                                                                                                                             | 132 |
| Abbildung 64: Entwicklung der ADH-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung .....                                                                                                                             | 133 |
| Abbildung 65: Entwicklung der ALDH-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung .....                                                                                                                            | 134 |
| Abbildung 66: Entwicklung der ACS-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung .....                                                                                                                             | 135 |
| Abbildung 67: Einfluss des Sudrhythmus auf die PDC-Aktivität der Hefe .....                                                                                                                                                             | 136 |
| Abbildung 68: Einfluss des Sudrhythmus auf die ADH-Aktivität der Hefe.....                                                                                                                                                              | 137 |
| Abbildung 69: Einfluss des Sudrhythmus auf die ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe.....                                                                                                                                                    | 138 |

|                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 70: Extraktabbau und Zellzahlentwicklung einer kontinuierlich belüfteten Propagationshefe während Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung .....                                                                                        | 139 |
| Abbildung 71: GL einer kontinuierlich belüfteten Propagationshefe während der Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung .....                                                                                                                      | 140 |
| Abbildung 72: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf den Extraktabbau und die Zellzahlentwicklung der Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung.....                                                  | 141 |
| Abbildung 73: GL einer intervallbelüfteten Propagationshefe in Abhängigkeit der Würzebelüftung.....                                                                                                                                                | 142 |
| Abbildung 74: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung .....                                                                            | 143 |
| Abbildung 75: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung .....                                                                              | 145 |
| Abbildung 76: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung.....                                                                                         | 146 |
| Abbildung 77: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung.....         | 147 |
| Abbildung 78: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung .....                                                                            | 148 |
| Abbildung 79: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung .....                                                                              | 149 |
| Abbildung 80: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung.....                                                                                         | 150 |
| Abbildung 81: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung.....         | 151 |
| Abbildung 82: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung .....                                                                    | 153 |
| Abbildung 83: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung.....                                                                       | 155 |
| Abbildung 84: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung.....                                                                                 | 156 |
| Abbildung 85: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung..... | 157 |
| Abbildung 86: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung .....                                                                            | 158 |
| Abbildung 87: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung .....                                                                              | 160 |

|                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 88: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung.....                                                                                         | 161 |
| Abbildung 89: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung.....         | 162 |
| Abbildung 90: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung .....                                                                            | 163 |
| Abbildung 91: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung .....                                                                              | 164 |
| Abbildung 92: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung.....                                                                                         | 165 |
| Abbildung 93: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung.....         | 166 |
| Abbildung 94: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung .....                                                                    | 167 |
| Abbildung 95: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung.....                                                                       | 169 |
| Abbildung 96: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung.....                                                                                 | 170 |
| Abbildung 97: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung..... | 171 |
| Abbildung 98: Die Zellzahlentwicklung einer intensiv propagierten Hefe und der resultierende Extraktabbau während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens .....                                                 | 173 |
| Abbildung 99: Die PDC-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens.....                                                                                           | 174 |
| Abbildung 100: Die ADH-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens.....                                                                                          | 175 |
| Abbildung 101: Die ALDH-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens.....                                                                                         | 175 |
| Abbildung 102: Die ACS-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens.....                                                                                          | 176 |
| Abbildung 103: Extraktabnahme und Hefezellzahlentwicklungen der Versuchsgärungen zur Ermittlung der Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren in der 1. Führung .....                                             | 178 |
| Abbildung 104: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung .....                                                                                                               | 179 |
| Abbildung 105: Aminosäuren mit unmittelbarer und sinkender Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung .....                                                                                                                   | 180 |

---

|                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 106: Aminosäuren mit konstanter und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung.....                                                                 | 181 |
| Abbildung 107: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung .....                                                                                          | 182 |
| Abbildung 108: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung und teils steigenden Konzentrationen im zweiten Teil der Hauptgärung                           | 182 |
| Abbildung 109: Extraktabnahme und Hefezellzahlentwicklungen der Versuchsgärungen zur Ermittlung der Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren in der 3. Führung ..... | 183 |
| Abbildung 110: Aminosäuren mit veränderter Aufnahme durch die Hefe in der 3. Führung in Abhängigkeit der Anstelltechnologie .....                                                                      | 184 |
| Abbildung 111: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren .....                                            | 185 |
| Abbildung 112: Aminosäuren mit kurzer Repressionsphase und weitreichender Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren.....                                  | 186 |
| Abbildung 113: Aminosäuren mit unmittelbarer und weitreichender Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren .....                                           | 187 |
| Abbildung 114: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren .....                                                                   | 188 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1: Kohlenhydratzusammensetzung der Würze .....                                                                                                                                                                                                     | 8   |
| Tabelle 2: Die Aufnahme der Aminosäuren und die Konzentrationen am Beispiel einer hellen Würze .....                                                                                                                                                       | 9   |
| Tabelle 3: Konzentrationen der Würzelipide .....                                                                                                                                                                                                           | 10  |
| Tabelle 4: Enzymklassifizierung nach dem Reaktionstyp ( <i>Voet, 1994</i> ) .....                                                                                                                                                                          | 12  |
| Tabelle 5: Bedeutende Ester und deren Aromaeindrücke.....                                                                                                                                                                                                  | 45  |
| Tabelle 6: Methoden zur Erfassung der Hefevitalität .....                                                                                                                                                                                                  | 55  |
| Tabelle 7: Aminosäuren und ihre korrespondierenden Streckeraldehyde .....                                                                                                                                                                                  | 67  |
| Tabelle 8: Probenahme- und Analysenplan der Versuche PK8 und PK2 .....                                                                                                                                                                                     | 84  |
| Tabelle 9: Die O <sub>2</sub> -Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Druckbeaufschlagung des Gärgefäßes .....                                                                                                                                               | 92  |
| Tabelle 10: Die Variationskoeffizienten der verschiedenen Enzymaktivitätsmessungen .....                                                                                                                                                                   | 104 |
| Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusanalyse bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses (Teil 1)..... | 114 |
| Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusanalyse bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses (Teil 2)..... | 115 |
| Tabelle 13: GNP-Spektrum des Propagationsbieres in Abhängigkeit der Belüftung von 2 und 8 mg/l O <sub>2</sub> -Konzentration .....                                                                                                                         | 125 |
| Tabelle 14: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung.....                                                                                                      | 144 |
| Tabelle 15: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung.....                                                                                                      | 148 |
| Tabelle 16: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung .....                                                                                             | 154 |
| Tabelle 17: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung.....                                                                                                      | 159 |
| Tabelle 18: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O <sub>2</sub> -Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung.....                                                                                                      | 164 |
| Tabelle 19: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung .....                                                                                             | 168 |
| Tabelle 20: Einfluss des Hefestammes auf das GNP-Spektrum des Bieres.....                                                                                                                                                                                  | 189 |
| Tabelle 21: Einfluss des Hefestammes auf die Konzentrationen der Fettsäuren und Fettsäureester im Bier.....                                                                                                                                                | 191 |
| Tabelle 22: Einfluss des Hefestammes auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres.....                                                                                                                                                        | 192 |
| Tabelle 23: Einfluss des Hefestammes auf die Konzentrationen der Alterungsindikatoren .                                                                                                                                                                    | 193 |
| Tabelle 24: Einfluss des Hefestammes auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres.....                                                                                                                                                                    | 194 |

Tabelle 25: Die GNP-Spektren des Bieres in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration bei der Propagation und der Belüftungsstrategie beim Drauflassverfahren in der 1. Führung ..... 195

Tabelle 26: Die GNP-Spektren des Bieres in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration bei der Propagation und der Belüftungsstrategie beim Drauflassverfahren in der 2. Führung ..... 196

Tabelle 27: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in der 1. und 2. Führung des Drauflassverfahrens ..... 196

Tabelle 28: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation und der Würzebelüftung beim Anstellen auf das GNP-Spektrum des Bieres ..... 197

Tabelle 29: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in Abhängigkeit der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation und der Würzebelüftung beim Anstellen..... 197

Tabelle 30: Die GNP-Spektren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung ..... 198

Tabelle 31: Die GNP-Spektren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung ..... 199

Tabelle 32: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in der 1. und 4. Führung in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses 200

Tabelle 33: Einfluss erhöhter Propagationsintensität und der Würzebelüftung im Drauflassverfahren auf die GNP-Spektren der Biere ..... 201

Tabelle 34: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in Abhängigkeit erhöhter Propagationsintensität und der Würzebelüftung im Drauflassverfahren ..... 202

Tabelle 35: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen..... 203

Tabelle 36: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die Konzentration der Alterungsindikatoren des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen..... 203

Tabelle 37: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen ..... 204

Tabelle 38: Die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung ..... 205

Tabelle 39: Die SO<sub>2</sub>-Konzentration der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung ..... 206

Tabelle 40: Die Konzentrationen der Alterungsindikatoren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung ..... 207

Tabelle 41: Die sensorische Bewertung der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung ..... 208

Tabelle 42: Die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung ..... 208

Tabelle 43: Die SO<sub>2</sub>-Konzentration der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung ..... 209

Tabelle 44: Die Konzentrationen der Alterungsindikatoren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung ..... 209

Tabelle 45: Die sensorische Bewertung der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung ..... 210

Tabelle 46: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren ..... 211

Tabelle 47: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die Konzentration der Alterungsindikatoren des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren ..... 211

Tabelle 48: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren ..... 212

Tabelle 49: Unterschiede im Aufnahmeverhalten der Hefe unter Propagationsbedingungen gegenüber der klassischen Gruppierung der Aminosäuren ..... 223

Tabelle 50: Einteilung der Aminosäuren in Abhängigkeit der Aufnahme durch die Hefe unter Propagationsbedingungen ..... 224

Tabelle 51: Unterschiede im Aufnahmeverhalten der Hefe unter Gärungsbedingungen gegenüber der klassischen Gruppierung der Aminosäuren ..... 233

Tabelle 52: Einteilung der Aminosäuren in Abhängigkeit der Aufnahme durch die Hefe unter Gärungsbedingungen ..... 234

Tabelle 53: Veränderungen im Aufnahmeverhalten von Aminosäuren der Hefe in Abhängigkeit des physiologischen Zustands ..... 234

**Formelverzeichnis**

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| Formel 1: Allgemeine Gleichung der Alkoholischen Gärung .....               | 3  |
| Formel 2: Schematische Darstellung einer Enzymreaktion .....                | 13 |
| Formel 3: Reaktionsgleichung der PDH.....                                   | 73 |
| Formel 4: Reaktionsgleichung der PDC .....                                  | 74 |
| Formel 5: Reaktionsgleichung der ADH .....                                  | 74 |
| Formel 6: Reaktionsgleichung der ALDH.....                                  | 74 |
| Formel 7: Reaktionsgleichung der ACS .....                                  | 75 |
| Formel 8: Gekoppelte Enzymreaktion zur Messung der ACS .....                | 75 |
| Formel 9: Berechnung des scheinbaren Vergärungsgrades .....                 | 80 |
| Formel 10: Berechnung der GL der Hefe .....                                 | 80 |
| Formel 11: Berechnung der O <sub>2</sub> -Zehrung der Hefe im Gärtank ..... | 81 |

## 1 Einleitung

Die Bierbereitung ist eines der ältesten biotechnologischen Verfahren, bei dem heutzutage einzigartig traditionelle Verfahrensweisen mit modernsten Technologien verknüpft werden. In Übereinkunft mit dem Reinheitsgebot erfordert der Einsatz von Gersten- und Weizenmalz, Wasser, Hopfen und Hefe als natürliche Rohstoffe eine komplexe Prozessführung und vollständige Überwachung, um ein konstantes Produkt von höchster Qualität zu erzeugen. Das Ziel der Brauereien muss dabei einerseits die Verbesserung von Qualität und Stabilität des Produktes Bier sein und andererseits gewinnt die Rentabilität der Produktion durch zunehmenden Kostendruck aufgrund von Globalisierung und Konsolidierung des Brausektors an Bedeutung.

Die Sortenbeschaffenheit der Rohstoffe, die Sudhaustechnik sowie die Bereiche der Filtration und der Abfüllung standen in der Vergangenheit oft im Vordergrund von Forschungsarbeiten. Erst in den letzten Jahren ist die optimale Nutzung des Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* in den Fokus der Brauwissenschaft gerückt und stellt eine der Herausforderungen der industriellen Bierbereitung dar. Denn die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nimmt in den zentralen Prozessschritten der Propagation, der Gärung und der Reifung eine entscheidende Rolle ein. Die Gesamtheit der sensorischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften des Bieres wird maßgeblich durch die Stoffwechselprodukte der Hefe beeinflusst.

Erste Erfolge der Braubranche, die Hefe und ihren physiologischen Zustand im Sinne der Bierbereitung besser zu nutzen, wurden mittels moderner Propagationsanlagen erreicht. Aber nur mit einer vollständig an die physiologischen Bedürfnisse der Hefe angepassten Technologie lassen sich weitere Verbesserungen in den Bereichen Produktivität, Bierqualität und Bierstabilität erreichen. Eine zügige Hefemehrung zu Beginn der Gärung, eine schnelle und weitreichende Umstellung im Stoffwechsel im Hinblick auf eine effektive Verwertung der vergärbaren Zucker, sowie eine reproduzierbare Bildung an Gärungsnebenprodukten sollten die zentralen Ziele eines modernen Hefemanagements sein. So können u.a. die vorhandenen Kapazitäten im Bereich der Gär- und Lagerkeller bestmöglich genutzt, Investitionskosten gesenkt und Teile des kostenintensiven Energieeinsatzes für die Kühlung der Gär- und Lagertanks eingespart werden.

Für eine Optimierung des Hefemanagements und der Hefetechnologie muss jedoch der physiologische Zustand der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen weitgehend erfasst werden und der Einfluss der verschiedenen Prozessparameter auf die Hefephysiologie bekannt sein. Vor allem der Sauerstoffeintrag bei der Propagation und während des Anstellvorgangs ist zwar unabdingbar für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen im Metabolismus der Hefe, aber die Versorgung wurde trotz der enormen Bedeutung für die Stabilität des Bieres hauptsächlich nur an empirischen Erfahrungswerten aus den resultierenden Gäreigenschaften und Bierinhaltsstoffen

orientiert. Eine an die Stoffwechselwege und Reaktionen des Hefemetabolismus adaptierte Sauerstoffversorgung findet bis heute meist nicht statt. Dabei sind ca. 15% des Hefegenoms direkt mit der Sauerstoffverfügbarkeit in der Umgebung verknüpft und steuern den evolutionär entwickelten Hefemetabolismus. Zusammen mit den negativen Eigenschaften oxidativer Vorgänge im Bereich der Bierstabilität ergibt sich daraus die wissenschaftliche Fragestellung zum optimalen Einsatz von Sauerstoff für die Hefe bei der Bierbereitung.

Um ein besseres Verständnis der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen zu erlangen, müssen die entscheidenden Stoffwechselwege der Hefe identifiziert und deren Erfassung in die Analytik implementiert werden. Dabei scheint der Knotenpunkt Acetaldehyd, an dem die vermehrungs- und gärungsphysiologischen Eigenschaften der Hefe miteinander verknüpft sind, von großer Bedeutung für die Hefe unter brautechnologischen Bedingungen zu sein.

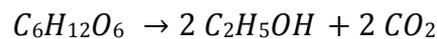
Mit einer angestrebten Enzymaktivitätsmessung der identifizierten Schlüsselenzyme, als eine direkte Methode zur Bestimmung von Stoffwechselaktivitäten, und der flusszytometrischen Analyse relevanter Inhaltsstoffe der Hefe soll eine umfassende Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen erfolgen. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Routineanalysen der Gärungstechnologie sollen als Ziel dieser Forschungsarbeit die Steuerungsparameter bei Propagation und Gärung optimal an den physiologischen Zustand der Hefe angepasst und praxistaugliche Ansätze zur Optimierung des zentralen Prozessschrittes der Gärung erarbeitet werden.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Die Geschichte der Hefeforschung

Die gewollte Fermentation zu Bier und Wein geht weit über 6000 Jahre zurück, aber über die Ursachen und das Wesen der Alkoholischen Gärung herrschte lange Unklarheit. Die Historie der intensiven Hefeforschung begann erst gegen Ende des 17. Jahrhunderts. *Antoni van Leeuwenhoek* erkannte 1680 kleine runde Gebilde in gärenden Flüssigkeiten (*Buchner, 1907; Schierbeek, 1953*). Es gelang ihm allerdings nicht, deren lebendige Natur zu erkennen. *Antoine de Lavoisier* dokumentierte 1789 indes die substanziellen Veränderungen der Alkoholischen Gärung. Er zeigte, dass bei der Weinfermentation aus Zucker Alkohol, Kohlendioxid und Essigsäure entsteht. Doch erst die Experimente von *Joseph Gay-Lussac* erbrachten die richtigen Verhältnisse der Fermentationsprodukte. Und obwohl die Summenformel von Glucose erst durch *John Baptiste Dumas* 1843 publiziert wurde, geht die allgemeine Gleichung der Alkoholischen Gärung auf *Gay-Lussacs* Veröffentlichung von 1815 zurück (*Barnett, 1998*).

#### Formel 1: Allgemeine Gleichung der Alkoholischen Gärung



Erst mit den Möglichkeiten der Mikroskopie konnte die Hefe als lebender Organismus identifiziert werden. 1836 bewies *Charles Cagniard-Latour*, dass die Hefe sich vermehrt und Ursache der Fermentation des Bieres ist (*Bulloch, 1938*). In seinen folgenden Untersuchungen entdeckte er zunehmende Zellzahlen während der Gärung und beschrieb die Sprossung und die damit verbundenen Sprossnarben der Hefezellen. *Cagniard-Latour* und *F. T. Kützing* gaben erste Größenmaße an und beschrieben die Hefe als Kügelchen mit einem Durchmesser von 6 bis 9 µm. Ebenfalls *Kützing* vermutete, dass unterschiedliche Arten von Fermentationen auf unterschiedliche Organismen zurückzuführen seien. Der deutsche Physiologe *Theodor Schwann* machte in seinen Experimenten die Infektion mit Hefezellen über die Luft deutlich und erkannte die Notwendigkeit von Stickstoffverbindungen für die Hefe. Seine Beschreibung der Hefe als Zuckerpilz stellte die Grundlage für die Namensgebung *Saccharomyces cerevisiae* durch *Franz Meyen* dar (*Meyen, 1838*). Zusätzlich wurden in dieser Zeit zum ersten Mal detailliert die Stadien der Hefevermehrung beschrieben. Das Voranschreiten der Hefeforschung wurde allerdings 1839 u.a. durch die Aussagen der Chemiker *Justus von Liebig* und *Friedrich Wöhler* für fast 20 Jahre unterbrochen, da sie die gewonnenen Erkenntnisse als unzutreffend verspotteten und eigene Theorien zur „chemisch-katalysierten“ Alkoholischen Gärung proklamierten (*Barnett, 1998*). Diese zwar unzutreffenden Aussagen stellten jedoch die Grundlage für die sich später entwickelnde Enzymatik dar. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts gelang es *Louis Pasteur* und *Pierre Eugène Marcellin Berthelot* die Mikrobiologie zu etablieren und erste Ansätze zur Erforschung der Physiologie von Mikroorganismen zu finden. *Pasteur*, der

ursprünglich ebenfalls als Chemiker seine Laufbahn begann, bekundete 1857 sein Interesse an der Fermentation und versuchte, die Biologie mit der Chemie zu verknüpfen. Die von *Pasteur* postulierten vier Grundsätze für die Erforschung der Fermentation sind vergleichbar mit den Kochschen Postulaten von 1876 (*Klein, 2009*):

1. Optimale Bedingungen müssen geschaffen werden.
2. Einfachste Anaboliten bzw. Hilfsstoffe müssen gefunden werden.
3. Die Gärungsorganismen müssen während der Gärung kontrolliert und konstant gehalten werden.
4. Ein exakter Ablauf der vermutlichen Ursachen muss eine charakteristische Fermentation bringen.

In seinen Veröffentlichungen von 1857 und 1858 widerlegte *Pasteur* die Äußerungen von *Liebig* und *Wöhler* unter der Annahme, dass, wenn es sich um eine allein katalytische Umsetzung der Zucker bei der Fermentation handelt, es keine Massenverluste geben dürfte, dies aber der Fall sei. Er schlussfolgerte: „The Breakdown of sugar into alcohol and carbonic acid is associated with a vital process (...) in which the sugar takes a direct part of the material of the yeast globules“ (*Barnett, 2000*). Weiterhin beschrieb er die Abnahme an Ammonium in Zusammenhang mit der Phosphataufnahme und der Bedeutung der Zucker als Kohlenstoffquelle während der Fermentation und des Hefewachstums. Zusätzlich beschäftigte sich *Pasteur* mit der Bildung von Glycerol und Succinat während der Fermentation. Zu diesem Zeitpunkt stellte er zwei Hypothesen gegeneinander, von denen er keine bevorzugte. Entweder die Hefe nimmt den Zucker als Nährstoff auf und gibt Alkohol und CO<sub>2</sub> ab oder die bildet Hefe einen Stoff ähnlich wie Pepsin, der außerhalb der Zellen für den Zuckerabbau verantwortlich ist, der bis dato jedoch in keiner gärenden Flüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Für *Pasteur* war es von großer Wichtigkeit festzuhalten, dass eine echte Fermentation an das physiologische Phänomen geknüpft ist. Auch die Forschungsergebnisse von *Berthelot*, in denen er 1860 die Invertase als Enzym und in seinen Augen somit das „Ferment“ isolierte und die Aussagen *Pasteurs* in Frage stellte, wurden von *Pasteur* mit dem Hinweis auf die Unzulänglichkeit hinsichtlich der alkoholischen Gärung und damit der echten Fermentation zurückgewiesen (*Swain, 2008*).

1861 veröffentlichte *Pasteur* seine vermutlich bedeutendsten Forschungsergebnisse in Bezug auf die Zuckerverwertung der Hefe in An- und Abwesenheit von Sauerstoff. In diesem Zusammenhang postulierte *Pasteur* 1863 die Begriffe „Aerob“ und „Anaerob“ und teilte die Mikroorganismen nach ihren Wachstumsbedingungen in zwei Gruppen. In seinen Versuchen zeigte sich, dass die Hefe unter anaeroben Bedingungen sehr viel mehr Zucker umsetzt bei gleichzeitig niedrigerem Hefewachstum als unter aeroben Bedingungen. *Pasteur* schrieb in seinen Veröffentlichungen von einer 20fach höheren Hefevermehrung unter aeroben Bedingungen (*Barnett, 2000*). *Lagunas* fügte hinzu, dass dieses erhöhte Wachstum nicht allein auf den respirativen Metabolismus des Zuckers zurückzuführen sei, sondern die Hefe in der Lage ist, unter aeroben Bedingungen zusätzlich die Fermentationsprodukte, speziell den Alkohol weiter zu verwerten. In diesem Zeitraum erarbeitete *Reess* 1870 in seinem Buch die erste Taxonomie der Hefen und zusammen mit seinen Zeichnungen, die u.a. auch die

Ascosporen der Hefen zeigten, wurde zum ersten Mal die sexuelle Vermehrung der Hefen diskutiert. Die kontroversen Ansichten zwischen den Chemikern und Biologen hielten trotz der gewonnenen Erkenntnisse, nicht zuletzt aufgrund der von *Berthelot* gefundenen Invertase an. Um die verschiedenen Definitionen des „Ferments“ auszuräumen und „Ferment“ eindeutig den Aktivitäten der Hefe bzw. allg. den Mikroorganismen zu zuordnen, führte *Wilhelm Kühne* 1878 den Begriff Enzyme ein. Dieser sollte sowohl die von der Hefezelle exkretierten Substanzen, als auch die von anderen Organismen stammenden Katalysatoren (Pepsin etc.) beinhalten (*Fruton, 2002*).

Nichts desto trotz war bis 1880 die Hefe und ihre physiologischen Eigenschaften nicht als Grundlage der Fermentation vollständig anerkannt. Die Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität, die zum Teil von der Forschung der Mikroorganismen abgekoppelt waren, machten ein Verständnis der Zusammenhänge schwierig.

In den folgenden 20 Jahren machte die Wissenschaft in allen Bereichen enorme Fortschritte. In der Mikrobiologie und Biochemie wurden die ersten Verfahren zur Isolierung und Anzucht von Reinkulturen durch den Mykologen *Brefeld* auf dem Gebiet der Schimmelpilze und Bakterien mittels Verdünnungsreihen und fester Nachweismedien erarbeitet. In seinen Arbeiten postulierte *Brefeld* Grundsätze zur Herstellung von Reinzuchten für Pilze, die noch heute weitgehend auf die Hefereinzuchten übertragbar sind (*Brefeld, 1872*).

1. Die Inokulation eines Mediums muss von einer einzigen Zelle in einer Lösung ausgehen.
2. Die Keimfreiheit muss mikroskopisch überprüft werden.
3. Das Medium muss optimale Nährstoffbedingungen für das Mikroorganismenwachstum mitbringen.
4. Das Nährmedium sollte klar sein, um das Wachstum aus einer Spore und das Heranwachsen überprüfen zu können.
5. Die Kulturen müssen sowohl vor Kontaminationen als auch vor eventuellem Austrocknen geschützt werden.

Dieses Verfahren war noch nicht auf die wesentlich kleineren Bakterien übertragbar. Hierfür entwickelte *Lister* 1878 erste Möglichkeiten mit geringen Probenmengen. Die wichtigsten Errungenschaften hinsichtlich von Reinkulturen lieferte dann *Robert Koch*. Auch die bis heute gebräuchlichen Techniken der Guss- und Ausstrichplatte gehen auf *Koch* und seine Mitarbeiter aus dem Jahre 1883 zurück. Unabhängig davon entwickelte *Hansen* 1883 eine effektive Methode zur Gewinnung von Reinkulturen von Brauereihefen. Zu Beginn arbeitete *Hansen* mit Verdünnungen der Hefesuspensionen, die er unter dem Mikroskop auf einem Deckglas auszählte. Nach dem Beimpfen eines Flüssigmediums ging er davon aus, dass es sich bei nur einer gewachsenen Kolonie am Flaschenboden um eine Reinkultur handeln musste (*Kodama, 2006*). In der Folge setzte er zusätzlich Gelatine an den Deckgläsern zur Trennung der Mikroorganismen ein. Damit geht auch die heute verwendete Objektträgermethode auf die Arbeiten von *Hansen* bei der Carlsbergbrauerei in Kopenhagen zurück (*Meusdoerffer, 2009*).

In dieser Zeit befasste sich *Hansen* ebenfalls mit auftretenden Qualitätsproblemen bei der Bierbereitung und konnte dies auf ein Isolat von *Saccharomyces pastorianus* zurückführen. Gleichzeitig isolierte er einen Stamm von *Saccharomyces carlsbergensis*, die die gewünschte Bierqualität sicherstellte. Er legte damit den Grundstein für die Nutzung einzelner Kulturhefestämme für die Bierbereitung und dies war ein Meilenstein in der Produktion kontinuierlich gleichbleibender Bierqualität. Dieser von *Hansen* isolierte Hefestamm wurde der Standard bei untergärigen Prozessbedingungen.

Insgesamt wurden so zwischen 1880 und 1990 ca. 130 verschiedene Hefen isoliert, beschrieben und benannt. Aus heutiger Sicht lässt sich nur vermuten, dass es sich hierbei wirklich um derart viele verschiedene Hefen gehandelt hat, oder Wachstumsbedingungen und Mischkulturen die Anzahl der Isolate vortäuschten (*Barnett, 2001*).

In den Jahren 1894 bis 1895 wurden von *Emil Fischer* die ersten Ergebnisse zum Metabolismus der Zucker bei Hefen publiziert. *Fischer* war zu dieser Zeit der führende Wissenschaftler der organischen Chemie und der Kohlenhydratchemie. Besonders seine Forschungen über die verschiedenen Zucker und deren Enantiomere brachten die Voraussetzungen, um die Zuckerverwertung von Hefen zu untersuchen. *Fischer* und *Thierfelder* berichteten über die Verwertung von Mannose, Fructose, Glucose, Galactose und Maltose verschiedener Stämme und zeigten, dass nur die D-Enantiomere von der Hefe verwertet werden können (*Lichtenthaler, 1992*). Zudem interpretierte *Fischer* seine Erkenntnisse über die verschiedenen Zucker und die wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Enzyme mit der heute noch gültigen und erwiesenen Annahme eines Schlüssel-Schlossprinzips (*Lichtenthaler, 1994*). Diese Annahme war an einige andere Aussagen verschiedener Wissenschaftler dieser Zeit angelehnt und mit deren Auffassungen verbunden. Ebenfalls wurde die Unfähigkeit von *Pichia membranefaciens* beschrieben, unter Fermentationsbedingungen jegliche Art von Zuckern zu metabolisieren. Auch Ansätze für die Aufnahme und Verwertung der Maltose gehen auf die wissenschaftlichen Arbeiten dieser Zeit zurück.

1908 übernahm *Hansen* mit *Saccharomyces cerevisiae* die Nomenklatur von *Meyen* für die hauptsächlich in der Ale-Produktion eingesetzten obergärigen Hefen. Mit der von *Fischer* gefundenen unterschiedlichen Verwertung der Melibiose ist eine bis heute angewandte physiologische Unterscheidung von ober- und untergäriger Hefe gefunden worden.

Die Wissenschaft machte in dieser Zeit enorme Fortschritte und so wurden Ende des 19. Jahrhunderts auch die ersten Ansätze für nährstoffabhängige Enzyminduktionen und zur Ausstattung der Hefe mit Transportmechanismen der Membran erarbeitet. *Frédéric Dienert* veröffentlichte 1899 und 1900 erste Studien zur Adaption der Hefe an verschiedene Zucker als Kohlenstoffquellen (*Barnett, 2002*).

Eine der herausragenden wissenschaftlichen Arbeiten war 1897 die von *Eduard Buchner* für die er 1907 den Nobelpreis bekam. Er erreichte die zellfreie Gärung durch Aufschluss der Hefe und dem gewonnenen Zellsaft. Aus seinen Ergebnissen schloss *Buchner* das

Vorhandensein einer gelösten Substanz, zweifellos ein Protein, und nannte dies Zymase als Erreger der Alkoholischen Gärung (*Buchner, 1907*). Die Zellbiologie als Bereich der wissenschaftlichen Bemühungen in dieser Zeit war hingegen weniger erfolgreich. Es wurden zwar viele Anstrengungen mit Färbemethoden etc. unternommen, einzelne Zellorganelle zu untersuchen, jedoch blieben die meisten davon ohne nennenswerte Ergebnisse. Erst ab 1950 mit der Einführung des Phasenkontrastmikroskops und des Elektronenmikroskops sowie der Konsolidierung der Biochemie, der Genetik und der Molekularbiologie konnten die Zellorganelle, wie Mitochondrien, der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum fundiert analysiert werden (*Barnett, 2002*).

*Van Dorsten* machte 1947 elektronenmikroskopisch die Sprossnarben der Hefezellen in den Zellwänden von *Schizosaccharomyces pombe* sichtbar. 1952 veröffentlichten *Northcote* und *Horne* ihre Ergebnisse zu den Bestandteilen der Zellwand. Sie bezifferten die Bestandteile der Zellmembran mit 29% Glukan, 31% Mannan, 13% Protein und 8,5% Lipide (*Northcote, 1952*). Nachdem bereits mehrfach Chitin als Bestandteil der Zellwände von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pastorianus* beschrieben wurde, konnte *Cabib* 1971 Chitin im äußeren Ring der Sprossnarben mit ca. 1% der gesamten Zellwand identifizieren (*Cabib, 1971*).

Bereits Ende der 50er Jahre begannen die ersten Wissenschaftler den Zellzyklus der Hefe genauer zu betrachten. Erster Anhaltspunkt für *Sylvén* und Kollegen sowie *Williamson* und *Scopes* waren die zeitgleiche Sprossung der Hefe bei dem Beimpfen von Nährmedien. In der Folge wurde erstmals eine Wachstumsphase der Hefezellen zwischen den Sprosszeitpunkten beschrieben und die Vermehrung in mehrere Phasen der Zellteilung unterschieden. 1966 veröffentlichten *Robinow* und *Marak* Bilder von fixierten und mit Fuchsin und Giemsa angefärbten Zellen bei der Teilung. In einer Veröffentlichung von 1974 zeichnete *Hartwell*, der 2001 zusammen mit *Nurse* und *Hunt* den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Forschungsarbeiten hinsichtlich des Zellzyklus erhielt, eine vollständige Einteilung der vier Vermehrungsphasen von *Saccharomyces cerevisiae* (*Hartwell, 1974*). Neben den Stadien des Zellzyklus und dem Zellwandaufbau sind auch die einzelnen Zellorganellen mit den modernen mikroskopischen Möglichkeiten untersucht worden. Die Anfänge machte neben vielen anderen Wissenschaftlern *Müller* in Jena, der ab 1959 die einzelnen Zellorganellen in den unterschiedlichen Wachstumsstadien zusätzlich filmte. In den folgenden Jahren sind Erkenntnisse über die Funktion der Chromosomen und deren Verhalten bei der Teilung ebenso hinzugekommen, wie die Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktionen der Mitochondrien, des Golgi-Apparates und der Ascosporen (*Barnett, 2002*). Dieses exponentiell zunehmende Wissen über die Zellbiologie und den Hefemetabolismus soll im Folgenden für die in dieser Arbeit relevanten Themen detailliert beschrieben werden.

## 2.2 Für die Hefeernährung relevante Würzeinhaltsstoffe

Die Würzezusammensetzung ist stets abhängig von den verwendeten Rohstoffen und der angewendeten Technologie in der Herstellung. Das Brauwasser, die Güte und Beschaffenheit des Hopfens und der Gerste sind zwar teilweise bereits beeinflussbar, aber dennoch führen die umweltbedingten Schwankungen in Kombination mit dem Herstellungsprozess auch innerhalb der Produktionschargen zu feinen Veränderungen der Konzentrationen und somit der Zusammensetzung einzelner Würzeinhaltsstoffe (Boulton, 2001). Bei normalen Vollbierwürzen liegt das Verhältnis zwischen vergärbaren Zuckern und den Stickstoffverbindungen in einem gewissen Rahmen, der technologisch bedingt in eine Richtung verschoben werden kann. Der Extrakt der Würze besteht zu 90-92% aus Kohlenhydraten und zu 4-5% aus Stickstoffverbindungen (Anderson, 2000). Als weitere Würzeinhaltsstoffe bilden die Mineralstoffe und Spurenelemente, sowie die Lipide, die Vitamine und die Purine und Pyrimidine zusammen mit dem während der Angärphase oder im Prozess der Propagation dosierten Sauerstoff die Nährstoffgrundlage für den Hefestoffwechsel (Narziß, 1992).

Die Maltose nimmt bei den vergärbaren Zuckern mit ca. 60-65% den Hauptanteil ein. Der Rest setzt sich aus Glucose, Fructose, Saccharose, Maltotriose, Maltotetraose und den höheren Dextrinen zusammen. Ca. 25% der Kohlenhydrate der Würze sind für die Bierhefe nicht zu verwerten. Neben einigen Monosacchariden (Arabinose, Xylose und Ribose), dem Disaccharid Isomaltose, einigen Trisacchariden (Panose und Isopanose) und den  $\beta$ -Glucanen besteht der nicht vergärbare Anteil zu 90% aus Dextrinen mit mehr als 4 Glucoseeinheiten. 40-50% davon sind Oligosaccharide mit 4-9 Glucoseeinheiten, und 50-60% sind höhere Dextrine mit >10 Glucoseeinheiten (Boulton, 2001). Die Tabelle 1 zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung der wichtigsten Kohlenhydrate einer 12 °P Vollbierwürze im Überblick (Narziß, 1995).

Tabelle 1: Kohlenhydratzusammensetzung der Würze

|                         | Anteil [%]   | Konzentration [g/l] |
|-------------------------|--------------|---------------------|
| <b>Glucose</b>          | <b>7-9</b>   | <b>5-10</b>         |
| <b>Fructose</b>         | <b>1-2</b>   | <b>1-2,5</b>        |
| <b>Saccharose</b>       | <b>2-4</b>   | <b>2-4,5</b>        |
| <b>Maltose</b>          | <b>41-48</b> | <b>37-53</b>        |
| <b>Maltotriose</b>      | <b>11-13</b> | <b>9-14</b>         |
| <b>Niedere Dextrine</b> | <b>6-12</b>  | <b>5-13</b>         |
| <b>Höhere Dextrine</b>  | <b>19-24</b> | <b>17-26</b>        |

Die 4-5% des Extraktes, die als Stickstoffverbindungen vorliegen, bestehen zu 85-90% aus Aminosäuren, kleineren Peptiden und Proteinen (Enari, 1974). Die Würze kann bis zu 1200 mg/l Stickstoffsubstanzen enthalten. Im Durchschnitt betragen die Werte zwischen 700 und 800 mg/l. Der gesamt lösliche Stickstoff besteht zu 20% aus Proteinen, 22% Polypeptide und zu 58% aus Peptiden und freien Aminosäuren. Neben den mittel- und hochmolekularen

Fraktionen, die für den Schaum und die Vollmundigkeit von höchster Relevanz sind, spielen für die Hefen insbesondere die niedermolekularen Verbindungen eine entscheidende Rolle. Lässt man die Ammoniumsalze aufgrund ihrer geringen Konzentration von max. 25-30 mg/l ( $\emptyset$  ca. 10 mg/l) außer Acht, sind vor allem die Aminosäuren und einige Dipeptide für eine ausreichende Heferversorgung mit  $\alpha$ -Amino-Stickstoff von zentraler Bedeutung. Die Konzentration der freien Aminosäuren beträgt dabei 150-230 mg/l in einer Würze von 12 °P. Die empfohlene Konzentration an freien Aminosäuren liegt bei 150-200 mg/l, wenn Sauerstoff den limitierenden Wachstumsfaktor ausmacht (Boulton, 2001). Ein Drittel bis die Hälfte der Aminosäuren wird durch die Enzyme beim Maischen freigesetzt. Die restlichen ca. 50% kommen direkt aus dem Malz und werden während des Mälzungsprozesses gebildet.

Die Aminosäuren lassen sich aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften in polare und unpolare oder in basische, neutrale und saure Aminosäuren unterteilen (Karlson, 1994). Für den Hefestoffwechsel unter brautechnologischen Bedingungen ist jedoch die Reihenfolge der Assimilation der einzelnen Aminosäuren entscheidend. Hierbei kann eine Unterscheidung in vier verschiedene Gruppen erfolgen. In der ersten Gruppe befinden sich die Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Serin, Threonin und Lysin. Die Aufnahme dieser Aminosäuren beginnt bereits während der Angärung. Die zweite Gruppe setzt sich aus Valin, Methionin, Leucin, Isoleucin und Histidin zusammen. Die Aufnahme beginnt ebenfalls bereits zu Beginn des Gärprozesses, ist aber langsamer und setzt sich über die gesamte Gärung kontinuierlich fort. Glycin, Phenylalanin, Tyrosin, Alanin und Tryptophan bilden die dritte Gruppe. Deren Verwertung durch die Hefe ist an die Aufnahme der ersten Gruppe gekoppelt. Erst nach der Aufnahme der Aminosäuren der ersten Gruppe durch die Hefe beginnt diese die dritte Gruppe der Aminosäuren in den Stoffwechsel einzuschleusen. Die Aminosäure Prolin, die in Proteine eingebunden mit für die kolloidale Stabilität des resultierenden Bieres verantwortlich ist, wird unter brautechnologischen Bedingungen nicht von der Hefe verwertet und bildet aufgrund dessen alleinstehend die vierte Gruppe. Der Gruppeneinteilung der Aminosäuren und die Konzentrationen am Beispiel einer hellen Würze sind in der Tabelle 2 zusammengefasst (Jones, 1969).

**Tabelle 2: Die Aufnahme der Aminosäuren und die Konzentrationen am Beispiel einer hellen Würze**

|                 | <b>Aminosäuren</b>                                | <b>Anteil<br/>verwertbarer<br/>AS [%]</b> | <b>Konzentration<br/>[mg/100 ml]</b> | <b>Aufnahme</b>                                                                         |
|-----------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gruppe 1</b> | <b>Glu, Asp, Asn, Gln,<br/>Ser, Thr, Lys, Arg</b> | 42                                        | 82                                   | <b>Sofortige und vollständige<br/>Aufnahme</b>                                          |
| <b>Gruppe 2</b> | <b>Val, Met, Leu, Ile,<br/>His</b>                | 34                                        | 66                                   | <b>Langsame aber<br/>kontinuierliche Aufnahme<br/>während der ganzen Gärung</b>         |
| <b>Gruppe 3</b> | <b>Gly, Phe, Tyr, Try,<br/>Ala</b>                | 24                                        | 47                                   | <b>Aufnahme erfolgt erst<br/>nachdem die Gruppe 1<br/>vollständig assimiliert wurde</b> |
| <b>Gruppe 4</b> | <b>Pro</b>                                        | -                                         | 48                                   | <b>Wird von der Hefe nicht<br/>verwertet</b>                                            |

Die Würze enthält zusätzlich verschiedene Nukleinsäuren und deren Abbauprodukte. 5,7-6,4% des Gesamt-Stickstoffes bestehen aus Purinen und davon sind ein Drittel freies Adenin und Guanin. Der Rest setzt sich aus Adenosin und Guanosin zusammen. Insgesamt machen die Purine und Pyrimidine in Summe ca. 280-330 mg/l aus (*Boulton, 2001*).

Nur ein geringer Teil der im Malz vorliegenden Lipide gelangt in die fertige Ausschlagwürze. Jedoch spielen diese verfügbaren Lipide eine wichtige Rolle hinsichtlich der Hefeernährung, stehen aber zugleich im Zusammenhang mit der Bildung geruchs- und geschmacksrelevanter Substanzen im fertigen Bier (*Gastl, 2006*). Die Konzentrationen der in der Würze vorhandenen Lipide sind stark von den verwendeten Technologien bei der Würzebereitung und den Rohstoffen abhängig. Dabei haben sowohl die Schrotbehandlung als auch die Läutertechnik einen großen Einfluss. So schwanken die Werte zwischen 10-80 mg/l bei der Verwendung eines Läuterbottichs und zwischen 10-25 mg/l bei der Nutzung eines Maischefilters. Der Hopfen trägt zusätzlich zur Ausstattung der Würzen an Lipiden bei (*Boulton, 2001*). Hopfenpellets sind besonders reich an 18:3 Fettsäuren und somit mit verantwortlich für die Konzentration an Linolensäure der Würze. Die freien und die in den Triglyceriden veresterten Fettsäuren machen den Großteil der Lipide der Würze aus. Die Tabelle 3 zeigt einen Überblick der Lipide einer durchschnittlichen 12 °P Vollbierwürze (*MacWilliam, 1968*).

**Tabelle 3: Konzentrationen der Würzelipide**

| Lipide                                  | Konzentration [mg/l] |
|-----------------------------------------|----------------------|
| Freie Fettsäuren (C4-C10)               | 0-1                  |
| Freie Fettsäuren (C12-18)               | 18-26                |
| Triacylglyceride                        | 5-8                  |
| Diacylglyceride                         | 0,2-0,5              |
| Monoacylglyceride                       | 1,6-18               |
| Sterolester                             | 0,1-0,2              |
| Freie Sterole                           | 0,2-0,4              |
| Phospho- und Glykolipide                | 3                    |
| Kohlenwasserstoffe (Squalen) und Wachse | 0,7                  |
| Freie Fettsäureester                    | 1,2-1,3              |

Die in der Würze vorhandenen Schwefelverbindungen von ca. 90 mg/l unterteilen sich zu 60% in organische und 40% anorganische Verbindungen. Das anorganische Sulfat kommt vorwiegend aus dem Brauwasser. Der organische Anteil stammt überwiegend von den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Hinzu kommen Glutathion, Thiamin und freies oder verestertes Acetyl-CoA als weitere biochemische Verbindungen. Der Gehalt der übrigen Mineralstoffe ist weitestgehend durch das Brauwasser und das Malz bestimmt, sodass die Mineralstoffzusammensetzung in Abhängigkeit der Biertypen und Brauereien starken Schwankungen unterworfen ist. Ebenfalls die während der Fermentation in höheren

Konzentrationen durch die Hefe abgegebenen organischen Säuren sind, wie auch einige Vitamine, bereits in der Würze vorhanden (*Mandl, 1974*).

## 2.3 Biochemische Grundlagen der Enzyme

Enzyme wirken im Stoffwechsel als Katalysatoren von biochemischen Reaktionen und sorgen für eine effiziente Verwertung diverser Metaboliten. An sie sind die Anpassung an wechselnde Habitat-Bedingungen, die Energiegewinnung und die Proliferation der Mikroorganismen geknüpft. Damit ist die grundsätzliche Bedeutung der Enzyme, die Funktionsweise, sowie ihre Regulationsmechanismen ein maßgeblicher Teil der Biochemie zum Verständnis des Stoffwechsels von Mikroorganismen (Voet, 1994). Zusätzlich haben die Eigenschaften der Enzyme und die Bandbreite ihrer katalysierten Reaktionen in den letzten Jahren mehr und mehr zu diversen großtechnischen Einsatzmöglichkeiten geführt. Auch im Bereich der Bier- und Getränkeherstellung hat die Enzymtechnologie, von dem direkten Einsatz im Produktionsprozess bis hin zur additiven Reinigung, Einzug erhalten.

Enzyme sind meist globuläre Proteine mit einem mittleren molaren Gewicht zwischen 12000 und 1 Mio. Dalton. In der Zelle können Enzyme sowohl gelöst als auch membrangebunden vorliegen und wirken im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren hochspezifisch. Sie können substratspezifisch, stereospezifisch und wirkungsspezifisch sein (Karlson, 1994; Brockhaus, 2003). Diese Spezifitäten der Enzyme führten zu einer Klassifizierung in sechs Hauptgruppen mit ihren Untergruppen, die abhängig sind von der katalytischen Wirkung und somit von der Struktur am aktiven Zentrum. Die gewöhnliche Benennung der Enzyme erfolgte durch das Anhängen der Nachsilbe „-ase“. Die Nachsilbe wurde dabei entweder an den Namen des Substrates oder einen Begriff, der die katalytische Wirkung des Enzyms beschreibt, angehängt. Dies führte dazu, dass verschiedene Namen das identische Enzym beschrieben und umgekehrt. Daraufhin wurde von der Internationalen Union für Biochemie (IBU) eine systematische funktionelle Klassifizierung und Nomenklatur anhand ihrer katalysierten chemischen Reaktionen entwickelt. Jedes Enzym erhielt neben dem Trivialnamen einen vierstelligen Zahlencode, die sog. Enzym-Commission (EC). Dabei steht die erste Zahl für die Hauptgruppe des Enzyms und beschreibt den katalysierten Reaktionstyp (vgl. Tabelle 4) (Voet, 1994; Deckwert, 1999).

Tabelle 4: Enzymklassifizierung nach dem Reaktionstyp (Voet, 1994)

| Klassifizierung           | Typ der katalysierten Reaktion                      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1. <u>Oxidoreduktasen</u> | Oxidation/Reduktion                                 |
| 2. <u>Transferasen</u>    | Transfer funktioneller Gruppen                      |
| 3. <u>Hydrolasen</u>      | Hydrolysereaktionen                                 |
| 4. <u>Lyasen</u>          | Gruppeneliminierung zur Bildung von Doppelbindungen |
| 5. <u>Isomerasen</u>      | Isomerisierung                                      |
| 6. <u>Ligasen</u>         | Kovalente Bindungen, gekoppelt mit ATP-Hydrolyse    |

Die zweite Zahl beschreibt die Unterklasse und die dritte die Unter-Unterklasse. Für die ADH (EC 1.1.1.1) bedeutet dies, dass sie zur Gruppe der Oxidoreduktasen gehört. Die erste

Untereinheit (EC 1.1.1.1) fasst dabei die Enzyme zusammen, die Reaktionen mit einer CH-OH Bindung als Donator katalysieren. Die Enzyme der Unter-Untereinheit (EC 1.1.1.1) nutzen dabei  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  als Akzeptor. Die vierte Zahl (EC 1.1.1.1) ist die willkürlich zugeteilte Seriennummer des Enzyms innerhalb seiner Unter-Unterkategorie (*Dillmann, 2008*).

Enzyme beeinflussen in ihrer Funktion jedoch nicht das Reaktionsgleichgewicht, sondern beschleunigen die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie. Das Herabsetzen der benötigten Aktivierungsenergie geschieht dabei durch die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym. Diese Wechselwirkungen können über Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte oder ionische Bindungen entstehen. Wie andere Katalysatoren auch, gehen Enzyme unverändert aus Reaktionen hervor (*Belitz, 2001*).

Eine vielfach gefaltete Polypeptidkette, an deren Aufbau 20 verschiedene Aminosäuren beteiligt sein können, bildet das molekulare Gerüst eines Enzyms und stabilisiert das aktive Zentrum, in dem die Substrate spezifisch gebunden werden. Dabei können die Enzyme aus mehreren gleichen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein (*Darnell, 1994*). Bei konjugierten Enzym-Proteinen wird zusätzlich zwischen dem Apoenzym und den entsprechenden Cofaktoren unterschieden, die zusammen das sog. Holoenzym bilden. Cofaktoren können Metallionen wie  $\text{Zn}^{2+}$  oder organische Moleküle – sog. Coenzyme – wie  $\text{NAD}^+$  sein. Manche Cofaktoren, z.B.  $\text{NAD}^+$ , binden nur vorübergehend an das Enzym, so dass sie praktisch als Cosubstrate arbeiten. Andere Cofaktoren – sog. prosthetische Gruppen – sind dagegen häufig über kovalente Bindungen dauerhaft mit dem Protein verbunden. Alle Coenzyme werden durch die katalysierte Reaktion chemisch verändert, so dass diese in ihren Ausgangszustand zurückgebracht werden müssen. Bei prosthetischen Gruppen kann dies nur in einer bestimmten Phase der enzymatischen Reaktion geschehen. Die Regeneration für vorübergehend gebundene Coenzyme wie  $\text{NAD}^+$  kann jedoch auch von einem anderen Enzym katalysiert werden. Etwa 50% aller Enzyme benötigen Coenzyme bzw. Cofaktoren für die Entfaltung ihrer katalytischen Wirkung (*Voet, 1994*).

Das aktive Zentrum lässt aufgrund seiner Flexibilität Konformationsänderungen zu, was für die Substratbindung, die katalytische Reaktion und die Produktfreigabe von großer Bedeutung ist. Im Allgemeinen verläuft eine Enzymreaktion nach folgendem Prinzip:

**Formel 2: Schematische Darstellung einer Enzymreaktion**



Hierbei bindet im ersten Schritt das Substrat (S) an das Enzym (E). Sie bilden den Enzym-Substrat-Komplex (ES). Nach der katalysierten Reaktion tritt das Enzym (E) unverändert aus der Reaktion aus und gibt das Produkt (P) frei. Proteine, die aufeinander folgende Reaktionsschritte katalysieren, werden als Multi-Enzymkomplexe bezeichnet und bestehen aus mehreren Enzymen als Untereinheiten (*Dillmann, 2008*).

Jedes Enzym hat eine spezifische Reaktionsgeschwindigkeit. Dabei müssen die Reaktionsbedingungen im Bereich des Temperatur- und pH-Optimums liegen, um die optimale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Abhängig von Substratkonzentration und Enzymmenge wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, wenn alle vorhandenen Enzyme als ES vorliegen. Liegt die Hälfte der vorhandenen Enzyme als ES vor und die andere Hälfte als freies E, so ist  $\frac{1}{2} v_{\max}$ , oder auch die Halbsättigung erreicht. Wird die bei  $\frac{1}{2} v_{\max}$  vorliegende Substratkonzentration  $S$  betrachtet, so erhält man die für jedes Enzym spezifische Michaelis-Menten Konstante ( $K_M$ ) (Bisswanger, 2000; Buxbaum, 2007).

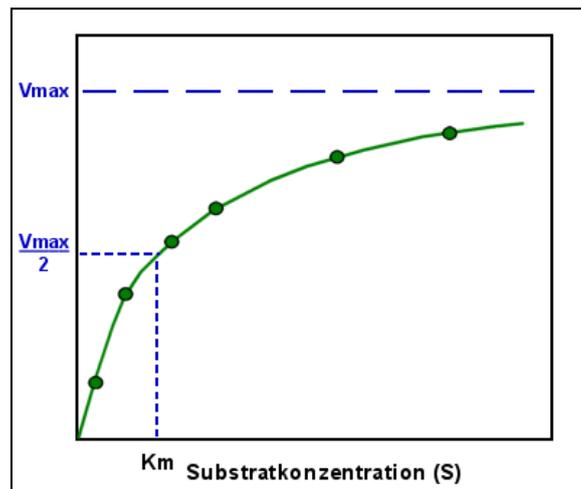


Abbildung 1:  $K_M$ -Wert Ermittlung eines Enzyms

Wenn die Substratkonzentration den  $K_M$ -Wert eines Enzyms übersteigt, so wird das Substrat bevorzugt durch ein Enzym, das einen höheren  $K_M$ -Wert für dieses Substrat besitzt, umgesetzt. In der Hefezelle werden durch den  $K_M$ -Wert einzelner Enzyme Stoffwechselwege reguliert. So besitzt zum Beispiel der PDH-Komplex einen weitaus geringeren  $K_M$ -Wert für Pyruvat als die PDC. Ebenso wird der Acetaldehyd (bei hohen Konzentrationen) vorwiegend über die ADH und weniger über die ALDH des PDH-Bypasses abgebaut (vgl. Kap. 2.4.3) (Pronk, 1996).

Die Expression der Enzyme im Hefestoffwechsel ist eine Antwort auf die vorherrschenden äußeren Bedingungen. Der entscheidende Vorteil der Enzyme im Stoffwechsel der Organismen ist die Möglichkeit, dass sie in ihrer Aktivität reguliert werden können. Neben der substratgesteuerten Regulierung in Abhängigkeit der Substratkonzentration existieren weitere Mechanismen zur Regulierung der Enzyme. Hierbei sind kurzfristige und langfristige Regulationsmechanismen zu unterscheiden. Kurzfristige Regulationsmechanismen sind Mechanismen, die sich direkt auf die Enzymaktivität beziehen. Dabei lässt sich zwischen der kompetitiven, allosterischen und nicht-kompetitiven Hemmung unterscheiden (Campbell, 2000).

Unter der kompetitiven Hemmung eines Enzyms ist das Konkurrieren zweier Moleküle um das aktive Zentrum zu verstehen, wodurch die Aktivität des Enzyms reguliert wird. Hierbei handelt es sich einerseits um das Substrat und andererseits um einen Inhibitor, der das

Enzym blockiert, aber nicht umgesetzt wird und vom Substrat in Abhängigkeit des vorliegenden Konzentrationsverhältnis (Substrat  $\leftrightarrow$  Inhibitor) wieder verdrängt werden kann. Eine der kompetitiven Hemmung ähnliche Regulation der Enzymaktivität stellt die Produkthemmung dar. Bei hohen Produktkonzentrationen kommt es oft zu einer Bindung des Produkts an das Enzym, welche den Zutritt des Substrats verhindert. Tritt diese Form der Hemmung bei einem Multienzymkomplex durch das Endprodukt ein, wird dies auch als Feedback Inhibition bezeichnet. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung, die für die Regulation im Stoffwechsel eine eher untergeordnete Rolle spielt, handelt es sich nicht um eine Blockade des Enzyms durch einen Inhibitor. Der Inhibitor bindet indes an einer anderen Stelle des Enzyms, so dass sowohl das freie Enzym als auch der Enzym-Substrat-Komplex gehemmt werden kann (Wenzel, 1993).

Zusätzlich existiert der Mechanismus der allosterischen Hemmung, der auf einer Änderung der Raumstruktur des Enzyms beruht. Dabei bindet der allosterische Effektor (Substrat, Cosubstrat, oder eine andere niedermolekulare Substanz) nicht direkt am aktiven Zentrum, sondern reversibel an einer Untereinheit des Enzyms. Das aktive Zentrum wird daraufhin in seiner Struktur derart verändert, dass die Substratbindung erschwert wird oder nicht mehr stattfinden kann. Allosterische Effekte treten hauptsächlich bei Enzymen mit positiver Kooperation auf, die somit nicht der Beziehung von *Michaelis* und *Menten* folgen (Voet, 1994; Karlson, 1994).

Eine übergeordnete Form der Regulation stellt die Interkonversion dar. Diese beruht auf der reversiblen, vollständigen Inaktivierung des Enzyms durch eine weitere enzymatische Reaktion. Beispielsweise resultiert eine aktivierende bzw. inaktivierende Konformationsänderung aus einer Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung einer Enzymuntereinheit.

Werden nicht die Enzymaktivitäten betrachtet, sondern die jeweiligen Enzymmengen, so unterliegen diese langfristigen Regulationsmechanismen. Der Enzymgehalt einer Zelle ist ebenso von der Abbaugeschwindigkeit wie von der Synthesegeschwindigkeit abhängig. Somit ist die Steuerung beider Prozesse gleichermaßen wichtig für die Kontrolle des Stoffwechsels. Die Lebensdauer verschiedener Enzyme kann zwischen wenigen Minuten und mehreren Tagen liegen. Dabei zeigen vor allem Enzyme an wichtigen metabolischen Knotenpunkten eher kurze Halbwertszeiten, die scheinbar eng mit den katalytischen und allosterischen Eigenschaften zusammenhängen. Dies schafft für die Zelle die Möglichkeit, schnell und effizient auf Veränderungen, z.B. in der Nährstoffzusammensetzung, zu reagieren (Voet, 1994).

Bei den langfristigen Regulationsmechanismen handelt es sich einerseits um die Enzyminduktion sowie die Enzymrepression. Beide Mechanismen finden auf Transkriptionsebene statt. Die Induktion beschreibt die Bildung katabolischer Enzyme in Abhängigkeit der vorhandenen Nährstoffe. Die sich daraus ergebenden Abbauprodukte der Enzyme können dann in den Stoffwechsel einfließen und von der Hefe weiter verwertet

werden. Die für die Umsetzung der Nährstoffe im Milieu nicht gebrauchten Enzyme werden indes in ihrer Bildung unterdrückt. Mit der Anhäufung der Metaboliten des katabolischen Stoffwechsels folgt die Expression der metabolischen Enzyme bei gleichzeitiger Repression der katabolischen Enzyme. Andererseits stellt die irreversible Inaktivierung als spezifische Proteolyse und somit den Abbau des Enzyms den endgültigen Verlust der Aktivität dar (*Karlson, 1994; Voet, 1994; Campbell, 2000; Belitz, 2001*).

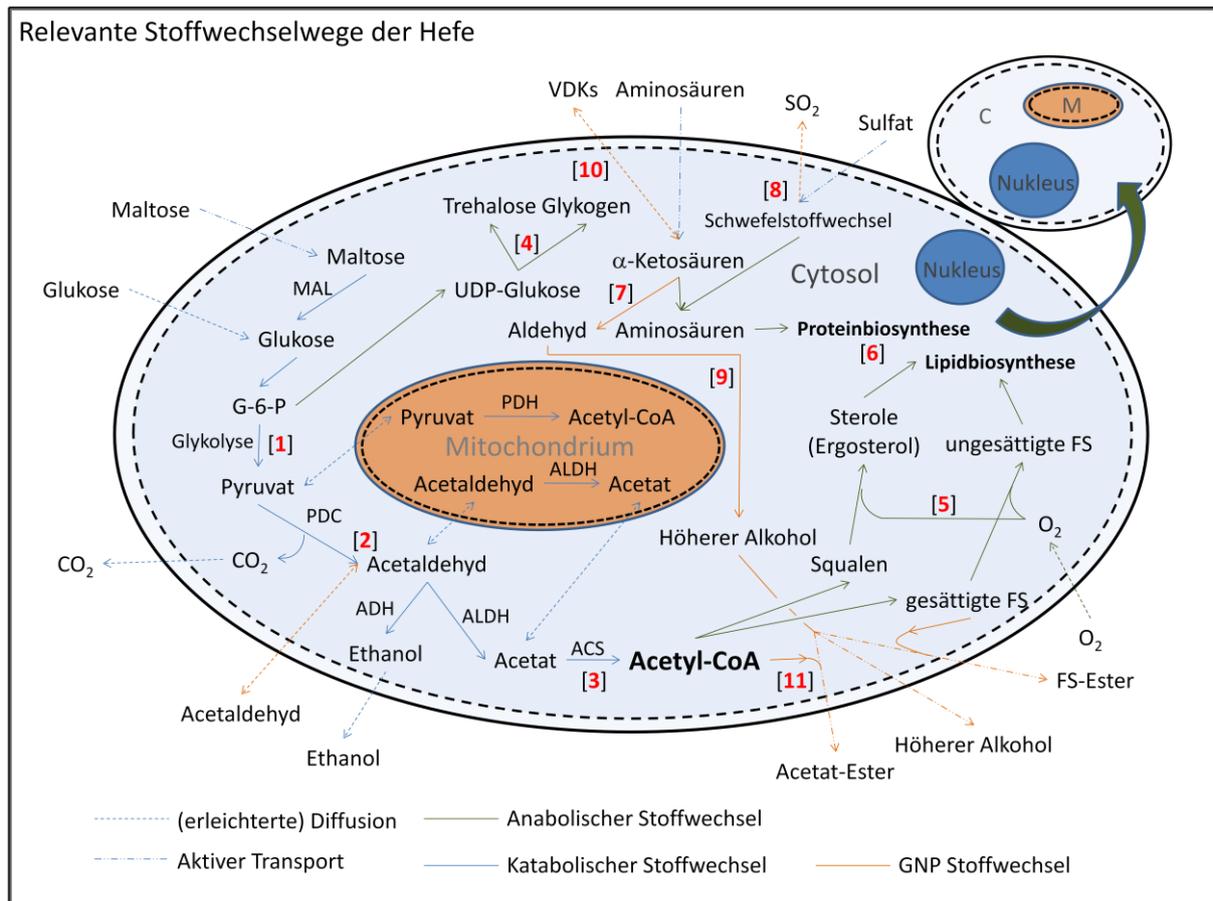
## 2.4 Der Hefemetabolismus

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist zu einem unschätzbar wertvollem eukaryontischen Modellorganismus geworden, an dem viele wissenschaftliche Fragestellungen beantwortet werden können. Grundsätzlich gehört die Hefe zu den chemoorganotrophen Organismen, d.h. sie gewinnt ihre Energie und den für den Zellaufbau notwendigen Kohlenstoff aus organischen Verbindungen. Gleichzeitig gehört die Hefe zu den fakultativen Anaerobiern und legt damit die Grundlage zum Einsatz in der Brauerei (*Schlegel, 1992*).

Auch für den Brauer stellt die Hefe einen zentralen Punkt der Forschung dar. Der Einfluss der Hefe auf die Bierqualität und Bierstabilität ist unumstritten, doch der mögliche Umfang zur Einflussnahme über den Mikroorganismus Hefe ist bis heute nicht vollständig erfasst (*Narziß, 1995; Boulton, 2001; Tenge, 2004; Back, 2005; Kunze, 2007; Annemüller, 2008*). Dies kann nur mit einem umfassenden Verständnis der Stoffwechselwege, die bei der Bierproduktion in den Prozessschritten der Propagation und Gärung aktiv sind und deren Einflussparameter erreicht werden. Doch unter brautechnologischen Bedingungen unterliegt der Hefestoffwechsel besonderen Herausforderungen. Die zwischen aerob und anaerob wechselnden Bedingungen und die Würzezusammensetzung nehmen hier maßgeblichen Einfluss. Hinzu kommen die an die Hefe in den Abschnitten der Gärung, der Reifung und der Lagerung geknüpften unterschiedlichen Ansprüche des Brauers.

Grundsätzlich lässt sich der Hefestoffwechsel in Abhängigkeit der Zielsetzung oder der Stoffgruppen im Kernbereich einteilen. So kann der Abbau organischer Verbindungen zur Energiegewinnung und der darauf basierende Aufbau komplexer Moleküle zur Biosynthese in die katabolischen und die anabolischen Reaktionen unterteilt werden. Dabei stellen die katabolischen Stoffwechselwege aus dem Kohlenhydrat- und dem Fettstoffwechsel die Grundlage der Energiegewinnung dar. Die anabolischen Stoffwechselwege sind im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel verankert und bilden die Grundlage für den Baustoffwechsel und die Bildung der Reservestoffe Glykogen, Trehalose und Neutrallipide (*Annemüller, 2008*).

Die einzelnen katabolischen und anabolischen Stoffwechselwege sind jedoch über viele Knotenpunkte miteinander verknüpft, und jede Veränderung im Stoffwechsel als Reaktion auf veränderte Umgebungsbedingungen hat Verschiebungen im gesamten Metabolismus der Hefe zur Folge (*Anderson, 2000; Boulton, 2001; Annemüller, 2008*). Die sich über Jahrtausende der Evolution ausgebildeten höchst effizienten und komplexen Strukturen machen eine Erfassung der einzelnen Teilbereiche und deren Einfluss auf die Bierproduktion besonders schwierig. Die Abbildung 2 stellt die umfassenden Zusammenhänge und Quervernetzungen des Hefestoffwechsels unter brautechnologischen Bedingungen dar. Ausgehend von den bedeutsamsten Würzeinhaltsstoffen und deren Aufnahme sind die im Brauprozess relevanten Reaktionsabschnitte, die wichtigsten Intermediärprodukte sowie die Bildung der für die Bierqualität mitentscheidenden GNP zusammengefasst.



**Abbildung 2: Die relevanten Stoffwechselwege der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen**

Aus Sicht des Brauers steht der Abbau der vergärbaren Kohlenhydrate zu  $\text{CO}_2$  und Ethanol im Vordergrund. Dabei werden die Zucker von der Hefe über die Glykolyse [1] und die Alkoholische Gärung [2] als Teil des Kohlenhydratstoffwechsels metabolisiert (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.4.3). Gleichzeitig stellt der Acetaldehyd als Intermediärprodukt des Gärungsstoffwechsels einen der wichtigen Knotenpunkte zum Baustoffwechsel der Hefe dar. Das für die im Cytosol stattfindende Synthese von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und Sterolen [5] essentielle Acetyl-CoA kann unter brautechnologischen Bedingungen nur über den Stoffwechsel des sog. PDH-Bypasses [3] generiert werden (vgl. Kapitel 2.4.5). In der Abbildung sind ebenfalls die Schlüsselenzyme (PDC, ADH, ALDH und ACS), die im Rahmen dieser Forschungsarbeit zur Charakterisierung des physiologischen Zustandes beitragen und ihre Stellung in den Reaktionswegen aufgezeigt.

Der anabolische Teil des Kohlenhydratstoffwechsels umfasst vor allem die Bildung der für die Ausstattung der Hefe wichtigen Reservestoffe [4]. Des Weiteren stellt die Proteinbiosynthese [6], die auf dem Aminosäurestoffwechsel [7] und dem Schwefelstoffwechsel [8] basiert, die Grundlage für die Proliferation der Hefezellen dar. Die Bildung der höheren Alkohole [9], der VDK [10] und der Ester [11] während der Gärung und der Reifung sind dabei eng mit der Hefevermehrung und den Reaktionen des Baustoffwechsels verknüpft, so dass die Auswirkungen geänderter Prozessbedingungen und eventuelle Abweichungen vom gewünschten Aromaprofil auch über die Konzentrationen der

GNP bestimmt werden können (Voet, 1994; Karlson, 1994; Van den Berg, 1996; Pronk, 1996; Filkweert, 1996; Boulton, 2001; Verstrepen, 2003; Back, 2005; Kunze, 2007; Annemüller, 2008) (vgl. Kapitel 2.7.1).

Anhand von im Detail erweiterten Ausschnitten der Abbildung 2 werden in den nachfolgenden Kapiteln die relevanten Bereiche des Hefestoffwechselwegs genauer beschrieben werden.

### 2.4.1 Kohlenhydratabbau unter optimalen Bedingungen

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist unter optimalen Nährstoffbedingungen bei Anwesenheit von Sauerstoff in der Lage, verschiedene Kohlenstoff- bzw. Energiequellen aerob über die Glykolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette zu verwerten. Hierbei entstehen bei vollständiger Oxidation neben den Edukten  $H_2O$  und  $CO_2$  38 Mol ATP pro Mol Glucose. Die so gewonnene Energie schafft die Basis zur Erhaltung des Stoffwechsels und zur Neusynthese von Zellbestandteilen für die Fortpflanzung (Narziß, 1995).

Im Kohlenstoffwechsel der Hefe unterliegen jedoch die Aufnahme und die Verwertung der verschiedenen Kohlenhydrate bestimmten Regulationen. Dabei steht aus Sicht der Hefe immer eine möglichst hohe Energieausbeute im Vordergrund der Zuckerassimilation. So stellen die Monosaccharide, insbesondere die Glucose, die effizientesten Kohlenstoffquellen für ihren Metabolismus dar. Deshalb werden auch in der Brauerei zu Beginn der Propagation und der Gärung die Hexosen Glucose und Fructose von der Hefezelle aus der Würze aufgenommen. Diese gelangen in Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten über Diffusion oder erleichterte Diffusion in die Zelle und können in den Kohlenhydratabbau einfließen (Lagunas, 1993).

Erst mit Abnahme der Glucosekonzentration im Medium kommt es zur einer Aufnahme und Verwertung zur Verfügung stehender Di- und Trisaccharide. Diese Mehrfachzucker bedürfen in der Regel eines aktiven, energieabhängigen Transportsystems (Permeasen) durch die Zellmembran und werden dann im Cytosol der Zelle mittels spezifischer Glucosidasen in ihre monomeren Bestandteile gespalten. Auch unter brautechnologischen Bedingungen ist diese Form der Glucoserepression der beteiligten Enzyme zur Umsetzung der in der Würze vorliegenden Maltose und Maltotriose für ein befriedigendes Gärergebnis entscheidend. (vgl. Kapitel 2.4.2). Eine Sonderstellung bei der Aufnahme der Würzezucker stellt das Disaccharid Saccharose dar. Die Saccharose wird bereits durch das in der Plasmamembran gebundene Enzym Invertase ( $\beta$ -Fructofuranosidase) in ihre Bestandteile Glucose und Fructose zerlegt, die dann ebenfalls direkt in die Zelle diffundieren können (Narziß, 1995).

Die Glykolyse als erster Schritt des Kohlenhydratabbaus stellt sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen mit einem Energiegewinn von 2 Mol ATP ausgehend von der Glucose den ersten Schritt des Kohlenhydratabbaus dar (vgl. Kapitel 2.4.3). Die Glykolyse kann in drei Abschnitte unterteilt werden und umfasst 10 enzymkatalysierte Reaktionsschritte. Die Reaktionen lassen sich in die Glucose-Phosphorylierung und Glucose-

Spaltung, die Substratkettenphosphorylierung und die Pyruvat-Bildung unterteilen (P. Karlson, 1994; Voet, 1994; Pronk, 1996; Fernie, 2004). Die Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die ersten fünf Reaktionsschritte des Kohlenhydratabbaus der Hefe bis hin zur Bildung des Glycerinaldehyd-3-phosphats.

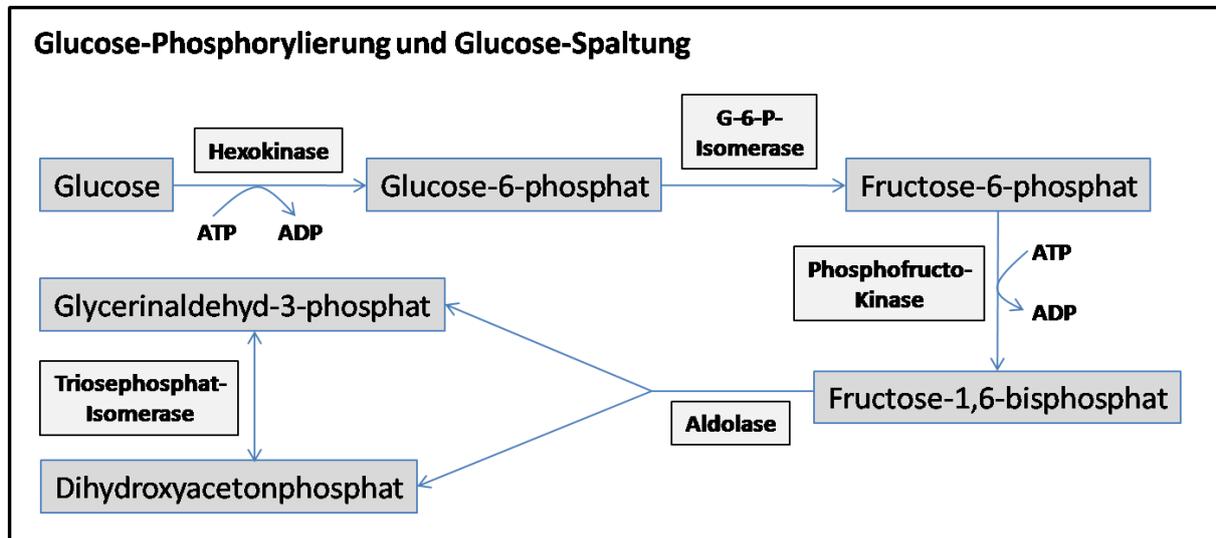


Abbildung 3: Umwandlung der Hexose in 2 Moleküle Triosephosphat während der Glykolyse

Zu Beginn der Glykolyse finden einerseits eine 2fache Phosphorylierung mittels ATP und andererseits eine Isomerisierung der Glucose zu Fructose-1,6-bisphosphat statt. Somit handelt es sich in der Startphase der Glykolyse um eine energiezehrende Aktivierung der Glucose. Im Anschluss katalysiert die Aldolase die Spaltung der Fructose-1,6-bisphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Die resultierende Ketotriose und Aldotriose stehen über die Enol-Form im Gleichgewicht, das zu 96% auf Seiten der Keto-Form liegt. Die angebundene Triosephosphat-Isomerase ist allerdings aufgrund ihrer hohen Umsatzraten in der Lage, das weiter in der Glykolyse benötigte Glycerinaldehyd-3-phosphat aus Dihydroxyaceton zu jedem Zeitpunkt in ausreichender Konzentration bereit zu stellen (P. Karlson, 1994; Voet, 1994; Narziß, 1995; Pronk, 1996; Fernie, 2004). Neben der Rolle als Intermediärprodukt der Glykolyse ist die Ketotriose gleichzeitig Ausgangsstoff für die Bildung von Glycerol im Hefestoffwechsel, das u.a. eine große Bedeutung für die Vollmundigkeit des Bieres hat (vgl. Kapitel 2.4.7).

Das Glycerinaldehyd-3-phosphat wird im folgenden Reaktionsschritt durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  wiederum phosphoryliert. Für die Ausrichtung des Hefestoffwechsels ist die Aufwendung von  $\text{NAD}^+$  an dieser Stelle von entscheidender Bedeutung und wird im Zusammenhang mit der Alkoholischen Gärung in Kapitel 2.4.3 detailliert besprochen (Bakker, 2001). Die Abbildung 4 zeigt die Substratkettenphosphorylierung im Überblick.

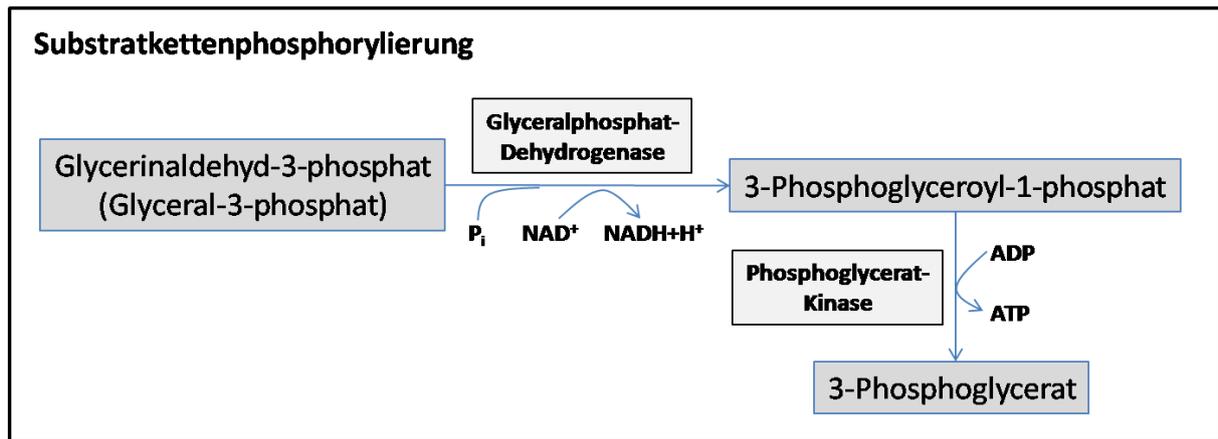


Abbildung 4: Die Substratkettenphosphorylierung während der Glykolyse

Erst bei der durch die Phosphoglycerat-Kinase katalysierten Umwandlung von 3-Phosphoglyceroyl-1-phosphat zu 3-Phosphoglycerat ist es der Hefe möglich, das bis dahin eingesetzte ATP zu regenerieren. Die zwei zur Phosphorylierung von Glucose zu Fructose-1,6-bisphosphat benötigten ATP werden nun aufgrund der zwei zu Verfügung stehenden Triosen im letzten Schritt der Substratkettenphosphorylierung zurückgewonnen.

In den anschließenden Reaktionsschritten (8-10) findet der eigentliche Energiegewinn der Glykolyse statt. Nach der Umwandlung von 3-Phosphoglycerat über 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat bildet die Hefe mit Hilfe der Pyruvat-Kinase das Endprodukt der Glykolyse in Form von Pyruvat. In diesem Reaktionsschritt wird freies Phosphat auf ADP übertragen. Die Abbildung 5 zeigt die Reaktionsschritte der Pyruvat-Bildung und die Generierung von ATP (Postma, 1989; Karlson, 1994; Voet, 1994; Narziß, 1992; Pronk, 1996; Filkweert, 1996; Fernie, 2004).

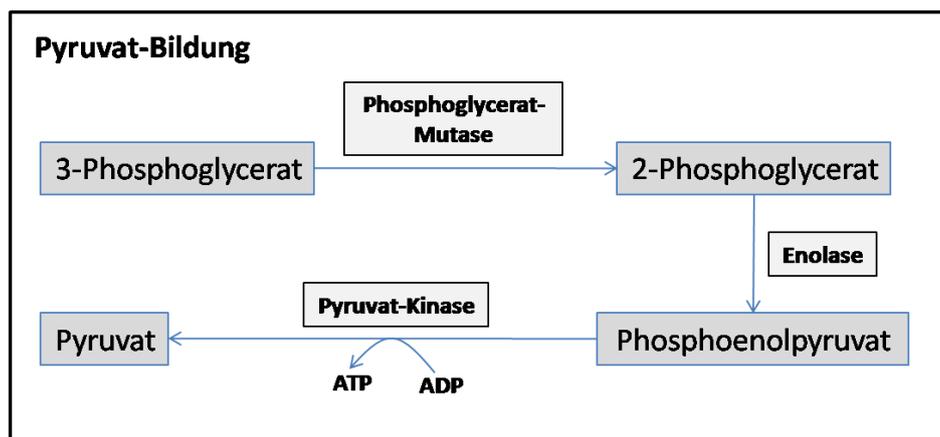


Abbildung 5: Die Pyruvatbildung zum Ende der Glykolyse

Sowohl das Pyruvat als auch das Phosphoenolpyruvat bilden nicht nur im Energiestoffwechsel wichtige Knotenpunkte. Beide Intermediärprodukte sind als  $\alpha$ -Ketosäuren zusätzlich Grundbausteine für die Synthese von Aminosäuren und Vorläufer von GNP im Stoffwechsel der Hefe (vgl. Kapitel 2.4.4 und 2.2.7).

Die im respirativen Stoffwechsel (Atmungsstoffwechsel) angeschlossene Umsetzung des Pyruvats zu Acetyl-CoA, die anschließende Verwertung im Citratzyklus und die vollständige Oxidation des Wasserstoffes in der Atmungskette spielen unter brautechnologischen Bedingungen mit einem Anteil von ca. 2-3% des Gesamtkohlenhydratumsatzes eine eher untergeordnete Rolle. Aufgrund eines während der Bierbereitung vorliegenden Stoffwechselphänomens, dem s.g. Crabtree-Effekt, ist die hier normalerweise stattfindende biologische Knallgasreaktion fast gänzlich unterdrückt (s. Kapitel 2.4.2). Dennoch kommt einigen Intermediärprodukten des Citratzyklus ( $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinyl-CoA und Oxalacetat) eine große Bedeutung zu (Boulton, 2001). Diese fungieren einerseits als Substrate für den Baustoffwechsel der Hefe und andererseits beeinflusst die Abgabe der organischen Säuren den pH-Wert und die Rezenz und somit die Qualität des fertigen Bieres. Zudem wäre aus Sicht des Energiegewinns der Hefe ein vollständiger Abbau, welcher in Abbildung 6 dargestellt ist, zu bevorzugen.

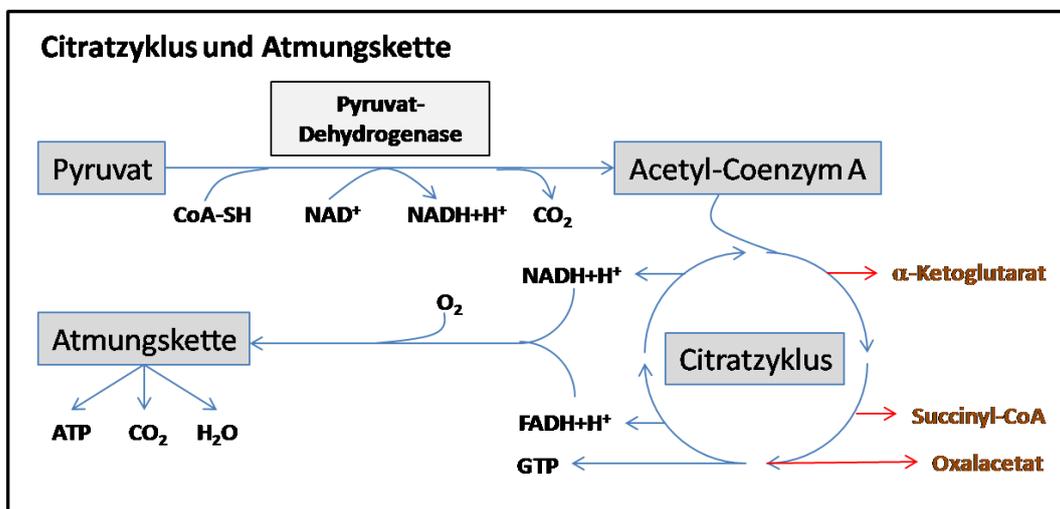


Abbildung 6: Umsetzung des Pyruvats über den Citratzyklus und die Atmungskette

Im ersten Schritt katalysiert die PDH die irreversible oxidative Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA, bei der CO<sub>2</sub> abgespalten und CoA-SH angelagert wird. Unter optimalen Bedingungen würde die Elektronentransportkette in der Mitochondriummatrix das in der Glykolyse und im Citratzyklus gewonnene NADH+H<sup>+</sup> und FADH+H<sup>+</sup> nutzen, um die darin gebundene Energie zur Bildung von ATP freizusetzen. So können aus den entstandenen 10 NADH+H<sup>+</sup>, dem FADH+H<sup>+</sup> und dem GTP mit Hilfe des erzeugten H<sup>+</sup>-Ionen-Potentials im extramitochondrialen Raum durch die ATP-Synthase insgesamt 36 Mol ATP pro Mol Glucose in der Atmungskette generiert werden (Karlson, 1994; Voet, 1994; Fernie, 2004).

## 2.4.2 Brautechnologisch relevante Stoffwechselphänomene

Das Stoffwechselsystem von Mikroorganismen ist stets abhängig von den im Habitat vorliegenden und verfügbaren Nährstoffquellen. Vor allem die Kohlenstoffquellen als Energielieferanten und Grundbausteine organischer Verbindungen besitzen ausgeprägte Regulierungsfunktionen im Stoffwechsel der Hefe.

Wird, aufgrund der Nährstoffzusammensetzung oder der daraus abgeleiteten Abbauprodukte (Kataboliten), die Expression von Stoffwechselkomponenten unterdrückt, werden diese Phänomene als Katabolitrepessionen bezeichnet (*Belitz, 2001*). Die ersten auf eine Katabolitrepession zurückzuführenden Stoffwechselphänomene wurden anhand der Glucose beschrieben. Die höchst effiziente Energieausbeute im Hefemetabolismus dieses monomeren Kohlenhydrats trägt dazu bei, dass die Hefe ihren Stoffwechsel auf dessen Verwertung fokussiert und die übrigen Kohlenhydratquellen der Würze bis zum weitgehenden Verbrauch der Glucose unterordnet (*Wills, 1990*).

Dabei spielt die frühzeitige Verwertung der Maltose als Hauptbestandteil der vergärbaren Zucker in der Bierwürze eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Gärdauer und einem weitgehenden Erreichen des EVG. Damit die Maltose allerdings in den Kohlenhydratabbau einfließen kann, muss sie mittels einer spezifischen Permease in die Zelle eingeschleust werden. Diese Form des aktiven Transports der Maltose in die Hefezelle ist mit einem Energieaufwand verbunden. Erst dann kann die durch die Maltase katalysierte hydrolytische Spaltung in ihre monomeren Bestandteile erfolgen (*Serrano, 1977; Loureiro-Dias, 1984; Chang, 1989*). Für die Maltosespaltung sind in *Saccharomyces cerevisiae* insgesamt 5 unabhängige MAL Loci erforderlich. Jeder dieser Loci verfügt über drei Strukturgene, die die Maltase, den Maltase Transporter/Permease und ein positives Regulator-Protein codieren (*Cohen, 1984; Dubin, 1985; Hong, 1986; Chow, 1989*). Bis auf das Regulatorgen, welches konstitutiv transkribiert wird, unterliegen die beiden anderen der Glucoserepression und der Maltoseinduktion. Die Fructose und die Saccharose tragen neben der Glucose zur Reprimierung dieser Gene bei (*Entian, 1997*).

Unter brautechnologischen Bedingungen ist jedoch vor allem eine besondere Form der Katabolitrepession, die ebenfalls erstmals anhand der Glucose beschrieben wurde, von enormer Bedeutung. Dieses Stoffwechselphänomen, der s.g. Crabtree-Effekt, spielt für die Hefe in der Brauerei eine entscheidende Rolle und stellt die Grundlage zur fermentativen Umsetzung der Bierwürze in der Brauerei dar (*De Deken, 1966; Barford, 1979; Postma, 1989*).

Der Crabtree-Effekt beschreibt dabei in erster Linie den auch unter aeroben Bedingungen stattfindenden Gärungsstoffwechsel, sobald die Zuckerkonzentration im Medium einen spezifischen Grenzwert überschreitet. In Gegenwart von Glucose tritt der Crabtree-Effekt bei einem Grenzwert von 0,1 g/l ein. Jedoch lässt sich die resultierende Stoffwechseleinschränkung auch auf die anderen Kohlenhydrate der Würze übertragen, so

dass unter brautechnologischen Bedingungen die Voraussetzung zum Eintreten des Crabtree-Effekts immer erfüllt wird (*Van Urk, 1989; Annemüller, 2008*).

Dieses Stoffwechselphänomen hat seinen Ursprung in der Repression der Atmungskapazität und der mitochondrialen Funktionen. Es wird davon ausgegangen, dass die Cytochromoxidase der Atmungskette durch die entsprechenden Zuckerkonzentrationen in ihrer Funktion gehemmt ist. Dies hat weitreichende Konsequenzen und Umstellungen im Hefestoffwechsel zur Folge. Die unter optimalen Bedingungen in der Atmungskette vollständige Oxidation der in der Glykolyse und im Citratzyklus reduzierten Coenzyme  $\text{NAD}^+$  und  $\text{FAD}^+$  ist somit unterdrückt (*Barford, 1979*). Dies führt zu Störungen im Fließgleichgewicht des als Energietransporteur eingesetzten Coenzym  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Im Kohlenhydratkatabolismus kommt es daraufhin zur Anhäufung und somit zu einem „Rückstau“ dieses Intermediärproduktes im Citratzyklus (*Van Urk, 1990; Bakker, 2001*). Die Hefe ist damit nicht mehr in der Lage diesen Zyklus kontinuierlich aufrecht zu erhalten. Jedoch müssen für den anabolischen Stoffwechsel benötigte Substrate weiterhin aus diesem System zu Verfügung gestellt werden. Der ständige Abzug von Intermediärprodukten aus dem Citratzyklus wird über anaplerotische Reaktionen unabhängig von dem durch die PDH katalysierten Acetyl-CoA reguliert. Somit ergibt sich im Bereich der Mitochondrien ebenfalls ein Überangebot von Acetyl-CoA und als Folge eine Endprodukthemmung der PDH, da die Hefe nicht in der Lage ist das entstandene Acetyl-CoA weiter zu verwerten (s. Kapitel 2.4.5). Daraufhin steigt auch der Pyruvatpool innerhalb der Hefezelle und um den glykolytischen Fluss und die Energieversorgung aufrecht zu erhalten, fließt das Pyruvat in den Abbau der Alkoholischen Gärung (s. Kapitel 2.4.3) (*Rieger, 1983; Verduyn, 1990; Van den Berg, 1995; Pronk, 1996*).

Nicht nur im Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels treten solche Effekte auf. Auch die Aufnahme der Stickstoffsubstanzen unterliegt bestimmten Abhängigkeiten. So wird davon ausgegangen, dass die Aufnahme der verschiedenen Aminosäuren der Würze sowohl von den geringen Konzentrationen der Ammoniumsalze als auch von den eigenen Konzentrationen in der Würze abhängig ist. Daraus ergeben sich Unterschiede in der Aufnahmegeschwindigkeit (vgl. Kapitel 2.2) (*Horák, 1997*).

### 2.4.3 Die Alkoholische Gärung

Die Alkoholische Gärung ist sowohl für die Brauer und Winzer als auch für die in den letzten Jahren stark gewachsene Produktion von Bioethanol der maßgebliche Stoffwechselweg der Hefe. Lange stand die Alkoholische Gärung allein für die Möglichkeit der Energiegewinnung von Mikroorganismen unter anaeroben Verhältnissen. Jedoch sollten mit Hinblick auf den unter aeroben Bedingungen auftretenden Crabtree-Effekt und der Tatsache existenter „Crabtree-Negativer“ Mikroorganismen auch die evolutionären Vorteile dieses Systems berücksichtigt werden (Postma, 1989; Verduyn, 1990; Van Urk, 1989). Einerseits gelingt es der Hefe durch den hohen glykolytischen Fluss, der bei einem fermentativen Stoffwechsel möglich ist, das Angebot an Kohlenstoffquellen schnell zu minimieren. Andererseits spielen die Zwischen- und Endprodukte Acetaldehyd, CO<sub>2</sub> und Ethanol eine entscheidende Rolle. Diese tragen zu den vorhandenen Selektionseigenschaften eines Milieus gegenüber konkurrierenden nicht fakultativ anaeroben, alkoholempfindlichen Mikroorganismen bei. Ebenfalls kann der pH-Wert aufgrund erhöhter Ausscheidungen von organischen Säuren und Wasserstoffionen schnell in einen weiter selektiven Bereich verschoben werden, der auch das Wachstum möglicher pathogener Keime unterdrückt. Damit erreicht die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die in der Lage ist das gebildete Ethanol bei nachfolgenden aeroben Bedingungen wieder als Kohlenstoffquelle zum Aufbau von Zellsubstanzen zu nutzen, deutliche Wachstumsvorteile gegenüber anderen Mikroorganismen (Postma, 1989; Piskur, 2006).

Neben den evolutionären Vorteilen der Alkoholischen Gärung kommt der anaeroben Umsetzung der vergärbaren Kohlenhydrate zu Acetaldehyd unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und der nachfolgenden Reduktion zu Ethanol eine enorme Bedeutung im Energie- und Baustoffwechsel der Hefe zu. Das bei der Glykolyse entstandene NADH + H<sup>+</sup> kann unter den gegebenen Bedingungen nicht über die Atmungskette oxidiert werden. Doch ohne dessen „Regeneration“ könnte die Hefe die bereits mit 2 ATP pro Mol Glucose minimierte Energiegewinnung nicht aufrechterhalten (Bakker, 2001).

Der katabolische Abbau der vergärbaren Würzezucker erfolgt nach eventueller hydrolytischer Spaltung, wie im Falle der Maltose durch die MAL, in der ersten Stufe unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit über die in Kapitel 2.4.1 beschriebene Glykolyse. Das Endprodukt der Glykolyse stellt dabei das Pyruvat dar. Im Stoffwechsel der Hefe konkurrieren bei einem Wachstum auf zuckerhaltigen Medien drei Enzymsysteme um dieses Substrat. Erstens besteht die unter brautechnologischen Bedingungen untergeordnete Möglichkeit der oxidativen Decarboxylierung zu Acetyl-CoA, durch die im Mitochondrium lokalisierte PDH, welche den Übergang zum respirativen Stoffwechsel darstellt. Zweitens kann das Pyruvat zu Oxalacetat carboxyliert werden, dessen zusätzliche Rolle als Substrat für die Aminosäuresynthese im Zusammenhang mit dem Stickstoffstoffwechsel der Hefe in Kapitel 2.4.4 beschrieben wird (Holzer, 1957; Kresze, 1981; Filkweert, 1996).

Die dritte Möglichkeit stellt die irreversible Decarboxylierung des Pyruvat zu Acetaldehyd dar. Damit wird sowohl die Alkoholische Gärung eingeleitet als auch die Grundlage der Hefevermehrung in den Prozessen der Propagation und der Gärung geschaffen. Die Abbildung 7 zeigt die Zusammenhänge der für die Hefe relevanten Stoffwechselwege des Kohlenhydratabbaus unter den in der Brauerei vorherrschenden Bedingungen.

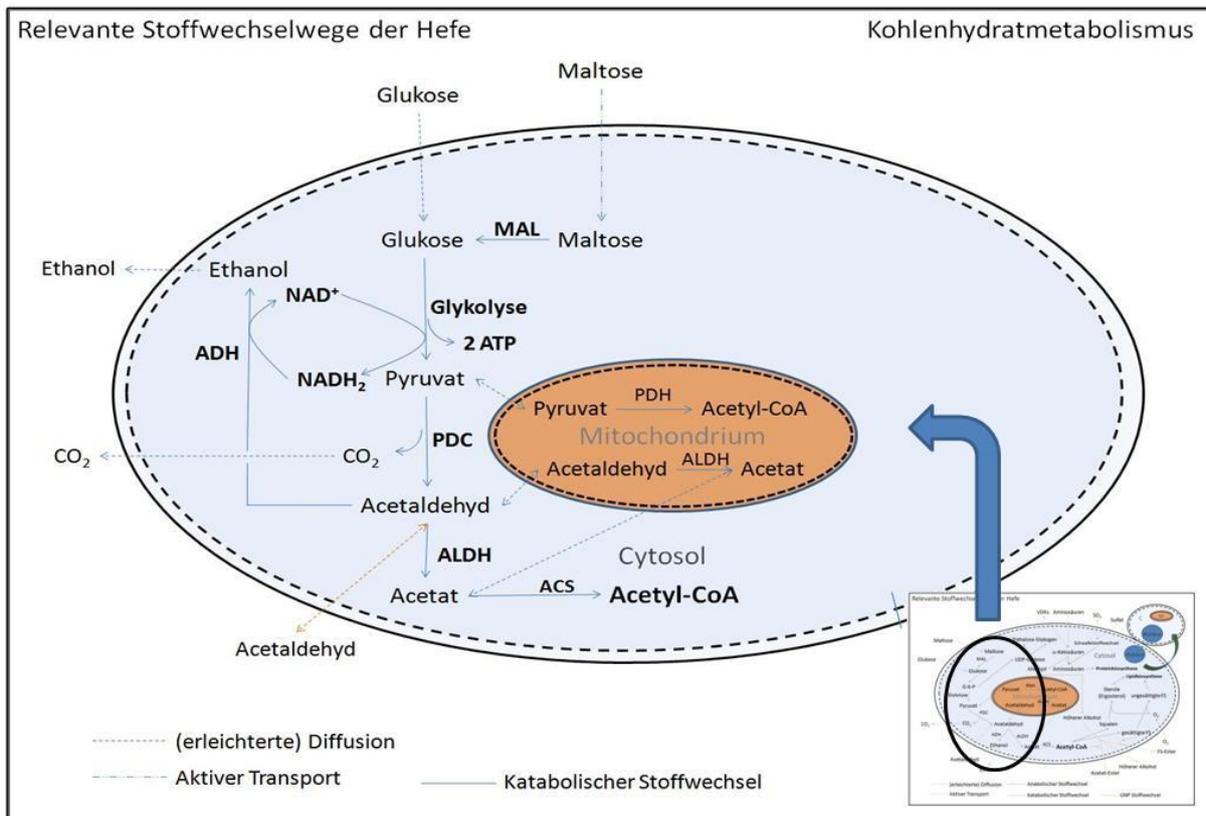


Abbildung 7: Die relevanten Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus

Der erste Reaktionsschritt der Alkoholischen Gärung wird durch das Tetramer PDC (E.C. 4.1.1.1) mit einer molekularen Masse von 240 kDa und vier fast identischen Untereinheiten katalysiert. Jede dieser Untereinheiten ist mit einem für die katalytische Funktion essentiellen permanent gebundenen ThDP Coenzym und einem Mg-Ion gekoppelt. Insgesamt sind drei Strukturgene für die Codierung der PDC im Hefegenom bekannt (Kellermann, 1986; Hohmann, 1991). Das Enzym ist aber nicht nur unter anaeroben Bedingungen aktiv, sondern auch bei Sauerstoffverfügbarkeit und einer Glucosekonzentration unter 0,1 g/l (Konzentrationsgrenze des Crabtree-Effekts) mitverantwortlich für die Bereitstellung des Acetyl-CoA über den PDH-Bypass als Basis für die Lipidbiosynthese (Filkweert, 1996).

Die katalytische Wirkung der durch Glucose induzierten PDC wird allosterisch über das Substrat Pyruvat reguliert und maßgeblich durch intrazelluläres Phosphat beeinflusst (Boiteux, 1970). Die Expression der PDC korreliert mit der Funktion des Zellwachstums und der Gärcapazität von *Saccharomyces cerevisiae*. In Versuchen zu den Auswirkungen verschiedener Kohlenstoffquellen (u.a. Ethanol, Glucose) auf die Expression der

Strukturgene in *Saccharomyces cerevisiae* konnte in allen Ansätzen die Transkription der Pdc1-mRNA nachgewiesen werden. Bei glucosehaltigen Medien und bei einem Wechsel von nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen auf Glucose konnte zusätzlich eine verstärkte Expression und eine Anreicherung von Pdc1-mRNA festgestellt werden (*Boles, 1993*). Um das Vorhandensein anderer Gene zu untersuchen, wurden Versuche mit PDC-Mutanten, deren Pdc1 Gen vollkommen entfernt wurde, gemacht. Diese zeigten zwar keine Inaktivität der PDC, aber es wurde eine um bis zu 80% geringere Aktivität festgestellt. Auch der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Medium spielt für die PDC-Aktivität eine große Rolle. Die Aktivität der PDC nimmt jedoch mit zunehmender Sauerstoffkonzentration ab, was vor allem zum Zeitpunkt des Anstellens mit hohen Glucosekonzentrationen eine entgegengesetzte Stoffwechselreaktion bedeuten würde (*Weusthuis, 1994; Filkweert, 1996*).

Aus Sicht der Hefe ist die nachfolgende Übertragung der Wasserstoffionen auf das Acetaldehyd essentiell. Die damit verbundene Regeneration von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  schafft die Grundlage zur Aufrechterhaltung des glykolytischen Flusses und der Energiegewinnung durch die Glykolyse (*Bakker, 2001*). Die durch die ADH (E.C. 1.1.1.1) katalysierte Bildung von Ethanol sichert damit das Überleben und die Vermehrung der eigenen Hefepopulation. Sogleich haben die gebildeten Stoffwechselprodukte  $\text{CO}_2$ , Acetaldehyd und Ethanol einen großen Anteil an den Qualitätsmerkmalen des resultierenden Bieres. Für den Elektronentransport im aktiven Zentrum der ADH sind festgebundene Zn-Ionen verantwortlich (*Leskovac, 1976*). Diese sind zusammen mit den Bindungsstellen für das Coenzym in den vier identischen Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 36 kDa lokalisiert (*Eklund, 1987*). In *Saccharomyces cerevisiae* sind drei für den Ethanolmetabolismus relevante ADH-Isoenzyme (Adh1, Adh2 und Adh3) nachgewiesen. Dabei hat die konstitutive, im Cytosol lokalisierte Adh1 aufgrund ihrer verstärkten Expression unter anaeroben Bedingungen und bei Anwesenheit von Glucose die größte Bedeutung für die Hefe während der Fermentation und macht den größten Teil der Aktivität der Isoenzyme aus. Die Adh2, welche für die Dissimilation von Ethanol zu Acetaldehyd zuständig ist, und die mitochondriale Adh3 unterliegen unterdes einer Glucoserepression (*Young, 1985; Ciriacy, 1997; Leskovac, 2002*).

#### 2.4.4 Der Stickstoffstoffwechsel

Eine ausgewogene Zusammensetzung von Zuckern und Stickstoffquellen hat bei der Fermentation in der Getränkeindustrie aufgrund der enormen Bedeutung für den Hefemetabolismus einen beachtlichen Einfluss auf die weitreichende Vergärung und die Produktqualität. Der Stickstoffstoffwechsel der Hefe ist auch im Prozess der Bierbereitung von zentraler Bedeutung. Neben den aus diesem System resultierenden GNP sind meistens die vorhandenen Stickstoffquellen der limitierende Faktor bei der Fermentation durch *Saccharomyces cerevisiae* (Manginota, 1998; Mendes-Ferreira, 2007). In der Natur kommt Stickstoff in den verschiedensten Formen und Komplexitäten vor. Dabei spielt er als eines der Hauptelemente in vielen Makromolekülen von Organismen eine entscheidende Rolle und bildet im Hinblick auf die erforderliche Menge neben dem Kohlenstoff einen Hauptnährstoff. Der Aufbau und die Integration der Transportproteine in den Zellmembranen, die Synthese von Enzymsysteme für die Stoffwechselreaktionen und die Bereitstellung von DNA-Bausteinen basieren auf den unterschiedlichsten stickstoffhaltigen Verbindungen und machen die Versorgung mit kompatiblen Stickstoffquellen zu einem zentralen Punkt bei der Ausstattung und dem physiologischen Zustand der Hefe (da Cruz, 2003; Batistote, 2006).

Die de-novo Synthese und Aufnahme von Aminosäuren sowie deren De- und Transaminierung sind unter brautechnologischen Bedingungen eine der wichtigsten Grundlagen für die anabolischen Reaktionen der benötigten Proteinstrukturen. Die daraus aufgebauten Eiweißkörper sind bedeutende Faktoren zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen der Zelle und machen zwischen 35% und 60% der TrS der Hefe aus (Annemüller, 2008).

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, eine große Bandbreite an Stickstoffquellen zu verwerten. Dabei stellen Amide, Aminosäuren und Peptide mögliche Lieferanten für den Stickstoffbedarf dar, wobei die strukturelle Komplexität dieser Verbindungen einen großen Einfluss auf den Hefemetabolismus hat. Die Ausstattung der Bierwürze mit ihren Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Purinen und Pyrimidinen ist ein typisches Beispiel für eine komplexe Umwelt und hat dementsprechend eine Vielzahl von Wechselwirkungen im Hefestoffwechsel zur Folge (Batistote, 2006)(vgl. Kapitel 2.2).

Die Reaktionen der Hefe auf die Nährstoffzusammensetzung beeinflusst neben den Gäreigenschaften die Interaktion zwischen Stickstoffstoffwechsel und Kohlenhydratstoffwechsel, aus dem ebenfalls Kohlenstoffgerüste für die Biosynthese bereitgestellt werden. Allerdings können bestimmte  $\alpha$ -Ketosäuren wohl nur über die entsprechenden Aminosäuren gewonnen werden. Deshalb können vor allem die Aminosäuren der Würze nach den essentiellen Eigenschaften der resultierenden  $\alpha$ -Ketosäuren im Hefemetabolismus klassifiziert werden. Die Kohlenstoffgerüste von Lysin, Histidin, Arginin und Leucin scheinen nur über die Aufnahme zu Verfügung zu stehen. Ein Mangel an diesen Aminosäuren könnte sich indes negativ auf die Hefephysiologie und somit

die Bierqualität auswirken. Des Weiteren ist die Synthese der Seitenketten von Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Glycin, Alanin und Tyrosin aus dem Kohlenhydratstoffwechsel mit fortschreitender Gärung unterdrückt (*Pierce, 1987; Boulton, 2001*).

Der erste Schritt zur Nährstoffversorgung ist der Transport in die Zelle und wird durch den zellulären Bedarf und die sich oft schnell wechselnden Umgebungsbedingungen reguliert. Die Aminosäureverwertung und damit auch die Gäreigenschaften der Hefe sind somit in erster Linie von den Aufnahmefähigkeiten abhängig. Wie alle Organismen hat auch die Hefe molekulare Kontrollmechanismen entwickelt, die durch Sensoren die Induktion und Repression von Schlüsselsystemen regulieren und eine konstante Versorgung sicherstellen. Gleichzeitig sorgt dieses Netzwerk dafür, dass auch unter Nährstoffmangel eine ausreichende Versorgung mit Proteinvorläufern sicher gestellt ist.

Die Verwertung der sekundären Stickstoffverbindungen benötigt spezifische katabolische Enzyme und Permeasen. In der Hefe existieren auffallend viele Transportsysteme mit hoher und niedriger Affinität, welche spezifisch für einige Aminosäuren oder kleinere Gruppen sind, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Zusätzlich gibt es ein allgemeines System, das die meisten Aminosäuren transportieren kann. Dabei kann die Aufnahme auch gegen das Konzentrationsgefälle durch einen sekundären H<sup>+</sup>-Symport erfolgen. Die Aminosäuren werden über die entsprechenden Transportproteine singulär gerichtet aus dem Substrat in die Zelle aufgenommen. Der eindimensionale Fluss kann auch bei einem Austausch für andere Aminosäuren für max. 10 bis 20% der gespeicherten Aminosäuren umgekehrt werden. Dies ist sowohl durch die Speicherung der Aminosäuren in den Zellkompartimenten (Vakuolen und Mitochondrien), als auch durch irreversible Transportmöglichkeit begründet (*Horák, 1997*).

Wie im Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels existieren auch innerhalb des Stickstoffmetabolismus Mechanismen zur Regulation der entsprechenden Transportsysteme. Ein Teil der Transportsysteme ist stark reguliert durch die Qualität der Stickstoffquellen. Der Rest ist konstitutiv und reagiert nicht wesentlich auf Veränderungen in der Stickstoffzusammensetzung der Umwelt. Dabei kann zwischen der transkriptionalen Repression durch Stickstoff-Kataboliten, die auch induktiven Charakter haben können, und der Stickstoff-Kataboliten-Inaktivierung auf der posttranskriptionalen Ebene unterschieden werden (*Batistote, 2006*). Gleichzeitig ist die Inhibition der Systeme vom Isoelektrischen Punkt der Aminosäuren abhängig und ändert sich bei einem pH-Wert von 5,5 von sauren zu basischen Aminosäuren. Die bevorzugten Stickstoffquellen der Hefe sind Ammonium, Asparagin und Glutamin. Glutamin ist dabei essentiell für die Synthese von Nucleotiden und diversen Aminosäuren (*Horák, 1997*). Die feste Regulierung der Proteine, die mit der Aufnahme und dem Metabolismus dieser Stickstoffsubstanzen verknüpft sind, zeigt die hohe Affinität der Hefe zu diesen Nährstoffquellen. So wird z.B. bei Vorhandensein von Ammonium oder Asparagin im Nährmedium die Aufnahme und Verwertung von Prolin, Allantoin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure reprimiert. Dabei haben die in der Würze ohnehin nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Ammoniumsalze allerdings negativen Einfluss auf

die Hefevermehrung und die Gärintensität. Höhere Biomassenertragsfaktoren zeigen die Hefen zumindest bei der Anwesenheit von Glucose bei der Versorgung mit Aminosäuren. *Ula4p* ist allerdings der einzig bekannte durch Stickstoff-Kataboliten reprimierte und durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure induzierte Aminosäuretransporter, der auf molekularer Ebene studiert wurde. Dies zeigt die noch unzureichende Klärung der Wechselwirkungen bei der Aufnahme und Verwertung der Aminosäuren auch unter brautechnologischen Bedingungen (*Horák, 1997*).

Die Anwesenheit von Glucose kann die  $H^+$ -Ionen-Transporter, die mit dem Aminosäuretransport gekoppelt sind, um ein vielfaches steigern und wird zusätzlich durch Kalium verstärkt. Die Regulierung und Stickstoffassimilation sind vor allem unter Wachstumsbedingungen enorm ausgeprägt. Die Stickstoffverarmung im Medium ist einer der Hauptgründe für das Ende der Wachstumsphase unter Fermentationsbedingungen. Aber auch während der stationären Phase ist die Anwesenheit von Kohlenstoffquellen für die Funktionsfähigkeit der Transporter essentiell. Dabei liegt in der stationären Phase, in der das Hefewachstum eigentlich abgeschlossen ist, eine besonders große technologische Bedeutung, da hier die höchste Zuckerverwertung stattfindet. Eine effektive Maltoseverwertung und damit die Möglichkeit, einen hohen EVG und eine entsprechende Ethanol-Produktion zu erreichen, ist nur bei der ausreichenden Versorgung der Hefe mit Aminosäuren möglich (*Manginota, 1998; Mendes-Ferreira, 2007*).

Die Populationsdichte im Medium hat ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf den metabolischen Prozess der Hefe und die Transportsysteme der Aminosäuren. Die Aktivität der Transporter kann bei sinkenden Zellkonzentrationen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen und des Hefestammes bis zu 200fach höher liegen. Dies wirkt sich auch auf die Fermentation von Glucose und Maltose aus, die in direktem Zusammenhang mit den verfügbaren Stickstoffsubstanzen steht.

Unklarheit besteht über die Bedeutung von kleineren Peptiden als Hefenährstoff in Zusammenhang mit der Bierbereitung. Zwar sind verschiedene Peptid-Transportsysteme in der Literatur beschrieben, die aber gleichzeitig bis auf die generellen Peptidpermeasen auch eine Rolle im Transport der Aminosäuren übernehmen (*Boulton, 2001*). Die von der Hefe verwertbaren Di- und Tripeptide werden nicht vorab hydrolysiert und die Aufnahme ist nicht an freien  $\alpha$ -Aminostickstoff und eine terminale Carboxylgruppe gebunden. Die Aufnahme ist dabei ebenfalls an vorhandene Kohlenhydratquellen gekoppelt und wird auch durch die primär bevorzugten Stickstoffquellen reguliert, aber auch durch Aminosäuren in geringer Konzentration im Medium induziert.

Auch die Aminosäuren werden wohl in bedeutendem Umfang intakt von der Hefezelle aufgenommen. Der Verwertung vorgeschaltet ist eine Sammlung der Aminosäuren in einem äußeren Pool, in dem eine Anreicherung stattfindet. Je nach Anforderung werden die Aminosäuren zu einem innerliegenderen Pool weitergeleitet, der eine konstante Größe beibehält. Im Zellinneren werden die Aminosäuren entweder direkt in die neu zu

synthetisierenden Proteinstrukturen eingebaut oder durch katabolische Deaminierung zu Ammonium und zum Aufbau von Glutamat nach entsprechender Transaminierung umgesetzt und nachfolgend zu den benötigten Aminosäuren umgewandelt (Anderson, 2000; Annemüller, 2008). Ammonium und Glutamat sind die Hauptabbauprodukte, die durch die Glutamatdehydrogenase ineinander überführt werden können. Glutamat und das daraus unter ATP-Verbrauch synthetisierte Glutamin scheinen die ultimativen Stickstoffquellen für die Biosynthesewege zu sein. Dabei dienen nicht nur die Kohlenstoffgerüste der deaminierten Aminosäuren als Bausteine, sondern auch die aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammenden Zwischenprodukte in Form von  $\alpha$ -Ketosäuren. Die Abbildung 8 zeigt die Zusammenhänge im Aminosäurestoffwechsel der Hefe. Die nachfolgend in diesem Kapitel beschriebenen Reaktionsschritte im Schwefelstoffwechsel der Hefe zur Generierung der schwefelhaltigen Aminosäuren sind ebenfalls graphisch dargestellt.

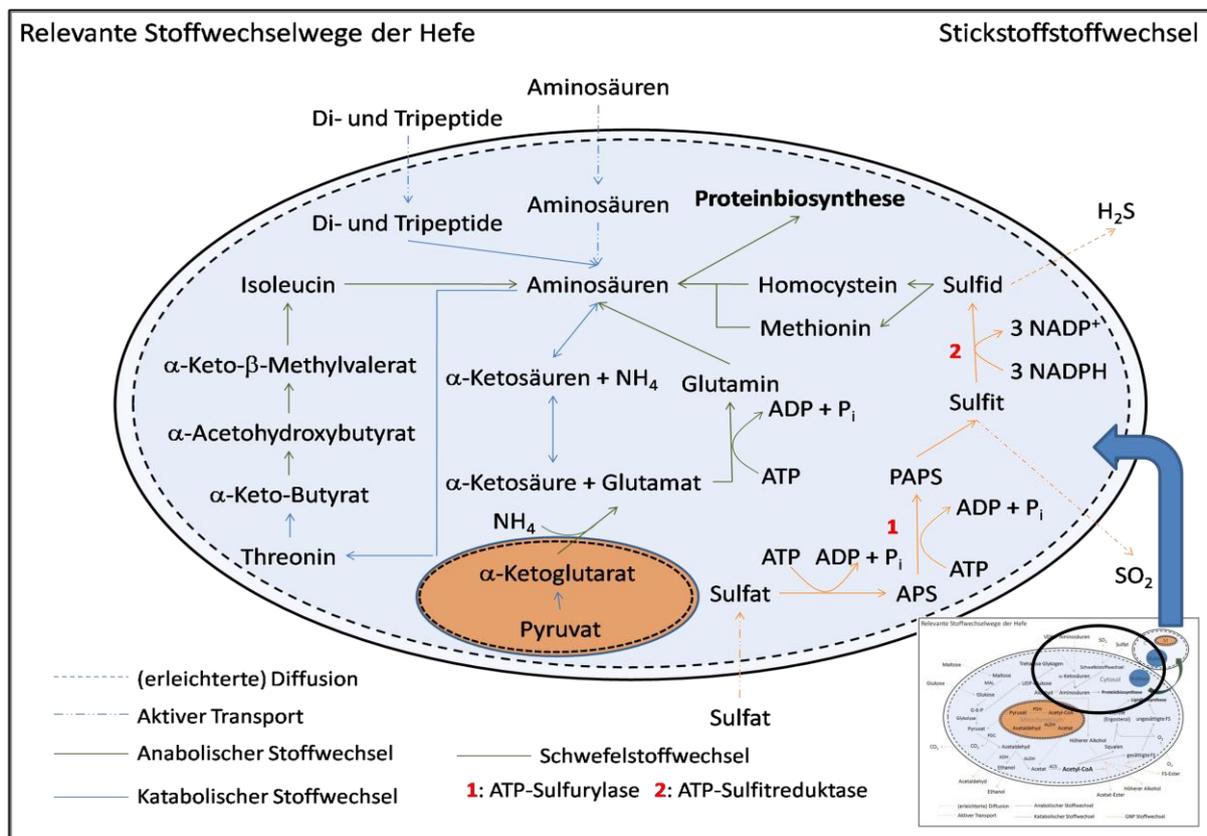


Abbildung 8: Der Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel der Hefe

Aufgrund der Transaminierungsreaktionen der Hefe, die am Beispiel von Threonin und Isoleucin in der Abbildung detailliert dargestellt sind, scheint die Bestimmung der gesamten Menge an assimilierbarem Stickstoff aus Sicht der Hefeernährung aussagekräftiger. Aber gerade in Hinblick auf die Regulierungsfunktionen der Zelle und die mit den Kohlenstoffgerüsten eng verbundene Synthese der höheren Alkohole macht eine Betrachtung der einzelnen Aminosäuren während der Gärung aus wissenschaftlicher Sicht notwendig (Chen, 1978). Auch wenn unter den Prozessbedingungen des Reinheitsgebotes

die Zusammensetzung des FAN nur bedingt beeinflussbar ist, kann über enzymtechnologische Verfahren oder den Zusatz einzelner Aminosäuren auf den Hefestoffwechsel und somit auf das Flavourprofil des Bieres Einfluss genommen werden.

Die Auswirkung einer Unterversorgung an FAN spiegelt sich sowohl in einer geringeren Hefevermehrung als auch in einer geringeren Gärintensität wieder. Die bei einem Mangel an Stickstoffquellen resultierende Konzentration an  $\alpha$ -Ketosäuren kann zudem ausschlaggebend für eine veränderte Zusammensetzung der GNP sein. Als Maßstab für eine gute Versorgung der Hefe gilt in der Würze ein Konzentrationsbereich an FAN von 200 bis 230 mg/l. Dieser wird unter Verwendung von einer 100%igen Malzschüttung durchaus erreicht. Nur bei dem Einsatz von Rohfrucht oder Zuckerprodukten sollte die FAN-Ausstattung kontinuierlich verfolgt werden. Die Stickstoffabnahme beläuft sich während der Gärung auf ca. 250 – 320 mg/l, so dass im Bier noch ca. 680 – 750 mg/l Stickstoff enthalten sind. Der Großteil entfällt dabei auf die Assimilation durch die Hefe. Ca. 100 – 120 mg/l sind auf die Aufnahme der Aminosäuren zurückzuführen. Ca. 50 – 70 mg/l fallen aufgrund der veränderten chemisch-physikalischen Bedingungen über den Gärprozess aus. Die Abnahme des FAN bis zum endvergorenen Bier sollte bei ca. 100 bis 140 mg/l liegen. Geringere Differenzen können einen Anhaltspunkt für einen Mangel an übrigen Nährstoffen sein (Narziß, 1995; Boulton, 2001; Kunze, 2007; Annemüller, 2008).

Im Hinblick auf die Geschmacksstabilität, die eng mit Schwefeldioxidgehalt des Bieres in Verbindung steht, und dem Einfluss des Schwefelwasserstoff auf den Jungbiercharakter wird im Folgenden auf die Synthese der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein im Detail eingegangen. Die Konzentrationen an  $\text{SO}_2$  und  $\text{H}_2\text{S}$  im Bier sind direkt mit der Synthese dieser schwefelhaltigen Aminosäuren verknüpft. Das  $\text{SO}_2$  als das Anhydrid der schwefligen Säure ist aufgrund seiner starken antioxidativen und konservierenden Wirkung in der Lebensmittelproduktion und vor allem bei der Weinbereitung als Zusatzstoff verbreitet (Belitz, 2001). Im Bereich der Bierproduktion ist die Konzentration an  $\text{SO}_2$  allein auf die natürlich von der Hefe abgegebene Menge zurückzuführen. Dennoch existiert für das Bier eine deklarationspflichtige Grenze von 10 mg/l. Um aber aus Stabilitätsgründen möglichst nah an diese Grenze zu gelangen, müssen der Schwefelstoffwechsel und die Einflussmöglichkeiten bekannt sein und innerbetrieblich die entsprechenden Möglichkeiten abgestimmt werden (Back, 2005). Jedoch sollte die definierte Bierqualität nicht durch Maßnahmen zur Steigerung des  $\text{SO}_2$ -Gehaltes negativ beeinflusst werden.

Die Grundvoraussetzung zur Eigensynthese schwefelhaltiger Aminosäuren ist die Möglichkeit des Organismus zur Aufnahme von Schwefelatomen aus dem Nährmedium und ein System zur Reduzierung des Schwefels zum benötigten Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ ). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der Lage, eine große Bandbreite von organischen oder anorganischen Schwefelverbindungen aufzunehmen und zu verwerten. Während der Bierbereitung stellt das anorganische Sulfat die Grundlage zur Eigensynthese der schwefelhaltigen Aminosäuren dar. Zunächst wird anorganisches Sulfat aus der Würze bzw. dem Jungbier durch einen aktiven Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen. Da eine direkte Reduktion des

$\text{SO}_4^{2-}$  zu  $\text{SO}_3^{2-}$  durch eine einfache Redox-Umsetzung mit NADP/NADPH eine endergone Reaktion darstellt, muss dieser Schritt durch eine Aktivierung des Sulfats umgangen werden. Wie bereits in der Abbildung 8 schematisch dargestellt, wird das Sulfat durch die ATP-Sulfurylase und die Übertragung des Adenosylphosphoryl-Restes von ATP in Adenosylphosphosulfat (APS) überführt. Eine erneute Phosphorylierung mittels der APS-Kinase führt dann zu 3'-Phosphoadenosylphosphosulfat (PAPS) [1]. Diese Reaktionen setzen das elektrochemische Potential des Sulfats herab und machen eine zweifache enzymatische Reduktion durch die Enzyme PAPS-Reduktase und Sulfitreduktase zu Sulfid über das Zwischenprodukt Sulfit möglich [2]. In dieser Form steht es der Hefe für den Einbau in die Kohlenstoffgerüste zur Aminosäurebildung zur Verfügung (Hilz, 1959; Thomas, 1997).

Die Bildung bzw. die Abgabe des „überschüssigen“  $\text{SO}_2$  und  $\text{H}_2\text{S}$  von der Hefe an das Jungbier während der Gärung kann in vier Phasen unterteilt werden und ist stark abhängig vom physiologischen Zustand der Hefe (Park, 2000). In der ersten Phase scheint die Würze genügend Methionin und Cystein bereitzustellen, und die Eigensynthese wird unterdrückt. In der zweiten Phase weist die Population ein erhöhtes Zellwachstum und damit verbunden einen höheren Bedarf an schwefelhaltigen Aminosäuren auf. Dieser kann nun nicht mehr ausreichend durch die Aufnahme aus der Würze gedeckt werden. Die Hefe beginnt mit der Neusynthese und der Schwefelstoffwechsel wird induziert. In dieser Phase kommt es noch zu keiner Abgabe von schwefelhaltigen Verbindungen an das Jungbier. In der dritten Phase gegen Mitte bis Ende der Hauptgärung kommt das Zellwachstum zum Erliegen und die Aktivität der Sulfitreduktase nimmt ab. Durch die weiterhin bestehende Verfügbarkeit von vergärbaren Zuckern versucht die Hefe dennoch die Biosynthese aufrecht zu erhalten. Demzufolge steigt die Sulfit-Konzentration in der Hefezelle (Kunze, 2007). Die toxischen Eigenschaften des steigenden Sulfit-Pools führen zur Komplexbildung mit Acetaldehyd, das die Toxizität herabsetzen kann, und zur Abgabe in den extrazellulären Raum. Die Ausschleusung erfolgt hierbei vermutlich über einen aktiven Transporter. In der abschließenden vierten Phase kommt es gegen Ende der Gärung aufgrund der Kohlenhydratmangels zum Erliegen des Schwefelstoffwechsels der Hefe und es wird kein weiteres Sulfit an das Bier abgegeben (Anderson, 2000; Back, 2005; Annemüller, 2008).

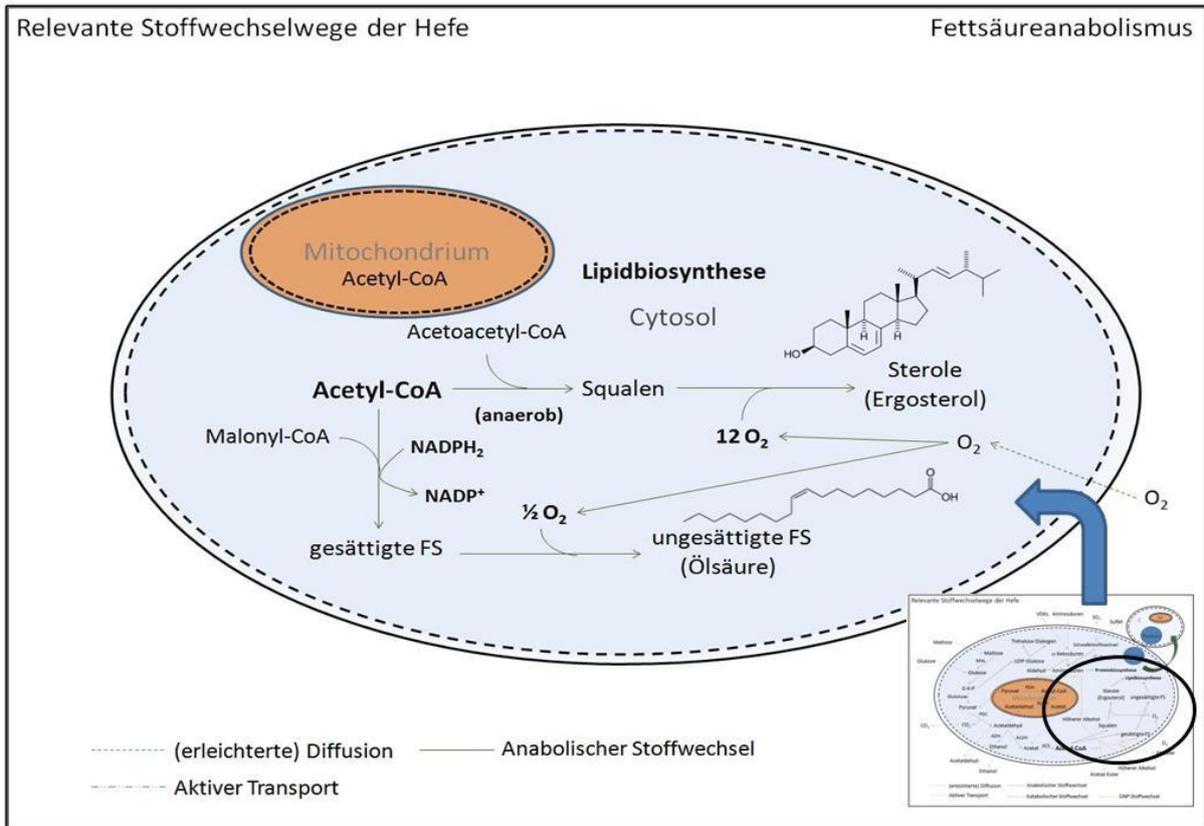
Einen großen Einfluss auf die Konzentration des  $\text{SO}_2$  im Bier besitzen die eingesetzten Hefestämme, die sich durch die genetische Ausstattung unterscheiden und somit Unterschiede in den Enzymsystemen und Regulierungsmechanismen der Sulfatassimilation aufweisen. Dabei bilden o.g. Hefen nur sehr geringe Mengen von max. 2 mg/l, wohingegen u.g. Hefen in der Lage sind, in Abhängigkeit ihres physiologischen Zustandes  $\text{SO}_2$ -Gehalte von über 20 mg/l zu erreichen. Daneben scheint der physiologische Zustand der Hefe bei der  $\text{SO}_2$ -Produktion ein wichtiger Faktor zu sein. Eine unzureichende Vitalität, oder Hefe, die einen tendenziell gärungsphysiologischeren Zustand aufweist, neigt zu einer erhöhten  $\text{SO}_2$ -Abgabe. Häufiges Führen, bei gleichzeitigem Herabsetzen der Würzebelüftung oder intensives Draufflassen ohne zusätzliche Belüftung der nachfolgenden Sude kann die  $\text{SO}_2$  Konzentration im Bier steigern (Wurzbacher, 2005). Dahingegen zeigen Reinzuchthefen, die

einen guten vermehrungsphysiologischen Zustand und eine gute Ausstattung an Lipiden aufweisen, eindeutige Tendenzen zu einer geringeren  $\text{SO}_2$  Produktion.

#### 2.4.5 Der Lipidstoffwechsel und die Bedeutung des PDH-Bypasses

Die Synthese der Lipide nimmt vor allem unter brautechnologischen Bedingungen einen besonders hohen Stellenwert ein. Sowohl für die Vermehrung als auch für eine zügige und weitreichende Aufnahme der vergärbaren Zucker, der Aminosäuren als Stickstoffquelle und anderer essentiellen Würzeinhaltsstoffe ist die Membranfluidität, die Membranpermeabilität und die Aktivierung der membrangebundenen Enzyme ausschlaggebend (Thomas, 1978; Alexandre, 1994; Tenge, 2006). Damit ist die Sicherung ausreichender Mengen an Fettsäuren, Phospholipiden und Sterolen innerhalb des Hefestoffwechsels für einen optimalen physiologischen Zustand der Hefe unabdingbar. Jedoch ist die Bildung von Ergosterol als sehr bedeutendes Strukturlipid, und die Bildung von ungesättigten Fettsäuren an die Sauerstoffverfügbarkeit geknüpft (Rosenfeld, 2003; Depraetere, 2008). Während die entsprechenden Vorstufen in Form von Squalen und gesättigten Fettsäuren auch unter anaeroben Verhältnissen synthetisiert werden können, benötigt die Hefe zur Ausbildung von Doppelbindungen in den Molekülstrukturen Sauerstoff, so dass dieser unter den in der Brauerei vorherrschenden Bedingungen Wuchsstoffcharakter bekommt. Da kein respirativer Stoffwechsel vorliegt, muss die Sauerstoffversorgung der Hefe über die Belüftung bei der Propagation und zum Zeitpunkt des Anstellens oder Drauflassens genau auf dieses Stoffwechselsystem abgestimmt werden (Postma, 1989; Remize, 2000; Boulton, 2001; Annemüller, 2008).

Eines der wichtigsten Substrate für die Lipidbiosynthese der Hefe stellt das Acetyl-CoA dar. Es nimmt insgesamt eine Schlüsselstellung im Hefestoffwechsel ein und ist an über 160 metabolischen Reaktionen beteiligt (KEGG). Neben der Bedeutung im Lipid- und Energiestoffwechsel ist das Acetyl-CoA u.a. an dem Aufbau von Aminosäuren, wie z.B. Leucin und Lysin, und Ketonkörpern beteiligt. Zudem ist der Einfluss auf die Bierqualität über die mit Acetyl-CoA verknüpfte Bildung der Essigsäure- und Fettsäureester von großer Bedeutung für die Bierbereitung. Die Abbildung 9 zeigt ausgehend vom Knotenpunkt Acetyl-CoA die Bildung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren sowie die Synthese von Ergosterol und zeigt die sauerstoffabhängigen Syntheseschritte.



**Abbildung 9: Die relevanten Stoffwechselwege des Fettsäuremetabolismus**

Die im Cytosol der Hefezelle ausgehend vom Acetyl-CoA stattfindende Kondensation von C<sub>2</sub>-Körpern zu ungesättigten Fettsäuren ist an das Redox-Coenzym NADP<sup>+</sup> gebunden. Sie umfasst die ATP-abhängige Carboxylierung unter Bildung von Malonyl-CoA und die exergone Decarboxylierung der Malonylgruppe während der Kondensation (*Ratledge, 1989; Voet, 1994*). Ebenfalls vom Acetyl-CoA ausgehend wird durch die Kondensation von sechs Isopreneinheiten Squalen als Vorstufe zum Ergosterol synthetisiert. Für die Umwandlung von Squalen in ein Ergosterol werden dann von der Hefe 12 O<sub>2</sub> und für die Ausbildung einer Doppelbindung in der Struktur der Fettsäuren ½ O<sub>2</sub> benötigt (*Ratledge, 1989; Gachotte, 1998; Rosenfeld, 2003*).

Da in der Hefe keine Transportmechanismen für Acetyl-CoA durch die Mitochondrienmembran bekannt sind und die Aktivität der PDH und somit der mitochondriale Abbau der Glucose zu Acetyl-CoA unter brautechnologischen Bedingungen stark eingeschränkt ist, kann die Hefe nur über die Enzyme des PDH-Bypasses die Grundlage für den Biomasseaufbau generieren (*Remize, 2000; Pronk, 1996*). Ausgehend von dem Acetaldehyd als Intermediärprodukt der Alkoholischen Gärung, existiert für die Hefe über die Enzyme ALDH und ACS eine nicht nur unter anaeroben Bedingungen essentielle Möglichkeit Acetyl-CoA bereitzustellen (*Briggs, 2004*). Gleichzeitig spielt die Regeneration der Coenzyme NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> eine wichtige Rolle zu Aufrechterhaltung der Redoxbilanz in der Hefezelle. Die Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der Reaktionszusammenhänge des Bypasses.

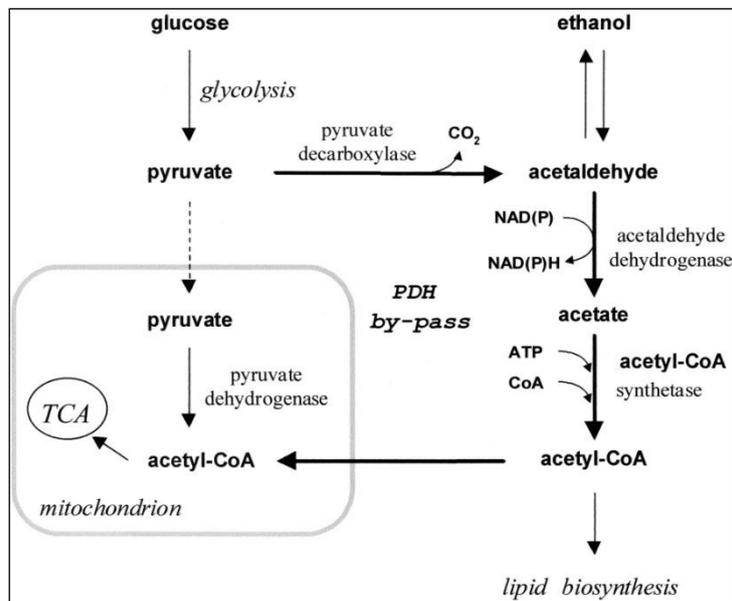


Abbildung 10: Schematische Darstellung des PDH-Bypasses

Wird die Umsetzung von Pyruvat zu Acetaldehyd durch die PDC bereits als Teil des Bypasses betrachtet, stellt die zweite Reaktion die durch die ALDH (E.C. 1.2.1.5 und E.C. 1.2.1.4) katalysierte Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat dar. Vier identische Untereinheiten mit jeweils 58 kDa bilden das Gerüst dieses ALDH-Tetramers. In *Saccharomyces cerevisiae* sind zwei in der Zelle räumlich voneinander getrennte Formen der ALDH bekannt. Die in den Mitochondrien lokalisierte ALDH wird durch Kalium und Thiol aktiviert und kann sowohl mit  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NAD}^+$  als Cofaktoren reagieren. Sie wird durch zwei Strukturgene (*Ald4* und *Ald5*) codiert. Während eines der Isoenzyme durch Glucose unterdrückt wird, bleibt das andere bei hohen Glucosekonzentrationen unverändert. Die cytosolisch lokalisierte Form hingegen benötigt  $\text{Mg}^{2+}$  zur Aktivierung und ist spezifisch an der Umsetzung von  $\text{NADP}^+$  beteiligt und wird im Genom von den Genen *Ald2*, *Ald3* und *Ald6* codiert (*Remize, 2000*). Die Tandem-Repeat Gene *Ald2* und *Ald3* werden durch Glucose reprimiert, so dass die Aktivität des cytosolischen Isoenzym hauptsächlich auf der Transkription des *Alp6* Gen beruht. Weiterhin schränkt die während der An- und Hauptgärung erhöhte Acetaldehydkonzentration die Funktion der ALDH aufgrund ihres niedrigen  $K_M$ -wertes ein. Dies könnte zu einer Reduzierung des Acetatpools für die nachfolgende Reaktion führen und das zeitgleiche Stadium der Hefevermehrung einschränken (*Wang, 1998*).

Das gebildete Acetat wird durch die ACS (E.C. 6.2.1.1) im letzten Schritt des PDH-Bypasses zu Acetyl-CoA unter Verbrauch von ATP umgesetzt. In *Saccharomyces cerevisiae* wurden in diesem Zusammenhang zwei Strukturgene (*Acs1* und *Acs2*) entdeckt, die jeweils ein vollständiges ACS-Isoenzym mit 151 kDa codieren (*Brenda*). In verschiedenen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass *Acs1* und *Acs2* unter aeroben Bedingungen sowohl auf Glucose (bei geringer Konzentration), als auch Ethanol und Acetat als Kohlenstoffquelle exprimiert werden. Die Transkription von *Acs1* unter aeroben Bedingungen ist jedoch von der Glucosekonzentration im Medium abhängig. Hohe Konzentrationen hemmen die Genexpression von *Acs1*. Unter Zuckermangel, auf Ethanol

oder Acetat als Kohlenstoffquelle wurde die Genexpression um das bis zu 100-fache gesteigert. Unter anaeroben Bedingungen hingegen wird nur Acs2 mit Glucose als Kohlenstoffquelle exprimiert. Mit diesen Erkenntnissen kann das von Acs1 transkribierte Isoenzym als „aerobes Enzym“ und das Acs2-Isoenzym als „anaerobe Enzym“ bezeichnet werden (Van den Berg, 1995; Serrano, 1977). Unter brauereitechnologischen Bedingungen allerdings scheint das Acs1-codierte Isoenzym keine Relevanz zu haben, da aufgrund der hohen Glucosekonzentrationen eine Expression des Gens vermutlich nicht stattfindet. Des Weiteren waren, Untersuchungen zur Folge, Hefemutanten ohne Acs2 Isoenzym auf Glucosemedien nicht lebensfähig. Zudem ist bei der Expression von Acs2 eine Verbindung mit der Fettsäurebiosynthese bekannt. In der Promoterregion der Gene der Enzyme zur Fettsäuresynthese (FAS1, Acetyl-CoA-Carboxylase) und des Acs2-Gens, wurde ein sog. ICRE gefunden (Inositol/Cholin-responsive Element). Inositol und Cholin sind Vorläufer der Phospholipide, welche für die Zellmembran benötigt werden und über deren Verfügbarkeit die Fettsäurebiosynthese zur Zellneubildung gesteuert wird. Da cytosolisch gebildetes Acetyl-CoA zur Fettsäurebiosynthese zu Verfügung stehen muss, scheint dieses unter brautechnologischen Bedingungen durch das in Acs2 codierte Isoenzym gebildet zu werden (Kratzer, 1997).

Aus den hier aufgeführten Zusammenhängen der Stoffwechseleigenschaften ergibt sich die enorme Bedeutung des PDH-Bypasses für die Vermehrung und den physiologischen Zustand der Hefe. Die Messung dieses Enzymsystems in den verschiedenen Phasen der Bierbereitung kann somit zu einem besseren Verständnis der Hefe in der Brauerei und zu Optimierungsansätzen der Prozesssteuerung beitragen.

#### 2.4.6 Die Proliferation der Hefe

Neben der Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen spielt für die Hefe vor allem die Neusynthese der zellulären Strukturen zur Fortpflanzung und damit zur Erhaltung der Population eine entscheidende Rolle. Dabei umfasst der Begriff des Baustoffwechsels die dafür notwendigen anabolischen Prozesse und setzt sich aus denen bereits beschriebenen Teilbereichen des Fettstoffwechsels, des Kohlenhydratstoffwechsels und des Proteinstoffwechsels zusammen. Jeder dieser Bereiche trägt dazu bei, dass die von der Hefe benötigten Metaboliten in ausreichender Menge für die Vermehrung bereitgestellt werden.

Die Hefe vermehrt sich unter brautechnologischen Bedingungen ausschließlich über die Form der vegetativen Sprossung, d.h. die Hefezellen vervielfältigen sich über mitotische Zellteilung und die entstehenden Tochterzellen stellen in diesem Fall einen genetischen Klon der Mutterzelle dar (Hutter, 2001). Die diploiden u.g. und polyploiden o.g. Hefezellen durchlaufen während diesem Prozess verschiedene Stadien. Dabei kann im Zellzyklus, wie in der Abbildung 11 dargestellt, zwischen der im Falle einer u.g. Hefe durch einen diploiden Chromosomensatz charakterisierten  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase (**gap1**), der S-Phase (DNA-Synthese) sowie der  $G_2$ -Phase (**gap2**) und der M-Phase (**M**itose, Zellteilung), die durch einen doppelten

Chromosomensatz gekennzeichnet sind, unterschieden werden (Forsburg, 1991; Hutter, 1993; Voet, 1994).

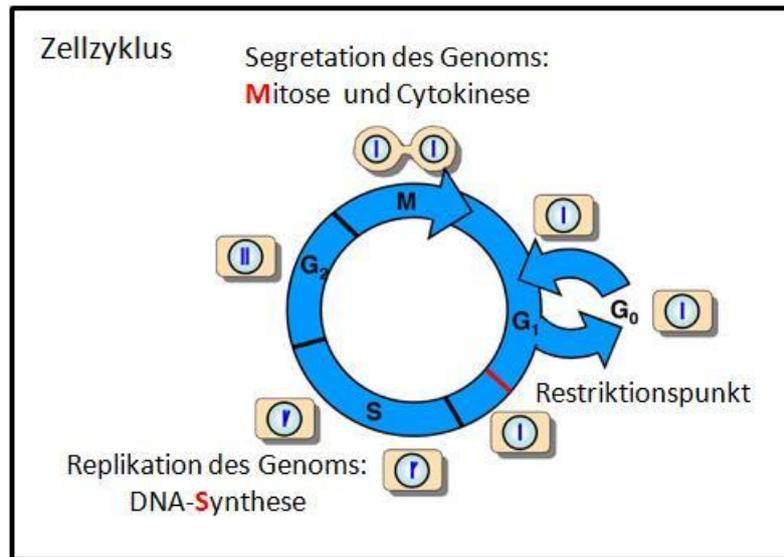


Abbildung 11: Zellzyklus der Hefe bei der Sprossung (Hengst, 2003)

In der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase befindet sich die Mutterzelle in einem Zustand des Zellzyklus, bei dem sie verharrt oder wächst. In dieser Phase findet während der Gärung der Hauptanteil des Extraktabbaus statt. Gleichzeitig prüft die Hefezelle in der  $G_1$ -Phase die vorhandene Nährstoffsituation. Bei einem nicht hinreichenden Nährstoffangebot verweilen die Zellen in einem Ruhestadium, der  $G_0$ -Phase. Ist die Nährstoffversorgung hingegen ausreichend, beginnt die Einleitung der eigentlichen Zellvermehrung. Die  $G_1$ -Phase lässt sich somit in die Startphase A (Analyse der ausreichenden Nährstoffversorgung) und Startphase B (Vorbereitung der DNA-Replikation) unterteilen. In diesem zweiten Stadium der  $G_1$ -Phase überschreitet die Hefe den sog. Restriktionspunkt und die Sprossung der Zelle kann nicht mehr abgebrochen werden. Die Zelle geht dann in die S-Phase über, in der die eigentliche Replikation der DNA stattfindet (Hohmann, 2003). In der darauffolgenden  $G_2$  + M-Phase befindet sich die u.g. Zelle mit einem tetraploiden Chromosomensatz im Stadium der Zellteilung. Zusammen mit einer „Grundausstattung“ an Zellkompartimenten wird im Zuge dieses Stadiums der entsprechende Teil des Genoms in die Tochterzelle transferiert und die Membran zwischen den zwei Zellen geschlossen. Die Tochterzelle wird solange in der  $G_1$ -Phase wachsen, bis sie eine kritische Größe erreicht, um selber in die Proliferation einzutreten. Der Größenunterschied zwischen Mutter- und Tochterzellen ist bei schnell wachsenden, fermentierenden Kulturen besonders ausgeprägt (Hutter, 1993; Boulton, 2001; Hengst, 2003; Annemüller, 2008).

In den zum Großteil im Batchverfahren durchgeführten Prozessschritten der Propagation und Gärung kommt es in der Brauerei aufgrund der jeweiligen Adaption an die frisch ausgeschlagene Würze und der im Laufe der Hauptgärung eintretenden Nährstoffverarmung zu sechs charakteristischen Wachstumsphasen. Für die Bierbereitung sind hier vor allem die Adaptionszeit in der Latenz- oder Induktionsphase (lag-Phase), das exponentielle Wachstum

(log-Phase) und der Übergang in die stationäre Phase von Bedeutung. Beim Übergang aus der exponentiellen in die stationäre Phase reagiert die Hefe aufgrund des Mangels an essentiellen Nährstoffen zusätzlich mit dem Aufbau von Glykogen und Trehalose (vgl. Kapitel 2.4.8). Die Übergänge und der zeitlicher Ablauf dieser Wachstumsphasen, die direkt mit dem vermehrungs- und gärungsphysiologischen Charakter der Hefe zusammenfallen, stellen durch eine gezielte Einflussnahme mittels der zu Verfügung stehenden Parameter einen Ansatz zur Optimierung im Sinne der Bierbereitung dar. Eine Verringerung der Adaptionszeit durch einen bereits stimulierten Hefestoffwechsel und der daraus resultierenden schnellen Anpassung an die frisch angestellte Würze, eine zügige und weitreichende Vermehrung und ein schnelles Eintreten der stationäre Phase kann die Prozesszeit im Bereich der Gärkeller senken (*Hutter, 1993; Hutter, 2001; Boulton, 2001; Hohmann, 2003; Annemüller, 2008*).

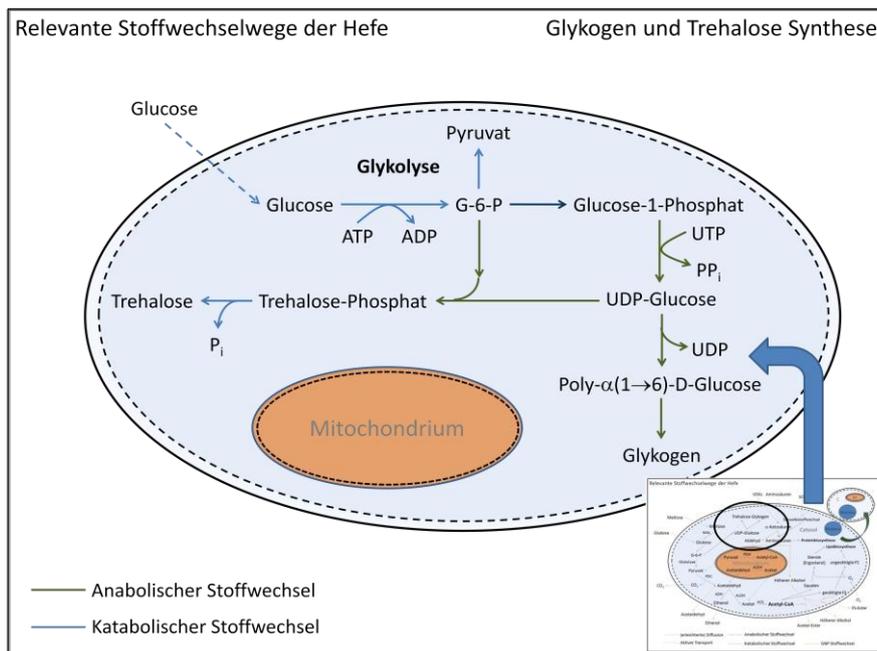
#### **2.4.7 Synthese und Bedeutung von Glykogen, Trehalose und Neutrallipiden**

Eine gute Ausstattung der Hefezellen an Reservestoffen ist in Phasen der Nährstoffverarmung und zur Vermeidung eines Hungertods essentiell für das Fortbestehen einer Population. Aus diesem Grunde reagiert die Hefe auch unter brautechnologischen Bedingungen bei einem Mangel an essentiellen Nährstoffen mit dem Aufbau von Kohlenhydrat- und Lipidspeichern. Die so gespeicherten Energiereserven tragen auch in Hinblick auf die nachfolgende Fermentation entscheidend zu einer schnellen Adaption an die Anstellbedingungen und dem zügigen Eintritt in den Vermehrungszyklus bei. Daraus resultierend sind eine hohe Gäraktivität und ein zügiger Gärverlauf zu erwarten. Deshalb kann die Bestimmung der Reservestoffe und deren Veränderung über den Gärverlauf und die Lagerung mit zur Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe herangezogen werden.

Die vorherrschende Kohlenhydratreserve von *Saccharomyces cerevisiae* ist das Glykogen. Zusätzlich synthetisiert die Hefe das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose, welches zusätzlich als Stressprotektant Funktionen im Hefestoffwechsel zu übernehmen scheint. Die Grundstruktur des Glykogens bilden kurzen Ketten von 10 bis 14 Glucoseeinheiten, die über  $\alpha$ -1,4-Bindungen glykosidisch verbunden sind (*Quain, 1982*). Diese Kurzketten wiederum sind zusätzlich über  $\alpha$ -1,6-Bindungen miteinander verknüpft und ergeben somit eine dem Amylopektin der Gerste ähnliche Formation. Diese komplexen Strukturen ermöglichen einen raschen Abbau und Freisetzung großer Mengen an Glucose an den Enden der Verzweigungen. Die Hefe kann eine beachtliche Menge an Glykogen synthetisieren. So kann je nach physiologischem Zustand der Hefe zwischen 20 und 30% der TrS aus Glykogen bestehen. Bis zu 4% der vergärbaren Zucker würden dementsprechend bei der Gärung in dieses Reservekohlenhydrat umgebaut werden (*Boulton, 2001*).

Die Regulierungsfunktionen der Reservekohlenhydrate sind sowohl bei der Freisetzung als auch in den in der Abbildung 12 dargestellten anabolischen Stoffwechselwege eng miteinander verknüpft. Ausgehend von der Glucose wird über die Zwischenprodukte G-6-P

und Glucose-1-Phosphat mit Hilfe von UDP als Glucosetransporter die Bildung initiiert. Im Falle des Glykogens verlängert dabei das Enzym Glykogen Synthase die wachsende Kette mit  $\alpha$ -1,4-Verbindungen. Die Synthese des vollständigen Glykogens wird durch eine Transferase katalysiert, die die zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-Bindungen formt und die entsprechenden Knotenpunkte erweitert. Die Freisetzung der Glucoseeinheiten ist nicht mit dem am Aufbau beteiligten Enzymsystem gekoppelt. Hierbei können durch die Glykogen Phosphorylase bei Anwesenheit von Phosphat ständig Glucoseeinheiten vom nicht reduzierenden Ende her abgespalten und als Glucose-1-Phosphat freigesetzt werden. In Kombination mit der Amylo- $\alpha$ -1,6-Glucosidase ist die vollständige Verwertung des Glykogens möglich (Quain, 1982; Anderson, 2000).



**Abbildung 12: Synthesewege von Glykogen und Trehalose**

Die Regulation der Synthese und Phosphorylierung des Glykogens ist komplex und kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Glykogensynthese ist einerseits abhängig von den Wachstumsphasen der Hefe und wird andererseits maßgeblich über die Nährstoffsituation durch Limitierung einzelner Substanzen bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Kohlenhydraten initiiert. Dies führt vor allem während der Hauptgärung, in der sich die Hefe in der exponentiellen Wachstumsphase befindet und die Stickstoffassimilation zum Erliegen kommt, zum Aufbau von Glykogen. Gleichzeitig tritt die Hefe in die stationäre Wachstumsphase ein (Hohmann, 2003). Unter brautechnologischen Bedingungen übernimmt das Glykogen im Folgenden zwei bedeutende Funktionen: In erster Linie dient es zur Bereitstellung des Kohlenstoffs für die Energieversorgung und den Aufbau von Sterolen und ungesättigten Fettsäuren während der aeroben Phase des Anstellens. Der Glykogenbedarf geht mit einer nicht vollständigen Membranfunktion der Hefezellen einher, da zum Ende der Gärung die Membran einen Mangel an Sterolen aufweisen kann. Zu Beginn der Gärung treten somit eine schnelle Verwertung des Glykogens und eine gleichzeitige

Synthese von Sterolen ein. Doch sobald die Sauerstoffverfügbarkeit abnimmt, verlangsamt sich auch der Glykogenabbau. Damit ergibt sich ein maximaler Glykogengehalt in den Hefezellen zum Ende der Wachstumsphase bzw. zum Eintritt in die stationäre Phase, der allerdings bis zum Ende der Hauptgärung wieder leicht abnimmt. Des Weiteren hat das Glykogen besonders in der Phase der Lagerung eine große Bedeutung für die Hefe und übernimmt lebenserhaltende Aufgaben. Deshalb ist eine zeitnahe Ernte und Kühlung der Hefe wichtig. Dies kann eine übermäßigen Zehrung der Reservestoffe verhindern und ihre Gäreigenschaften für die kommende Führung konservieren.

Die Trehalose als zweites bei Nährstoffmangel synthetisiertes Reservekohlenhydrat besteht ebenfalls aus Glucoseeinheiten. Dabei sind zwei Glucosemoleküle über eine  $\alpha$  1,1 Bindung glykosidisch miteinander verbunden. Ähnlich der Glykogen-Synthese fungiert auch hier UDP als Glucosetransporter. Der sog. Trehalose Synthase Komplex katalysiert die Übertragung von UDP-Glucose auf G-6-P (vgl. Abbildung 12). Die Untereinheiten dieses Enzymkomplexes bildet die Trehalose-6-Phosphat Synthase, welche in dem Gen Tps1 und dem sehr strukturähnliches Gen Tsp3 codiert ist, und die Trehalose-6-Phosphatase, codiert in Tps2. Auch im Falle der Trehalose ist die Mobilisierung der Glucose an ein zweites unabhängiges, entweder im Cytosol oder in den Vakuolen lokalisiertes Enzym, die Trehalase, geknüpft. Sowohl die Synthese von Trehalose als auch von Glykogen ist an die Regulierung durch cyclisches AMP und damit an die Energiebilanz der Zelle gebunden. Die Trehalose-6-Phosphat Synthase ist dadurch normalerweise inaktiviert bei der Anwesenheit von Glucose, wird jedoch bei fermentativem Wachstum ständig exprimiert. Die enzymatische Regulation wird durch entsprechende Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen gesteuert.

Die grundlegende Aufgabe der Reservestoffe im Metabolismus ist die Bereitstellung von Energie über eine Hungerphase hinweg. Die Tatsache, dass zur Synthese von Trehalose allerdings Energie in Form von ATP aufgewendet werden muss, die bei der Freisetzung nicht zurückgewonnen werden kann, deutet bereits die Sonderstellung dieses Disaccharids in der Hefezelle an. Die Trehalose-Synthese kann aufgrund der engen Verknüpfung der Synthesewege auf der Basis vorhandener Glucose oder auf dem Abbau von Glykogen beruhen. Dabei tritt die Trehalosesynthese erst nach der Glykogensynthese ein und der Glykogenspeicher scheint an der Sicherung der Trehalosesynthese beteiligt zu sein. Dies führt zu dem Schluss, dass die Trehalose nicht als normales Speicherkohlenhydrat allein fungiert, sondern weitere Aufgaben im Hefestoffwechsel übernimmt (*Hutter, 1993*).

Die Trehalose kommt in vielen Organismen vor und gilt als Stressprotektant der Zellen im Cytosol. Bei der Reaktion der Zelle auf plötzlich auftretende Stressfaktoren können verschiedene Phasen als Antwort unterschieden werden. Nach einer direkten Antwort der Zelle zu Beginn erfolgt die Adaption und schließlich zum Ende einer jeden Stressantwort steht die Rückkehr der Zelle zur Proliferation. Organismen können dabei eine große Bandbreite verschiedenster selbst synthetisierter oder aufgenommener Stressprotektanten entweder einzeln oder in Kombination nutzen. Dies können Kaliumionen, Zucker,

Zuckeralkohole und Aminosäuren sowie deren Derivate sei. Im Falle von *Saccharomyces cerevisiae* sind dies wohl hauptsächlich Zuckeralkohole (z.B. Glycerol) sowie Trehalose. Gleichzeitig stellt die Trehalose für das Stadium der Sporulation einen essentiellen Inhaltsstoff für ein erneutes Wachstum dar. In der Hefezelle scheint die Trehalose in der Lage zu sein, Proteinstrukturen, und damit auch Enzymsysteme, während der Stresseinwirkung zu stabilisieren. Sie unterstützt in Kombination mit hitzeschockrelevanten Proteinen die Hitzeresistenz der Hefezellen. Zudem wird Trehalose unter Stressbedingungen ausgeschleust und trägt zu einer Stabilisierung der Membranfunktionen auch in Phasen der Zellteilung bei. Die Trehalosebildung wird vor allem in der stationären Phase gebildet und dann langsam von der Hefe wieder abgebaut. Erntehefen zeigen einen Trehalosegehalt von weniger als 5% der TrS mit Ausnahme von Hefen aus High Gravity Gärungen, die einen um das bis zum Vierfachen gesteigerten Gehalt aufweisen können. Eine Belüftung der Hefe vor dem Anstellen bewirkt ebenfalls die Synthese an Trehalose bei einer gleichzeitigen Abnahme des Glykogengehalts der Hefe. Dies macht deutlich, dass der Aufbau von Trehalose durch den Abbau von Glykogen erfolgen kann. Das Erreichen der Ethanol-Toleranzgrenze, das Auftreten von Druck oder osmotischem Stress bewirken eine ähnliche Antwort der Hefe, wie bei einem Hitzeshock zu beobachten. Da hier die gleichen Mechanismen der Hefe aktiviert werden, legt die Wirkung der Trehalose als Stressprotektant nahe. Somit bedingen alle Formen des Stresses für die Hefe (Ethanol, Belüftung, Osmotischer Druck) eine Synthese von Trehalose. Somit kann die Trehalose und eine erhöhte Synthese als Maß für den Stress auch unter brautechnologischen Bedingungen herangezogen werden. Eine notwendige oder maximale Konzentration an Trehalose muss dabei in Abhängigkeit der Technologie und des Hefestammes noch ermittelt werden (Hohmann, 2003).

Die Lipidspeicher setzen sich vorwiegend aus Neutrallipiden zusammen. Diese sind innerhalb der Hefezelle langsamer zu mobilisieren und stellen aufgrund des benötigten Sauerstoffs beim Abbau nur unter aeroben Bedingungen eine zusätzliche Energiereserve dar. Allerdings sind die Langzeitspeicherstoffe im Gegensatz zum Glykogen energiereicher, nicht wasserlöslich und tragen somit nicht zum osmotischen Druck der Zelle bei. Da diese nicht hydratisiert sind, kann von der Hefe im Vergleich zu den Kohlenhydratreserven neun Mal so viel Energie pro Gewichtseinheit eingelagert werden. Somit sind die Lipidspeicher bei längeren Perioden der Substratarmut von großer Bedeutung für die Biosynthese.

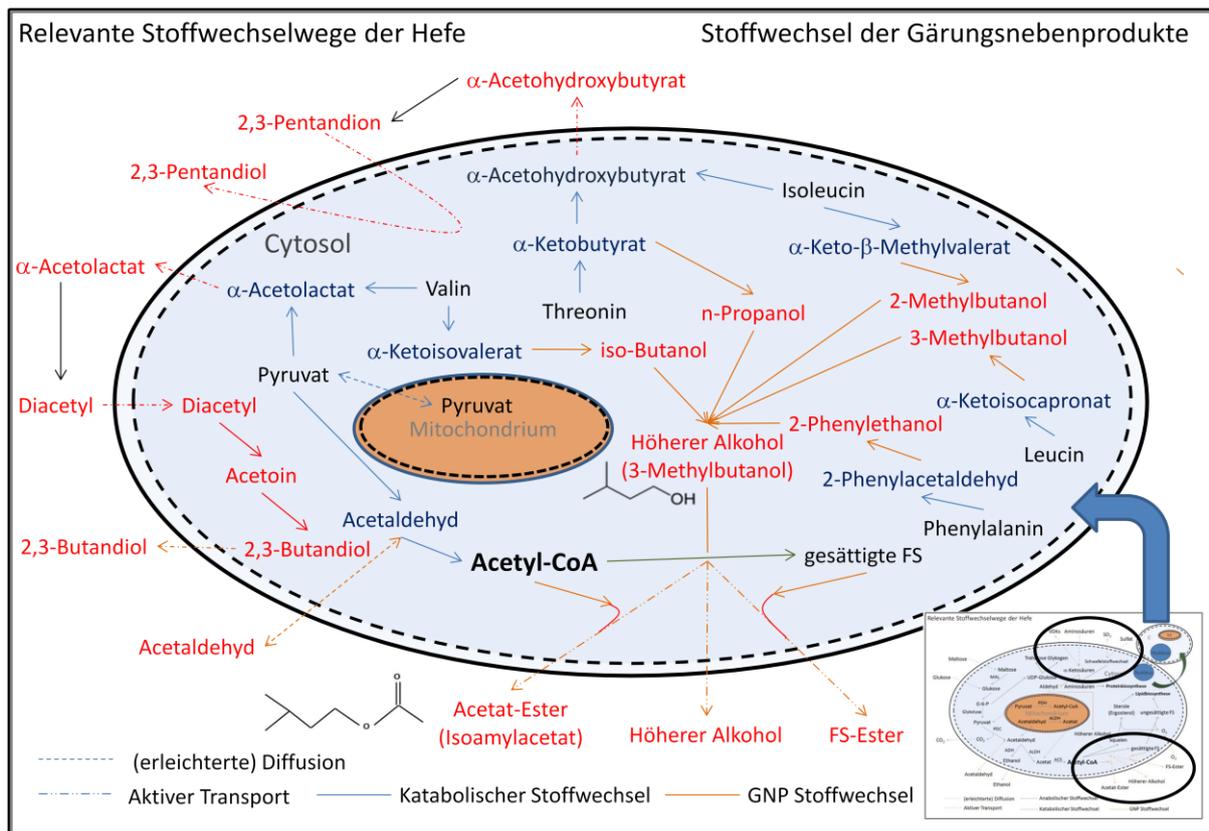
#### **2.4.8 Bildung der Gärungsnebenprodukte**

Das Geruchs- und Geschmacksprofil des Bieres wird maßgeblich im zentralen Prozessschritt der Gärung bestimmt. Der Metabolismus der Hefe sondert während der Gärung eine Reihe von Stoffwechselprodukten ab. Diese können zum Teil miteinander reagieren oder zu einem späteren Zeitpunkt von der Hefe aufgenommen und weiter umgesetzt werden. Dabei ist die Konzentration im fertigen Bier ein ausschlaggebendes Qualitätsmerkmal. Die GNP setzen sich dabei aus verschiedensten chemischen Verbindungen zusammen. Für die Bierqualität relevant sind sowohl die Konzentrationen der höheren Alkohole und Ester, die den mengenmäßig größten Anteil stellen, als auch die Gehalte an organischen Säuren,

Schwefelverbindungen, phenolischen Substanzen und den Carbonylverbindungen. Diese setzen sich wiederum aus Aldehyden, Ketonen und vicinalen Diketonen zusammen (*Narziß, 1995; Kunze, 2007*).

Die GNP können neben ihrer chemischen Zuordnung grundlegend auch in Jungbukettstoffe und Bukettstoffe unterschieden werden. Während die Jungbukettstoffe während der Gärung auf Basis des Hefestoffwechsels gebildet werden und im späteren Verlauf durch die Hefe oder durch technologische Maßnahmen in ihrer Konzentration reduziert werden, entstehen die Bukettstoffe zwar ebenfalls auf Basis des Hefestoffwechsels, können aber im weiteren Prozessablauf nicht mehr maßgeblich beeinflusst werden. Die Abhängigkeit des GNP-Spektrums von der Hefephysiologie und den Wachstumsphasen macht jedoch eine Einflussnahme auf die einzelnen Komponenten möglich. Das heißt zugleich, dass eine Variation der Steuerungsparameter im Gärprozess auch eine Veränderung in der Produktion der GNP bedingt.

Ausgehend vom Kohlenhydratstoffwechsel stellen das Pyruvat - als Endprodukt der Glykolyse - und die organischen Säuren aus dem unter Gärungsbedingungen diskontinuierlichen Citratzyklus, und das zum größten Teil aus dem PDH-Bypass resultierende Acetyl-CoA die wichtigsten Knotenpunkte zum Aufbau der GNP dar. Die aus der Deaminierung im Aminosäurestoffwechsel stammenden  $\alpha$ -Ketosäuren und die kurz- und mittelkettigen Fettsäuren aus dem Lipidstoffwechsel bilden die weiteren Reaktionspartner. Die Abbildung 13 zeigt eine Übersicht der komplexen Stoffwechselzusammenhänge bei der Bildung und Reduktion der verschiedenen GNP (*Pronk, 1996; Anderson, 2000; Boulton, 2001; Back, 2005; Annemüller, 2008*).



**Abbildung 13: Die relevanten Stoffwechselwege bei der Bildung der Gärungsnebenprodukte**

Im Folgenden soll vorwiegend auf die Bildung der Acetat- und Fettsäureester, der höheren Alkohole, sowie die Bildung und den Abbau der vicinalen Diketone Diacetyl und 2,3-Pentandion eingegangen werden, da deren Konzentrationen mit in die Bewertung der Hefephysiologie und Bierqualität in den unternommenen Versuchsreihen eingeflossen sind.

- Bildung der höheren Alkohole

Die höheren Alkohole umfassen den auf die Konzentration bezogenen größten Anteil der GNP und sind zugleich Vorläufer der im Bier vorkommenden Esterverbindungen. Die durch die höheren Alkohole vermittelten Aromaeindrücke reichen von alkoholisch und lösungsmittelartig bis zu einem im Falle des 2-Phenylethanol's rosenartigen Charakter des Bieres. Dabei können die höheren Alkohole in aliphatische und aromatische Alkohole unterteilt werden. Die Bildung dieser Bukettstoffe kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die dazu notwendigen  $\alpha$ -Ketosäuren stammen entweder aus den katabolischen Trans- und Deaminierungsreaktionen des Aminosäurestoffwechsels oder aus dem Zuckerabbau und den nachfolgenden anabolischen Reaktionen. Diese Ketosäuren werden im ersten Schritt decarboxiliert. Der resultierende Aldehyd wird in einer weiteren Reaktion durch eine Alkoholdehydrogenase zu dem entsprechenden Alkohol reduziert. Dieser Reaktionsschritt trägt äquivalent zur Ethanolbildung mit zu der Regeneration von  $\text{NAD}^+$  bei. Diese feine Regulierung der zellulären Redoxbilanz unterstützt somit die Aufrechterhaltung der Glykolyse zur Energiegewinnung (Renger, 1992; Narziß, 1995; Anderson, 2000; Boulton, 2001; Kunze, 2007).

Die verschiedenen höheren Alkohole lassen sich über die Ketosäuren den entsprechenden Aminosäuren zuordnen. Damit sind z.B. 2- und 3-Methylbutanol auf die Synthesewege von Isoleucin und Leucin und iso-Butanol und n-Propanol auf Valin und Threonin zurückzuführen. Die Bildung der höheren Alkohole kann grundsätzlich durch Faktoren, die zu einer Steigerung der Hefevermehrung beitragen, gefördert werden. So können durch erhöhte Gärtemperaturen, forcierte Bewegung, intensive Belüftung und Drauffassen, sowie einer Reduzierung der verfügbaren Aminosäuren die Konzentrationen der höheren Alkohole gesteigert werden.

- Synthese der Esterverbindungen

Die für das fruchtige Aroma des Bieres verantwortlichen flüchtigen Ester bilden die Hauptkomponente für das Geruchs- und Geschmacksprofil und sind damit entscheidend für die Qualität des Bieres. Die aus ca. 100 Einzelsubstanzen bestehende Gruppe der Ester setzt sich aus den Essigsäure- und Fettsäureestern zusammen. Dabei steht die Bildung der einzelnen Ester in engem Zusammenhang mit den Zwischenprodukten des Fettsäuremetabolismus der Hefe. Die Forschungen über die Regulation und die Mechanismen der Esterbildung sind in den vergangenen Jahren zwar vorangeschritten, aber die Ergebnisse noch nicht vollständig. Denn eine Vielzahl von Faktoren nimmt Einfluss auf die Esterbildung. Dabei stellen der Hefestamm und die Gärtemperatur die einflussreichsten Möglichkeiten dar, die Esterkonzentrationen im Bier zu variieren. Zudem sind der Stammwürzegehalt, die Lipid- und Stickstoffausstattung, die Würzebelüftung, das Anstellverfahren sowie die Druckverhältnisse, auch in Abhängigkeit der Tankgeometrie, von großer Bedeutung für die Konzentration und Zusammensetzung der Esterfraktion (*Boulton, 2001; Verstrepen, 2003; Kunze, 2007*).

Auch wenn die Konzentrationen der Ester als einzelne Substanzen mit Ausnahme des Isoamylacetats meist nicht oberhalb ihres jeweiligen Geschmacksschwellenwerts vorliegen, beeinflussen sie das Bieraroma über synergistische Effekte maßgeblich und geringe Konzentrationsunterschiede können deutliche Auswirkungen auf die Qualität des resultierenden Bieres ausüben. Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die bedeutendsten Ester und deren sensorischen Einfluss auf das Bieraroma.

**Tabelle 5: Bedeutende Ester und deren Aromaeindrücke**

| <b>Esterverbindung</b>      | <b>Aromaeindruck</b> |
|-----------------------------|----------------------|
| <b>Ethylacetat</b>          | Lösungsmittel        |
| <b>Isoamylacetat</b>        | Banane/fruchtig      |
| <b>Phenylethylacetat</b>    | Rose/blumig          |
| <b>Isobutylacetat</b>       | Fruchtig             |
| <b>Octansäureethylester</b> | Saurer Apfel         |
| <b>Hexansäureethylester</b> | Anis                 |

Aufgrund ihrer Fettlöslichkeit diffundieren die Essigsäureester nach ihrer intrazellulären Synthese schnell in das Jungbier. Die Transportgeschwindigkeit durch die Zellmembran der

Fettsäureester nimmt hingegen mit zunehmender Kettenlänge ab. Längerkettige Fettsäureester mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen verbleiben in der Hefezelle und werden nicht an das Jungbier abgegeben. Zusätzlich bedingen tiefere Temperaturen ein Zurückbleiben der Fettsäureester in der Hefe (*Peddie, 1990; Boulton, 2001; Verstrepn, 2003*).

Um gezielten Einfluss auf die Bierqualität zu nehmen und die Hefe im Sinne der Esterproduktion besser steuern zu können, ist es notwendig die Hintergründe der Estersynthese im Detail zu kennen. Dabei sollten nicht alleine die absoluten Konzentrationen berücksichtigt werden, sondern ebenfalls die Zusammensetzung der Einzelsubstanzen. So wird bei der Verwendung von höheren Stammwürzen von ca. 20 GG-% oft eine Überproduktion der Acetatester beobachtet. Gleichzeitig kann es bei dem Einsatz von Würzen mit erhöhtem Maltoseanteil zu einer Reduktion von Ethylacetat um 10% und Isoamylacetat um 40% kommen. Dies führt oftmals zu einem unausgewogenen Geruchs- und Geschmacksprofil und das resultierende Bier erscheint sehr fruchtig und lösungsmittelartig (*Yoshioka, 1984*).

Die im Bier vorkommenden Konzentrationen der Ester sind über eine direkte Veresterung eines höheren Alkohols mit einer freien Fettsäure nicht zu begründen, da deren Reaktionskinetik nur einen Bruchteil erklären könnte. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die für die Esterbildung notwendigen Metaboliten Acetyl-CoA bzw. Acyl-CoA zuerst durch die entsprechenden Acetyl-CoA und Acyl-CoA Synthasen gebildet werden und die nachfolgende Veresterung auf einer enzymkatalysierten Kondensation mit Ethanol oder einem höheren Alkohol basiert. Dabei scheinen verschiedene Enzymsysteme an diesen Reaktionen beteiligt zu sein. Die weitgehend verantwortlichen Enzyme für die Bildung von Isoamylacetat und Ethylacetat sind wohl die Alkohol Acetyl Transferasen I und II, die in den Genen ATF1 und ATF2 codiert sind. Neben weiteren Enzymen wie der Ethanol Hexanoyl Transferase, spielt für die endgültige Konzentration der Ester vermutlich auch die Aktivität der Esterasen und damit das Verhältnis von auf- und abbauenden Enzymen eine Rolle. Dass es sich im ersten Reaktionsschritt zur Bildung von Acetyl-CoA bzw. Acyl-CoA um einen ATP verbrauchenden Reaktionsmechanismus handelt, scheint die Veresterung eine Rolle in der zellulären Bilanz zwischen Acetyl-CoA und der Vorstufe CoA-SH zu übernehmen (*Verstrepn, 2003*).

Somit kommen grundlegend zwei Faktoren für die Regulierung der Estersynthese in Betracht. Es können sowohl die vorhandenen Konzentrationen der Reaktionspartner, als auch die Aktivitäten der involvierten Enzyme ausschlaggebend für die endgültige Konzentration der Ester sein. Das unter brautechnologischen Bedingungen für die Lipidbiosynthese maßgeblich über den PDH-Bypass generierte Acetyl-CoA könnte einen der limitierenden Faktoren darstellen. Somit müssten alle Parameter, die sich auf eine erhöhte Produktion des Acetyl-CoA auswirken eine weitreichendere Esterbildung nach sich ziehen. So fördert die Verfügbarkeit von Glucose, eine bessere Versorgung mit Stickstoffquellen und eine Absenkung des Druckes die Esterproduktion. Die Zusammenhänge scheinen jedoch deutlich komplexer zu sein, da diese Maßnahmen in der Regel ebenfalls ein höheres

Hefewachstum und einen damit verbundenen wachsenden Bedarf an Acetyl-CoA und Fettsäuren bewirken. Dies setzt die Verfügbarkeit gleichfalls wieder herab. Denn eine weitreichende Belüftung der Hefe führt zu einer Reduzierung der Esterbildung. Dies lässt den Schluss zu, dass die höheren Alkohole als Vorläufer eine bestimmende Funktion einnehmen, auch wenn diese generell in höheren Konzentrationen als die Ester vorliegen. So konnte in Versuchen durch die Zugabe von 3-Methylbutanol oder der Verwendung von Hefemutanten, die eine stärkere Bildung der höheren Alkohole zeigten, eine gesteigerte Estersynthese nachgewiesen werden. Allerdings bewirken erhöhte Belüftungsraten und die Zugabe von Fettsäuren, die ebenfalls zu einer Steigerung der höheren Alkohole führen, ein Absenken der Esterkonzentrationen, sodass zusätzliche Faktoren von Bedeutung sein müssen (*Yoshioka, 1984; Peddie, 1990; Anderson, 2000; Boulton, 2001; Annemüller, 2008*).

Schließlich bleibt der Einfluss der Enzymsysteme als mögliche zentrale Regulation der Esterbildung. Die Regulation soll dabei im Zusammenhang mit den ROX-Stoffwechselwegen und den Proteinkinasen stehen. Untersuchungen zeigten, dass die Aktivitäten der Alkohol Acetyl Transferasen mit den Estergehalten korrelieren und diese durch Sauerstoff und ungesättigte Fettsäuren reprimiert werden. Bei Hefen mit einer Überexpression der Alkohol Acetyl Transferasen konnten bis zu 5fach höhere Esterkonzentrationen erreicht werden. Dies weist auf die entscheidende Bedeutung der Enzymaktivitäten hin (*Verstrepen, 2003*).

- Bildung und Reduktion der vicinalen Diketone

Die Konzentrationen der vicinalen Diketone Diacetyl und 2,3-Pentandion sind als Haupttreifungsindikatoren für die Bierqualität von höchster Bedeutung. Der bei Überschreiten des Schwellenwerts von 0,1 mg/l unreine, süßliche und in höheren Konzentrationen butterartige Geruchs- und Geschmackseindruck des Diacetyls wird in den meisten Fällen als deutliches Fehl aroma betrachtet und führt zu Bieren minderer Qualität.

Der Auf- und Abbau der vicinalen Diketone lässt sich grundlegend in drei Phasen unterteilen. Die Acetohydroxysäuren  $\alpha$ -Acetolactat und  $\alpha$ -Acetohydroxybutyrat als Vorstufen der vicinalen Diketone entstehen im Hefestoffwechsel bei der Aminosäuresynthese. Dabei können diese über das Pyruvat oder die entsprechend aufgenommenen Aminosäuren Valin und Isoleucin durch Deaminierung gebildet werden. Diese werden von der Hefe an das Jungbier abgegeben. Die Umwandlung der Vorstufen findet durch eine temperaturabhängige nicht-enzymatische oxidative Decarboxylierung statt. Dabei entstehen die Jungbukettstoffe Diacetyl und 2,3-Pentandion, deren Bildung bei höheren Temperaturen und niedrigen pH-Werten (4,2-4,4) schneller verläuft (*Narziß, 1995; Anderson, 2000; Boulton, 2001; Kunze, 2007; Annemüller, 2008*).

Die anschließende Umwandlung durch die Hefe bestimmt die Reifungsgeschwindigkeit der Biere. Das gebildete Diacetyl und Pentandion wird wieder in den Hefemetabolismus eingeschleust und zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert. Dabei erfolgt die Umwandlung des Diacetyls über das Zwischenprodukt Acetoin. Die entstehenden mehrwertigen Alkohole 2,3-Butandiol und 2,3-Pentandiol besitzen einen deutlich höheren

Geschmacksschwellenwert im Bier und dominieren das Aroma nicht mehr. Der Aufbau der vicinalen Diketone ist dabei stark von dem verwendeten Hefestamm und der Hefegabe abhängig. Eine höhere Hefegabe führt zwar zu einer verstärkten Bildung der  $\alpha$ -Ketosäuren aus dem Stickstoffstoffwechsel, aber gleichzeitig kommt es zu einem rascheren und intensiveren Abbau. Der Abbau des Diacetyls kann einerseits gezielt über eine gesteigerte Reifungstemperatur und eine intensive Bewegung und damit einem guten Nährstoffkontakt gefördert werden und andererseits bewirkt eine hohe Konzentration der Hefe bei der Reifung ebenfalls eine zügigere Umsetzung.

## 2.5 Bedeutung des Sauerstoffs für die Hefe

### 2.5.1 Einfluss von Sauerstoff auf die Genexpression der Hefe

Der Sauerstoff übernimmt, neben seinen Aufgaben als direkter Reaktionspartner im Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel, vor allem Regulierungsfunktionen auf der Genomebene von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Gene, deren Expression von der Verfügbarkeit von Sauerstoff abhängt, lassen sich grundlegend in zwei Kategorien einteilen. Einerseits handelt es sich dabei um die sog. „aeroben“ Gene, die bei der Anwesenheit von Sauerstoff optimal transkribiert werden. Andererseits existieren im Genom „hypoxische“ Gene, welche unter sauerstofflimitierten Bedingungen exprimiert werden (*Kwast, 1998*).

Eine Vielzahl der respiratorischen Cytochrome und weitere Proteine, die entweder im aeroben Metabolismus strikt benötigt werden oder vor oxidativen Schädigungen der Zelle durch RSS schützen, sind auf den aeroben Genen verschlüsselt (vgl. Kapitel 2.5.2). Zusätzlich sind viele dieser Proteinstrukturen durch homologe hypoxische Gene codiert. Das bedeutet, dass die Hefe unter sauerstoffarmen bis -freien Bedingungen Gene transkribiert, deren Proteinstrukturen nur unter aeroben Bedingungen eine direkte Funktion im Stoffwechsel übernehmen. Zwar fehlen definierte experimentelle Beweise, dennoch wird vermutet, dass dies den Fluss von Metaboliten unter sauerstofflimitierten Bedingungen aufrechterhält. Im Falle der Sterol- und Fettsäuresynthese ist dies durch die Bildung von Squalen und gesättigten Fettsäuren für die Hefe von großer Bedeutung. So können kurzzeitige aerobe Bedingungen für eine Bildung der essentiellen Zellbestandteile für das Hefewachstum genutzt werden (vgl. Kapitel 2.4.5). Eine Transkription von hypoxischen Iso-Enzymen trägt damit zu einer schnelleren Anpassung bei wechselnden Habitatbedingungen und einer effektiveren Nutzung geringer Sauerstoffmengen bei (*Kwast, 1998*).

Gene, deren Expression von Sauerstoff abhängt, werden in vier Gruppen eingeteilt. Die Gruppe I umfasst Gene bzw. Genpaare, die Proteine verschlüsseln, welche für den respiratorischen Stoffwechsel benötigt werden. Darunter fallen wichtige Enzyme der Atmungskette, wie die Cytochrome. Die Gruppe II enthält u.a. Enzyme, die an der Häm-, Sterol- und Fettsäuresynthese beteiligt sind. Für diese Reaktionen wird Sauerstoff direkt benötigt. Die Proteinstrukturen dieser Gene werden sowohl unter aeroben Bedingungen gefunden aber erfahren eine gesteigerte Expression unter sauerstoffarmen und anaeroben Bedingungen. Dies lässt vermuten, dass in manchen Genpaaren aerobe und hypoxische Gene gleichermaßen Proteine und deren Iso-Formen verschlüsseln. In der Gruppe III sind Enzyme codiert, die an der Antwort der Hefezellen auf oxidativen Stress beteiligt sind (Katalase, Mn-Superoxid-Dismutase, usw.) und positiv durch Sauerstoff reguliert werden. Zu der Gruppe IV gehört u.a. das aerobe Gen ROX1, welches den Transkriptionsrepressor Rox1p verschlüsselt. Dieser hemmt alle hypoxischen Gene.

Die sauerstoffabhängige Regulation der Transkription der im Zellkern lokalisierten Gene wird durch mindestens drei Faktoren realisiert. Das Hap1p (**h**eme **a**ctivated **p**rotein) aktiviert die

Transkription vieler aerober und einiger hypoxischer Gene. Hap2/3/4/5p aktivieren hingegen nur die Transkription der aeroben Gene. Es müssen aber noch weitere Aktivatoren für bestimmte aerobe Gene existieren, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten. Das Rox1p (*regulation by oxygen*) dagegen hemmt die Transkription der hypoxischen Gene unter aeroben Bedingungen. Das Häm dient in diesen Fällen als Vermittler der Genexpression und trägt indirekt über das Hap1p zur Transkription des ROX1 Gens bei. Das heißt, dass unter sauerstoffarmen oder -freien Bedingungen die Transkription der hypoxischen Gene dereprimiert wird. Allerdings sind die kompletten Mechanismen der Regulation durch Häm noch nicht vollständig geklärt. Sowohl die Konzentration als auch der Redoxzustand von Häm scheinen daran beteiligt zu sein. Fest steht jedoch, dass die Expressionsintensität der aeroben und hypoxischen Gene nicht direkt von der An- bzw. Abwesenheit des Sauerstoffs abhängt, sondern die Konzentration des Sauerstoffs die Expression über die Regulationsmechanismen bestimmt. Die Expression der hypoxischen Gene ist im Vergleich zur Expression der aeroben Gene strikter an die Sauerstoffkonzentration gekoppelt. Die Induktion der aeroben Gene hingegen verläuft zügiger als die der hypoxischen Gene. Hypoxische Gene variieren in Bezug auf zeitliche Ausprägung der Expression und Expressionsmuster. Für fast alle sauerstoffabhängigen Gene erfolgt eine scharfe Änderung der Transkriptionsintensität bei geschätzten  $1 \mu\text{mol/l O}_2$ . Unter dieser Konzentration steigt die Expressionsrate der hypoxischen Gene drastisch an und die der aeroben Gene sinkt ab (*Zitomer, 1992; Bunn, 1996; Kwast, 1998*).

Neben den Regulierungsfunktionen auf Genomebene ist der Sauerstoff auch direkt an der enzymkatalysierten Bildung der Porphyrine beteiligt, welche einen Grundbaustein des Häms darstellen. Dabei ergeben sich Zusammenhänge zwischen dem  $k_m$ -Wert des Synthesoenzyms Koproporphyrinogen-Oxidase und der Transkriptionsintensität der aeroben und hypoxischen Gene in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration. Dieser Reaktionsmechanismus scheint ebenfalls in die Regulierungsfunktion der Expressionsrate involviert zu sein (*Kwast, 1998*).

## 2.5.2 Oxidativer Stress der Hefe

Die einerseits essentiellen Eigenschaften des Sauerstoffes vor allem für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen wurden bereits in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Andererseits hat die Toxizität des Sauerstoffs bei den wechselnden aeroben und anaeroben Bedingungen bei der Bierbereitung ebenfalls Auswirkungen auf den physiologischen Zustand der Hefe. Falls die Systeme der Oxidation, der Antioxidation und der zelleigenen Schadensbehebung nicht im Gleichgewicht stehen, kommt es zu oxidativem Stress. Dieser wird von den radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen und ist eng verknüpft mit dem Redoxzustand des Schwefels und dem Metabolismus von Eisen und Kupfer. Bei diesen Spezies kann es sich um Singulett-Sauerstoff,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$  handeln (*Mönch, 1995; Hohmann, 2003*). Die meisten ROS bilden sich während der nicht vollständigen Reduktion des Sauerstoffes bei der Atmung, aber können ebenso innerhalb der Lipidbiosynthese entstehen. Die reaktionsfreudigste Form der ROS, das Hydroxyradikal, kann sobald es entsteht Zellschädigungen verursachen. Die Hydroxidradikale können Wasserstoff von

anderen Molekülen abspalten und diese treten dann wiederum als Radikale auf. Dabei können sie mit den aromatischen Systemen der Purine und Pyrimidine reagieren, mit Aminosäuren und auch mit Metallionen und diese in radikale Strukturen überführen. Zusammen mit der Möglichkeit, das ungepaarte Elektron abzugeben, können hieraus Kettenreaktionen der Radikalbildung entstehen. Die verursachten molekularen Veränderungen können sich somit auf Lipide, Proteine oder DNA-Bausteine beziehen. Zusätzlich kann es unter Umständen zu einer Abspaltung von OH-Gruppen der Enzyme der Glykolyse kommen und damit der glykolytische Fluss herabgesetzt werden.

Mehr als 900 Gene werden durch oxidativen Stress exprimiert und ca. 600 Gene gleichfalls reprimiert. Damit sind ca. 14% des Genoms an Reaktionen auf umweltbedingten Stress geknüpft. Die Reaktion der Hefe findet innerhalb von einer Minute statt, während nach dem Stress bis zu 90 min vergehen, bis der Ausgangszustand wieder hergestellt wird. Zwei Drittel der reprimierten Gene spielen in der Zellvermehrung eine Rolle, dem mRNA Metabolismus oder der Proteinsynthese. Das übrige Drittel ist an der Energiegewinnung und Speicherung, der ROS Detoxification, der Zellwandmodifikation und Proteinstrukturierung bzw. an der Reparatur beschädigter DNA beteiligt (Hohmann, 2003).

Die Stoffwechselwege, die an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sind, werden vermutlich durch komplexe Redoxsensormechanismen geregelt. Dabei scheint die Zelle Veränderungen in den intrazellulären Konzentrationen der Oxidantien zu detektieren. Die Folgen des oxidativen Stresses können in einer Wachstumsinhibition bis hin zum Zelltod liegen. Er wird ebenfalls mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose, in Verbindung gebracht. Zellen in der Stationären Phase zeigen eine höhere Toleranz gegenüber oxidativem Stress als Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Respiration der Zellen kann zu einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Stress beitragen. Zellen, deren respirative Fähigkeiten eingeschränkt sind, zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress (Higgins, 2003). Eine effektive Möglichkeit, die stressbedingte Wachstumsstörung der Hefe zu messen, ist die flusszytometrische Analyse der DNA-Verteilung mit Hinblick auf die Synchronität der Hefepopulation.

### 2.5.3 Sauerstoffbedarf der Hefe in der Brauerei

Der maximale Sauerstoffbedarf von *Saccharomyces cerevisiae* ist sehr genau bekannt und wird mit 740 mg O<sub>2</sub>/g HTS beziffert. Dieser von der Backhefeindustrie auf Melasse oder synthetischen Zuckerlösungen ermittelte Sauerstoffverbrauch setzt jedoch eine Zuckerkonzentration von < 0,1 g/l ohne die Limitierung weiterer Nährstoffe voraus und führt zu einem Biomassenertragsfaktor von 0,54 g HTS/100 g Glucose. Diese Werte sind allerdings nicht auf die Hefe unter brautechnologischen Bedingungen zu übertragen. Mit einer Zuckerkonzentration von ca. 78 g/l in einer normalen Vollbierwürze schränkt der vorherrschende Crabtree-Effekt die Sauerstoffverwertung im respirativen Stoffwechsel stark ein, und der resultierende Gärungsstoffwechsel wird nur durch die sauerstoffabhängigen Stoffwechselwege unterstützt. Zudem stellen - vor allem unter Propagationsbedingungen -

die vorhandenen Stickstoffquellen einen limitierenden Faktor bei der Hefevermehrung dar. Dies führt zu einem veränderten Bedarf bzw. Verbrauch der Hefe an Sauerstoff. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls auf Melasse der spezifische Sauerstoffbedarf mit steigender Zuckerkonzentration von 100 bis 140 mg O<sub>2</sub>/g HTS-Zuwachs bestimmt. Im viel komplexeren Nährmedium Würze wird im Anfangsstadium der Hefevermehrung sogar noch weniger Sauerstoff benötigt, da viele Nährstoffe, wie u.a. Fettsäuren und Aminosäuren, anfangs aus der Würze genommen und nicht von der Hefe synthetisiert werden. Zur Synthese des benötigten Fettsäureniveaus werden in der Literatur bei der Betriebsgärung Werte zwischen 30-35 mg O<sub>2</sub>/g HTS-Zuwachs angegeben. Bei einem durchschnittlichen Zuwachs der HTS von 1 g/l Würze während der Betriebsgärung und einer normalen Sauerstoffsättigung von 8 mg/l entspricht das nur ca. 7% des Wertes in Melasse. Die in der Brauerei mit großen Schwankungen ermittelten Sauerstoffaufnahme rate zwischen 2-33 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h, je nach Gärtemperatur und Extraktgehalt sind auf die teilweise fehlenden Zusammenhänge mit der Hefevitalität zurückzuführen. Als Durchschnittswert bei einer Fermentationstemperatur von 15 bis 16 °C kann bis heute eine optimale spezifische Sauerstoffaufnahme rate von 13 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h angesehen werden. Die Sauerstoffaufnahme scheint dabei in einem breiten Konzentrationsbereich unabhängig von der Konzentration des gelösten Sauerstoffs. Jedoch existiert eine Grenze des Mindestgelöstsauerstoffs von > 0,3 mg/l. Unterhalb dieses Wertes ist der Hefestoffwechsel wohl nicht in der Lage, den Sauerstoff effektiv für eine weitere Biosynthese zu nutzen und der Biomassenertragsfaktor sinkt zusätzlich ab (*Annemüller, 2008*).

Diese unzureichenden Erkenntnisse über den tatsächlichen Bedarf der Hefe an Sauerstoff haben vor allem im Propagationsprozess zu willkürlich gewählten oder aus Erfahrung gefundenen Intervallbelüftungen geführt. Auch Belüftungsvorgaben aus Modelrechnungen auf der Basis der o.g. Sauerstoffaufnahme rates, des Zuwachsfaktors und unter Berücksichtigung der Adaptions- und Endphase der Propagation können aufgrund der fehlenden Zusammenhänge mit dem Hefestoffwechsel nur als Richtwerte angesehen werden. Dennoch zeigen diese Berechnungen, dass mit einer vorgeschlagenen Belüftungszeit von 3\*3 min in der 10stündigen Startphase und 11\*4 min in der Endphase von ebenfalls 10 h der Sauerstoffeintrag bei der Propagation deutlich reduziert werden könnte (*Annemüller, 2008*).

Auch im Bereich der Anstelltechnologie ist die Belüftung nur unzureichend an den Bedarf der Hefe orientiert worden. Die Optimierung der Drauflassverfahren ist unabhängig von dem eigentlichen Sauerstoffbedarf der Hefe erfolgt, vielmehr wurde allein auf die Qualitäts- und Stabilitätseigenschaften des Bieres Rücksicht genommen. Zwar ist dieser Ansatz für die Bierproduktion sicherlich angemessen, jedoch ließen sich durch eine Verknüpfung der Hefephysiologie mit den für die Bierqualität entscheidenden Parametern die vorhandenen Ansätze weiter vervollständigen. Die möglichen Belüftungsvariationen in der Anstelltechnologie und deren Auswirkungen auf die Hefephysiologie und die resultierenden Qualitätsmerkmale des Bieres sind in Kapitel 2.7 zusammengefasst (*Annemüller, 2008*).

Um die Optimierung der Prozessschritte Propagation und Gärung jedoch weiter voran zu bringen, muss die Sauerstoffversorgung, unter Berücksichtigung der Regulierungsfunktionen auf Genomebene und dem durch die RSS hervorgerufenen oxidativen Stress, auf die sauerstoffabhängigen Stoffwechselwege der Lipidbiosynthese abgestimmt werden. Die Bereitstellung der ungesättigten Fettsäuren und Sterole aus ihren anaeroben Vorstufen ist ausschlaggebend für einen guten vermehrungs- und gärungsphysiologischen Zustand der Hefe (vgl. Kapitel 2.4.5 und 2.6). Nur mit einem besseren Verständnis der Stoffwechselfunktionen unter den Bedingungen der Propagation und Gärung können Anhaltspunkte für einen optimalen Sauerstoffeintrag zu Gunsten der Hefephysiologie und der Bierqualität gefunden werden. Dieser Ansatz war Grundlage der unternommenen Versuchsreihen mit dem Ziel, den physiologischen Zustand der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen weitreichender zu erfassen, und daraus Ansätze zu Optimierung der Propagation und Gärung abzuleiten (*Hohmann, 2003; Boulton, 2001; Annemüller, 2008*).

## 2.6 Anforderungen und Erfassung der Hefephysiologie

Neben den allgemeinen mikrobiologischen Ansprüchen an eine Reinkultur spielt im zentralen Prozessschritt der Gärung vor allem die Hefephysiologie eine bedeutende Rolle. Dabei unterliegen die Anforderungen an die Hefe dem jeweiligen Teilprozess der Hefeherführung, der Gärung und der Reifung und verdienen eine unterschiedliche Betrachtung des Hefestoffwechsels und folglich eine veränderte Ausrichtung der Prozessparameter. Dabei wirken sich die Faktoren Temperatur, Belüftung, Druck, physikalische Behandlung der Hefe, Lagerung, Anzahl der Führungen und die Anstellkonzentration neben der vorgegebenen Nährstoffzusammensetzung in Abhängigkeit von der genetischen Disposition und dem Alter der Hefepopulation in verschiedenster Weise auf die Hefephysiologie aus.

Im Bereich der Hefeherführung ist die Gewinnung einer anstelltauglichen Hefezellzahl mit einem hohen Biomassenertragsfaktor für die nachfolgende Gärung entscheidend. Zudem muss die Hefephysiologie zum Ende der Propagation auf eine schnelle Adaption an die Gärungsbedingungen angepasst sein und die Ausstattung der Hefe an Metaboliten als Biosynthesestufen auch die Möglichkeit zum mehrmaligen Einsatz sicherstellen. Dies setzt in erster Linie einen ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Zustand der Hefe voraus. Gleichzeitig muss ebenfalls die Qualität des Propagationsmediums berücksichtigt werden, da dieses mit mind. 10 bis 15% in den Produktionsprozess einfließt und die Qualitätsmerkmale des Bieres mitbestimmen kann. Deshalb sollte die Bildung der GNP und die oxidative Belastung des Propagator-Inhalts beachtet und die Steuerungsparameter zusätzlich darauf abgestimmt werden. Im Bereich der nachfolgenden Gärung spielt die Hefevermehrung aus Sicht der Bierbereitung eine untergeordnete Rolle. Der zügige und weitgehende Extraktabbau und die Ausprägung des gewünschten Aromaprofils stehen in diesem Prozessschritt im Mittelpunkt. Dies kann durch eine Hefe mit einem ausgeprägten gärungsphysiologischen Charakter über die Phase der Hauptgärung garantiert werden. Beim Einsatz von Propagations- und Erntehefen, die evtl. aus unterschiedlichen Führungen stammen, müssen zudem konstante und reproduzierbare Gärergebnisse erzielt werden können. Der Reifungsprozess hingegen orientiert sich an den Faktoren der Aromareifung, d.h. in erster Linie der schnelle Abbau von Diacetyl und Acetaldehyd unter den Geschmacksschwellenwert, sowie der weitgehenden Vergärung des Restextrakts und der damit verbundenen CO<sub>2</sub>-Bildung und Bindung. Um diese Stoffumsätze zu gewährleisten, bedarf es einer Hefe, die auch zu diesem Zeitpunkt noch einen guten physiologischen Zustand aufweist und ausreichend ZIS sicherstellt. Dennoch sind mit Hinblick auf die Lagerung und Filtration auch die weitreichende Klärung und eine möglichst vollständige Hefefernte von zentraler Bedeutung. Dazu muss die eingesetzte Hefe ein gutes Absetzverhalten aufweisen, das vorwiegend auf den verwendeten Hefestamm zurückzuführen ist, aber durch die Physiologie mitbestimmt werden kann. Zusätzlich muss in allen Abschnitten die Gefahr der nachträglichen Qualitätseinbußen durch die Abgabe negativer zellulärer Inhaltsstoffe aufgrund mangelhafter Vitalität minimiert werden.

Im Gegensatz zur Viabilität der Hefe ist die Bestimmung der Hefephysiologie nicht mit einer übergreifenden Methode möglich. Die Grunderscheinungen der Lebensvorgänge in funktionellen und dynamischen Zusammenhängen und die daraus abgeleitete Komplexität zu erfassen, stellt eine der wissenschaftlichen Herausforderungen im Bereich der Hefeforschung dar. Um einen tieferen Einblick in die Hefezelle zu gewinnen, existieren verschiedenste Möglichkeiten zur Analyse von Indikatoren, die Hinweise auf Veränderungen im Stoffwechsel der Hefe geben und die Auswirkungen der Prozesssteuerung deutlich machen. Dabei kann grundlegend zwischen den Analysen der metabolischen Aktivität und des Gärverhaltens sowie der Messung von zellulären Kompartimenten und Inhaltsstoffen unterschieden werden. Hinzu kommen molekularbiologische Methoden zur Bestimmung der Genexpression im Hefeorganismus. Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Hefevitalität (*Lentini, 1993; Müller, 1997; Heggart, 2000*).

Tabelle 6: Methoden zur Erfassung der Hefevitalität

| Grundlage der Messmethode                                                   | Analyseverfahren                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fermentationskapazität/Gärverhalten</b><br><b>Metabolische Aktivität</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Labor Gärversuche/Kurz-Gärttest</li> <li>• Glykolytische Flussrate</li> <li>• Aktivitätsmessung von Schlüsselenzymen</li> <li>• CO<sub>2</sub>-Bildung/CO<sub>2</sub> Druckaufbautest</li> <li>• Mikrokalometrie</li> <li>• Reduktionsvermögen (z.B. VDK)</li> <li>• Spezifische Sauerstoffaufnahme (Q<sub>O<sub>2</sub></sub>)</li> <li>• Acidification Power Test (APT)</li> <li>• Intrazellulärer pH-Wert (ICP)</li> <li>• Protease Aktivitäts-Test</li> </ul> |
| <b>Messung zellulärer Kompartimente und Inhaltsstoffe</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosintriphosphat (ATP)</li> <li>• Adenylate Energy Charge (AEC)</li> <li>• Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)</li> <li>• Glykogen/Trehalose</li> <li>• Neutallipide</li> <li>• Sterole (3β-Hydroxysterolgehalt)</li> <li>• ungesättigte Fettsäuren</li> <li>• DNA-Gehalt (Zellzyklusanalyse)</li> <li>• Mitochondrien/Vakuolen</li> </ul>                                                                                                                    |
| <b>Molekularmikrobiologische Methoden</b>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Genexpression/Mikroarray-Technologie</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

Zwar liefert z.B. der Intrazelluläre pH-Wert der Hefepopulation eine Maßzahl für schlechte, mittlere oder gute Vitalität, jedoch lassen sich daraus nur grobe Möglichkeiten zur Erfassung der Hefephysiologie und Verbesserungen im Bereich der Hefetechnologie und des Hefemanagements ableiten. Die daraus gewonnen Erkenntnisse haben dennoch in der Vergangenheit zu grundsätzlichen Verbesserungen der Hefewirtschaft in der Brauerei maßgeblich beigetragen. Eine detaillierte Aussage über den physiologischen Zustand, die genauen Einflüsse der Prozessparameter und Unterschiede im vermehrungs- und gärungsphysiologischen Zustand der Hefe lässt sich aus den Ergebnissen der ICP-Messung

nur bedingt abschätzen. Deswegen wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit neben den routinemäßigen Kontrollen von Extraktverlauf, Zellzahlentwicklung und pH-Verlauf mit der Aktivitätsmessung von Schlüsselenzymen im Kohlenhydratstoffwechsel und der fluoreszenzoptischen Analyse von Zellinhaltsstoffen eine erweiterte Bandbreite von Analysen zur Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe herangezogen, um den nötigen Einblick in die Hefephysiologie zu gewinnen und die Optimierungsmöglichkeiten weiter auszuschöpfen (vgl. Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

## 2.7 Hefemanagement und Hefetechnologie in der Brauerei

Das Hefemanagement schließt alle Manipulationen der Hefe in der Brauerei ein und kann in verschiedene Bereiche mit unterschiedlich zielgerichteten Aufgaben unterteilt werden. Eine der Hauptaufgaben des Hefemanagements ist den Herführungsprozess bzw. die Erntehefebehandlung mit Hilfe der zu Verfügung stehenden Steuerungsparameter auf die Sudhausarbeit abzustimmen. Zum Zeitpunkt der Würzekühlung muss eine hochvitale Hefe in ausreichender Menge zum Einleiten der Gärung bereitgestellt werden. Eine Einteilung des Hefemanagement kann in die Abschnitte Hefeherführung, Bierproduktion, Hefelagerung und schließlich Entsorgung erfolgen.

Die Hefeherführung basiert einerseits auf der im Betriebslabor stattfindenden Auswahl und Isolierung der Reinkultur bis zur kontaminationsfreien Kultivierung einer für die betriebliche Weiterführung ausreichenden Menge von ca. 5 bis 10 l Jungbier. Andererseits beinhaltet die Herführung die Vermehrung der Hefe in der Brauerei bis zu der erforderlichen Anstellmenge einer Gärcharge. Das Hefemanagement im Bereich der eigentlichen Bierproduktion beinhaltet die Anstelltechnologie und die Gärührung bis hin zur Hefeernte. Die darauf folgende Lagerung der Hefe bis zum erneuten Anstellen schließt den Kreislauf der Hefe in der Brauerei. Die überschüssige Hefe aus der Hauptgärung und die aus dem Reifungs- und Lagerungsprozess stammende Gelägerhefe muss schließlich aus dem Betrieb entfernt werden. Dies kann bei ökonomischen Vorteilen für die Brauerei mit einer Hefebiergewinnung gekoppelt sein. Über alle Bereiche hinweg sollte jeweils der an den Prozess angepasste optimale physiologische Zustand der Hefe im Mittelpunkt stehen, um die Effektivität der eingesetzten Hefe zu steigern und Vorteile für den Produktionsprozess und die resultierende Bierqualität zu erreichen (vgl. Kapitel 2.6). Die Abbildung 14 zeigt schematisch die Struktur des Hefemanagements in der Brauerei. Die für die vorliegenden Untersuchungen zentralen Punkte des Hefemanagements sind rot hervorgehoben.

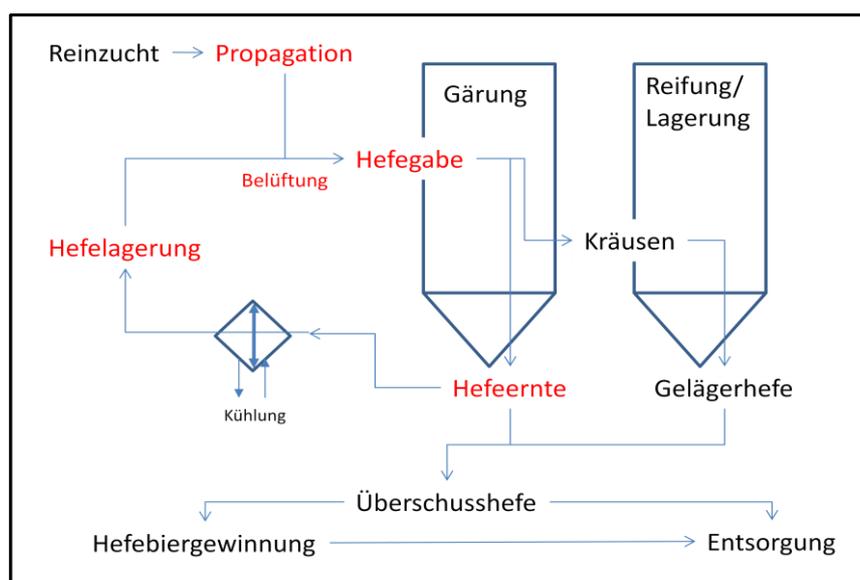


Abbildung 14: Grundlage des Hefemanagements in der Brauerei

Die betriebliche Weiterführung der Reinzuchtheife aus dem Brauereilabor hat in den vergangenen Jahren eine stetige Weiterentwicklung durchlaufen. Die zentrale Aufgabe im Herführungsprozess sollte die optimale Versorgung der Hefe mit Sauerstoff sein, um das primäre Ziel, eine möglichst hohe Biomasse in optimalem physiologischem Zustand bereitzustellen, zu erreichen. Die klassischen Herführungsmethoden, die durch mehrmaliges Draufflassen im Hochkräusenstadium immer größerer Würzemengen eine Vermehrung der Hefe erreichen, sind meist aufgrund wirtschaftlicher Gesichtspunkte nur noch in kleineren und mittleren Brauereien zu finden. Dennoch stellt dieses einfache Verfahren eine zweckdienliche Alternative bei der Breitstellung geringer Hefemengen dar. Da in den meisten Fällen jedoch nur eine normal geklärte, einfach belüftete und nicht keimfreie Würze zu Verfügung steht, ergeben sich Nachteile hinsichtlich einer längeren Prozesszeit, einem erhöhten mikrobiologischen Risiko und einer resultierenden Hefe in nicht bestmöglichem physiologischen Zustand.

Eine optimale Nährstoffausnutzung bei der Hefeherführung, eine damit verbundene Steigerung des Biomassenertragsfaktors und kürzere Prozesszeiten lassen sich nur durch eine zusätzliche mechanische Bewegung und eine weitreichendere Belüftung erzielen. Diese Maßnahmen fördern einen besseren Kontakt der Zellen mit den Nährstoffen der Würze und sorgen für eine effektivere Versorgung der sauerstoffabhängigen Stoffwechselwege der Hefe. Aus diesen technologischen Ansätzen sind die modernen Hefeinzuchtapparate bzw. Hefepropagationsanlagen entwickelt worden, mit dem Ziel, reingezüchtete Hefe unter keimfreien Bedingungen für größere Volumina mit einer besseren Hefequalität bereitzustellen. Die sich daraus ergebenden Vorteile sind sowohl eine kürzere Herführungszeit mit reprozierbarer, guter Hefequalität und ein hoher Automatisierungsgrad. Zudem wirkt sich die verbesserte Hefequalität positiv auf eine verkürzte Adaptionszeit, einen zügigeren Gärverlauf und einen schnelleren und weitreichenderen pH-Sturz sowie eine verbesserte Diacetylreduktion aus. Außerdem wird aufgrund der besseren Hefevitalität der Selektionsdruck auf Fremdkeime und so die mikrobiologische Sicherheit erhöht. Weiterhin werden den Hefen aus den modernen Herführungsanlagen positive Einflüsse auf die sensorische Eigenschaften des Bieres und eine Verbesserung der chemisch-physikalischen Stabilität sowie der Geschmacksstabilität zugeschrieben. Dennoch sind die Wechselwirkungen zwischen der spezifischen Belüftungsrate und den Regulierungsfunktionen im Hefestoffwechsel unter brautechnologischen Bedingungen noch nicht ausreichend bekannt. Ein an die Bedürfnisse der Hefe angepasster Prozessablauf und eine eventuelle Einflussnahme auf die Hefephysiologie über den Einsatz von Sauerstoff könnten weitere Vorteile bringen.

Es haben sich zwei Varianten der Propagationsverfahren in der Praxis durchgesetzt. Eines dieser Verfahren arbeitet auf der Basis eines reinen Batch-Betriebs. D.h. der gesamte Propagationsinhalt wird zum Anstellen einer Gärung genutzt. Die Anlage wird dadurch vollständig entleert und anschließend gereinigt. Für eine erneute Propagation wird die Anlage wieder mit frischer Sterilwürze gefüllt und mit einer neuen Reinzuchtheife aus dem

vorgeschalteten Prozess (Laborreinzucht, kleinere Propagationseinheit) beipflicht. Dieses Verfahren bietet Vorteile hinsichtlich einer Vermeidung möglicher Verschleppung von Kontaminationen, aber die Adaptionsphase der neu eingebrachten Hefe und die Manipulationszeiten schränken die Effizienz dieser Prozessgestaltung ein. Als zweite Möglichkeit existiert ein halbkontinuierliches Verfahren. Dabei findet nach dem herkömmlichen Anstellen eine wiederholte Propagation eines Teil- bzw. Restvolumens von 10 bis 15% des gesamten Propagatorinhalts statt. Von zentraler Bedeutung ist, die Hefe in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten und somit ständig Hefe hoher Qualität bereitstellen zu können (*Thiele, 2005*). Dieses Verfahren kann allerdings auch ohne das Auftreten eventueller Fremdkeime nicht unbegrenzt aufrechterhalten werden. Das Risiko von Mutationen steigt, und durch die Verdünnung essentieller Würzenährstoffe kann es zu Degenerationserscheinungen der Hefe kommen. Vor allem die Aminosäurekonzentration, die einen limitierenden Faktor bei der Hefepropagation darstellt, und die mögliche Verarmung an Zink, als einziges in der Würze eventuell unterbilanziertes Spurenelement, kann über die Prozessdauer negativ auf den physiologischen Zustand der Hefe wirken. Zudem nehmen die Konzentrationen von Ethanol und der GNP über die Prozessführung zu und beeinflussen die Hefephysiologie gleichermaßen.

Die in der Praxis eingesetzten Propagationsanlagen unterscheiden sich in weiteren anlagentechnischen Faktoren. Die Einrichtung des Belüftungssystems und die Art der mechanischen Bewegung sind zusammen mit der Behälterzahl die signifikanten Unterschiede. Einerseits existieren Bauformen, bei denen eine Belüftungslanze und ein Mischer direkt im Tank eingebaut sind. Bei unzureichender Reinigung und Desinfektion erhöht sich durch die Einbauten allerdings das Risiko einer mikrobiologischen Kontamination. Zudem muss eine zusätzliche Pumpe das Entleeren und Füllen des Propagators übernehmen. Diese Pumpe wird in Bauformen mit Belüftungsleitung gleichzeitig für die Umwälzung des Tankinhalts verwendet und ersetzt den innenliegenden Mischer, wobei die Homogenität der Hefesuspension sichergestellt werden muss. Die Umpumpleitung ist mit einer entsprechenden Belüftungseinrichtung ausgestattet. Diese basieren heutzutage meist auf dem Venturiprinzip. Die moderne Zweistoffdüse stellt in diesem Zusammenhang eine gute Durchmischung und effektive Sauerstoffversorgung aufgrund einer engen Größenverteilung feinsten Luftbläschen sicher (*Wening, 2007*). Diese Anlagentypen existieren als Ein- oder Zweitankverfahren. Der zweite Behälter kann entweder als reiner Sterilwürzetank angelegt sein oder wie im Assimilationsverfahren nach *Back* als vollwertiger Propagationstank für den wechselseitigen Betrieb ausgestattet werden. Zudem findet bei der Einführung eines Assimilationsverfahrens eine ganzheitliche Anpassung des Herführungssystems und somit auch der geometrischen Verhältnisse der Vermehrungstanks auf die in der Brauerei angewendete Technologie und die Wachstumsansprüche der Hefe statt (*Back, 2005*).

Im Rahmen der technologischen Einflussfaktoren ist die Variation der Prozessführung breiter verteilt und von betrieblichen Vorgaben abhängig. Die wichtigsten Steuerungsparameter im

Propagationsprozess stellen Temperatur, Zeit und Belüftung dar. Die Auswirkungen der Temperatursteuerung sind allgemein bekannt. Dennoch sollte mit Hinblick auf die GNP-Bildung und die nachfolgende Gärung die Propagationstemperatur an die Gärführung angepasst sein. Dabei sollte eine Temperaturdifferenz von  $> 4 \text{ }^\circ\text{C}$  nicht überschritten werden, um eine mögliche Schockexkretion von niedermolekularen Zellinhaltsstoffen zu vermeiden. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung muss sichergestellt werden, jedoch bringt eine Übersättigung keine reellen Vorteile für die Hefevermehrung, sondern führt zu einer übermäßigen Schaumbildung und damit zu einem Verlust an schaumpositiven Substanzen. Die in verschiedenen experimentellen Untersuchungen ermittelte Untergrenze der Sauerstoffversorgung bei der Propagation liegt mit Werten zwischen 1,0 und 1,5 mg/l über denen aus der Backhefeindustrie bekannten Werten für den Mindestgelöstsauerstoff von  $> 0,3 \text{ mg/l}$  (vgl. Kapitel 2.5.3).

Als weitere Steuerungsparameter stehen die Anstellzellzahl und der Extraktgehalt zu Verfügung, die wiederum durch das Mischungsverhältnis von Jungbier und unvergorener Würze beeinflusst werden können. Der entscheidende Faktor bei der Nutzung der hohen Hefequalität aus dem Propagationsprozess ist der Entnahmezeitpunkt. Zwar ist eine hohe Konzentration der Anstellhefe wünschenswert, aber sobald eine Limitierung von essentiellen Würzenährstoffen eintritt, beginnt die Hefe Reservestoffe zur Zellneubildung zu mobilisieren, was zu einer raschen Verschlechterung des physiologischen Zustands der Hefe führt. Die in der Literatur große Varianz der anzustrebenden Zellkonzentrationen mit bis zu 250 Mio. Z/ml ist vermutlich auf Unterschiede im Ausgangszustand und die z.T. fehlende Beachtung des resultierenden physiologischen Zustands der Hefe sowie anlagentechnische Faktoren zurückzuführen. Um die Vorteile einer modernen Hefepropagation voll nutzen zu können, hat sich ausgehend von einer Anstellkonzentration von 10 bis 15 Mio. Z/ml eine anzustrebende Hefezellzahl von 100 bis 120 Mio. Z/ml als angemessener Richtwert erwiesen. Um eine bis zum Ende der Propagation ausreichende Nährstoffversorgung sicherstellen zu können, sollte in diesem Zusammenhang ein Restextraktgehalt von 7% bis 9% angestrebt werden. Die Prozesszeit schwankt in Abhängig der o.g. Parameter und dem Ausgangszustand der Hefe im Bereich von 24 bis 48 h (*Thiele, 2005*).

Die Anstelltechnologie in der Brauerei eröffnete ebenso viele Variationsmöglichkeiten wie der Propagationsprozess. Dabei ist die verwendete Technologie entscheidend für den Gärverlauf und die Reifungsgeschwindigkeit und nimmt so Einfluss auf die Qualität des produzierten Bieres. Unabhängig vom physiologischen Zustand der Hefe ist vor allem die Bandbreite der Belüftung in den praktizierten Drauflassverfahren weit gesteckt. Eine ausreichende Versorgung von Sauerstoff ist dabei essentiell für einen guten physiologischen Zustand der Hefe. Dahingegen hat sich eine gesamte Hefegabe zum ersten Sud sowohl für die Gäreigenschaften als auch für die Qualität des produzierten Bieres als Vorteilhaft erwiesen (*Boulton, 2001; Tenge, 2004; Back, 2005*). Eine auf die einzelnen Sude verteilte Hefegabe hat vermutlich aufgrund der verzögerten Adaption der nachfolgenden Hefecharge und der dadurch fehlenden Synchronität der Population verlängerte Gärzeiten, einen

geringeren pH-Sturz, einen niedrigeren Endvergärungsgrad und eine verminderte Diacetylreduktion zur Folge. Zudem konnte eine geringere Hefevitalität auf Basis der ICP-Messung und eine erhöhte Konzentration an Alterungsindikatoren in forciert gealterten Bieren nachgewiesen werden.

Die Würzbelüftung orientiert sich unter normalen Umständen an der Sättigungsgrenze des als Sterilluft eingebrachten Sauerstoffs. Dabei sind in Abhängigkeit der Temperatur und der Dichte Sauerstoffkonzentrationen von 8 bis 11 mg/l zu erreichen. Dies kann durch die Verwendung von reinem Sauerstoff deutlich gesteigert werden. Die anlagentechnisch aufwändige und kostenintensivere Versorgung mit reinem Sauerstoff findet jedoch nur im Bereich der High-Gravity Verfahren aufgrund der hohen Stammwürzekonzentrationen Anwendung und eine Überdosierung steigert das Risiko des oxidativen Stresses der Hefe und bedingt so Nachteile in ihrer Vitalität. Die Frage nach der effektiven Verfügbarkeit für die Hefe und die oxidative Belastung der Würze durch den eingebrachten Sauerstoff ist nicht hinreichend geklärt. Zur Steigerung des SO<sub>2</sub>-Gehaltes im Bier wird eine Reduzierung der Belüftung nachfolgender Sude entweder durch Teilbelüftung oder Reduzierung der Sauerstoffkonzentration vorgeschlagen. Dabei muss zwischen möglichen Qualitätseinbußen, einer Schwächung der Hefevitalität und der forcierten SO<sub>2</sub> Bildung abgewogen werden. Bei einer vorgeschalteten Belüftung zur Vitalisierung der Erntehefe vor dem Anstellen, wie sie z.T. in der Literatur vorgeschlagen wird, sollte wiederum die Zehrung intrazellulärer Reservestoffe aufgrund fehlender Würzenährstoffe berücksichtigt werden. Falls eine derartige Belüftung vorgenommen wird, ist eine zeitnahe Einleitung der Gärung wesentlich (*Depraetere, 2003*).

Die weiteren Steuerungsparameter während der Gärführung sind die Anstellkonzentration der Hefe, die Temperaureführung und eine mögliche Druckbeaufschlagung. Diese Faktoren wirken sich einerseits ebenfalls auf die Hefevermehrung und –aktivität und damit auf die Gärgeschwindigkeit aus, aber andererseits wird die Zusammensetzung der GNP deutlich beeinflusst (vgl. Kapitel 2.4.8). Für eine reproduzierbare Bierqualität sollte die Anstellkonzentration der Hefe möglichst konstant gehalten werden und mit den entsprechenden anlagentechnischen Möglichkeiten überwacht werden. Eine Erhöhung der Hefegabe führt allgemein zu einer Verkürzung der Gärzeit. So kann bei der Produktion untergäriger Biere mit einer Vervierfachung der Hefegabe bei gleicher Gärtemperatur die Gärzeit von 12 auf 4 Tage gesenkt werden. Allerdings sinkt mit dieser Maßnahme die Verfügbarkeit der Nährstoffe pro Hefezelle, so dass es zu einem geringeren Hefewachstum während des Gärprozess kommt. In diesem Zusammenhang wird über eine unzureichende Hefeernte und eine ausbleibende Verjüngung der Hefepopulation berichtet. Aus Sicht der in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt der Forschung gerückten Produktstabilität führt eine höhere Hefegabe zu einer deutlichen Verschlechterung der Alterungsstabilität und ist deshalb nicht zu empfehlen. In Abhängigkeit der Gärtemperatur sollte die Anstellkonzentration zwischen 15 und 30 Mio. Z/ml betragen. Eine Mischung von Propagations- und Erntehefe führt zu einer Verringerung der Abfallmenge, niedrigeren

Investitionskosten im Bereich der Propagationsanlagen sowie erhöhten SO<sub>2</sub>-Gehalten durch den ausgeprägten gärungsphysiologischen Charakter der Erntehefen im Bier. Die könnte auch durch eine bessere Ausrichtung des physiologischen Zustands der Propagationshefe erreicht werden.

Generell bewirkt eine Erhöhung der Gärtemperatur einen intensiveren Hefestoffwechsel. Darauf beruhen eine Beschleunigung der Hefevermehrung und ein schnellerer und tieferer pH-Sturz, sowie eine bessere Verteilung der Hefe im Gärtank aufgrund der erhöhten Konvektion. Allerdings bewirken erhöhte Temperaturen eine deutlich stärkere Bildung der höheren Alkohole. Ein ungünstiges Verhältnis im GNP-Spektrum kann zu unausgewogenen, wenig aromatischen und leeren Bieren führen. Zudem führt eine intensivere Gärung zu einer erhöhten Ausscheidung an Eiweißen und Bitterstoffen. Unter Berücksichtigung dieser Nachteile ist die Druckgärung entstanden, die das Hefewachstum aufgrund des höheren Druckes und der vermehrten CO<sub>2</sub>-Bindung in der Hauptgärphase drosselt und so die Bildung der höheren Alkohole reduziert. Bei einer Gärtemperatur von 15 °C und einem ab der zweiten Sprossung eingestellter Spundungsdruck von 0,3 bis 0,5 bar wird unter Berücksichtigung des zusätzlichen statischen Drucks ein CO<sub>2</sub>-Gehalt im Jungbier von ca. 2,5 bis 3,0 g/l erreicht. Konzentrationen von > 1 g/l schränken die Hefevermehrung bereits stark ein.

Neben der generellen Möglichkeit, eine klassische kalte oder warme Gärführung einzusetzen, entscheidet vor allem die Temperatur der drauf gelassenen Würze über eine zügige und weitreichende Vergärung. Die frische Würze muss unbedingt an die im Gärtank befindliche Temperatur angeglichen werden. Eine Absenkung der Gärtemperatur während des Anstellens führt zu einer Verschlechterung der Hefeviabilität und -vitalität und bedingt eine Reduzierung der Gäraktivität um bis zu 30%. Hinzu kommen ein deutlicher Anstieg des FAN-Gehalts im fertigen Bier, sowie ein leicht erhöhter pH-Wert.

Ein gutes Absetzverhalten der Hefe während der Nachgärung ist Grundvoraussetzung für eine optimale Hefeernte. Das Flokkulationsvermögen des Hefestammes hat hierbei den größten Einfluss und wird über die Mineralstoffzusammensetzung sowie den Ethanolgehalt und pH-Wert mitbestimmt. Gleichzeitig beeinflussen die in Schwebelagerung verbleibenden Zellen den Reifungs- und Filtrationsprozess. Für die Qualität der Hefeernte und des Bieres ist sowohl der Erntezeitpunkt als auch die Methode der Hefeernte von Bedeutung. Hinsichtlich der Wiederverwendung der Hefe in der nächsten Führung müssen die Ernte- und Lagerungsbedingungen auf die Hefephysiologie abgestimmt werden. Eine möglichst frühzeitige Entfernung der Hefe vom Jungbier ist wünschenswert. Die abgesetzte Hefe fängt bereits in der Nachgärung an, niedermolekulare Eiweiße zu exkretieren, die sich negativ auf die Schaumstabilität auswirken können. Vor allem die Konzentration und die Aktivität der Proteinase A können bei fehlender Inaktivierung über den weiteren Prozessweg die Schaumstabilität herabsetzen. Die teilweise hohen Temperaturen und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der abgesetzten Hefe, bedingt durch unzureichende Kühlmöglichkeiten und den statischen Druck in hohen ZKGs, können zu Autolyseerscheinungen der Hefe beitragen. Die

in Lösung gehenden Zellbestandteile wirken sich sowohl auf das Geruchs- und Geschmacksprofil, als auch auf die Glanzfeinheit und Filtrierbarkeit negativ aus. Auch die Voraussetzung für eine gute Geschmacksstabilität wird durch die mögliche Exkretion von Fettsäuren stark gemindert. Zugleich steigt der pH Wert des Bieres an, der damit als Indiz für eine Hefeautolyse herangezogen werden kann.

Bei der Hefeernte sollte darauf geachtet werden, dass die Hefe im Konus langsam nachrutscht und möglichst vollständig entfernt werden kann, ohne dass Reste an den Wandungen des Konus zurückbleiben. Eine Verwerfung des Vor- und Nachzeugs ist vorteilhaft, aber bei der Ernte aus einem ZKG teilweise schwierig zu koordinieren. Der Hefeernte aus einem ZKG sollte dabei eine schonende und möglichst weitreichende Druckentlastung nachfolgen. Die Entfernung des CO<sub>2</sub>, das als Zellgift negativen Einfluss auf die Hefephysiologie und vor allem auf die Vermehrungseigenschaften besitzt, muss möglichst weitreichend erfolgen. Falls ein direktes Wiederanstellen geplant ist, empfiehlt es sich, die CO<sub>2</sub>-Entfernung mit einer zusätzlichen Belüftung der Hefe zu forcieren. Falls vor der nächsten Führung eine Lagerphase der Hefe ansteht, ist eine zusätzliche Belüftung nicht empfehlenswert, da der Hefemetabolismus angeregt wird und durch das Fehlen von Würzenährstoffen eine Zehrung der Reservestoffe erfolgt, die für die nachfolgende Vermehrungs- und Gäreigenschaften von großer Bedeutung sind (vgl. Kapitel 2.4.7).

Die Behandlung und Aufbewahrung der Hefe sollte auf eine möglichst vollständige Konservierung des physiologischen Zustands ausgerichtet werden. Dabei ist eine schnelle Kühlung der Hefe von besonderer Bedeutung. Bei einem direkten Wiederanstellen kann auf eine vollständige Kühlung unter die Anstelltemperatur verzichtet werden, ansonsten sollte eine Lagertemperatur von 3 bis 4 °C angestrebt werden. Längere Lagerzeiten der Hefe setzen zur Erhaltung des physiologischen Zustands eine Aufbewahrungstemperatur zwischen 0 und 2 °C voraus. Bei der Kühlung der Hefe ist der Einsatz eines Plattenwärmetauschers gegenüber einer konventionellen Tankkühlung zu bevorzugen. Dieser ermöglicht eine homogenere und schnellere Temperatursenkung. Eine zu warme Hefelagerung hat deutlich negativen Einfluss auf die Hefeviabilität und die nachfolgende Gärung. Über Veränderungen des Sauerstoffbedarfs in Abhängigkeit der Lagerzeit sind bis heute keine Ergebnisse formuliert.

## 2.8 Die Bialterung

### 2.8.1 Bedeutung der Geschmacksstabilität

Das „Frischeprodukt“ Bier unterliegt bereits nach der Abfüllung und dem Verlassen der Brauerei einer ständigen Veränderung über die gesamte Lagerdauer. Sowohl die Zentralisierung der deutschen Braulandschaft, als auch die zunehmende Globalisierung im internationalen Markt machen aufgrund der daraus resultierenden immer längeren Distributionswege die Stabilität des Produktes besonders wichtig. Neben chemisch-physikalischen Veränderungen stellt die negative Entwicklung des Geruchs- und Geschmacksprofil einen maßgeblichen Verlust der Qualitätsmerkmale hierbei dar. Es greifen zwei Mechanismen im Rahmen der Profilveränderung ineinander. Es kommt einerseits zu einem Verlust an aromapositiven Substanzen des Bieres sowie zur Bildung von neuen Substanzen, die den Alterungsgeschmack des Bieres bewirken (*Meilgaard, 1975*). Die aufgrund des Reinheitsgebotes meist auf die Technologie beschränkten Möglichkeiten bei der Malz- und Bierbereitung zur Verbesserung der Geschmacksstabilität stellen eine der großen wissenschaftlichen Herausforderung im Brauwesen dar. Durch gezielte Maßnahmen im Bereich der Rohstoffauswahl und deren Lagerung sowie einer Verbesserung der Anlagentechnik konnten bereits deutliche Fortschritte zur Erhaltung des Bieraromas erzielt werden (*van Waesberghe, 2001*). Dabei ist vor allem die Sauerstoffaufnahme des Bieres bei der Abfüllung zu kontrollieren und zu minimieren, da hier das Schädigungspotenzial am deutlichsten ist und alle vorher unternommen Anstrengungen, zu einer verbesserten Geschmacksstabilität beitragen, überschattet werden können (*Wilson, 1978; Narziss, 1999; Gastl, 2006*).

Die Auslöser der Oxidationsvorgänge bei der Bialterung stellen die ROS dar. Sie können u.a. mit Polyphenolen, iso- $\alpha$ -Säuren, Aminosäuren, Fettsäuren und Alkoholen kritische Reaktionen eingehen. Die Bildung von Carbonylverbindungen scheint im Rahmen der Alterungserscheinungen einen maßgeblichen Anteil zu besitzen. Allerdings tragen auch nicht oxidative Reaktionen zum Alterungsprozess der Biere bei. Hierbei spielen die Bildung verschiedener Ethylester, hauptsächlich die über die sauerstoffunabhängige Maillardreaktion gebildeten heterozyklischer Verbindungen und die Abnahme der bei der Gärung durch die Hefe gebildeten Ester eine wichtige Rolle (*Bamforth, 1985; Kaneda, 1989; De Cooman, 2000*). Die Bildungsreaktionen der Leitsubstanzen der Bialterung werden in Kapitel 2.8.2 beschrieben.

Im Bereich der Fermentation steht bis heute vor allem die von der u.g. Hefe abgegebene  $\text{SO}_2$ -Konzentration im Vordergrund. Dieses Antioxidans ist in der Lage, die maßgeblich auf Oxidationsvorgänge durch Sauerstoffeintrag zurückzuführende Instabilität des Bieraromas abzuschwächen (*Kunz, 2002*). Während in allen Prozessschritten der Bierbereitung die Sauerstoffbelastung im Rahmen der technischen Möglichkeiten zu reduzieren ist, ist aufgrund des sauerstoffabhängigen Wachstums und zur Sicherstellung eines optimalen physiologischen Zustandes der Hefe eine Sauerstoffversorgung im Bereich des Anstellens

unerlässlich. Damit bekommt der Einfluss der Würzebelüftung mit Hinblick auf mögliche Oxidationsvorgänge der Würzeinhaltsstoffe eine besondere Bedeutung. Jedoch muss in diesem Zusammenhang einerseits die durch die Sauerstoffzehrung der Hefe bedingte kurze Kontaktzeit berücksichtigt und andererseits der Einfluss des Hefemetabolismus auf eine evtl. Reduzierung möglicher Alterungssubstanzen während der Gärung in Abhängigkeit ihres physiologischen Zustands in Betracht gezogen werden (*Narziss, 1999; Wurzbacher, 2005; Thiele, 2008*). Allerdings zeigen bis heute vor allem Maßnahmen, die einen negativen Einfluss auf den physiologischen Zustand der Hefe besitzen, positive Effekte auf die SO<sub>2</sub>-Bildung der Hefe. Dabei werden Richtwerte zwischen 5 mg/l und der deklarationspflichtigen Grenze von 10 mg/l als wirkungsvoller Schutz in der Literatur vorgeschlagen, meist ohne auf weitere Qualitätsmerkmale zu achten.

Eine Belüftung und damit angestrebte Vitalisierung der Hefe vor dem Zeitpunkt des Anstellens scheint hier eine Möglichkeit, die oxidative Belastung der Würze zu verringern ohne einen negativen Einfluss auf die Hefephysiologie und Gäreigenschaften zu bewirken (*Depraetere, 2003*). Dabei bleibt offen, in wie weit die Sauerstoffversorgung getrennt von der Aufnahme der essentiellen Nährstoffe der Würze den physiologischen Zustand der Hefe effektiv beeinflusst und sich auf die Gäreigenschaften, die Bildung der GNP und somit das Qualitätsprofil auswirkt. Nur ein tieferes Wissen über die Hefevitalität unter Brauereibedingungen kann zu Lösungs- und Verbesserungsansätzen der Geschmacksstabilität beitragen. Es wird auch in den nächsten Jahren zu großen Anstrengungen im Brauwesen kommen, den Mikroorganismus Hefe und die Gärparameter weiterhin auf eine Verbesserung der Geschmacksstabilität ohne Einschnitte anderer Qualitätsmerkmale des Bieres auszurichten.

Biere auf ihre Stabilität hin zu untersuchen, stellt sich jedoch als äußerst schwierig dar. Der vielschichtige Prozessablauf bei der Bierbereitung und die komplexe Matrix dieses Produktes machen eine reproduzierbare Studie über die Einflussfaktoren auf die Geruchs- und Geschmacksstabilität schwierig. Aufgrund des Einsatzes natürlicher Rohstoffe, dem nicht reproduzierbaren physiologischen Zustand der Hefe während der Gärung und die sich darauf aufbauende schwierige Vergleichbarkeit mit dem frischen Produkt sind technologische Verbesserungen schwer voranzutreiben. Eine mögliche forcierte Alterung spiegelt zwar Trends der natürlichen Alterung wider und wird in die Bewertung mit einbezogen, aber zeigt keine 100%ige Übereinstimmung. Dennoch sind verschiedene erfolgreiche Verfahren zur Beurteilung oder Vorhersage der Geschmacksstabilität und der Anfälligkeit von Bier vorhanden. Neben der Berechnung des Stabilitätsindex aus den Analysen der Lag-Time, des antiradikalischen Verhaltens, dem antiradikalischen Potential und des Reduktionsvermögens, hat die gaschromatische Bestimmung von Leitsubstanzen, die als Hauptverursacher der Alterungsgeschmackes des Bieres gelten, zu zahlreichen Verbesserungen in den unterschiedlichen Prozessen der Bierbereitung geführt. Allerdings sind noch nicht alle verantwortlichen Substanzen identifiziert, so dass die Liste der

Indikatoren weiter verbessert werden muss, um die Verbesserung der Geschmacksstabilität vorantreiben zu können (Forster, 1999; Kunz, 2002; Wurzbacher, 2005; Depraetere, 2008).

### 2.8.2 Bildung der Alterungskomponenten

Eine Vielzahl von Carbonylverbindungen im Bier ist maßgeblich an der Bildung des Alterungsgeschmacks beteiligt. Die aus der Maillardreaktion, aus dem Streckerabbau, der Oxidation höherer Alkohole, dem oxidativen Abbau von Isohumulonen und Fettsäuren der Aldolkondensation von Aldehyden, der sekundären Autooxidation langkettiger, ungesättigter Aldehyde und der Freisetzung vorhandener Aldehyde aus Sulfit-Additionsbindungen stammenden Substanzen sollen kurz erläutert werden. Weiterhin verursachen die Oxidationsvorgänge die Bildung einer Vielzahl an organischen Säuren im Bier (Huvaere, 2003).

- Maillardreaktion und Streckerabbau

Die auch als nicht-enzymatische Bräunung benannte Maillardreaktion beruht auf einer Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern (z.B. Glucose) und Aminosäuren. Die Produkte dieser komplexen Reaktionsabläufe sind auch für die Farbgebung und als Wärmeindikatoren von Bedeutung. Im ersten Reaktionsschritt kommt es zur Bildung eines N-Glykosylamins, das über die Schiff'sche Base zum Amadoriprodukt umgelagert wird. Diese Amadoriverbindung kann über die zwei möglichen Endiolformen zu Carbonylen und Dicarbonylen reagieren. Im weiteren Verlauf kann es dann zur Bildung von Melanoidinen kommen.

Ebenfalls können Aminosäuren über den Streckerabbau zu stark alterungsrelevanten Aldehyden oxidiert werden; was durch Sauerstoff, Lichteinstrahlung und Riboflavin gefördert und durch die antioxidative Kapazität von Polyphenolen gebremst werden kann. Ausgehend vom Amadoriprodukt können über den Streckerabbau ebenfalls verschiedene Carbonylverbindungen entstehen. Die können über Kondensation weiter zu aromatischen Substanzen weiterreagieren. Dabei reagieren über Transaminierung und Decarboxylierung im ersten Schritt Aminosäuren mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zu Aminoketon und dem korrespondierenden Aldehyd. In Folgereaktionen kann es zu Kondensation mit verfügbaren Verbindungen kommen. Als Endprodukte können hierbei Pyrazine und ebenfalls Melanoidine entstehen. Jedoch verbleibt ein geringer Anteil der Aldehyde und Ketone als aromaaktive Substanzen im Bier. Die zeigt die zu den Aminosäuren korrespondierenden Strecker-aldehyde (Vanderhaegen, 1990; Lustig, 1994; Gastl, 2006).

Tabelle 7: Aminosäuren und ihre korrespondierenden Streckeraldehyde

| Aminosäure          | Streckeraldehyd   |
|---------------------|-------------------|
| <u>Glycin</u>       | Formaldehyd       |
| <u>Alanin</u>       | Acetaldehyd       |
| <u>Valin</u>        | 2-Methylpropanal  |
| <u>Isoleucin</u>    | 2-Methylbutanal   |
| <u>Leucin</u>       | 3-Methylbutanal   |
| <u>Phenylalanin</u> | Phenylacetaldehyd |

- Oxidation höherer Alkohole

Die aus dem GNP-Stoffwechsel der Hefe stammenden höheren Alkohole können bei Anwesenheit von Melanoidinen zu Aldehyden oxidiert werden.

- Oxidativer Abbau von *iso*- $\alpha$ -Säuren

Die Oxidation der *iso*- $\alpha$ -Säuren erfolgt an den Seitenketten der Bitterstoffe. Isohumulone können auch in Abwesenheit von gelöstem Sauerstoff oxidativen Reaktionen unterliegen. Die dabei entstehenden Carbonylverbindungen setzen sich aus Acetaldehyd, Aceton, 2-Butenal, 2-Pentanal, 2-Hexanal, 2,4-Hexadienal, 2-Methylpropanal, 3-Methylbutanal, 3-Methylbutan-2-on, 3-Methylpentan-2-on und 4-Methylpentan-2-on zusammen. Innerhalb der Oxidationsvorgänge bei den *Iso*- $\alpha$ -Säuren scheinen besonders die *trans*-Isomere im Gegensatz zu ihren korrespondierenden *cis*-Isomeren beeinträchtigt zu sein (Back, 2005).

- Abbau von Fettsäuren

Die in der Würze vorliegenden Fettsäuren werden, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, sowohl über das Malz als auch den Hopfen eingetragen. Ein Großteil der vorhandenen Fettsäuren wird von der Hefe aufgenommen und in zelleigene Substanzen überführt. Hinzu kommt, dass zum Ende der Gärung aufgrund der toxischen Eigenschaften für den Hefemetabolismus kurz- und mittelkettige Fettsäuren an das Jungbier abgegeben werden. Dennoch sind Konzentrationen von ungesättigten Fettsäuren in geringen Konzentrationen im fertigen Bier vorhanden, die auch aus evtl. apoptotischen Zellen stammen können. Diese Fettsäuren unterliegen während der Lagerung in Tank und Flasche einem teilweisen enzymatischen und autooxidativen Abbau (Vanderhaegen, 1990). Die Endprodukte des enzymatischen Abbaus stellen dabei ebenfalls Aldehyde aber auch Oxosäuren dar. Sie entstehen durch die von Lipoxyenasen und Hydroperoxidisomerasen katalysierte Bildung nichtbeständiger Hydroxysäuren. Den über die Autooxidation ungesättigter Fettsäuren und Fettsäureethylester entstehenden Alterungscarbonylen kommt eine weitaus größere Bedeutung zu. Dabei können sich mit der Bildung von Peroxy-, Alkoxy- oder Alkyl-Radikalen typische Kettenreaktionen ausbilden und der folgende Reaktionsprozess (Kettenwachstum und Kettenverzweigung) wird nur über die Entstehung von stabilen Produkten abgebrochen. Aus den primär entstehenden, aromaneutralen Monohydroperoxiden kann dann im Weiteren wiederum eine Vielzahl von Aldehyden entstehen. Neben der Autooxidation von

Fettsäuren existiert die Möglichkeit der Photooxidation in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit und reaktionsstabilisierender Farbstoffe, wobei allerdings das Hauptprodukt *trans*-2-Nonenal als Hauptprodukt der Fettsäureoxidation unabhängig von der Sauerstoffbelastung bei der Abfüllung scheint (Vanderhaegen, 1990; Lustig, 1994; Wackerbauer, 2003; Gastl, 2006).

- Aldolkondensation und sekundäre Autooxidation von Aldehyden

Kurze gesättigte Aldehyde bilden über die Aldolkondensation längerkettige  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Aldehyde, die Alkenale. Die sekundäre Autooxidation kann wieder zu einer Umwandlung in gesättigte kurzkettige Aldehyde führen. Die in der Literatur berichtete Abnahme von *2-trans*-Nonenal könnte mit der Oxidation dieses Aldehyds zu Pentanal, Heptanal oder Octanal erklärt werden.

- Freisetzung von Aldehyden aus Sulfit-Additions-Verbindungen

Aufgrund der durch die Oxidation zu Sulfat kommt es im Laufe der Lagerung von Bier zu einer Abnahme an Sulfit. Zusammen mit der sinkenden Affinität von Sulfit bei höherer Kettenlänge der Aldehyde und der geringeren Stabilität der Sulfidadditionsbrücken kommt es über den Alterungsprozess zu einer Freisetzung von längerkettigen Carbonylen. Die Freisetzung von Heptanal und *2-trans*-Nonenal als Vertreter dieser Gruppe wird durch eine mögliche Bildung von Acetaldehyd aus Ethanol und der daraus abzuleitenden Verdrängungsreaktion weiter verstärkt (Back, 2005).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Acetaldehyd, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Acriflavin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alkoholdehydrogenase (from Yeast, E.C. 1.1.1.1), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

ATP (Adenosine 5`-triphosphate, disodium salt hydrate), 99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Benztraubensäure (Natriumpyruvat), E. Merck, Darmstadt

Biuret-Lösung (CuSO<sub>4</sub>), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Citrate Synthase (from porcine heart, E.C. 4.1.3.7), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

CoA-SH (Coenzyme A, Yeast), Reinheitsgrad I, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

ConA-FITC, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

DL-Dithiothreitol, 99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ethanol (96%), Sigma-Aldrich, Taufkirchen oder E. Merck, Darmstadt

Fluoresceindiacetat (FDA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Gluthation, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Glycin, E. Merck, Darmstadt

Kaliumacetat, 99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kaliumhydrogenphosphat, -dihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

KCl, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

L-Malat Dehydrogenase (from porcine heart, E.C. 1.1.1.37, cytoplasmic), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

L-Malat, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

MgCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich Taufkirchen

Na-Azid, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

NAD<sup>+</sup> (β-Nicotinamide adenine dinucleotide, oxidierte Form), ≥ 96,5%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

NADH-Na<sub>2</sub> (β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduzierte Form), Reinheitsgrad II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Natrium-Pyruvat, E. Merck, Darmstadt

Nilrot, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PBS-Puffer, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Periodische Säure, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Phenylmethansulfonylfluorid, E. Merck, Darmstadt

PNPG (p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyrranosid), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Propidium Iodid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Pyrazol, 98%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ribonuclease A, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Thioglycerol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trichloressigsäure, J.T. Baker INC., Grieslau

Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan-HCl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### **3.1.2 Hefestämme und Fermentationsmedien**

Um eine möglichst konstante Würzezusammensetzung für die Propagations- und Gärversuche zu gewährleisten und damit den großen Einfluss der Konzentrationsverschiebungen zwischen den Inhaltsstoffe auszublenden, kamen vorwiegend Ausschlagwürzen aus großtechnischen Anlagen zum Einsatz. Diese wurden zu Zeitpunkt Kühlmitte dem laufenden Prozess entnommen. Für die Versuchsreihen mit untergäriger Hefe kamen dabei zum Einsatz:

- Ausschlagwürze Hell, Staatsbrauerei Weihenstephan
- Ausschlagwürze Hell, Hofbrauhaus Freising
- Ausschlagwürze Pils, Staatsbrauerei Weihenstephan

Für die Versuche mit obergärigen Hefen wurde ausschließlich die Ausschlagwürze des hellen Weißbieres der Staatsbrauerei Weihenstephan eingesetzt.

Bei allen Versuchsreihen ist der Hefestamm W 34/78-093 der Hefebank Weihenstephan zum Einsatz gekommen. Bei den Untersuchungen zum physiologischen Zustand und den Gäreigenschaften verschiedener Hefestämme und deren Einfluss auf die Bierqualität sind für

die Versuche mit untergärigen Hefen zusätzlich die Stämme W 34/70-160, W 66/70-054, W 69-048, W 128-056, W 194-047 und für die Versuche mit obergäriger Hefe die Stämme W 68-134, W 127-051 (Weißbier-Hefen), W 177-053 (Kölsch-Hefe) und W 184-043 (Altbier-Hefe) der Hefebank Weihenstephan verwendet worden (vgl. Kap. X.X).

### **3.1.3 Propagatoren und Gärtanks**

Fermenter (Bruttoinhalt: 5 Liter), Pilotanlage des Lehrstuhls Technologie der Brauerei II, Applikon, Schiedam, NL

Fermenter (Bruttoinhalt: 119 Liter), Pilotanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, Esau&Hueber, Schrobenhausen

Fermenter (Bruttoinhalt 10 Liter), Pilotanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, Freising

Gärtanks (Nettoinhalt 20 und 30 Liter), Pilotanlage des Lehrstuhls Technologie der Brauerei II, Freising

EBC-Gärröhren (Bruttoinhalt 2 Liter), Pilotanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, Freising

### **3.1.4 Sonstige Geräte**

Abfüllanlage, Esau & Hueber, Pilotanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II

Aufschlussgerät (French-Press mit Druckzelle FA-030), SLM-Aminco®, Urbana, USA

Corneliusbehälter (Bruttoinhalt 10 und 20 Liter), Cornelius, Lagenfeld

Durchflusszytometer, Coulter EPICS XL-MCL, Fullerton, USA

Durchflusszytometer, Cell Lab Quanta SC, Fullerton, USA

Kieselgurrahmen- und Entkeimungsfilter, Seitz Pilot, Seitz Werke GmbH, Bad Kreuznach

Handbiegeschwinger, DMA 35N Density Meter, Anton Paar, Graz, AT

Präzisions-Küvetten Suprasil, Hellma, Müllheim

Rotor SS-34, Kendro, Langenselbold

pH Meter, pH 521 WTW (Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten), GmbH, Weilheim

Photometer, Ultrospec 3100 pro, UV/Visible Spektralphotometer, Biochrom Ltd., Cambridge, GB

Sudwerk, Pilotanlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, Freising

Zählkammer nach Thoma, Brand, Wertheim

Zentrifuge, Pico, Heraeus Instruments, Kendro, Langenselbold

Zentrifuge, Sorvall RC-5B und RC-5C+ Refrigerated Superspeed Centrifuge, Kendro, Langenselbold

Sonstige Geräte und Verbrauchsmaterialien gehören zur Laborgrundausrüstung

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität

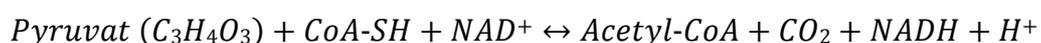
Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität setzt sich zusammen aus der Messung der Enzymaktivität eines Heferohextraktes und einer für dieselbe Probe gültigen Proteinbestimmung, welche nach der modifizierten Methode nach Biuret durchgeführt wurde. Zum Aufschluss der Hefezellen kam eine French-Press *SLM Aminco* mit der Druckzelle *FA-030* zum Einsatz. Der Zellaufschluss hat das Ziel, die cytoplasmatischen Proteine und Bestandteile der Zellkompartimente in Lösung zu bringen. Bei einem Aufschlussdruck von 1130 bar lassen sich innerhalb eines Durchgangs Aufschlussraten von über 50% erzielen. Das Zentrifugieren der Proben (Probenvolumen ca. 40 ml) zur Gewinnung der Hefepellets und anschließend des Zellextraktes erfolgte bei 23600 g für 15 min. Während der Probenaufbereitung, bei der eine konstante Temperatur von 4 °C vorgeherrscht hat, sind die Hefen zum „Waschen“ in einem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, + 10 mM Thioglycerol und 0,02% Na-Azid) resuspendiert worden. Vor dem Aufschluss der Hefeproben wurden zusätzlich 400 µl PMSF (0,1 mM) als Proteaseninhibitor zugegeben. Für die Aktivitätsmessung der Enzyme des PDH-Bypasses (ALDH und ACS) und der PDH wurde der Zellextrakt unverdünnt eingesetzt. Zur Messung der Schlüsselenzyme der Alkoholischen Gärung (PDC und ADH) musste in Abhängigkeit von der gewonnen Hefemenge die Probe mittels einer BSA-Lösung (5 g/l) zur Stabilisierung der Proteine im Verhältnis 1:5 bis 1:20 verdünnt werden.

Die Aktivitätsmessung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Reaktionstemperatur von 25 °C. Die Grundlage der photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität ist die Extinktionsdifferenz zwischen der oxidierten und der reduzierten Form des an die Enzymreaktion gekoppelten Coenzym  $NAD^+$ . Aus der Steigung der Extinktionskurve und der Proteinmenge des eingesetzten Heferohextraktes ergibt sich eine auf den Stoffumsatz bezogene spezifische Enzymaktivität in U/mg der jeweiligen Probe. Der in die Berechnung einzubeziehende Extinktionskoeffizient von NADH beträgt  $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ . Die Messungen erfolgten in 2 ml Halbmikroküvetten aus Quarzglas Suprasil mit einer Schichtdicke von 10 mm. Für jedes Enzym ist eine 4fache Bestimmung durchgeführt worden. Die einzelnen Enzymreaktionen sind in den Formel 4 bis 6 dargestellt und die Zusammensetzung der Testansätze wird im Folgenden beschrieben.

#### PDH:

Der Testansatz zur Messung der PDH-Aktivität setzte sich aus 100 µmol Tris-HCl (pH 8,1), 1 µmol  $MgCl_2$ , 1 µmol  $NaCl_2$ , 4,2 µmol Thiaminphyrophosphat, 1,2 µmol  $NAD^+$ , 4 µmol Na-Pyruvat, 2 µmol Cystein-Hydrochlorid und 0,2 µmol CoA-SH als Startersubstanz zusammen.

#### Formel 3: Reaktionsgleichung der PDH



PDC:

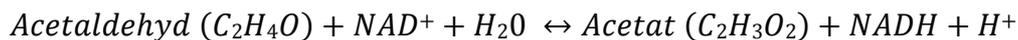
Bei dem Testansatz zur Messung der PDC-Aktivität handelte es sich um eine gekoppelte Enzymreaktionen. Dabei wurde im Falle der PDC die sich auch im Hefestoffwechsel direkt anschließende Reaktion der ADH (s. Formel 5) genutzt. Der Reaktionsansatz zur Messung der PDC-Aktivität bestand aus 50  $\mu\text{mol}$  Imidazol-HCl (pH 6,5), 5  $\mu\text{mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{mol}$  Thiaminpyrophosphat, 0,16  $\mu\text{mol}$   $\text{NADH}_2\text{-Na}_2$  und 0,2 U ADH zusammen. Die Reaktion wird mit 64  $\mu\text{mol}$  Pyruvat gestartet.

**Formel 4: Reaktionsgleichung der PDC**ADH:

Den Testansatz zur Messung der ADH-Aktivität bildeten 87  $\mu\text{mol}$  Natriumpyrophosphat 76  $\mu\text{mol}$  Semicarbazidhydrochlorid, 13,3  $\mu\text{mol}$  Ethanol und 1,5  $\mu\text{mol}$  Glutathion. Die Messung wurde mit 2  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$  gestartet.

**Formel 5: Reaktionsgleichung der ADH**ALDH:

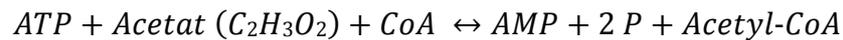
Bei der Messung der ALDH könnte zusätzlich zwischen dem cytosolisch und mitochondrial lokalisierten Enzymen zur Umsetzung von Acetaldehyd mit Hilfe von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  als Wasserstoffakzeptor unterschieden werden.

**Formel 6: Reaktionsgleichung der ALDH**

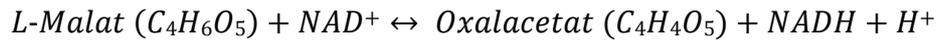
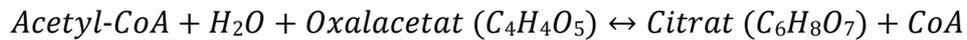
Der Testansatz zur ALDH setzte sich aus 1000  $\mu\text{mol}$   $\text{KPO}_4$ -Puffer, 150  $\mu\text{mol}$  Pyrazol, 4  $\mu\text{mol}$  Dithiothreitol, 100  $\mu\text{mol}$  KCl, 4  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$  und 1  $\mu\text{mol}$  Acetaldehyd als Startersubstanz zusammen.

ACS:

Bei der Aktivitätsbestimmung der ACS handelte es sich ebenfalls um eine gekoppelte Enzymreaktion, welche die notwendige Umsetzung von  $\text{NAD}^+$  in Abhängigkeit der ACS-Aktivität katalysieren. Dabei bildeten 100  $\mu\text{mol}$  Tris-HCl, 10  $\mu\text{mol}$  L-Malat, 0,2  $\mu\text{mol}$  Coenzym A, 8  $\mu\text{mol}$  ATP, 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NAD}^+$ , 100  $\mu\text{mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 3 U L-Malat Dehydrogenase und 0,4 U Citrat Synthase den Testansatz. Gestartet wurde die Messung durch die Zugabe von 100  $\mu\text{mol}$   $\text{K}^+$ -acetat als Substrat.

**Formel 7: Reaktionsgleichung der ACS**

Die für die Messung erforderlichen Enzymreaktionen der Citrat Synthase und der L-Malat Dehydrogenase sind in der Formel 8 dargestellt.

**Formel 8: Gekoppelte Enzymreaktion zur Messung der ACS**

Aus den resultierenden Enzymaktivitäten wurde zusätzlich die Berechnung des Verhältnisses G/V (Verhältnis der Schlüsselenzyme aus dem Gärungsstoffwechsel zu den Enzymen des PDH-Bypasses) nach folgender Formel vorgenommen:

$$\text{Verhältnis } G/V = \frac{\text{Aktivität } PDC \left[ \frac{U}{mg} \right] + \text{Aktivität } ADH \left[ \frac{U}{mg} \right]}{\text{Aktivität } ALDH \left[ \frac{U}{mg} \right] + \text{Aktivität } ACS \left[ \frac{U}{mg} \right]}$$

### 3.2.2 Flusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ist in den letzten Jahren als zuverlässige Schnellmethode zur Beurteilung von Mikroorganismen besonders in den klinischen Anwendungen mehr und mehr zum Einsatz gekommen. Dabei werden ausgewählte Zellinhaltsstoffe fluorochromiert und anschließend quantitativ flusszytometrisch erfasst. Mittels dieser schnellen Charakterisierung des Zellzustandes können auch in der Brauerei verschiedene Parameter, wie z.B. die spezifische Belüftungsrate bei der Hefeherführung, innerhalb der einzelnen Prozessabläufe angepasst und so die Leistungsfähigkeit der Hefe gesteigert werden. Innerhalb der Reinzucht- und Anstelltechnologie kann so die Vermehrungsaktivität erhöht, und bereits vor dem eigentlichen Anstellen auf die physiologischen Grundlagen für eine stabile und optimale Gärung hingearbeitet werden (Müller, 1999).

Für die flusszytometrischen Analysen der Zellinhaltsstoffe der Hefen kamen zwei verschiedene Durchflusszytometer zum Einsatz. Einerseits wurde mit einem *Coulter EPICS XL-MCL*, andererseits mit einem *Cell Lab Quanta SC* gearbeitet. In der Abbildung 15 ist schematisch der optische Aufbau eines Durchflusszytometers dargestellt.

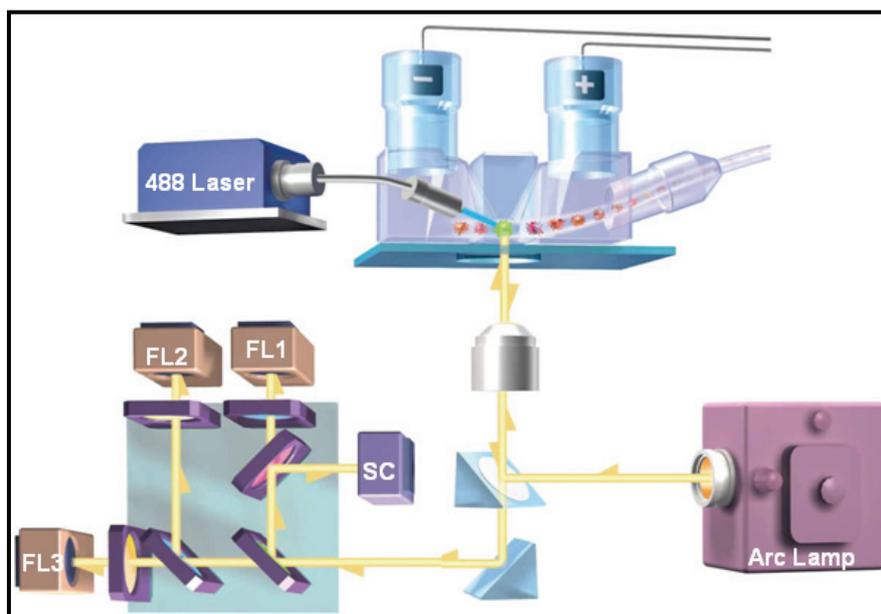


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers

Zu den wichtigsten Komponenten eines Durchflusszytometers gehören die Lichtquellen (Argon-Laser  $\lambda_{\text{ex}}=488$  nm und Quecksilberdampfampe  $\lambda_{\text{ex}}=365$  nm, 405 nm und 435 nm), die den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff in der Flusszelle anregen. In dieser werden die Hefen nach der Probenaufgabe mittels eines Hüllstroms hydrodynamisch vereinzelt. Die dabei auftretenden laminaren Strömungsverhältnisse verhindern eine Mischung der Probenflüssigkeit mit der Hüllflüssigkeit. Beim *Cell Lab Quanta SC* ist die trianguläre Flusszelle zusätzlich mit einer exakten Volumenmessung nach Prinzip des *Coulter Volumens* ausgestattet. Das sonst im FSC aufgefangene optische Signal, das als Maß für die Größe galt,

ist hier durch eine elektrische Widerstandsmessung ersetzt. Das von der Zelle verdrängte Volumen an Elektrolyt ist als direkt proportionaler Spannungsimpuls messbar.

Die emittierten Fluoreszenzsignale werden von dort über die optischen Filter zur Auswertung geleitet. Die flexibel gestaltbaren Filtereinsätze teilen (dichroitische Filter) oder begrenzen (Emissionsfilter) das emittierte optische Signal und leiten es zu den entsprechenden Photomultiplier-Detektoren (PMT, Sekundärelektronenvervielfacher) weiter. Dort wird das entsprechende Signal verarbeitet und in digitaler Form an die Auswerte-Software weitergeleitet. Die Detektoren können ein Spektrum von violett bis tiefrot aufnehmen (*BeckmanCoulter*).

Für die flusszytometrischen Analysen wurden jeweils 2 ml Probenmaterial mit 8 ml 70%-igem Ethanol fixiert. Die fixierten Proben wurden bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert. Zur fluoreszenzoptischen Visualisierung der Inhaltsstoffe werden diese mit entsprechenden Reagenzien markiert. Die DNA der Hefezellen wurde mittels Phenanthridium-Derivaten ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ ) oder DAPI ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$ ) angefärbt. Diese interkalierenden Farbstoffe lagern sich zwischen übereinanderliegenden Basenpaare doppelsträngiger DNA an. Da sich der Farbstoff PI auch an die doppelsträngige t-RNA im Zytoplasma anlagert, muss diese zuvor enzymatisch durch eine RNase bei 37 °C und einer Inkubationszeit von 60 min eliminiert werden. Bei der Auswertung der flusszytometrischen Analysedaten lassen sich die diploiden u.g. Hefezellen innerhalb der Population in die unterschiedlichen Fraktionen der Vermehrung einteilen. Die Ergebnisse liefern eine zuverlässige Aussage über die Vermehrungsaktivität einer Hefepopulation. Dabei kann, wie in der Abbildung 16 dargestellt, zwischen der  $G_0/G_1$ -Phase, der S-Phase und die  $G_2 + M$ -Phase unterschieden werden (*Hutter, 2001*).

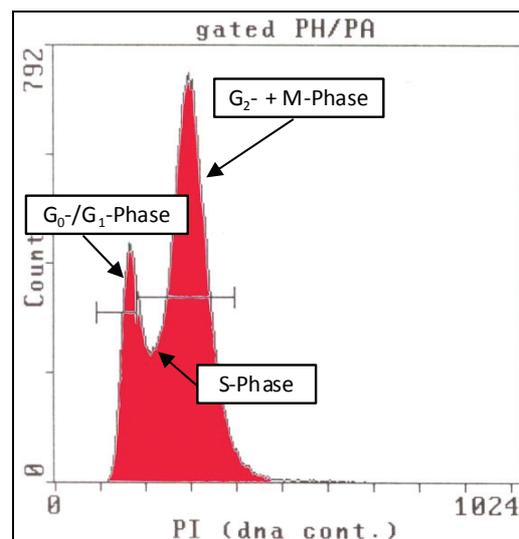
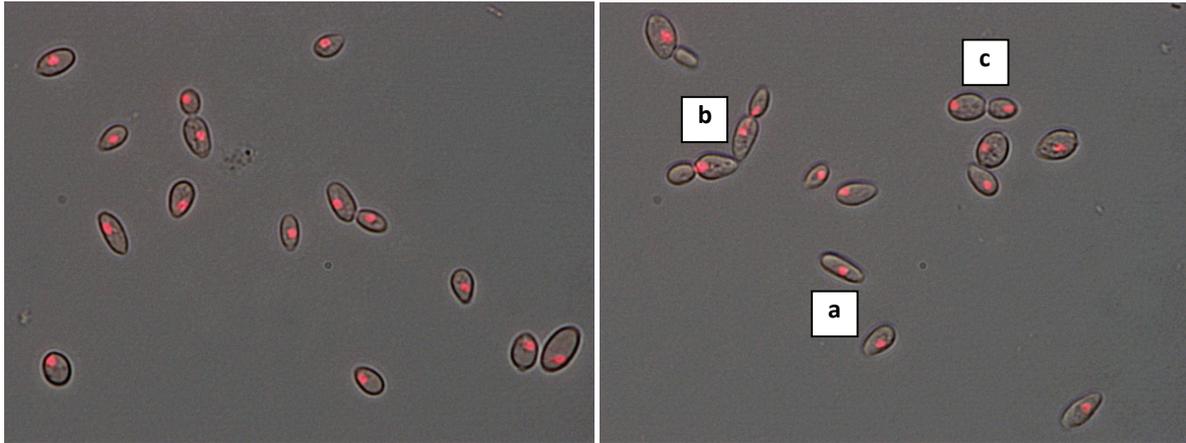


Abbildung 16: Graphische Darstellung der DNA-Verteilung einer u.g. Hefepopulation

Diese Differenzierung ist bei der flusszytometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes für o.g. Brauereihefen nicht präzise möglich, da sich die DNA-Häufigkeitsverteilung der einzelnen

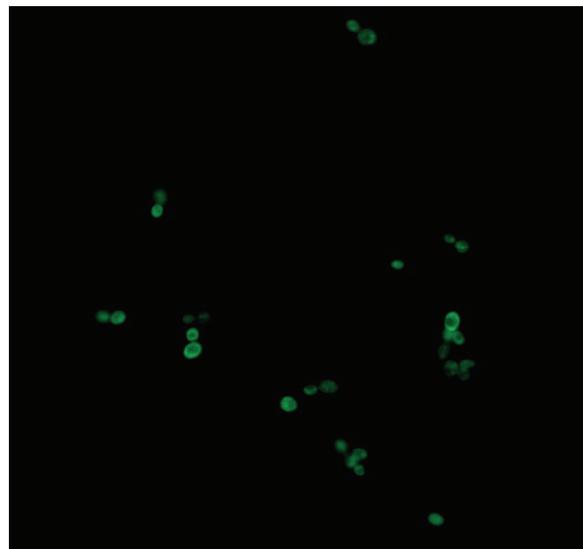
polyploiden Klone überlappt. Dabei kommt es zu mehreren Peaks, unter denen sich Hefezellen mit unterschiedlichen DNA-Gehalten rekrutieren.

Die Abbildung 17 zeigt Hefezellen, deren Erbgut mit PI-Lösung angefärbt wurde. Im linken Bild der Abbildung sind hauptsächlich einzelne Zellen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase zum Beginn des Anstellens zu sehen (Hutter, 1993). Im rechten Bild sieht man die Hefezellen in der logarithmischen Phase. Es lassen sich hier alle Stadien der Vermehrung von der Mutterzelle (a) über die Teilung des Erbgutes (b) bis zu der noch verbundenen Mutter- und Tochterzellen (c) erkennen.



**Abbildung 17: DNA-Färbung zur flusszytometrischen Messung**

Der intrazelluläre Speicherstoff Glykogen der Hefezellen wurde für die flusszytometrische Messung mit dem Schiffschenschen Reagenz angefärbt. Dabei ist Acriflavin ( $\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ) als Fluoreszenzfarbstoff für die grüne Färbung des Glykogens in den Hefezellen verantwortlich (s. Abbildung 18). Um die Färbung der Hefezellen zu ermöglichen, mussten diese bei der Probenaufbereitung für 10 min mit einer Oxidationslösung (2,2 mM Periodische Säure) inkubiert werden (Hutter, 2000).



**Abbildung 18: Glykogenfärbung zur flusszytometrischen Messung**

Als weiterer Speicherstoff konnten die Neutrallipide erfasst werden. Dies geschah, wie die Abbildung 19 zeigt, durch die Reaktion mit dem Färbereagenz Nilrot ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 635 \text{ nm}$ ), das chemisch dem Benzophenon zuzuordnen ist. Der Färbemechanismus ist nicht vollständig geklärt. Es scheint aber mehr eine Einlagerung in die Lipidtröpfchen zu sein als eine kovalente Bindung an die Lipide (Hutter, 2000).

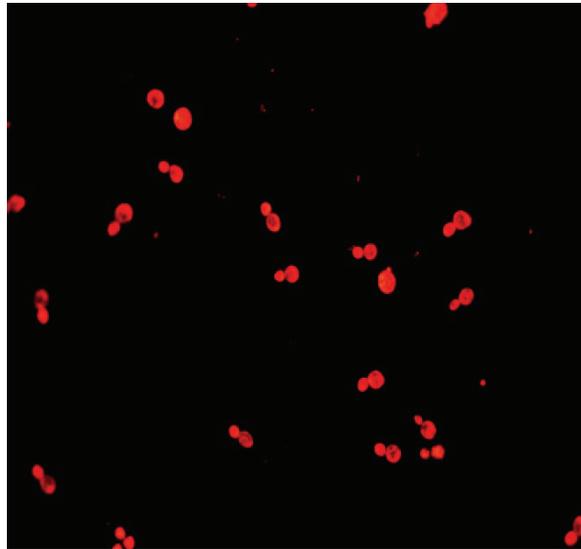


Abbildung 19: Neutrallipidfärbung zur flusszytometrischen Messung

Die Messung der Trehalose basiert auf Basis der Färbung mit Lectin-Fluorescein isothiocyanate (Con A FITC:  $\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$ ) (Hutter, 2000).

### 3.2.3 Sonstige brautechnische Analysen

Zellen in Schwebelösung, MEBAK III, 10.11.4.4

pH Wert nach MEBAK II 2.14

Extrakt, Stammwürze nach MEBAK II, 2.10.2.3

Gärungsnebenprodukte nach MEBAK III 1.1.1/1.2.1 (Headspace)

Alterungsindikatoren (lehrstuhleigene Methode GC Nr. 007/96) (Kaltner, 2000)

Schaumstabilität, MEBAK II, 2.19.4

Aminosäuren in Würze und Bier (FAN) MEBAK III, 3.3

### 3.2.4 Hinweise zur Berechnung des Vergärungsgrades und der Gärleistung

Berechnung des Vergärungsgrades:

**Formel 9: Berechnung des scheinbaren Vergärungsgrades**

$$VG = 100 - \frac{\text{Extraktgehalt}_{(\text{scheinbar})} [GG - \%] * 100}{\text{Stammwürze} [GG - \%]}$$

Berechnung der Gärleistung (*Wellhoener, 2006*):

**Formel 10: Berechnung der GL der Hefe**

$$GL = \frac{\text{Extrakt}_{T_2} [GG - \%] - \text{Extrakt}_{T_1} [GG - \%]}{\frac{ZiS_{T_1} \left[ \text{Mio.} \frac{Z}{\text{ml}} \right] + ZiS_{T_2} \left[ \text{Mio.} \frac{Z}{\text{ml}} \right]}{2}}$$

### 3.3 Versuchsplanungen und Versuchsdurchführungen

#### 3.3.1 Versuche zur Ermittlung der oxidativen Belastung der Würze und der Sauerstoffzehrung der Hefe

Die im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen sind zur Ermittlung der Sauerstoffzehrung in Abhängigkeit der Würzebelüftung und des physiologischen Zustand der Hefe durchgeführt worden. Die anschließende Berechnung der O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe erfolgte dabei auf Basis der in der Formel 11 dargestellten Gleichung.

**Formel 11: Berechnung der O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe im Gärtank**

$$O_2\text{-Zehrung } [\mu\text{g O}_2/\text{Mio. Z} * \text{min}] = \frac{\beta(O_2)t_2 - \beta(O_2)t_1}{\Delta Z_i S}; \text{ mit } \Delta Z_i S = Nt_1 + \frac{Nt_2 - Nt_1}{2}$$

Diese Zehrung lässt sich weiterhin mit einem Richtwert von durchschnittlich 40 Mio. Z/ml pro g HTS-Zuwachs auf die Trockensubstanz der als mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h beziehen und dadurch mit denen in der Literatur angegebenen Werten vergleichen. Dabei werden jedoch die Größenverteilung der Population in Abhängigkeit der Wachstumsphasen, etwaiger morphologische Unterschiede verschiedener Hefestämme und die Granularität in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes der Hefe vernachlässigt und die berechneten Sauerstoffaufnahmeleistungen können ebenfalls nur als Richtwerte betrachtet werden.

- Ermittlung der oxidativen Belastung der Würze:

Zur Ermittlung der oxidativen Belastung der Würze während des Anstellvorgangs wurde der Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen in Abhängigkeit der Hefezugabe bestimmt. Hierzu wurden in einem parallel geführten Versuchsaufbau die Ausschlagwürzen bis zum Erreichen einer Sauerstoffkonzentration von ca. 6 – 8 mg/l O<sub>2</sub> bei ca. 10 °C belüftet und anschließend in EBC-Gärröhren eingebracht. Bei jeweils einem der Ansätze erfolgte eine Hefegabe von 15 Mio. Z/ml (**Bez. T1 und T2**), während der Andere (**Bez. T3 und T4**) ohne Hefezugabe verblieben. Über die eingebrachten Sauerstoffsonden wurde der Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen bis zur vollständigen Aufzehrung durch die Hefe aufgezeichnet. Die auf Basis der Zehrungszeit und Zellkonzentration ermittelte O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe ermöglicht die Berechnung der oxidativen Belastung der Würze während des Anstellvorgangs.

- Ermittlung der O<sub>2</sub>-Zehrung in Abhängigkeit der Druckbeaufschlagung des Gärtanks

Um die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe während der Angärphase in Abhängigkeit der Druckbeaufschlagung eines Gärtanks zu erfassen, wurde in einem parallel geführten Versuchsaufbau jeweils eine der folgenden Variationen mit einer in einem offenen Behälter (Bez. EBC-GR2, EBC-GR4 und EBC-GR6) durchgeführten Angärung verglichen:

- ✓ Geschlossener Gärtank (**Bez. EBC-GR1**)
- ✓ Druckbeaufschlagung p<sub>ü</sub> = 0,5 bar mit Luft im Kopfraum (**Bez. EBC-GR3**)
- ✓ Druckbeaufschlagung mit p<sub>ü</sub> = 0,5 bar mit Stickstoff im Kopfraum (**Bez. EBC-GR5**)

Die Hefegabe erfolgte mit 15 Mio. Z/ml in die vorab mit ca. 8 mg/l O<sub>2</sub> bei 10 °C belüfteten Würzen. Die einbrachten Sauerstoffsensoren zeichneten die Sauerstoffkonzentrationen in den Gärtank bis zur vollständigen Zehrung der Hefe auf.

- Untersuchungen zum Einfluss des Propagationsprozesses und der Lagerzeit auf die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe

Zur Ermittlung der O<sub>2</sub>-Zehrung während der Angärphase in Abhängigkeit des vorgeschalteten Propagationsprozesses wurde die Sauerstoffaufnahme der Hefe aus einer mit ca. 8 mg/l O<sub>2</sub> belüfteten Würze jeweils vor und nach der Propagation bestimmt. Die dazu notwendige Propagation wurde in einem 5 l-Maßstab durchgeführt und die Hefen von einer Anstellkonzentration von 15 Mio. Z/ml auf 120 Mio. Z/ml bei 16 °C vermehrt. Die Gärversuche fanden bei einer Temperatur von 10 °C statt und wurden mit einer Zellkonzentration von 15 Mio. Z/ml durchgeführt.

Um mögliche Veränderungen in der O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe über die Lagerzeit bis zu einem erneuten Anstellen zu untersuchen, erfolgten zwei Versuchsreihen (Bez. LZ 1 und LZ 2). Dabei wurde jeweils die Sauerstoffaufnahme durch die Hefe während der Angärung aus einer mit ca. 8 mg/l O<sub>2</sub> belüfteten Würze am 1., 2., 3., 6. und 7. Tag der Lagerung bei 10 °C gemessen. Die Konzentration der Hefezellen in der Würze betrug dabei 15 Mio. Z/ml.

- Ermittlung der O<sub>2</sub>-Konzentration im Gärtank und der O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe während des Anstellvorgangs bei verschiedenen Drauflassverfahren

Um die Auswirkungen der Würzebelüftung (8 mg/l O<sub>2</sub>) auf die resultierende Sauerstoffkonzentration im Jungbier und die O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe bei einem Drauflassverfahren zu untersuchen, wurden in dieser Versuchsreihe die nachfolgenden Variationen des Anstellvorgangs mit 4 Suden pro Tank und einem Sudrhythmus von 2,5 h durchgeführt und der Verlauf der Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet.

- ✓ Alle vier Sude belüftet (**Bez. S1-4**)
- ✓ Sud 1 belüftet, Sud 2, 3 und 4 unbelüftet (Ergebnisse nicht dargestellt)
- ✓ Sud 1 und 2 belüftet, Sud 3 und 4 unbelüftet (**Bez. S1+2**)
- ✓ Sud 1, 2 und 3 belüftet, Sud 4 unbelüftet (**Bez. S1-3**)
- ✓ Sud 1 und 4 belüftet, Sud 2 und 3 unbelüftet (**Bez. S1+4**)

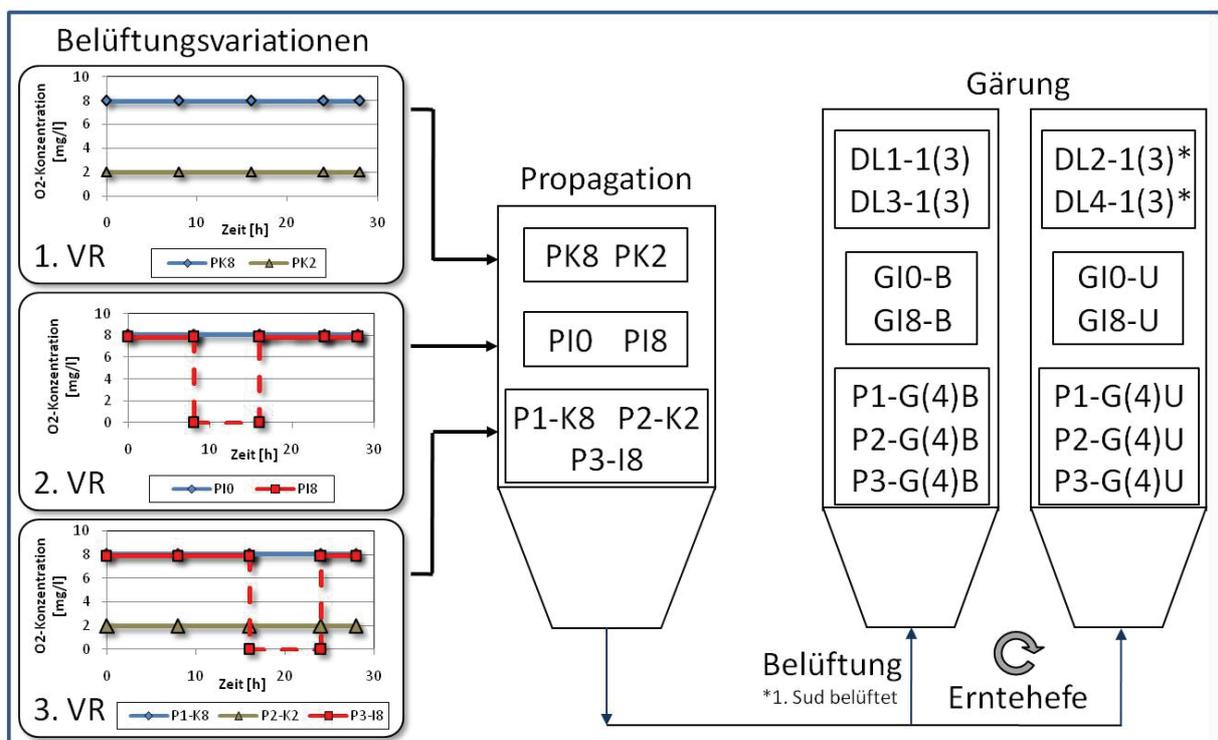
Dabei wurden die Würzen bei einer Temperatur von 10 °C bis zu einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l belüftet. Die auf den vollgefüllten Gärtank berechnete Hefegabe von 15 Mio. Z/ml erfolgte bei allen Versuchen vollständig zum ersten Sud.

Zusätzlich wurden von der Praxis abgewandelte Belüftungsversuche beim Drauflassverfahren unternommen und die Sauerstoffabnahme im Gärtank ermittelt, um deren Auswirkungen auf die Hefephysiologie und das resultierende Gärverhalten zu untersuchen. Dabei wurde einerseits eine forcierte Belüftung der Würzen simuliert, die in einer effektiven Sauerstoffkonzentration von 8 mg/l O<sub>2</sub> nach jedem draufgelassenen Sud im Gärtank resultiert und andererseits die Belüftung an der O<sub>2</sub>-Konzentration im Gärtank orientiert. Dabei wurde jeweils der gesamte Gärtankinhalt unabhängig vom Sudrhythmus bei

Unterschreiten einer O<sub>2</sub>-Konzentration im Jungbier von 1 mg/l wieder auf 8 mg/l O<sub>2</sub> belüftet. Die Belüftung wurden in drei parallelen Versuchen für 2,5 h (**Bez. VRB2,5**), 5 h (**Bez. VRB5**) und 7,5 h (**Bez. VRB7,5**) bei einer auf den gesamten Tankinhalt berechneten Anstellkonzentration von ebenfalls 15 Mio. Z/ml und einer Temperatur von 10 °C aufrechterhalten.

### 3.3.1 Propagations- und Gärversuche zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs und des physiologischen Zustands der Hefe in der Brauerei

Die durchgeführten Versuchsreihen zum Sauerstoffbedarf und dem physiologischen Zustand der Hefe während der Propagation und zum Einfluss des Propagationsprozesses auf die Gäreigenschaften der Hefe und die resultierende Bierqualität lassen sich nicht zu Letzt aufgrund der erzielten Zwischenergebnisse in drei, in der Abbildung 20 graphisch dargestellte, Versuchsreihen gliedern.



**Abbildung 20: Versuchsreihen (VR) zum Einfluss des Propagationsprozesses auf den physiologischen Zustand der Hefe, sowie deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität in Abhängigkeit der Würzebelüftung**

- Aufbau und Durchführung der 1. Versuchsreihe zum Einfluss des Propagationsprozesses auf den physiologischen Zustand der Hefe, deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss des Sauerstoffs auf die Hefephysiologie während der Propagation bei einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium von 2 und 8 mg/l untersucht. Die beiden im 10 l Maßstab parallel durchgeführten Propagationsansätze (Bez. **PK2** und **PK8**) wurden dabei sowohl hinsichtlich der Hefezellzahlentwicklung, der Extraktabnahme und des pH-Wertes als auch mittels der Enzymaktivitätsmessung und der

flusszytometrischen Analyse auf die Veränderungen im physiologischen Zustand der Hefe untersucht. Zur Beurteilung der Jungbierqualität sind ebenfalls die GNP-Spektren analysiert worden. Zusätzlich erfolgten bei diesen Propagationsversuchen Untersuchungen zur Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe. Die Zeitpunkte der Probenahme mit den dazugehörigen Analysen sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Probenahme- und Analysenplan der Versuche PK8 und PK2

| Proben-Nr.                  | PK8-A | PK8-B | PK8-C | PK8-D | PK8-E |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                             | PK2-A | PK2-B | PK2-C | PK2-D | PK2-E |
| Zeit [h]                    | 0     | 7     | 12    | 24    | 27    |
| Extrakt, pH, ZiS            | •     | •     | •     | •     | •     |
| Enzymaktivitätsmessung      | •     | -     | •     | •     | -     |
| Trehalose und Neutrallipide | •     | •     | •     | •     | •     |
| Zellzyklusanalyse           | -     | -     | -     | -     | •     |
| FAN/AS-Spektrum             | •     | •     | •     | •     | •     |

Mit denen in den Versuchen PK8 und PK2 hergeführten Hefen wurden im Weiteren jeweils zwei Gärversuche (Bez. **DL3**, **DL4** aus PK8 und **DL1**, **DL2** aus PK2) über drei Führungen (Bez. **DL(X)-1** bzw. **DL(X)-3**) im Drauflassverfahren unternommen. Dabei wurden sowohl die Gäreigenschaften der Hefe mit Hilfe von Extraktabnahme, Hefewachstum und pH-Verlauf erfasst als auch die Aufnahme der Aminosäuren in Abhängigkeit des Propagationsprozesses untersucht. Um einen möglichen Einfluss der Würzebelüftung bei der Aminosäureverwertung zu erkennen, wurde zusätzlich die Belüftung der mit 3 Suden und einem Sudrhythmus von 3 h im 30 l Maßstab angestellten Gärungen variiert. Bei den Gärungen DL2 und DL4 erfolgte die Belüftung aller Sude, wo hingegen bei DL1 und DL3 nur die jeweils ersten Sude belüftet wurden. Die Anstelltemperatur betrug 9 °C und die Hauptgärtemperatur 12 °C. Die auf den gesamten Tankinhalt berechnete Hefegabe von 15 Mio. Z/ml erfolgte vollständig zum ersten Sud.

Nach der Hauptgärung wurden die Biere mit einem Restextrakt von 10% über EVG geschlaucht und 7 Tage bei 4 °C gereift. Anschließend lagerten die Biere 3 Wochen bei 0 °C. Nach der Filtration erfolgte die Abfüllung der Biere auf 0,5 l NRW-Flaschen. Im Anschluss fand eine Verkostung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG statt. Zudem wurden die GNP-Spektren der Biere analysiert und nach einer Lagerzeit von 6 Monate die Konzentrationen der Alterungsindikatoren bestimmt.

- Aufbau und Durchführung der 2. Versuchsreihe zum Einfluss des Propagationsprozesses auf den physiologischen Zustand der Hefe, deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung aus den Propagationsversuchen PK2 und PK8 lieferten die Grundlage für die 2. Versuchsreihe zum Einfluss der Belüftungsstrategie bei der

Propagation auf den physiologischen Zustand der Hefe. In dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkungen von Belüftungspausen und den resultierenden anaeroben Phase von 4 h (Ergebnisse nicht dargestellt) und 8 h (Bez. **PI8**) auf die Hefephysiologie bei der Propagation im Vergleich zu einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium von 8 mg/l O<sub>2</sub> (Bez. **PI0**) getestet (vgl. Abbildung 20). Während der Belüftungsphasen der Intervallpropagationen wurde ebenfalls eine O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l eingestellt. Neben der Extraktabnahme, dem Verlauf der ZiS und dem pH-Wert wurden während der Propagationen die Enzymaktivitätsmessungen zur Beurteilung des physiologischen Zustandes der Hefe herangezogen. Die Propagationsversuche wurden im 120 l Maßstab durchgeführt. Die Anstellkonzentration der Hefe betrug 15 Mio. Z/ml und die Propagationstemperatur lag bei 15 °C.

Bei denen im Anschluss durgeführten Versuchsgärungen im Batchverfahren zu den Gäreigenschaften der Hefen wurde ebenfalls die Würzebelüftung variiert. Dabei wurde die Würze bei jeweils einer der im 20 l Maßstab durchgeführten Gärungen (**PI0-B** und **PI8-B**) bis zu einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l belüftet, während bei den verbleibenden Gärungen (**PI0-U** und **PI8-U**) vollständig auf eine Würzebelüftung verzichtet wurde. Die Gärungen wurden mit 15 Mio. Z/ml angestellt und bei einer Temperatur von 12 °C durchgeführt. Um die resultierenden Gäreigenschaften der Hefe bewerten zu können, wurden der Extraktabbau, die ZiS und der pH-Verlauf während der Gärungen erfasst.

Nach der Hauptgärung wurden die Biere mit einem Restextrakt von 10% über EVG geschlaucht und 7 Tage bei 4 °C gereift. Anschließend lagerten die Biere 3 Wochen bei 0 °C. Nach der Filtration erfolgte die Abfüllung der Biere auf 0,5 l NRW-Flaschen. Im Anschluss fand eine Verkostung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG statt. Zudem wurden die GNP-Spektren der Biere analysiert und nach einer Lagerzeit von 12 Monate die Konzentrationen der Alterungsindikatoren bestimmt.

- Aufbau und Durchführung der 3. Versuchsreihe zum Einfluss des Propagationsprozesses auf den physiologischen Zustand der Hefe, deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität

Die im Anschluss durchgeführte dritte Versuchsreihe sollte einerseits weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Prozessvariation bei der Propagation auf den physiologischen Zustand der Hefe und ihrer Gäreigenschaften geben und andererseits den Einfluss der Hefephysiologie und der Würzebelüftung auf die Qualität der resultierenden Biere über mehrere Führungen aufzeigen. Die Belüftung der ersten beiden Propagationen (Bez. **P1-K8** und **P2-K2**) wurde dabei wiederum auf eine kontinuierliche O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium von 8 und 2 mg/l eingestellt. Im Gegensatz zu der Intervallbelüftung des Versuchsaufbaus von PI8 wurde die 8stündige Belüftungspause der dritten Propagation (Bez. **P3-I8**) aufgrund der erzielten Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen aus PI8 in das letzte Drittel des Propagationsprozesses verschoben, so dass in dem Zeitraum von 16 bis 24 h eine anaerobe Phase eingehalten wurde. Bei den Propagationen wurde neben der Enzymaktivitätsmessung die flusszytometrische Analyse des Zellzyklus der Hefe in die Beurteilung der Hefephysiologie

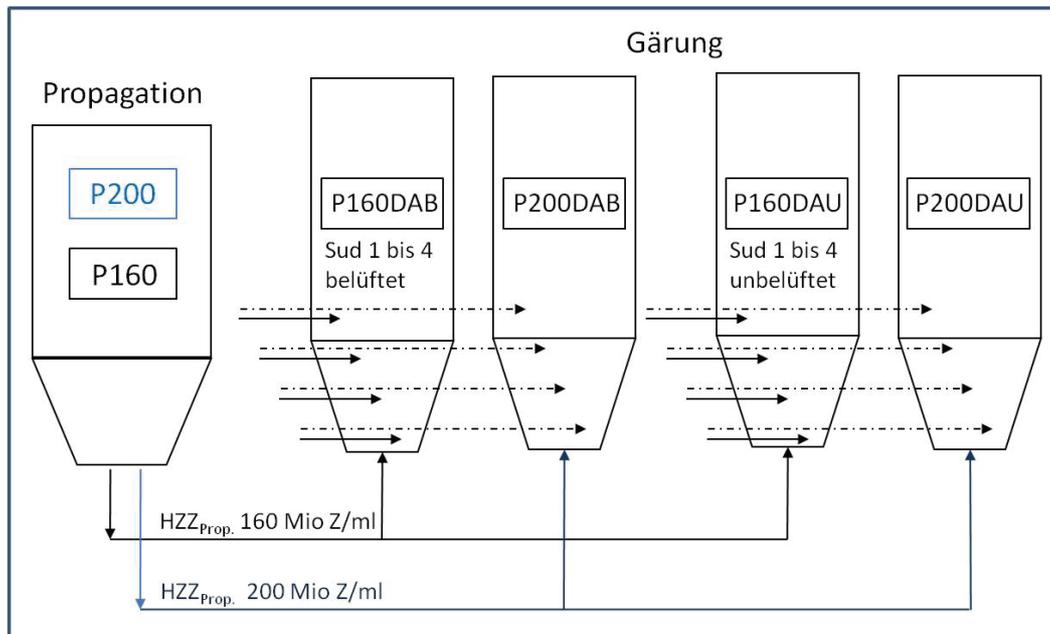
einbezogen. Die Propagationen der Hefen erfolgten in einem 120 l Propagator und die Zellen wurden von 15 Mio. Z/ml auf 100 Mio. Z/ml über einen Zeitraum von ca. 28 bis 30 h vermehrt. Die Propagationstemperatur betrug 15 °C.

| Proben-Nr.                  | PK8-A | PK8-B | PK8-C | PK8-D | PK8-E |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                             | PK2-A | PK2-B | PK2-C | PK2-D | PK2-E |
| Zeit [h]                    | 0     | 7     | 12    | 24    | 27    |
| Extrakt, pH, ZiS            | •     | •     | •     | •     | •     |
| Enzymaktivitätsmessung      | •     | -     | •     | •     | -     |
| Trehalose und Neutrallipide | •     | •     | •     | •     | •     |
| Zellzyklusanalyse           | -     | -     | -     | -     | •     |
| FAN/AS-Spektrum             | •     | •     | •     | •     | •     |

Mit den so hergezogenen Hefen wurden wiederum jeweils zwei Gärversuche (Bez. **P(X)-G**) über vier Führungen (Bez. **P(X)-G1** bis **4**) ebenfalls in belüfteter und unbelüfteter Würze (Bez. **P(X)-G(X)B** und **P(X)-G(X)U**) im Batchverfahren durchgeführt. Die Gärungen wurden mit 15 Mio. Z/ml angestellt und bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Um die resultierenden Gäreigenschaften der Hefe bewerten zu können, wurden der Extraktabbau, die ZiS und der pH-Verlauf während der Gärungen erfasst. Für die Beurteilung des physiologischen Zustandes der Hefe wurde neben der Enzymaktivitätsmessung auch die flusszytometrische Analyse des Zellzyklus einbezogen. Dabei wurden die in dargestellten Analysen auf die 1. und 4. Führung begrenzt.

Nach der Hauptgärung wurden die Biere mit einem Restextrakt von 10% über EVG geschlaucht und 7 Tage bei 4 °C gereift. Anschließend lagerten die Biere 3 Wochen bei 0 °C. Nach der Filtration erfolgte die Abfüllung der Biere auf 0,5 l NRW-Flaschen. Im Anschluss fand eine Verkostung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG statt. Zudem wurden die GNP-Spektren der Biere analysiert und nach der forcierten Alterung die Konzentrationen der Alterungsindikatoren bestimmt.

Um den Einfluss einer intensiven Hefepropagation auf den physiologischen Zustand der Hefe und die resultierenden Gäreigenschaften sowie die Auswirkungen auf die Bierqualität zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsreihe unternommen, bei der die Hefe bis zu Zellzahlen von 160 und 200 Mio. Z/ml (Bez. **P160** und **P200**) propagiert worden. Die Propagationen fanden im 5 l Maßstab bei einer Temperatur von 15 °C mit einer Anstellkonzentration von 10 Mio. Z/ml statt. Der Versuchsaufbau ist in der Abbildung 21 graphisch dargestellt.



**Abbildung 21: Versuchsaufbau zum Einfluss einer intensiven Hefepropagation auf den physiologischen Zustand und die Gäreigenschaften der Hefe sowie die resultierende Bierqualität in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Draufflasverfahren**

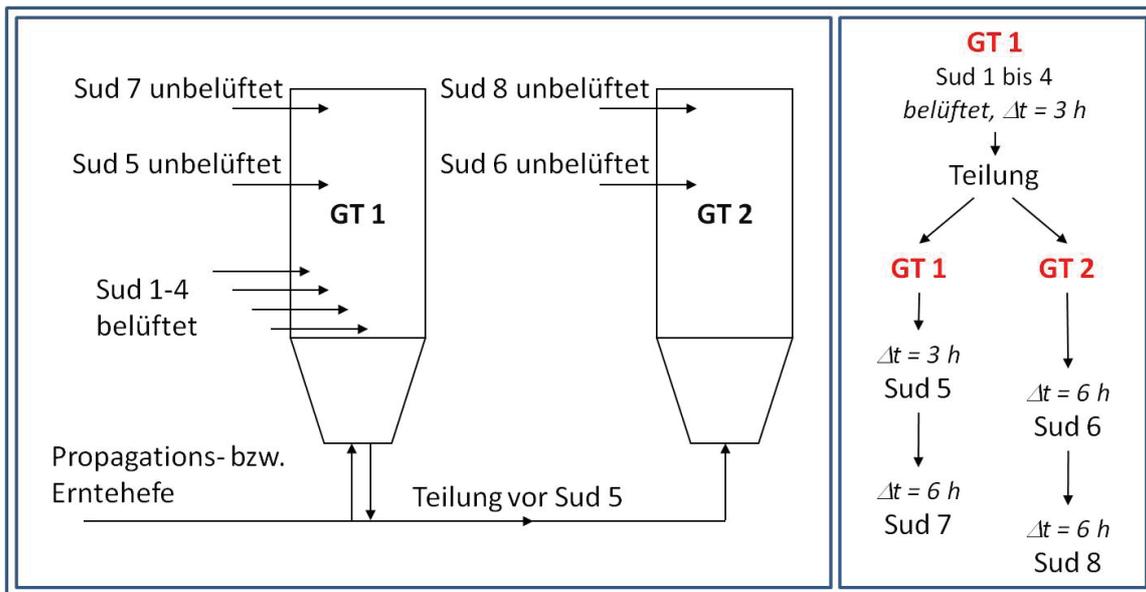
Die nachfolgenden Versuchsgärungen wurden als Draufflasverfahren mit 4 Suden und einem Sudrhythmus von 2,5 h im 20 l Maßstab durchgeführt. In Abhängigkeit der Zellzahlkonzentration im Propagator wurden jeweils zwei Gärungen mit einerseits der Belüftung aller Sude (**P160DAB** und **P200DAB**) und andererseits dem Verzicht der Würzebelüftung (**P160DAU** und **P200DAU**) angestellt. Die auf den gesamten Tankinhalt berechnete Hefegabe von 15 Mio. Z/ml erfolgte vollständig zum ersten Sud und die Gärtemperatur betrug 12 °C.

Nach der Hauptgärung wurden die Biere mit einem Restextrakt von 10% über EVG geschlaucht und 7 Tage bei 4 °C gereift. Anschließend lagerten die Biere 3 Wochen bei 0 °C. Nach der Filtration erfolgte die Abfüllung der Biere auf 0,5 l NRW-Flaschen. Im Anschluss fand eine Verkostung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG statt. Zudem wurden die GNP-Spektren der Biere analysiert und nach der forcierten Alterung die Konzentrationen der Alterungsindikatoren bestimmt.

### 3.3.2 Weitere Gärversuche zur Erfassung des physiologischen Zustandes und Sauerstoffbedarfs der Hefe

- Untersuchungen zum Einfluss des Sudrhythmus und mehrmaligen Führens auf den physiologischen Zustand der Hefe

Um die Auswirkungen von Variationen im Sudrhythmus auf die Hefephysiologie zu untersuchen, wurde ein Kräusenverfahren nach dem in der Abbildung 22 graphisch dargestellten Versuchsaufbau durchgeführt.

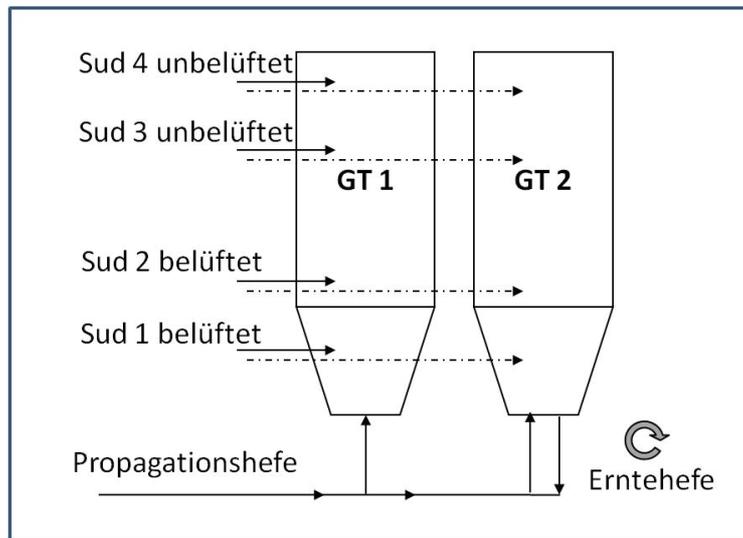


**Abbildung 22: Versuchsaufbau des Kräusenverfahrens zum Einfluss des Sudrhythmus auf die Hefephysiologie**

Hierbei wurde zuerst der GT1 (**Bez. SR3-3-3-6**) mit vier bis auf 8 mg/l O<sub>2</sub> belüfteten Suden gefüllt. In Anschluss fand eine 50%ige Teilung des Tankinhalts von GT1 in GT2 (**Bez. SR3-3-6-6**) statt. Die nachfolgenden Sude wurden jeweils wechselseitig in die beiden Tanks gelassen, so dass sich für GT1 Sudrhythmen von 3 und 6 h und für GT2 Pausen von jeweils 6 h bis zum nächsten Sud ergaben. Bei denen nach der Teilung drauf gelassenen Suden wurde auf eine erneute Belüftung verzichtet. Die auf die gesamten Tankinhalte berechnete Hefegabe von 15 Mio. Z/ml erfolgte vollständig zum ersten Sud und die Gärtemperatur betrug 12 °C.

In einem parallel durchgeführten Gärversuch zum Einfluss mehrmaligen Führens der Hefe auf den physiologischen Zustand der Hefe, konnte gleichzeitig die Auswirkungen der Drauflasszeitpunkte eines konventionellen Drauflassverfahrens (**Bez. SR-3-3-3-3**) mit in die Untersuchungen zum Sudrhythmus eingezogen werden.

Hierzu wurden vorab Hefe von 15 Mio. Z/ml auf 120 Mio. Z/l bei 15 °C im 5 l Maßstab bei 15 °C und kontinuierlicher Belüftung propagiert und anschließend zum Anstellen eines Drauflassverfahrens mit zwei belüfteten und zwei unbelüfteten Suden genutzt (vgl. Abbildung 23)



**Abbildung 23: Versuchsaufbau zu möglichen Veränderungen in der Hefephysiologie im Drauflassverfahren über vier Führungen**

- Untersuchungen der Enzymaktivitäten verschiedener Hefestämme, deren Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität

Um die Effektivität der Steuerungsparameter auf die Hefephysiologie, die Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität in den übrigen Versuchsreihen mit dem Stamm W 34/78 besser bewerten zu können, sollten die möglichen Unterschiede durch einen Einsatz anderer Hefestämme betrachtet werden. Hierzu wurden neben dem Stamm W 34/78 fünf weitere Hefestämme (vgl. Kap. 4.4.1) in konventionell belüfteten Gärungen im Batchverfahren auf Unterschiede in den Enzymaktivitäten, ihre Gäreigenschaften und deren Auswirkungen auf die GNP-Bildung und die Bierqualität hin untersucht. Die Gärungen wurden mit einer Hefekonzentration von 15 Mio. Z/ml angestellt und bei einer Temperatur von 12 °C durchgeführt.

Nach der Hauptgärung wurden die Biere mit einem Restextrakt von ca. 10% über EVG geschlaucht und 7 Tage bei 4 °C gereift. Anschließend lagerten die Biere 3 Wochen bei 0 °C. Nach der Filtration erfolgte die Abfüllung der Biere auf 0,5 l NRW-Flaschen. Im Anschluss fand eine Verkostung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG statt. Zudem wurden die GNP-Spektren der Biere analysiert und nach einer Lagerung von 6 Monaten die Konzentrationen der Alterungsindikatoren bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit und O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe während des Anstellens

#### 4.1.1 Die Sauerstoffzehrung der Hefe und oxidative Belastung der Würze

Die oxidative Belastung der Würze ist von besonderer Bedeutung für die wertgebenden Eigenschaften Qualität und Stabilität des fertigen Produktes. Zudem steht der durch die Abreaktion mit Würzeinhaltsstoffen geminderte Sauerstoff nicht mehr als Wachstoffsstoff für die Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen im Hefemetabolismus zu Verfügung und hat damit maßgeblichen Einfluss auf den physiologischen Zustand der Hefe. Um eine Aussage über die effektive Belastung der Würze während des Anstellvorganges treffen zu können und gleichzeitig den der Hefe zu Verfügung stehenden Sauerstoff zu ermitteln, wurde die O<sub>2</sub>-Abnahme in belüfteten Würzen in Abhängigkeit der Hefegabe im Gärtank untersucht. Die Abbildung 24 zeigt den Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Gärtanks zweier Versuchsreihen, bei denen jeweils in einem Gärtank (T1 und T2) eine Hefegabe erfolgte, während der jeweilige Vergleichstank (T3 und T4) ohne Hefezugabe verblieb.

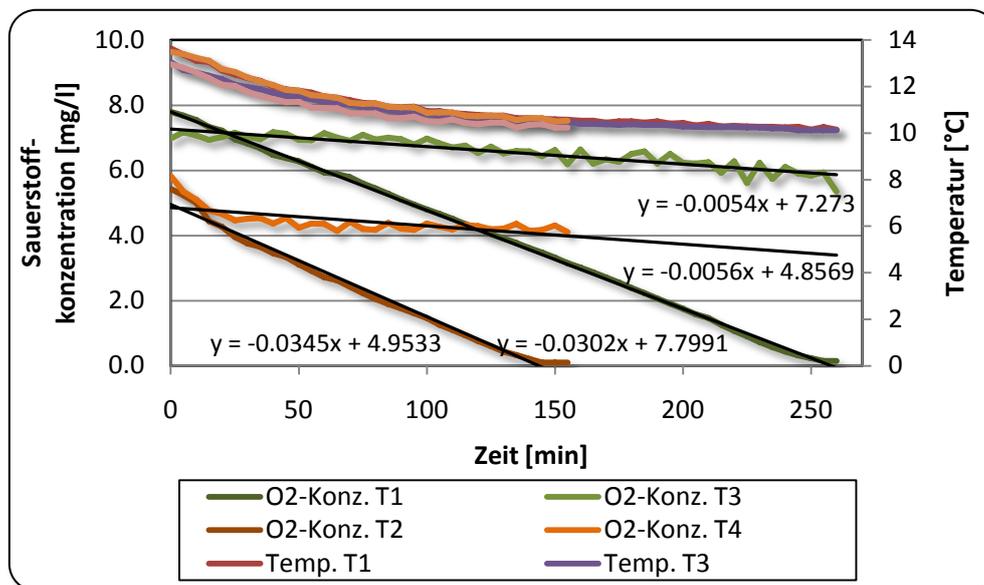


Abbildung 24: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Gärtank während der Angärung und die resultierende O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe und oxidative Belastung der Würze beim Anstellen

Die Hefen im Tank T1, in dem die Würze bis zu einem O<sub>2</sub>-Gehalt von ca. 7,8 mg/l belüftet wurde, zehrten den vorliegenden Sauerstoff innerhalb von 255 min fast vollständig auf, während die Hefen in T2, dessen Würze auf einen O<sub>2</sub>-Gehalt von ca. 5,2 mg/l eingestellt wurde, den Sauerstoff bereits innerhalb von 140 min aufnahmen. Dabei blieb die O<sub>2</sub>-Abnahme in beiden Fällen über den gesamten Zeitraum nahezu konstant, wie anhand der angelegten linearen Trendlinien zu erkennen ist. Deren Gleichungen sind für die

nachfolgenden Berechnungen maßgeblich. In Anbetracht der Hefezellzahlen in T1 von 19 Mio. Z/ml und in T2 von 16 Mio. Z/ml und unter Vernachlässigung der O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Würze würden sich daraus theoretische Werte für die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefen in T1 von 0,0016 µg/Mio. Z\*min und 0,0022 µg/Mio. Z\*min für die in T2 ergeben. Berechnet auf die HTS und Stunde würde dies eine spezifische Sauerstoffaufnahme von 3,90 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h im Falle von T1 und 5,31 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h für T2 bedeuten.

Um die wirkliche Menge des von der Hefe aufgenommenen Sauerstoffs zu ermitteln, bedarf es jedoch der Subtraktion des von der Würze über dieselbe Zeit gebundenen Anteils. Die Kurven der O<sub>2</sub>-Konzentration in den ohne Hefegabe verbliebenen Tanks T3 und T4 zeigten parallel eine Abnahme von 7,3 auf 5,9 mg/l und von 4,9 auf 4,1 mg/l. Daraus ergibt sich eine auf die Oxidation von Würzeinhaltsstoffen zurückzuführende Zehrung von 5,5 µg/l\*min bzw. 0,336 mg/l\*h für T3 und 5,7 µg/l\*min bzw. 0,343 mg/l\*h für T4. Daraus abgeleitet, kann die wirkliche O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefen in T1 mit 0,0013 µg/Mio. Z\*min und derer in T2 mit 0,0019 µg/Mio. Z\*min beziffert werden. Auch die spezifische O<sub>2</sub>-Aufnahme sank damit von 3,90 auf 3,19 mg O<sub>2</sub>/ g HTS\*h für die Hefen in T1 und von 5,13 auf 4,28 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h für die in T2. Anhand dieser Werte würden zwischen 15 und 20% des eingebrachten Sauerstoffs in Oxidationsreaktionen mit Würzebestandteilen fließen.

Anhand der aufgezeichneten O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Gärversuchen zum Einfluss der spezifischen Belüftungsrate der Würze von 3 mg O<sub>2</sub>/l und 8 mg O<sub>2</sub>/l auf den physiologischen Zustand der Hefe, ihrer Gäraktivität und die daraus resultierenden Biere, kann eine identische Berechnung der O<sub>2</sub>-Zehrung erfolgen (vgl. Kapitel 4.6). Die Abbildung 25 stellt die O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Gärtanks und die O<sub>2</sub>-Zehrungen der Hefe nach dem Anstellen unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Werte für die Abreaktion des Sauerstoffs mit Würzebestandteilen dar.

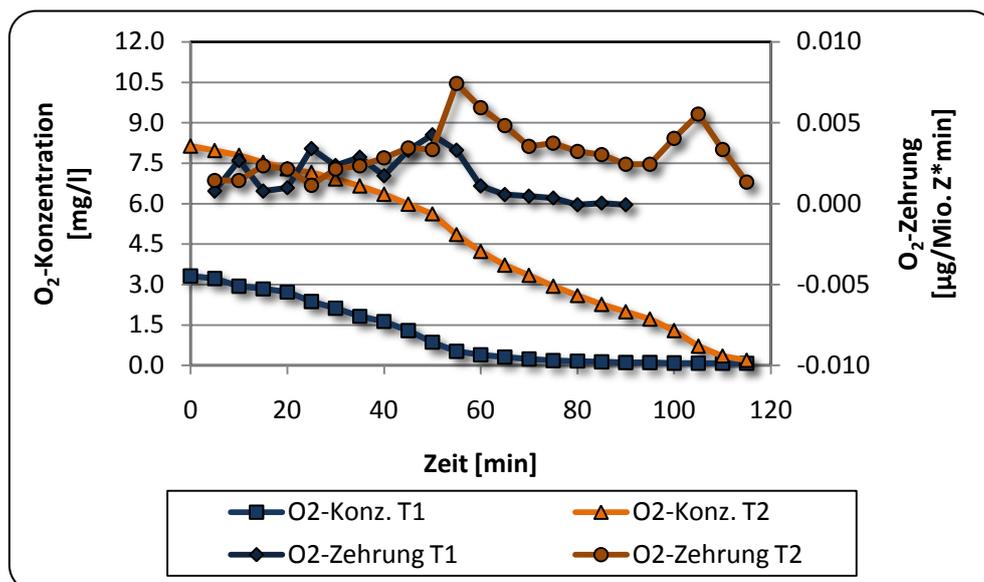


Abbildung 25: Die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der spezifischen Belüftungsrate der Würze

Der Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentrationen zeigt, dass in der mit einem geringeren O<sub>2</sub>-Gehalt von 3 mg/l angestellten Gärung von T1 der Sauerstoff bereits nach 60 min fast vollständig aufgezehrt war, wo hingegen den Hefen aus T2 Sauerstoff für ca. 120 min zu Verfügung stand. In beide Gärungen, die mit der identischen Hefe angestellt wurden, kam es im Vergleich zu dem in der Abbildung 24 dargestellten Versuch nicht zu einer durchgehend konstanten, sondern über die Zeit beschleunigten Abnahme des Sauerstoffs. Unter Berücksichtigung der Hefekonzentrationen von 19 Mio. Z/ml in T1 und 20 Mio. Z/ml in T2 erreichten die Hefen in den ersten 40 min eine O<sub>2</sub>-Zehrung von 0,0019 bzw. 0,0020 µg/Mio. Z\*min. Diese Werte sind mit denen aus dem vorangegangenen Versuch nahezu identisch. Im weiteren Verlauf der Angärung steigerte die Hefe ihre O<sub>2</sub>-Aufnahme. Trotz zunehmender Limitierung des verfügbaren Sauerstoffs in T1 erreichten die Hefen im Zeitraum von 40 bis 60 min nach dem Anstellen eine O<sub>2</sub>-Zehrung von 0,0029 µg/Mio. Z\*min. Dies bedeutet gleichzeitig, dass mit dem Übergang zu einer intensiveren O<sub>2</sub>-Zehrung der Sauerstoff in T1 bereits fast vollständig aufgezehrt war. Bei den Hefen in T2 stieg die durchschnittliche O<sub>2</sub>-Zehrung auf 0,0038 µg/Mio. Z\*min bis zur vollständigen Zehrung nach 120 min.

Mit den bereits ermittelten Werten für die oxidative Belastung der Würze ergab sich aufgrund der schnelleren O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe in diesem Versuch, dass nur ca. 8% in T1 und ca. 10% in T2 des eingebrachten Sauerstoffs eine Oxidation von Würzebestandteilen hätten bewirken konnten. Zudem war die absolute Menge an Sauerstoff, die in Oxidationsreaktionen mit Würzebestandteilen einfließen konnte, in T1 im Vergleich zu T2 um ca. 50% reduziert. Die Auswirkungen der vorgenommenen Minimierung in der Belüftung von T1 auf die Gäreigenschaften und die resultierende Bierqualität werden in den Kapiteln 4.6.1 und 4.8.5 beschrieben.

Partialdrücke von Gasen sind mit verantwortlich für die in der Flüssigkeit gelöste Stoffmenge. Um den Einfluss einer Druckbeaufschlagung eines Gärtanks, wie in der Praxis üblich von  $\Delta p_{\bar{u}} = 0,5$  bar, auf den Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentration im Gärtank und die O<sub>2</sub>-Aufnahme durch die Hefe zu untersuchen, wurden verschiedene Druckbedingungen jeweils gegenüber einem offenen System (Bez.  $\Delta p_{\bar{u}} = p_{rel}$ ) verglichen. Die Tabelle 9 zeigt die durchschnittliche O<sub>2</sub>-Zehrung während der Angärung in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen (vgl. Kapitel 3.3.1).

Tabelle 9: Die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Druckbeaufschlagung des Gärgefäßes

|                                               | EBC-GR1<br>$\Delta p_{\bar{u}} = 0$ bar | EBC-GR2<br>$\Delta p_{\bar{u}} = p_{rel}$ | EBC-GR3<br>$\Delta p_{\bar{u}} = 0,5$ bar | EBC-GR4<br>$\Delta p_{\bar{u}} = p_{rel}$ | EBC-GR5<br>$\Delta p_{\bar{u}(N_2)} = 0,5$ bar | EBC-GR6<br>$\Delta p_{\bar{u}} = p_{rel}$ |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| O <sub>2</sub> -Zehrung V1<br>[µg/Mio. Z*min] | 0,0039                                  | 0,0039                                    | 0,0035                                    | 0,0035                                    | 0,0032                                         | 0,0032                                    |
| O <sub>2</sub> -Zehrung V2<br>[µg/Mio. Z*min] | 0,0050                                  | 0,0049                                    | 0,0029                                    | 0,0029                                    | 0,0027                                         | 0,0026                                    |

Der Verlauf der  $O_2$ -Konzentrationen in den untersuchten Gärungen und die daraus berechnete  $O_2$ -Zehrung der jeweiligen Hefen zeigten keinen signifikanten Einfluss einer möglichen Druckbeaufschlagung während des Anstellens im Rahmen der in der Praxis üblichen Bedingungen gegenüber dem jeweiligen offenen System. So ergaben die parallel und in Doppelbestimmung durchgeführten Testansätze (**V1** und **V2**) jeweils die fast identische  $O_2$ -Aufnahme durch die Hefe.

Trotz der konstant gehaltenen Versuchsaufbauten und -durchführungen kam es dennoch, nicht zuletzt aufgrund des verwendeten Pilot-Maßstabs, zu Unterschieden in den Durchschnittstemperaturen während den Messungen bei den einzelnen Versuchsbedingungen. Da die  $O_2$ -Abnahme jeweils parallel in einem offenen System gemessen wurde, hatte dies zwar keinen Einfluss auf die Aussage zur Bedeutung der Druckbeaufschlagung, jedoch machen die in der Abbildung 26 dargestellten Messwerte die Bedeutung des physiologischen Zustands der Hefe für die  $O_2$ -Aufnahme auch gegenüber der Temperatur deutlich.

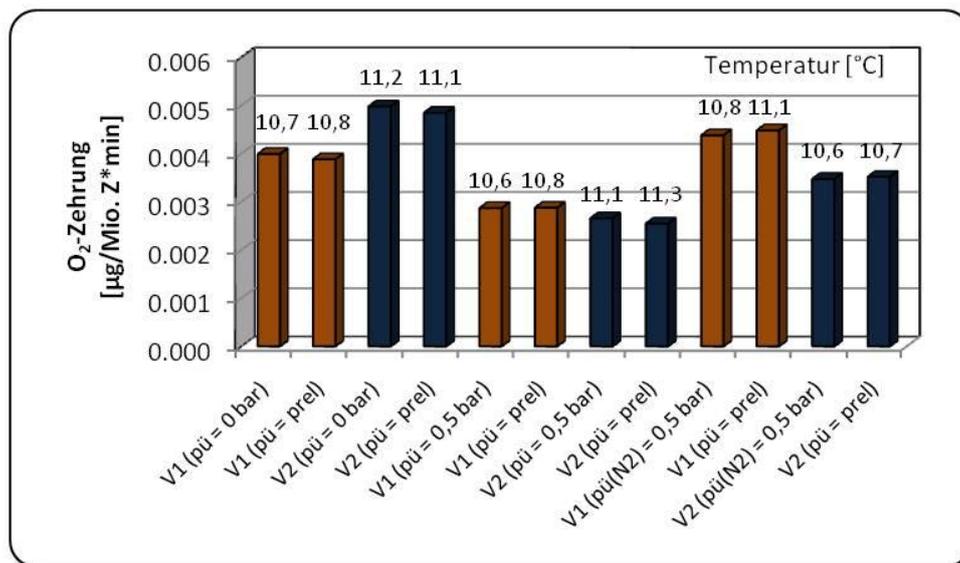


Abbildung 26: Die durchschnittliche  $O_2$ -Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Anstelltemperatur

Am Beispiel der Ergebnisse für die  $O_2$ -Aufnahme aus V2 ( $p_{\bar{u}} = 0 \text{ bar}$ ) und V2 ( $p_{\bar{u}} = 0,5 \text{ bar}$ ) und den dazu gehörigen offenen Systemen konnte bei gleicher Temperatur von ca. 11,2 °C eine Differenz von 0,0023  $\mu\text{g}/\text{Mio. Z}^*\text{min}$  und damit von fast 50% in der  $O_2$ -Zehrung der Hefe ermittelt werden. Zusätzlich wird anhand der  $O_2$ -Zehrung der Hefen aus V1 ( $p_{\bar{u}} = 0,5 \text{ bar}$ ) und V2 ( $p_{\bar{u}} = 0,5 \text{ bar}$ ), bei denen eine annähernd gleiche Aufnahmerate erreicht wurde, ersichtlich, dass der Einfluss einer Temperaturdifferenz von 0,5 °C durch den physiologischen Zustand der Hefe überlagert werden kann.

#### 4.1.2 Vergleich der Zehrungsintensität zwischen Ernte- und Propagationshefen

Um die Abhängigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme vom physiologischen Zustand der Hefe und einer möglichen Gewöhnung an die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit näher zu betrachten, wurden in der folgenden Versuchsreihe die Unterschiede zwischen einer Erntehefe und einer aus der selben Population stammenden propagierten Hefe untersucht. In der Abbildung 27 sind die O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den mit Ernte- oder Propagationshefe angestellten Gärtanks und der Verlauf der jeweiligen O<sub>2</sub>-Zehrung während der Angärung dargestellt.

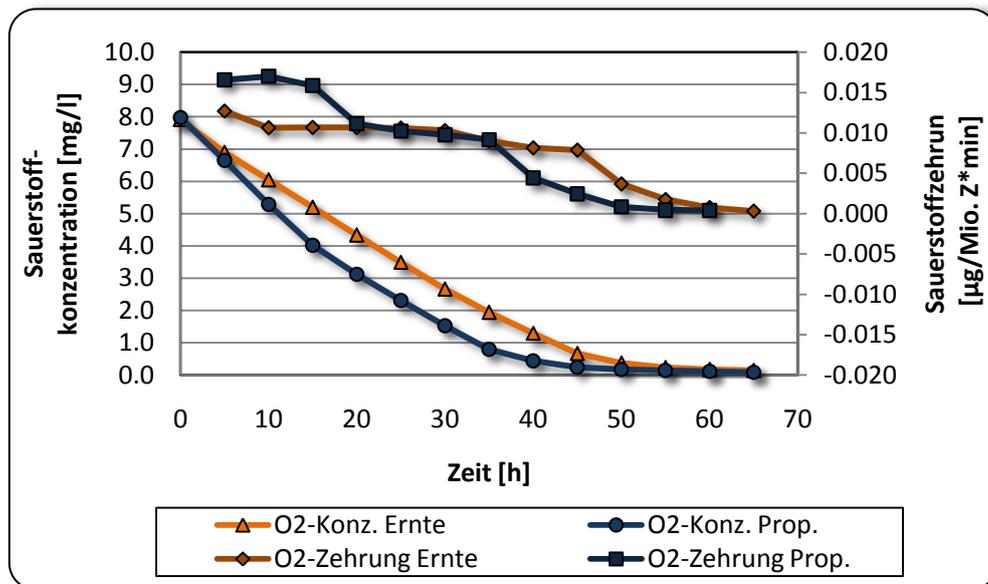


Abbildung 27: Vergleich der O<sub>2</sub>-Zehrung von Ernte- und Propagationshefe

Die über 24 h von 10 auf 100 Mio. Z/ml bei 15 °C im Propagator vermehrten Hefen zeigten besonders zu Beginn der Gärung eine um ca. 30% höhere Sauerstoffaufnahme im Vergleich zur Erntehefe. In der Folge fiel die O<sub>2</sub>-Konzentration in diesem Tank in den ersten 20 min deutlich schneller ab. Erst im weiteren Verlauf wiesen beide Hefen eine vergleichbare O<sub>2</sub>-Zehrung von durchschnittlich ca. 0,010 µg/Mio. Z\*min auf. Die Propagationshefe nahm den vorhandenen Sauerstoff innerhalb von ca. 45 min auf. Im Gegensatz dazu stand der Erntehefe in Folge der zu Beginn geringeren, aber bis zu einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,5 mg/l nahezu konstanten Zehrungsintensität, der Sauerstoff 10 min länger zu Verfügung. Insgesamt zeigten beide Hefen eine vergleichbare O<sub>2</sub>-Zehrung mit durchschnittlich 0,0097 µg/Mio. Z\*min bzw. 39,7 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h bei der Propagationshefe und 0,0075 µg/Mio. Z\*min bzw. 30,5 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h bei der Erntehefe. Dies verdeutlicht den immensen Einfluss des physiologischen Zustands der Hefe auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme und die Folgen für eine mögliche oxidative Belastung der Würze. So wären unter Berücksichtigung der im Kapitel 4.1.1 ermittelten durchschnittlichen Abreaktion von Sauerstoff mit Würzeinhaltsstoffen von 5,6 µg/l\*min in dieser Versuchsreihe nur ca. 3 bzw. 4% des Gesamtsauerstoffs für eine mögliche Oxidation in Betracht gekommen.

### 4.1.3 Einfluss der Hefelagerung auf die Sauerstoffzehrung der Hefe

Während unter 4.1.2 der Einfluss der Propagation, d.h. die über die Zeit an die aeroben Bedingungen eventuell stattfindende Adaption des Hefemetabolismus auf die Sauerstoffaufnahme der Hefe untersucht wurde, erfolgte in der nachfolgenden Versuchsreihe die Evaluierung zur Bedeutung der Lagerzeit und damit die ständige Abwesenheit von Sauerstoff bis zu einem Wiederaanstellen auf die resultierende  $O_2$ -Zehrung der Hefe. Die dazu über einen Zeitraum von einer Woche untersuchte Erntehefe zeigte deutliche Veränderungen in der Aufnahmegeschwindigkeit. Die Abbildung 28 stellt die Verläufe der  $O_2$ -Konzentration nach dem Anstellen in Abhängigkeit der absolvierten Lagertage dar.

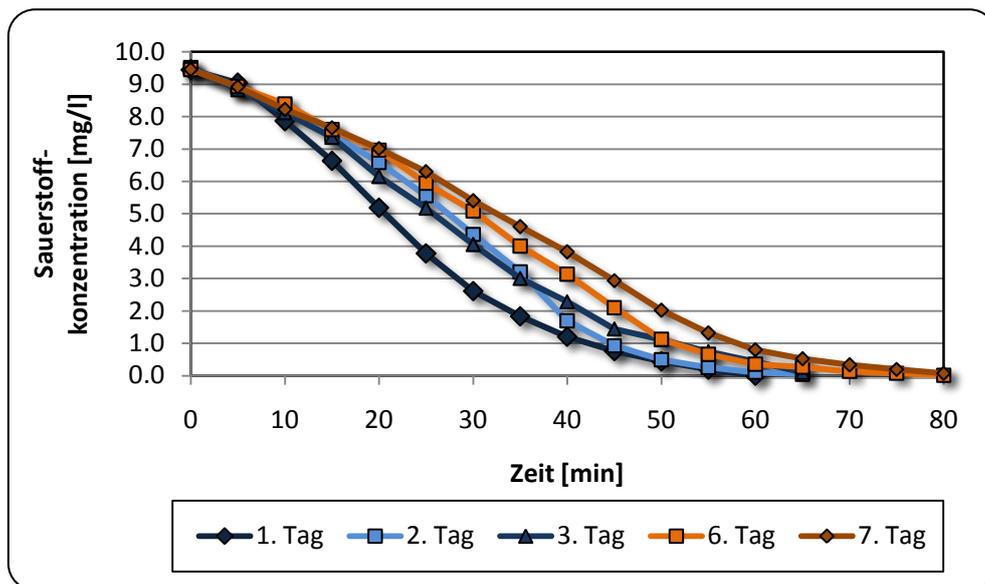


Abbildung 28: Veränderung der  $O_2$ -Aufnahme durch die Hefe in Abhängigkeit der Lagerzeit

Trotz optimaler Lagerbedingungen der Hefe von 4 °C kam es mit zunehmender Lagerdauer zu einer deutlichen Abflachung bei den Kurven der  $O_2$ -Konzentration in den Gärtanks über den Anstellvorgang. Während die Hefen am 1. Tag den Sauerstoff noch innerhalb von 60 min und am 3. Tag von 65 min aufzehrten, benötigten die Hefen am 6. und 7. Tag bereits ca. 80 min für die vollständige Aufnahme. Werden die Konzentrationen an Hefezellen von 15 Mio. Z/ml mit einbezogen, ergeben sich die in der Abbildung 29 dargestellten Durchschnittswerte für die  $O_2$ -Zehrungen der Hefe. Dabei zeigten beide durchgeführten Versuchsreihen (V LZ 1 und V LZ 2) dieselbe Tendenz.

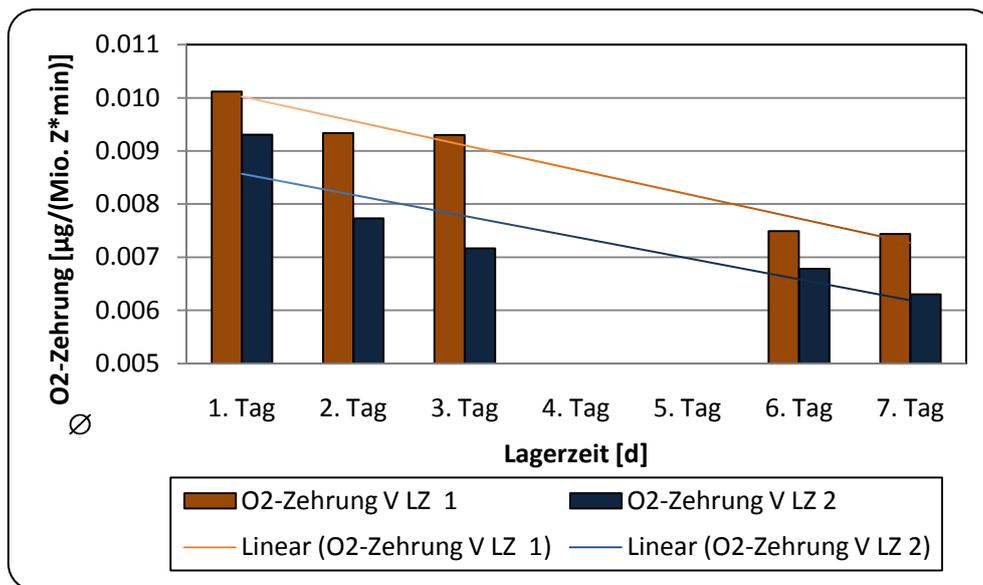


Abbildung 29: O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe in Abhängigkeit der Lagerzeit

Anhand der angelegten Trendlinien ist der eindeutige Rückgang in der O<sub>2</sub>-Zehrung durch die Hefe in Abhängigkeit der Lagerzeit zu erkennen. Im Zeitraum vom 1. bis zum 7. Lagertag sanken die Durchschnittswerte von 0,0101 auf 0,0074 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min im Falle der Versuchsreihe V LZ 1 und von 0,0093 auf 0,0063 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min bei V LZ 2. Dies ergibt eine prozentuale Minderung der O<sub>2</sub>-Aufnahmerate über den Zeitraum von einer Woche von 26 bzw. 33%. Gleichzeitig ergibt sich daraus am Beispiel von V LZ 1 auch eine Steigerung des an der Würzeoxidation beteiligten Sauerstoffs um ca. 30%.

#### 4.1.4 Sauerstoffverfügbarkeit in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren

Die Sauerstoffverfügbarkeit während eines Drauflassverfahrens ist von besonderer Bedeutung für den Metabolismus der Hefe. Denn nur wenn genügend Vorstufen zur Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen zum Zeitpunkt der Belüftung zu Verfügung stehen, ist der Sauerstoff in vollem Umfang für die Hefe im Sinne des Baustoffwechsels zu nutzen. In der Abbildung 30 ist der Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentrationen in zwei Drauflassverfahren dargestellt. Die mit je 4 Sude, einem Sudrhythmus von 2,5 h und einer zum 1. Sud erfolgten Hefegabe von 15 Mio./ml (auf den gesamten Tankinhalt berechnet) angestellten Gärungen unterschieden sich nur in der Belüftungsstrategie. Bei dem Verfahren in T1 sind dabei alle Sude und in T2 nur die ersten 3 Sude belüftet worden.

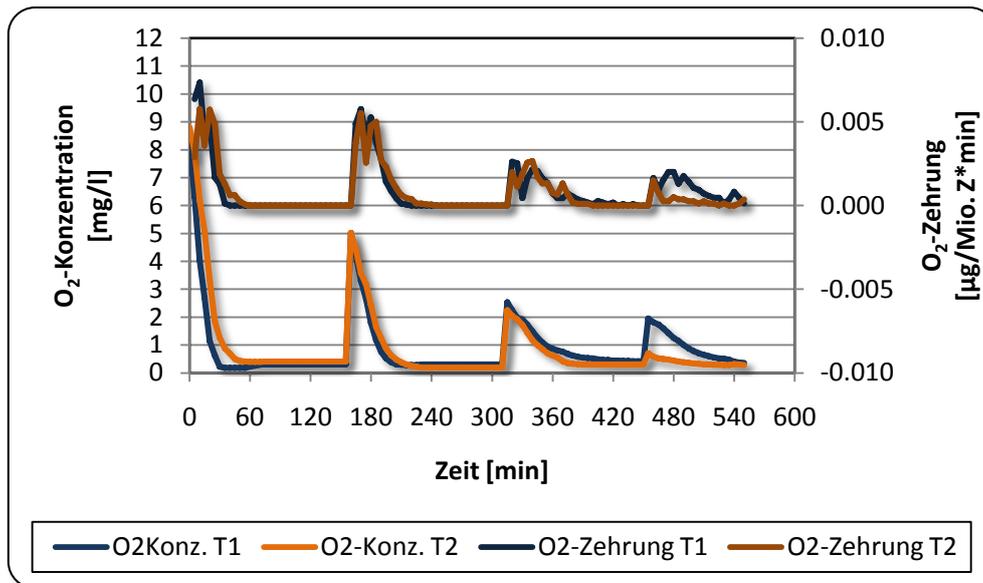
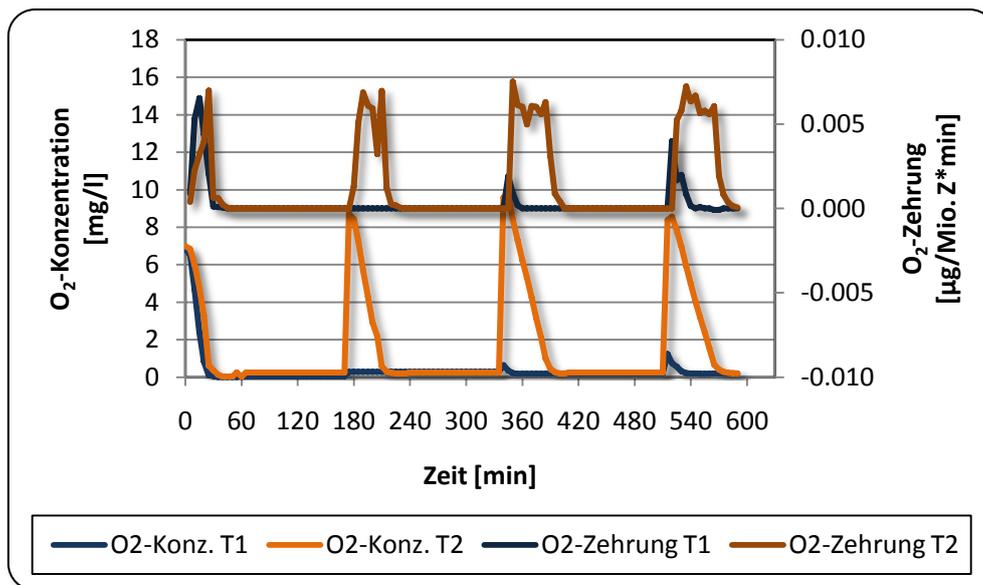


Abbildung 30: Die O<sub>2</sub>-Konzentration im Gärtank bei verschiedenen Drauffassverfahren im Gärtank

Der Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentrationen zeigt eine vollständige O<sub>2</sub>-Zehrung zwischen den Suden in T1 und T2 während der Angärphase. Der auch über das Mischungsverhältnis errechenbare O<sub>2</sub>-Gehalt macht deutlich, dass bei einer Würzebelüftung von 8 bis 10 mg/l die resultierende Konzentration im gesamten Gärtank um den Faktor ½ beim 2. Sud auf 5 mg/l bis hin zu ¼ bei 4. Sud auf 2 mg/l reduziert wurde. Gleichzeitig veränderte sich die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe bei jedem erneuten Drauffassen belüfteter Würze. Wiesen die Hefen in T1 und T2 nach dem 1. Sud eine durchschnittliche O<sub>2</sub>-Zehrung von 0,0037 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min auf, sank diese auf 0,0032 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min nach dem 2. Sud und 0,0016 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min nach dem 3. Sud. Bei T2 fiel die Zehrung nach dem 4. Sud nochmals auf 0,0014 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min ab. Dies bedeutet eine Abnahme in der O<sub>2</sub>-Aufnahmerate um ca. 60% von 8,9 auf 3,3 mg O<sub>2</sub>/g HTS\*h.

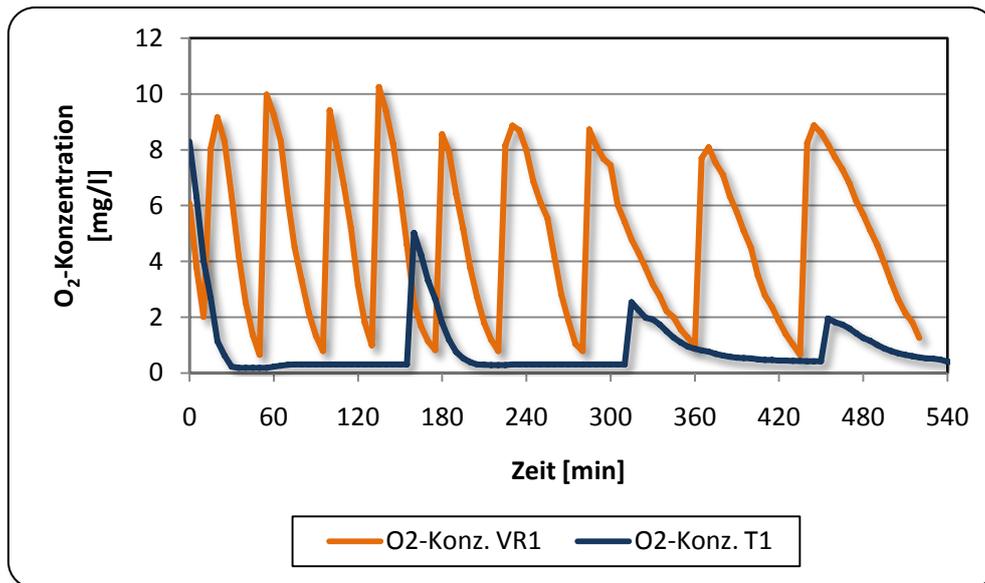
Dass jedoch die O<sub>2</sub>-Zehrung in Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffs über den Verlauf des Drauffassverfahrens sank, zeigte ein nachfolgender Versuch, in dem eine gesteigerte Würzebelüftung simuliert wurde, die einen effektiven O<sub>2</sub>-Gehalt von 8 bis 10 mg/l im Tank bewirkte. Der Konzentrationsverlauf dieses Drauffassverfahrens (Bez. **T1**) und die berechnete O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe sind in der Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Vergleich der O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Gärtank bei forcierter spezifischer Belüftungsrate**

Die gegen ein Drauflassverfahren (Bez. **T2**) mit einer Belüftung des 1. und 4. Sudes aufgetragene O<sub>2</sub>-Zehrung zeigt, dass ein resultierender O<sub>2</sub>-Gehalt im Gärtank von 8 bis 10 mg/l eine nahezu konstante Aufnahme der Hefezellen bewirkte und für deutlich längere aerobe Verhältnisse sorgte. Dabei nahmen die Hefen nach den ersten beiden Suden jeweils 0,0041 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min und nach den letzten beiden Suden 0,0048 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z\*min auf. Die Hefen im Vergleichsverfahren erreichten nach dem 1. Sud zwar eine vergleichbare O<sub>2</sub>-Zehrung, zeigten aber nach dem 4. Sud eine mit der aus vorangegangenen Versuchen analoge und somit reduzierte Zehrung.

Um den Einfluss einer ständigen Sauerstoffverfügbarkeit während der Angärphase, entsprechend dem Beginn einer Propagation, im Vergleich zu einer konventionellen Würzebelüftung im Drauflassverfahren auf die Physiologie der Hefe und ihrer Gäreigenschaften zu untersuchen, wurden vier Versuche mit unterschiedlich langer Belüftung von 2,5 bis 7,5 h unternommen. Die Abbildung 32 zeigt die resultierenden O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Gärtank am Beispiel der 7,5stündigen Belüftung (Bez. **VR1**) im Vergleich zu dem eingesetzten Drauflassverfahren mit einer Würzebelüftung von 8 bis 10 mg/l (Bez. **T1**).



**Abbildung 32: Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentration bei einer auf den O<sub>2</sub>-Gehalt im Gärtank abgestimmten Belüftung des gesamten Tankinhalts im Vergleich zu einem herkömmlichen Drauflassverfahren**

Da bei beiden Anstellverfahren die auf den gesamten Tankinhalt berechnete Hefegabe zum 1. Sud erfolgte, ergab sich zu Beginn der Gärung eine deutlich schnellere O<sub>2</sub>-Abnahme. Erst mit den weiteren Suden und der damit absolut betrachtet erhöhten Menge an Sauerstoff pro Hefezelle verlangsamte sich auch die O<sub>2</sub>-Abnahme im Gärtank von VR1. So waren insgesamt 10 Belüftungsvorgänge nötig, um eine ständige Sauerstoffverfügbarkeit zu gewährleisten. Das parallel durchgeführte, konventionell über alle vier Sude belüftete entsprach dem in der Abbildung 30 dargestellten Verfahren. Dabei ergab die ständige Belüftung, dass in VR1 den Hefen durchschnittlich 1,3 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z zu Verfügung standen. Im Gegensatz dazu konnten die Hefen in T1 aufgrund der O<sub>2</sub>-Limitierung in Abhängigkeit der Würzebelüftung nur maximal 0,2 µg O<sub>2</sub>/Mio. Z aufnehmen. Die Auswirkungen dieser Belüftungsstrategie auf das Gärverhalten und den physiologischen Zustand der Hefen sind in Kapitel 4.6.2 zusammengefasst.

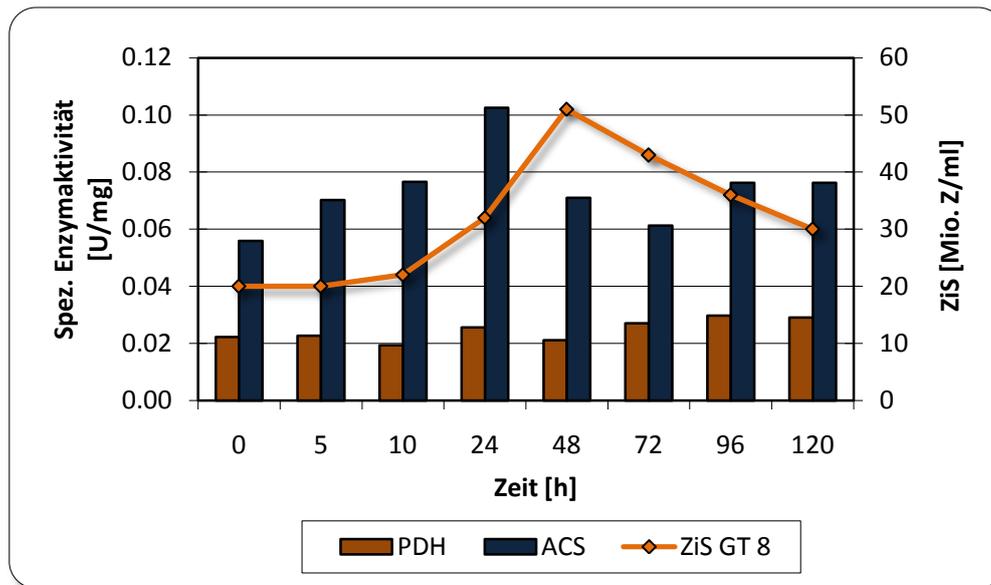
## 4.2 Implementierung der Enzymaktivitätsmessung des PDH-Bypasses

### 4.2.1 Aktivität und Bedeutung der ACS für die Physiologie und das Wachstum der Hefe

Die Erfassung und Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe, sowie das Verständnis für die Reaktionen des Hefemetabolismus auf die brautechnologischen Bedingungen und die eingesetzten Steuerungsparameter ist immer noch eine der Herausforderungen im Bereich der Hefeforschung in der Brauerei. Eine effektive Möglichkeit zur Beurteilung der Stoffwechsellausprägungen der Hefe stellt die Aktivitätsmessung von Schlüsselenzymen dar. Die bereits in früheren Arbeiten zur Untersuchung des Knotenpunktes Pyruvat und der ADH-Aktivität eingesetzte Methode hat eindeutige Hinweise auf eine große Bedeutung des Knotenpunktes Acetaldehyd für die Hefephysiologie geliefert (*Wellhoener, 2006*). An dieser Stelle ist die Hefe in der Lage einerseits den Acetaldehyd über das Enzym ADH zu Ethanol zu reduzieren und somit die Regeneration von  $\text{NAD}^+$  im Energiestoffwechsel aufrecht zu erhalten und andererseits über das Intermediärprodukt Acetat die Grundlage für die Lipidbiosynthese in Form von Acetyl-CoA zu generieren.

Die Implementierung der Aktivitätsmessung der daran beteiligte Enzyme ALDH und ACS in die Routineanalytik war somit der erste Schritt eine bessere Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen vornehmen zu können und stellt damit einen Grundbaustein dieser Arbeit dar. Mit denen aus der Literatur zusammengestellten Reaktionsansätzen ist es gelungen, diese Enzymaktivitätsmessung reproduzierbar zu etablieren (*Wang, 1998*). Bei der Aktivitätsbestimmung der ACS handelt es sich dabei um eine gekoppelte Enzymreaktion, bei der die Umsetzung von  $\text{NAD}^+$  zu NADH photometrisch gemessen wird. Bei der Messung der ALDH könnte zusätzlich zwischen denen im Cytosol oder in den Mitochondrien lokalisierten Isoenzymen zur Umsetzung von Acetaldehyd mit Hilfe von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  als Wasserstoffakzeptor unterschieden werden (vgl. Kapitel 3.2.1).

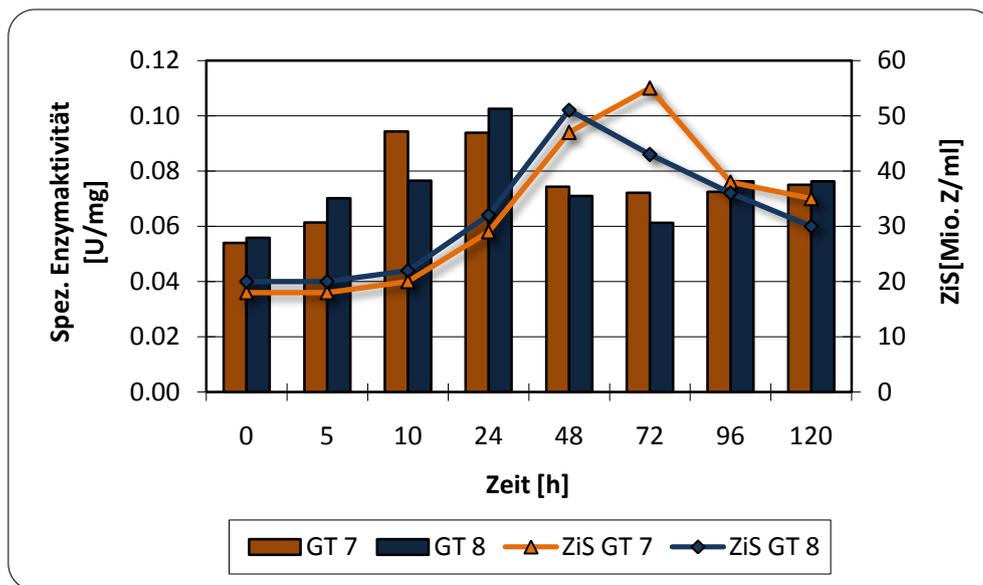
In den ersten Versuchsreihen zur Bestimmung der ACS-Aktivität der Hefe bestätigte sich die große Bedeutung des PDH-Bypasses als Grundlage der Hefevermehrung in der Brauerei. Die Abbildung 33 zeigt die Zellvermehrung und die Entwicklung der ACS-Aktivität gegenüber der mitochondrial lokalisierten PDH-Aktivität der Hefe in einer konventionellen Gärung im Batch-Verfahren (Bez. **GT8**).



**Abbildung 33:** Die spezifische Enzymaktivität der PDH und ACS der Hefe während der Gärung

Die zunehmende ACS-Aktivität der Hefe in den ersten 24 h der Gärung und die damit vermehrte Bereitstellung an Acetyl-CoA korrelierte, unter Berücksichtigung einer zeitlichen Verzögerung zur Umsetzung des Acetyl-CoA in neue Biomasse, mit dem Anstieg der Zellvermehrung der Hefe. Dabei stieg die Aktivität von 0,056 U/mg zum Zeitpunkt des Anstellens auf ein Maximum von 0,103 U/mg nach 24 h. Im weiteren Verlauf der Hauptgärung sank zunächst die ACS-Aktivität innerhalb von weiteren 48 h wieder nahezu auf das Ausgangsniveau und erreichte mit 0,061 U/mg ihr Minimum zum Zeitpunkt von 72 h. In der Folge nahmen nach einem Maximum von 51 Mio. Z/ml am 2. Gärtag auch die ZiS wieder ab. Zum Ende der Hauptgärung stieg die ACS-Aktivität nochmals leicht an, was sich allerdings nicht im Verlauf der Hefezellzahlkonzentration widerspiegelte. Dahingegen zeigte die PDH, wie bereits in früheren Forschungsarbeiten dargestellt, eine konstant und vergleichsweise geringe Aktivität um 0,025 U/mg, die auch während der Wachstumsphase keine additive Expression erfuhr (Wellhoener, 2006).

Um eine Korrelation zwischen der absoluten Expressionsrate und der Hefezellzahlentwicklung zu untersuchen, wurde parallel zu GT8 eine weitere Gärung (Bez. **GT7**) untersucht. Die Abbildung 34 stellt die ACS-Aktivitäten und die Zellzahlentwicklungen der Hefe in beiden Tanks über den Gärverlauf gegenüber.



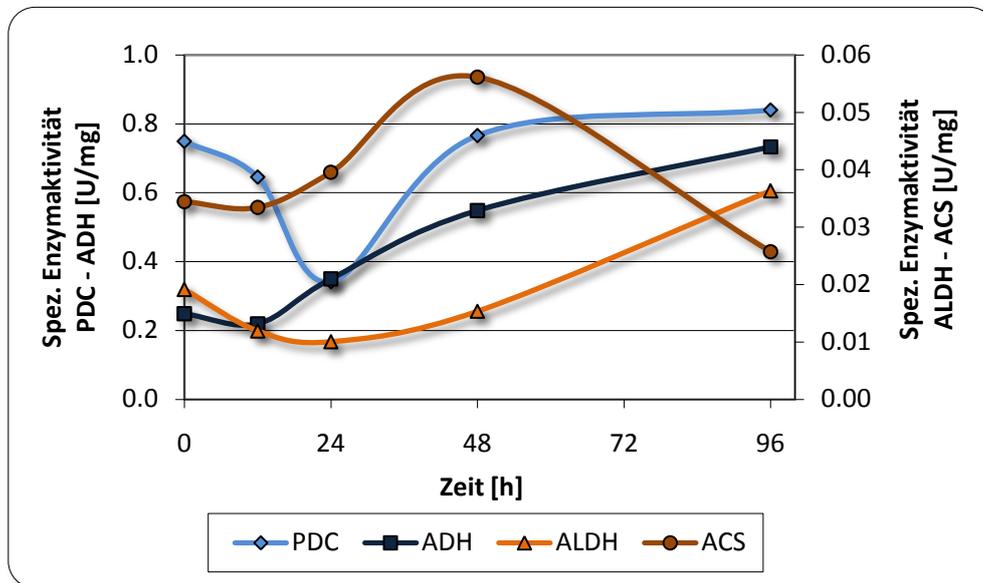
**Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der ACS-Aktivität der Hefe und dem Wachstum während der Gärung**

Sowohl die Entwicklung der ACS-Aktivität als auch die Zellzahlentwicklung der Hefen in den beiden Versuchsgärungen zeigten leichte Unterschiede. Die ACS-Aktivität der Hefen in GT7 nahm bereits in den ersten 10 h der Gärung von 0,054 U/mg auf ein Maximum von 0,094 U/mg zu und blieb für weitere 12 h konstant auf diesem Niveau. Im gleichen Zeitraum vermehrte sich die Hefe in GT7 von 18 Mio. Z/ml auf 29 Mio. Z/ml am 1. Gärtag und auf 47 Mio. Z/ml am 2. Gärtag. Die ZiS in GT7 erreichten am 3. Gärtag mit 55 Mio. Z/ml ihr Maximum und fielen im weiteren Verlauf der Hauptgärung wieder auf einen Wert von 35 Mio. Z/ml ab. Im Gegensatz dazu stieg die ACS-Aktivität der Hefen in GT8 über die ersten 24 h fast konstant von 0,056 auf 0,103 U/mg. Die ZiS von GT8 erreichten bereits nach einer Zellzahlzunahme von 20 Mio. Z/ml auf 32 Mio. Z/ml in den ersten 24 h am 2. Gärtag mit 51 Mio. Z/ml ihr Maximum, bevor sich zum Ende der Hauptgärung auf 30 Mio. Z/ml abfielen. Aus dem Verhalten der ACS-Aktivität und dem Zellwachstum lässt sich auch unter Berücksichtigung der zeitlichen Verschiebung zwischen der Synthese von Acetyl-CoA und der Zellneubildung keine absolute, sondern nur eine tendenzielle Korrelation finden, und eine Steigerung der ACS-Aktivität kann somit unter Gärungsbedingungen zwar als Indikator für einen ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Charakter der Hefe angesehen werden, aber ermöglicht scheinbar keine direkte Voraussage der Hefezellzahlentwicklung.

#### 4.2.2 Die Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsel während der Gärung

Eine Aussage über den physiologischen Zustand der Hefe und seiner Veränderungen unter brautechnologischen Bedingungen zu treffen, bedingt die kollektive Betrachtung der ausgewählten Schlüsselenzyme. Zudem scheinen das Zusammenwirken und die jeweilige Entwicklung der Enzyme über den Prozess für den physiologischen Zustand der Hefe, sowie ihrer Vermehrungs- und Gäreigenschaften entscheidend zu sein, wie die weiteren Ergebnisse zeigen werden. So wurden zur Beurteilung der Hefephysiologie stets alle

Aktivitäten der Schlüsselenzyme im Kohlenhydratstoffwechsel erfasst. In der Abbildung 35 sind die Aktivitäten der untersuchten Enzyme ADH, PDC, ALDH und ACS einer aus der Propagation stammenden Hefe in der 1. Führung über den Gärverlauf aufgetragen, um an diesem Beispiel einen Überblick in die Entwicklung der Enzymaktivitäten unter brautechnologischen Bedingungen zu bekommen.



**Abbildung 35: Die spezifische Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels der Hefe während der Gärung**

Die Betrachtung und Interpretation der Enzymaktivitäten muss allgemein unter Berücksichtigung der generellen und für die einzelnen Enzyme spezifischen Regulationsmechanismen erfolgen. Die aus der Literatur bekannten Mechanismen sind eingehend in den Kapiteln 2.3, 2.4.3 und 2.4.5 zusammengefasst.

In dieser mit 4 Suden im Drauflassverfahren angestellten Gärung ergaben die Aktivitätsmessungen der für die unter brautechnologischen Bedingungen nicht oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd verantwortliche PDC in den ersten 24 h der Gärung eine Abnahme von 0,75 U/mg auf ein Minimum von 0,34 U/mg. Dieser Rückgang kann einerseits auf die vorherrschende Maltaserepression durch die in der Anstellwürze vorhandene Glucose und die damit evtl. limitierte Bereitstellung an Pyruvat durch die Glykolyse zurückzuführen sein und andererseits führt ein steigender Sauerstoffgehalt in Glucose- und Maltose-haltigen Medien zu einer geringere Expression der PDC-Aktivität in der Hefe. Im zweiten Teil der Hauptgärung, in der sowohl der Sauerstoff als auch die Glucose bereits verbraucht waren, war eine Steigerung der PDC-Aktivität der Hefe auf Maximum von 0,84 U/mg nach 96 h zu beobachten.

Die ADH-Aktivität als Maß für die Bildung von Ethanol aus Acetaldehyd in der Hefe zeigte, wie auch in früheren Forschungsarbeiten während der Propagation beobachtet, eine für Gärungsbedingungen geringe Aktivität von 0,25 U/mg zum Zeitpunkt des Anstellens. Die

ADH-Aktivität erfuhr im Verlauf der Gärung eine ständig zunehmende Expression und stieg auf einen Wert von 0,73 U/mg am 4. Gärtag.

Die für die Umsetzung von Acetaldehyd zu Acetat im PDH-Bypass verantwortliche ALDH wurde zu Beginn der Gärung reprimiert. Sie fiel in den ersten 24 h von 0,019 auf 0,010 U/mg ab und stieg erst in der zweiten Hälfte der Hauptgärung wieder an und erreichte eine maximale Aktivität von 0,036 U/mg. Der niedrige  $k_m$ -Wert der ALDH und die steigenden Konzentrationen an Acetaldehyd im Jungbier können hierfür verantwortlich sein und würden eine erneute Expression der ALDH zum Ende der Gärung bei sinkenden Acetaldehyd-Konzentrationen, wie sie im Verlauf der hier betrachteten Gärung zu beobachten ist, erklären.

Die ACS-Aktivität der Hefe in dieser Versuchsgärung glich tendenziell dem in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Verhalten. Allerdings fiel das in diesem Versuch mit 0,056 U/mg erreichte Maximum der Aktivität erst auf den 2. Gärtag. Jedoch erreichten auch die ZiS mit einem Tag Verzögerung gegenüber den vorangegangenen Versuchen GT7 und GT8 den höchsten Wert und bestätigten somit die Bedeutung des PDH-Bypasses als Grundlage für die Hefevermehrung unter Gärungsbedingungen.

Um eine Aussage über effektive Veränderungen und Unterschieden in den Enzymaktivitäten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen treffen zu können, ist der Variationskoeffizient der einzelnen Testansätze ermittelt worden. Die Tabelle 10 gibt für die in dieser Arbeit analysierten Enzyme die entsprechenden Variationskoeffizienten der Aktivitätsmessung an.

**Tabelle 10: Die Variationskoeffizienten der verschiedenen Enzymaktivitätsmessungen**

|                                  | PDH | PDC | ADH | ALDH | ACS |
|----------------------------------|-----|-----|-----|------|-----|
| <b>Variationskoeffizient [%]</b> | 7,2 | 5,2 | 5,6 | 6,5  | 7,6 |

Der Variationskoeffizient der Analyse der PDC- und ADH-Aktivität fällt mit 5,2 und 5,6% am geringsten aus, während die Aktivitätsmessungen der Enzyme des PDH-Bypasses mit 6,5% für die ALDH und 7,6% für die ACS eine leicht höhere Abweichung zeigen, aber dennoch eine eindeutige Beurteilung der Messungen zulässt. Die nur im Kapitel 4.2.1 und 4.3.1 genutzte Analyse der PDH-Aktivität weist eine Abweichung von 7,2% auf.

### 4.3 Der physiologische Zustand der Hefe bei der Propagation

#### 4.3.1 Einfluss der spezifischen Belüftungsrate bei der Propagation auf den physiologischen Zustand der Hefe

Die Hefeführung und damit die Sauerstoffversorgung während der Propagation ist heutzutage einer der wichtigsten Prozessschritte in der Brauerei und bestimmt über den physiologischen Zustand der Hefe und das Propagations-Jungbier maßgeblich die resultierende Bierqualität. Zusätzlich ist die Belüftung bei der Propagation aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten für die Brauerei von Bedeutung. Die erforderliche Bereitstellung von Druckluft und eine bei übermäßiger Luftzufuhr begrenzten Kapazitätsauslastung durch eine erhöhte Schaumbildung macht eine Optimierung der Sauerstoffversorgung ebenfalls nötig. Das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, anhand der spezifischen Belüftungsrate der Propagation die Auswirkungen auf den physiologischen Zustand zu beurteilen. Die dazu parallel durchgeführten Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration im Propagationstank von 2 mg/l (Bez. **PK2**) und 8 mg/l (Bez. **PK8**) sind hinsichtlich des Extrakt- und pH-Verlaufs, der Hefezellzahlentwicklung, den Enzymaktivitäten sowie des relativen Trehalose- und Neutrallipidgehalts der Hefezellen untersucht worden. Zudem erfolgte eine flusszytometrische Analyse der DNA-Verteilung der Hefepopulationen zum Ende der Propagationen. Die Abbildung 36 zeigt den Extraktabbau und pH-Sturz sowie die Hefezellzahlentwicklung von PK2 und PK8 über den Verlauf der Propagation.

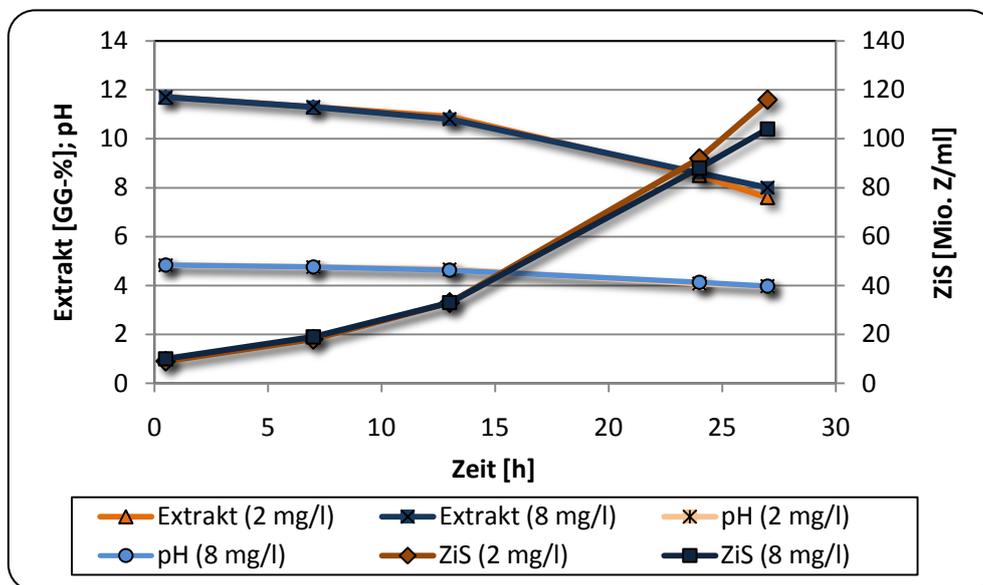
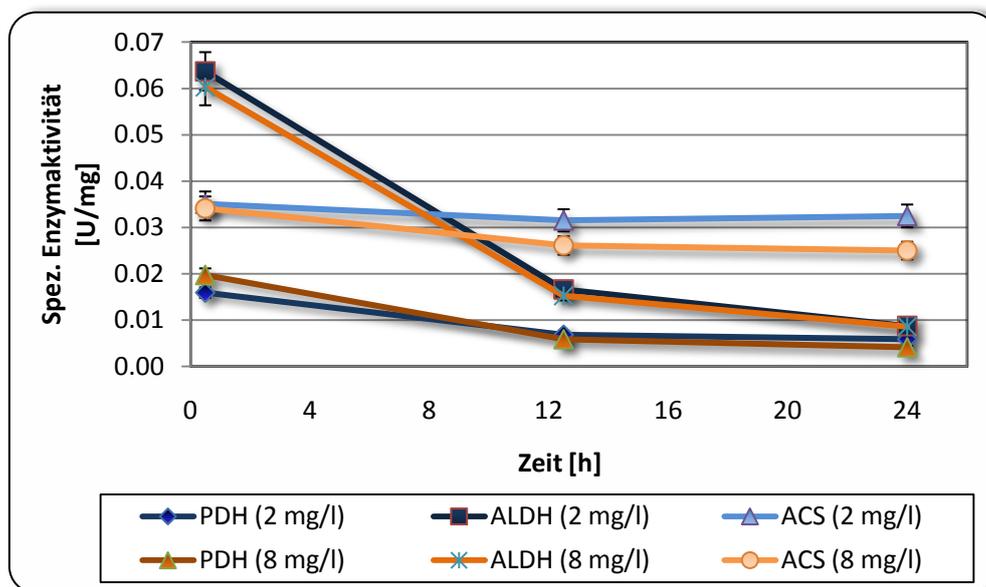


Abbildung 36: Hefezellzahlentwicklung, Extraktabbau und pH-Verlauf bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l

Maßgeblich für den Propagationsprozess ist meist die Hefezellzahlentwicklung, welche in beiden Versuchsansätzen bis zu einem Zeitpunkt von 24 h identisch verliefen. Erst gegen Ende der Propagation kam es in PK2 zu einer leicht höheren Zunahme der ZiS. Dem zu Folge verlief auch der Extraktabbau und pH-Sturz bis zu 24 h deckungsgleich und nur während der

letzten 4 h bauten die Hefen von PK2 um 0,4 Gew.-% mehr Extrakt ab. Insgesamt erfüllten beide Propagationen die in der Literatur vorgeschlagenen Richtwerte und erreichten innerhalb von 28 h eine Zellvermehrung von 10 auf ca. 110 Mio. Z/ml bei einem Extraktabbau von 11,7 auf ca. 7,8 Gew.-%.

In der Abbildung 37 sind die Enzymaktivitäten der PDH, ALDH und ACS der Hefe während der Propagationsprozesse dargestellt. Dabei zeigte die PDH zu Beginn in beiden Versuchen mit 0,020 U/mg ein mit dem unter Gärungsbedingungen vergleichbares, niedriges Aktivitätsniveau (vgl. Kapitel 4.2.1). Dies und die über den Prozess trotz aeroben Bedingungen weiter fallende PDH-Aktivität belegte die geringe Bedeutung für den Hefemetabolismus unter den in der Brauerei vorherrschenden Bedingungen. Zusammen mit den aus früheren Forschungsarbeiten stammenden Erkenntnissen wurde deswegen in den nachfolgenden Versuchsreihen allgemein bei Propagation und Gärung auf die Analyse der PDH-Aktivität verzichtet (Wellhoener, 2006).

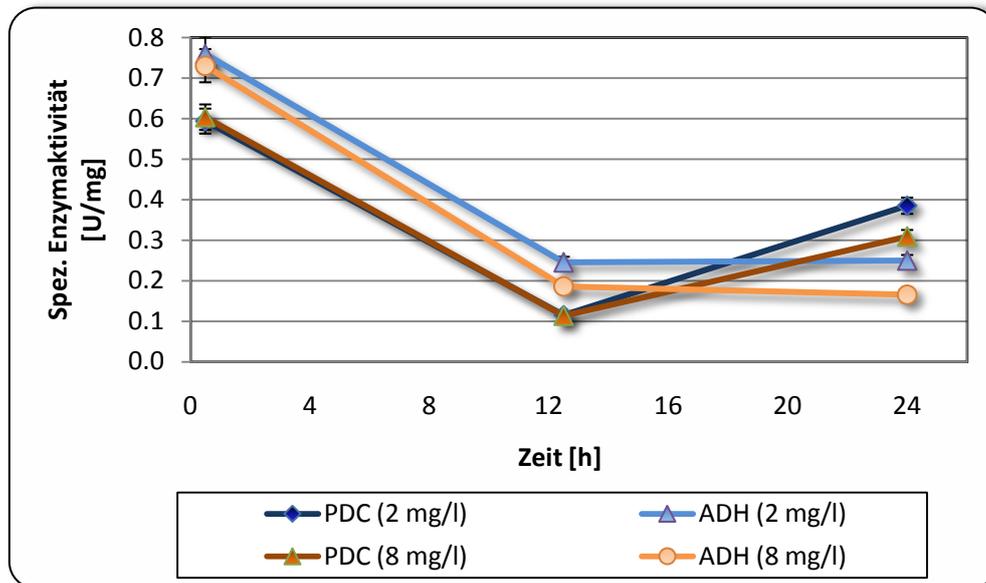


**Abbildung 37: PDH-, ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Die ALDH als Teil des PDH-Bypasses erfuhr in beiden Propagationen in den ersten 12 h unabhängig von der Belüftung eine deutliche Repression und sank von ca. 0,062 auf 0,015 U/mg und nahm bis zum Ende weiter auf einen Wert von 0,009 U/mg ab. Die ACS-Aktivität der Hefe hingegen zeigte eine über die Propagation nahezu konstante Expression. Dabei lagen die Werte aus PK2 mit 0,032 und 0,033 U/mg nach 16 bzw. 24 h leicht über den von PK8 mit 0,026 und 0,025 U/mg. Da beide Propagationen parallel mit identischer Anstellhefe durchgeführt wurden, ist dieser Unterschied allein auf die Belüftungsvariation zurückzuführen.

Die Abbildung 38 zeigt die Enzymaktivitäten der PDC und ADH während der Propagationen. Beide Enzyme präsentierten hinsichtlich ihrer Entwicklung in den ersten 12 h ein mit der

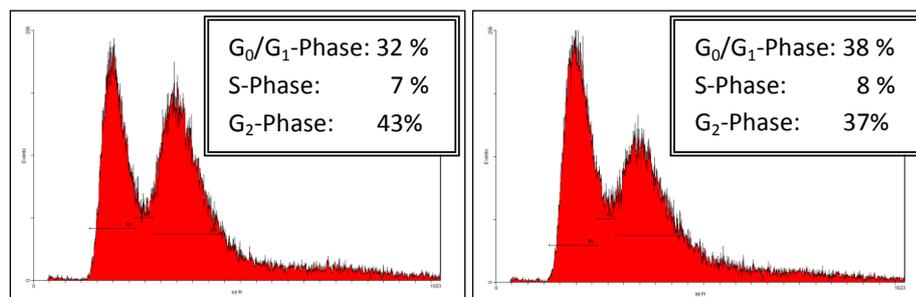
ALDH vergleichbares Verhalten. Jedoch lag das Aktivitätsniveau zu Beginn mit ca. 0,75 U/mg bei der ADH und 0,60 U/mg bei der PDC deutlich höher.



**Abbildung 38: PDC- und ADH-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Die ADH-Aktivitäten der Hefen fielen in beiden Propagationen vom o.g. Ausgangswert auf 0,25 U/mg in PK2 und 0,19 U/mg in PK8 bereits innerhalb von 12 h ab, blieben aber im weiteren Propagationsprozess nahezu konstant. Die PDC-Aktivitäten der Hefen sanken zwar ebenfalls während der ersten 12 h in beiden Propagatoren von 0,60 auf 0,11 U/mg, erfuhren jedoch im Gegensatz zur ADH eine erneute Expression zum Ende der Propagation. Insgesamt zeigte die geringere Belüftung von 2 mg/l eine tendenzielle Steigerung der Enzymaktivitäten, so dass alle Schlüsselenzyme der Versuchsreihe PK2 geringfügig in ihrer Aktivitäten über denen von PK8 lagen.

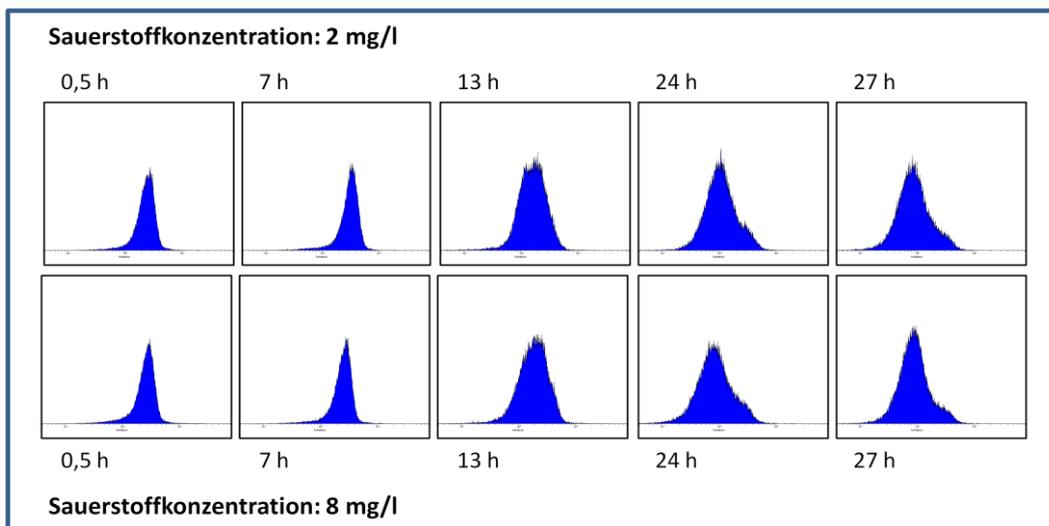
In der Abbildung 39 sind die Zellzyklusanalysen der Hefen aus PK2 und PK8 mit den dazugehörigen prozentualen Verteilungen der einzelnen Phasen dargestellt. Auch hier scheinen sich die Unterschiede der O<sub>2</sub>-Konzentration im Propagator geringfügig auf die DNA-Verteilung der Hefe ausgewirkt zu haben.



**Abbildung 39: DNA-Verteilung der Hefepopulation zum Ende der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Vergleichbar mit den ACS-Aktivitäten zeigten die Hefen aus PK2 zum Ende der Propagation mit 43% gegenüber 37% eine leicht höhere Tendenz an Zellen in der G<sub>2</sub>-/M-Phase, was darauf schließen lässt, dass die Aktivität der ACS auch unter Propagationsbedingungen mit der Hefezahlentwicklung tendenziell, aber auf niedrigerem Aktivitätsniveau korreliert.

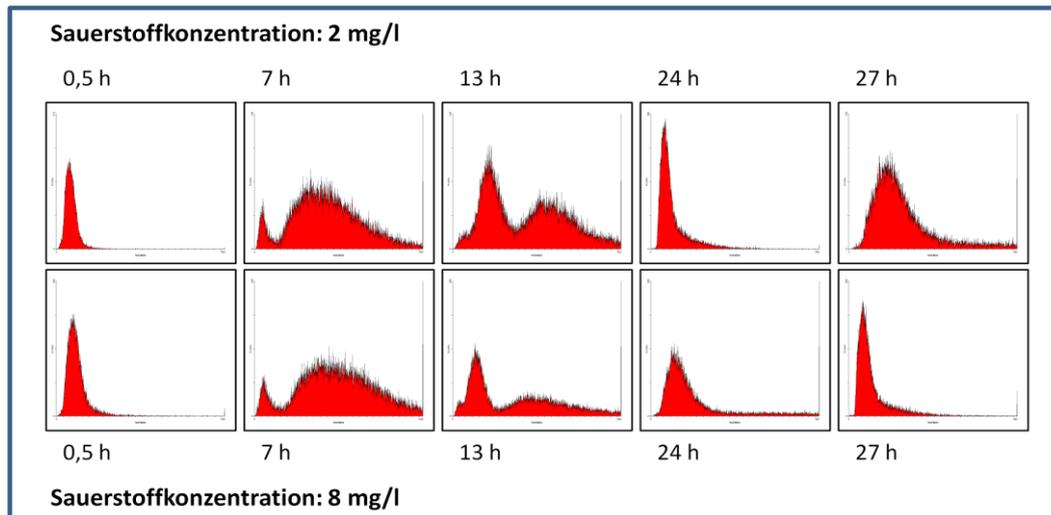
Der auf die Hefe einfließende Stress steht in Zusammenhang mit dem Trehalosegehalt in der Zelle. Dieses nicht reduzierende Disaccharid wird zwar hauptsächlich mit der Hitzetoleranz der Hefe in Verbindung gebracht, gilt aber ebenso als Indikator für den osmotischen und oxidativen Stress. Die Abbildung 40 zeigt die flusszytometrische Analyse des Trehalosegehaltes der Hefezellen von PK2 und PK8 über den Propagationsverlauf.



**Abbildung 40: Entwicklung des Trehalosegehaltes der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Die als Häufigkeitsverteilungen in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität, also des rel. Gehalts an Trehalose, dargestellten Graphen lassen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der Belüftung während der Propagation erkennen. Dennoch kam es in beiden Propagationen zu einem leichten Anstieg des durchschnittlichen Trehalosegehaltes in den ersten 13 h. Zusätzlich konnte mit fortschreitender Propagationsdauer eine breitere Verteilung beobachtet werden. D.h. die Unterschiede im Trehalosegehalt zwischen den einzelnen Zellen der Population stiegen während des Prozess an. Diese breitere Verteilung blieb über den weiteren Verlauf zwar bestehen, insgesamt nahm der Trehalosegehalt gegen Ende der Propagation jedoch wieder ab.

Ausschlaggebend für eine gute Ausstattung der Hefe sollte vor allem die Konzentration der Langzeitspeicherstoffe sein, um eine möglichst gleichbleibende Vitalität der Hefe über mehrere Führungen hinweg zu erreichen. In der Abbildung 41 ist die flusszytometrische Analyse der Neutrallipidgehalte der Hefe während des Propagationsprozesses zusammengestellt.



**Abbildung 41: Entwicklung des Neutrallipidgehalts der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Der Gehalt an Neutrallipiden nahm ausgehend von einem relativ niedrigen Niveau über die ersten 13 h in beiden Propagationen gleichermaßen deutlich zu. Danach ergaben sich zu den Zeitpunkten von 24 und 27 h dennoch Unterschiede bei den Hefen von PK2 und PK8. Zwar nahmen in beiden Populationen die Neutrallipide im Vergleich zur vorangegangenen Messung wieder ab, wobei der Rückgang in PK2 stärker ausfiel. Dies ist mit auf die Teilungen der Zellen und damit auf die Auftrennung der Neutrallipidgehalte auf Mutter- und Tochterzelle zurückzuführen. Gleichwohl zeigten die Hefen in PK2 zum Ende der Propagation einen höheren Pool an Neutrallipiden im Gegensatz zu den Hefen aus PK8, die einen zur Anfangskonzentration vergleichbaren Gehalt aufwiesen. Jedoch scheint der Auf- und Abbau der Neutrallipide ein während der Propagation oszillierender Prozess zu sein. Dies macht den Neutrallipidgehalt zu einem ungenügenden Parameter für die Bestimmung des optimalen Entnahmezeitpunktes.

### 4.3.2 Die Belüftung der Propagation als Steuerungsinstrument der Hefephysiologie

Die in Kapitel 4.2 bei der Implementierung und in Kapitel 4.3.1 erzielten Ergebnisse zur Expression der im PDH-Bypass lokalisierten Enzyme ALDH und ACS zeigten, dass diese Enzyme unter Propagationsbedingungen eine deutlich veränderte Expression als unter Gärungsbedingungen erfuhren. Die Abbildung 42 stellt die Entwicklungen der ALDH- und ACS-Aktivitäten der Hefe unter diesen Bedingungen gegenüber.

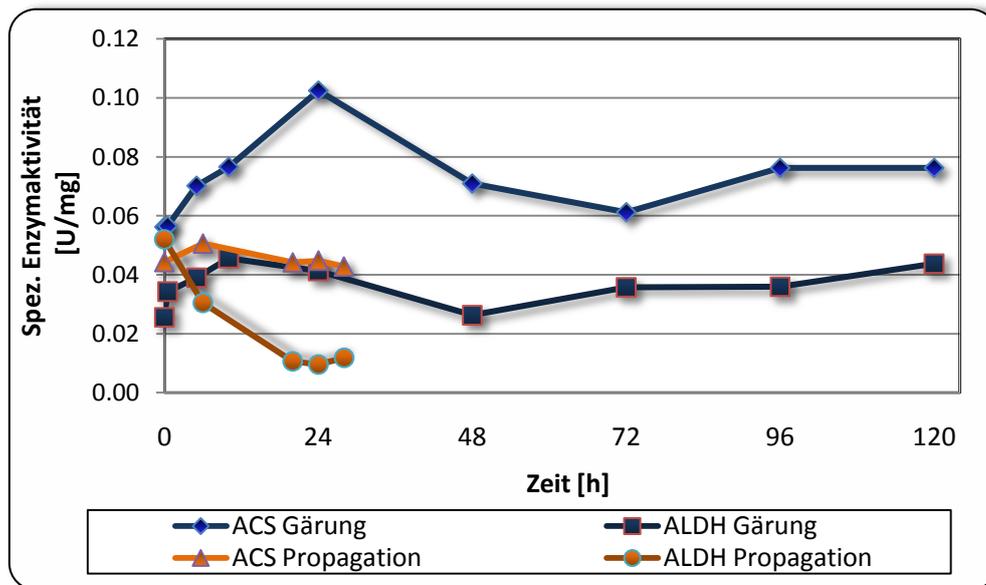
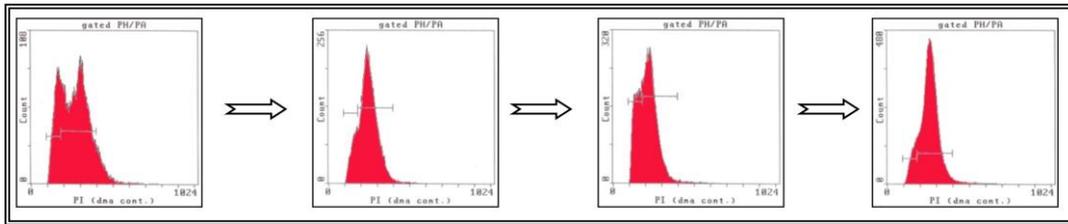


Abbildung 42: Vergleich der Enzymaktivitäten des PDH-Bypasses der Hefe bei Propagation und Gärung

Die ACS-Aktivität der Hefe zeigte unter Gärungsbedingungen eine mit dem Hefewachstum korrelierende Zunahme. Im Gegensatz dazu stagnierte die ACS-Aktivität im Propagationsprozess. Ähnlich verhielt es sich bei der Expression der ALDH-Aktivitäten der Hefen. Während diese direkt nach dem Anstellen kurzzeitig stiegen und im weiteren Verlauf der Gärung nach einer vergleichsweise geringen Repression konstant blieben und zum Ende leicht anstiegen, wurden die ALDH-Aktivität während des gesamten Propagationsprozesses deutlich reprimiert.

Da in beiden Versuchsreihen ausschließlich helle Vollbierwürzen und der identische Hefestamm verwendet wurden, konnte dieses kontroverse Verhalten der Enzymaktivitäten nur auf die bei der Propagation vorherrschenden, kontinuierlich aeroben Bedingungen zurückzuführen sein. Um die Auswirkungen von Phasen mit  $O_2$ -Verfügbarkeit und  $O_2$ -Abwesenheit auf eine Hefepopulation zu untersuchen, wurde eine Hefepopulation wechselseitig für jeweils 8 h aeroben und anaeroben Verhältnissen ausgesetzt und der Zellzyklus jeweils 30 min nach dem Wechsel der Bedingungen analysiert. Die Abbildung 43 zeigt die Histogramme der Häufigkeitsverteilungen der Zellzyklusanalysen vor und nach dem Umstellenden der Habitatbedingungen.



**Abbildung 43: Einfluss von Belüftungswechseln im Propagationsprozess auf die DNA-Verteilung der Hefepopulation**

Die Hefen zu Beginn des Versuchs zeigten, wie aus dem ersten Histogramm der Abbildung 43 ersichtlich, eine durchschnittliche DNA-Verteilung einer im Wachstum befindlichen Population. Ca. 30 min nach dem ersten Wechsel von anaeroben auf aerobe Bedingungen befand sich ein überdurchschnittlich großer Anteil an Zellen in der  $G_2$ -/M-Phase. Auch nach dem darauf folgenden Wechsel von aeroben auf anaerobe Bedingungen konnte eine vergleichbare Verteilung der Population mit einer klaren Steigerung der Zellen in der  $G_2$ -/M-Phase des Vermehrungszyklus erreicht werden. Dieses Ergebnis zeigte auch die im 4. Histogramm dargestellte DNA-Verteilung der Hefepopulation bei einem erneuten Wechsel der Habitatbedingungen. Somit scheint ein Belüftungswechsel den Zellzyklus der gesamten Population zu synchronisieren und einen positiven Einfluss auf die Vermehrungsaktivität der Hefen auszuüben.

Die entgegengesetzte Entwicklung der Enzymaktivitäten bei Propagation und Gärung sowie die Auswirkungen eines Belüftungswechsel auf die Vermehrungseigenschaften der Hefe führten zu der nachfolgenden Versuchsreihe, die den Einfluss einer Intervallbelüftung bei der Propagation auf die Hefephysiologie bzw. die Entwicklung der Enzymaktivitäten des PDH-Bypasses untersuchte. Dabei wurde sowohl ein 4ständiger Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen als auch eine 8ständige Belüftungspause in den Propagationsprozess integriert. Eine effektive Beeinflussung der Enzymaktivitäten erbrachte jedoch nur die im Zeitraum von 8 bis 16 h eingehaltene anaerobe Phase. Die Ergebnisse der Versuche mit einer 8ständigen Belüftungspause (Bez. **PI8**) sind in der Abbildung 44 dargestellt.

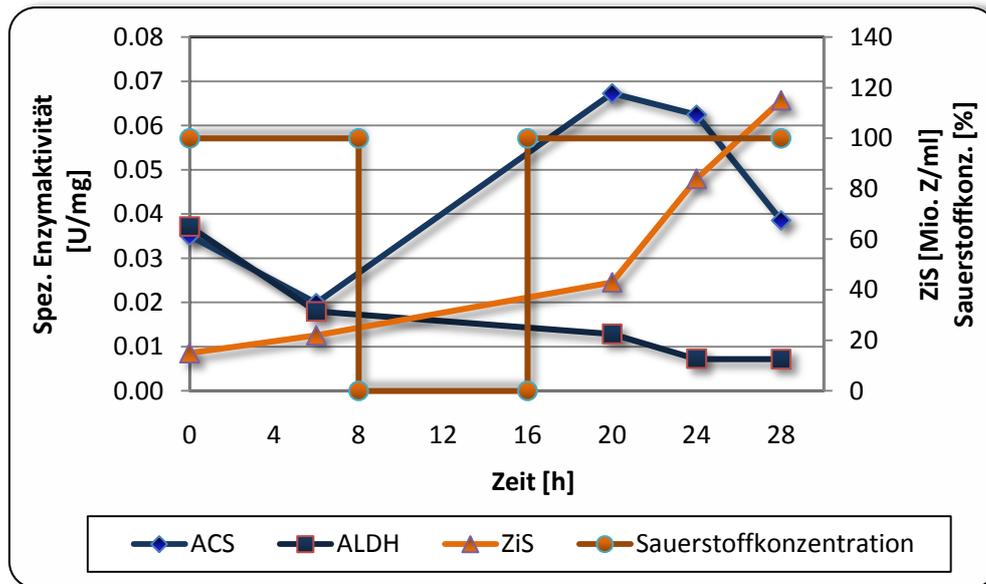


Abbildung 44: ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit 8stündigem Belüftungsintervallen

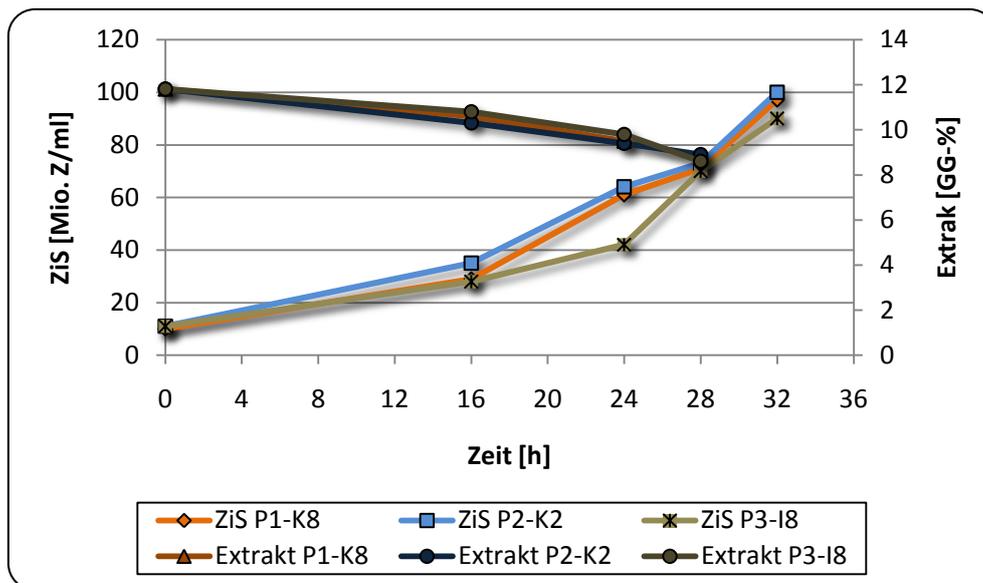
Die zu Beginn fallenden Enzymaktivitäten der ALDH und ACS wurden durch die 8stündige Belüftungspause deutlich positiv im Sinne der nachfolgenden Gärung in ihrer Expression beeinflusst. Zwar zeigte die ALDH-Aktivität eine leicht fallende Entwicklung, konnte aber über die anaerobe Phase annähernd konserviert werden. Die ACS-Aktivität der Hefen wurde während der Belüftungspause von 0,020 U/mg auf ein Maximum von 0,067 U/mg gesteigert. Diese um ca. 300% erhöhte Enzymaktivität konnten bei keiner der bisher untersuchten Hefen während des Propagationsprozesses erreicht werden. Unter den nachfolgenden aeroben Bedingungen bleibt die ACS-Aktivität zwar für weitere 4 h auf gleichbleibend hohem Niveau, fiel aber bis zum Ende der Propagation wieder auf einen vergleichbaren Wert mit denen zuvor untersuchten Propagationen zurück.

Mit den aus den bisherigen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen zur Manipulation der ACS- und ALDH-Aktivitäten durch eine Variation der Belüftungsstrategie bei der Propagation und den positiven Ergebnissen der an die Propagation PI8 angeschlossenen Gärversuche, die in Kapitel 4.5.1 beschrieben werden, erfolgte eine weitere Versuchsreihe. Diese sollte den Einfluss der verschiedenen Propagationsverfahren auf den physiologischen Zustand der Hefe, ihre Gäreigenschaften und die Auswirkungen auf die resultierende Bierqualität über mehrere Führungen hinweg untersuchen.

Insgesamt wurden dazu drei Propagationen im 120 l-Maßstab durchgeführt. Die einerseits wiederum mit einem kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Gehalt von 8 und 2 mg/l durchgeführten Propagationen (Bez. **P1-K8** und **P2-K2**) wurden um eine mit einer 8stündigen Belüftungspause variierten Propagation ergänzt (Bez. **P3-I8**). Allerdings wurde aufgrund der zum Ende hin in PI8 wieder abgefallenen ACS-Aktivität die Belüftungspause in das letzte Drittel des Propagationsprozesses verschoben. Daraus ergab sich eine 16stündige aerobe Phase mit einem kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Gehalt von 2 mg/l zu Beginn der Propagation und eine im Zeitraum von 16 bis 24 h eingehaltenen anaerobe Phase. Bis zum Erreichen der

erforderlichen Zellzahl wurde die Hefe dann wieder mit einer  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l für ca. 8 h kontinuierlich mit Sauerstoff versorgt (vgl. Kapitel 3.3.1).

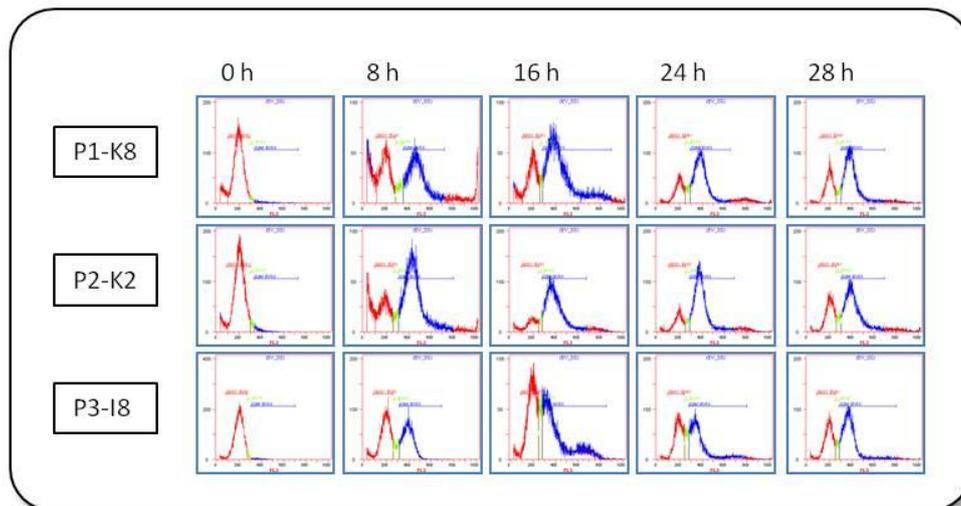
Der Extraktabbau durch die Hefen in den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 zeigte keine signifikanten Unterschiede und nahm innerhalb von 28 h von 11,8 auf durchschnittlich 8,7 Gew.-% ab. Die ZiS in P2-K2 lagen dabei tendenziell höher, was aufgrund der möglichen Messabweichung der eingesetzten Thoma-Zählkammer jedoch als nicht signifikant betrachtet werden kann. Die ZiS und der Extraktabbau in den Versuchen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 sind in der Abbildung 45 dargestellt.



**Abbildung 45: Vergleich der Hefezellzahlentwicklung und des Extraktabbau bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

Die Hefen in P3-I8 hingegen zeigten über die anaerobe Phase erwartungsgemäß ein geringeres Wachstum. Die ZiS von P3-I8 betragen zum Ende der anaeroben Phase nach 24 h ca. 42 Mio. Z/ml und damit rund 20 Mio. Z/ml weniger als die in den Versuchen P1-K8 und P2-K2 zum selben Zeitpunkt. Im weiteren Verlauf hatten die Hefen von P3-I8 jedoch eine deutliche höhere Vermehrungsaktivität und erreichten im Zeitraum von 24 bis 28 h eine mit denen in den Propagationen P1-K8 und P2-K2 vergleichbare Konzentration von ca. 70 Mio. Z/ml.

Um einen tieferen Einblick in die Vermehrungsintensität und den physiologische Zustand der Hefe während der verschiedenen Propagationen zu erlangen, wurden sowohl der Zellzyklus als auch die Enzymaktivitäten der Hefen analysiert. Die Histogramme der Zellzyklusanalysen aus den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 sind in der Abbildung 46 dargestellt.



**Abbildung 46: Vergleich der Zellzyklusanalyse der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

Die Histogramme zeigen für die Propagationen P1-K8 und P2-K2 eine vergleichbare Entwicklung der Vermehrungsaktivität der Hefen über den gesamten Prozess. So nahm der Anteil der Hefen in der rot dargestellten  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase bereits innerhalb der ersten 8 h ab, und die Hefen gingen größtenteils in die blau markierte  $G_2$ -/ $M$ -Phase über. Erst nach 28 h und somit gegen Ende der Propagationen wiesen die Populationen in P1-K8 und P2-K2 wieder einen steigenden Gehalt der Zellen in der Ruhe- bzw. Wachstumsphase auf. Gleichzeitig geben die Graphen bereits einen Hinweis auf eine absolut betrachtet höhere Vermehrungsaktivität der Hefen in P2-K2 gegenüber P1-K8 zu den Zeitpunkten 8, 16 und 24 h. Dies bestätigten die in der Tabelle 11 (Teil 1: 0 bis 16 h) und Tabelle 12 (Teil 2: 24 und 28 h) zusammengefassten prozentualen Verteilungen der einzelnen Phasen des Zellzyklus.

Die Histogramme von P3-I8 in der Abbildung 46 zeigen ab dem Zeitpunkt von 16 h aufgrund der Belüftungspause eine von den kontinuierlich belüfteten Propagationen abweichende Entwicklung in der Vermehrungsaktivität der Hefen. Die Anteile an den Vermehrungsphasen waren über den weiteren Propagationsprozess nahezu gleich verteilt. Auch gegen Ende war der Anteil der Hefen in der  $G_2$ -/ $M$ -Phase mit denen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase analog, wie die Tabelle 11 und Tabelle 12 zeigen.

**Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusanalyse bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses (Teil 1)**

|                                                     | 0 h   |       |       | 8 h   |       |       | 16 h  |       |       |
|-----------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                                     | P1-K8 | P2-K2 | P3-I8 | P1-K8 | P2-K2 | P3-I8 | P1-K8 | P2-K2 | P3-I8 |
| <b><math>G_0</math>-/<math>G_1</math>-Phase [%]</b> | 94,9% | 93,9% | 94,5% | 37,6% | 22,4% | 46,8% | 23,4% | 14,0% | 40,1% |
| <b>S-Phase [%]</b>                                  | 2,4%  | 3,0%  | 3,4%  | 7,8%  | 5,0%  | 8,8%  | 3,5%  | 4,5%  | 8,2%  |
| <b><math>G_2</math>-/<math>M</math>-Phase [%]</b>   | 2,7%  | 3,0%  | 2,1%  | 54,5% | 72,6% | 44,4% | 73,1% | 81,5% | 51,7% |

**Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusanalyse bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses (Teil 2)**

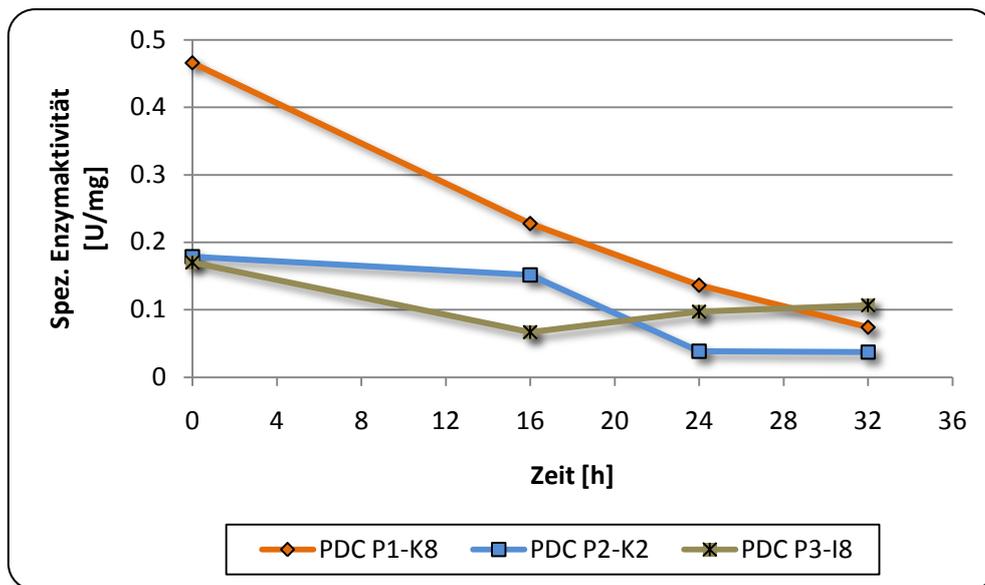
|                                              | 24 h  |       |       | 28 h  |       |       |
|----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                              | P1-K8 | P2-K2 | P3-I8 | P1-K8 | P2-K2 | P3-I8 |
| <b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase [%]</b> | 22,9% | 17,5% | 36,5% | 28,5% | 29,0% | 33,7% |
| <b>S-Phase [%]</b>                           | 7,3%  | 4,8%  | 11,3% | 6,0%  | 6,8%  | 6,0%  |
| <b>G<sub>2</sub>/M-Phase [%]</b>             | 69,8% | 77,7% | 52,2% | 65,5% | 64,2% | 60,2% |

Anhand der Werte in den Tabellen ist ersichtlich, dass trotz eines identischen Ausgangszustands der Hefen in P1-K8 und P2-K2 bei den Hefen in P2-K2 bereits nach 8 h der Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase mit fast 73% um ca. 18% über der Population aus P1-K8 lagen. Auch die beiden nachfolgenden Analysen zeigten eine höhere Vermehrungsaktivität der Hefezellen in P2-K2 gegenüber P1-K8. Dies bestätigt somit die in der Abbildung 45 dargestellten, tendenziell höheren Hefezellzahlen in P2-K2.

Aus den Histogrammen der Abbildung 46 waren bereits Unterschiede in den DNA-Verteilungen zwischen den kontinuierlich belüfteten und der intervallbelüfteten Propagation ersichtlich. Während sich der Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase in P1-K8 und P2-K2 im Zeitraum von 8, 16 und 24 h deutlich erhöhte, zeigten die Hefen aus P3-I8 eine geringere Entwicklung der Vermehrungsaktivität und diese korrelierte somit ebenfalls mit den ermittelten ZiS. Wie auch die Gegenüberstellung der prozentualen Verteilung zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus in Abhängigkeit der eingesetzten Propagationsvariationen in den Tabelle 11 und Tabelle 12 belegt, befanden sich in P3-I8 maximal 52% der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Da die Proben für die Zellzyklusanalyse nicht 30 min nach dem Umstellen von anaeroben auf aerobe Bedingungen erfolgte, wie bei den vorangegangenen Messungen zum Einfluss eines Belüftungswechsel, sondern parallel dazu erfolgte, war in dieser Versuchsreihe keine mit denen in Abbildung 43 vergleichbare DNA-Verteilung ersichtlich. Jedoch kann aufgrund der überdurchschnittlich hohen Zellzahlentwicklung in den 4 h nach dem Wechsel der Habitatbedingungen von einer ähnlichen Verteilung der Hefen in P3-I8 zu diesem Zeitpunkt ausgegangen werden.

Neben dem Einfluss der Intervallbelüftung auf den in der G<sub>2</sub>/M-Phase befindlichen Anteil der Hefepopulation, wirkte sich die Belüftungsvariation ebenfalls auf den in der S-Phase befindlichen Teil aus. Der Anteil an Zellen in P3-I8, die sich in dieser Phase des Zellzyklus befanden, lag über weite Strecken oberhalb der anderen beiden Propagationen. Zum Ende der Propagationen war bei allen Populationen eine vergleichbare DNA-Verteilung zu beobachten und es befanden sich ca. 30% in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase und noch ca. 60% der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase.

Da die Propagationsversuche P1-K8, P2-K2 und P3-I8 in einem größeren Maßstab gegenüber den Versuchen PK2 und PK8 durchgeführt wurden, konnten diese nicht parallel erfolgen, sondern mussten über den Zeitraum von 2 Wochen und dem zu Folge mit zwei unterschiedlichen Ausgangshefen und -würzen unternommen werden. Anders als bei den Messungen der ZiS, dem Extraktabbau und der DNA-Verteilung wurde der ungleiche Ausgangszustand in der Hefephysiologie in den Ergebnissen der Enzymaktivitätsmessung deutlich. Während die für die Versuche P2-K2 und P3-I8 aus einer Charge stammenden Hefen vergleichbare Anfangsaktivitäten aufwiesen, wichen die der Anstellhefe für P1-K8 teilweise stark ab. Die Abbildung 47 zeigt die PDC-Aktivität der Hefen über den Vermehrungsprozess.

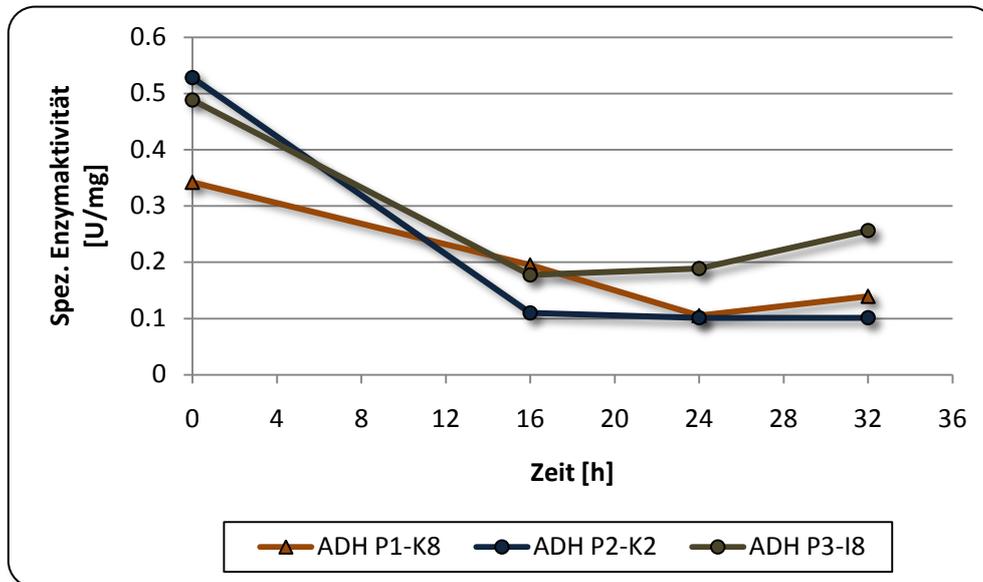


**Abbildung 47: PDC-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

Die PDC-Aktivitäten zeigten gleichzeitig die größten Unterschiede zwischen den beiden zur Propagation eingesetzten Anstellhefen. Die PDC-Aktivität der Hefen in P1-K8 lag dabei zu Beginn mit 0,47 U/mg deutlich über der in P2-K2 und P3-I8 verwendeten Hefen, die mit 0,17 U/mg einen vergleichsweise geringen Stoffumsatz aufwiesen. Im Verlauf der Propagation sank die PDC-Aktivität der Hefe in P1-K8 aufgrund der höheren Anfangsaktivität deutlicher stärker ab, als dies in den anderen beiden Propagationen der Fall war. Zum Ende der Herführung zeigten dann alle Hefen eine geringe Expression. Allerdings führte die anaerobe Phase in P3-I8 zu einer gesteigerten PDC-Aktivität in der 2. Hälfte des Prozesses, so dass diese Hefen mit 0,11 U/mg eine höhere Aktivität als diejenigen aus P1-K8 mit 0,07 U/mg und aus P2-K2 mit 0,04 U/mg hatten.

Bei den in Abbildung 48 dargestellten Ergebnissen zur Enzymaktivitätsmessungen der ADH wird ebenfalls der unterschiedliche Ausgangszustand der Anstellhefen von P1-K8 gegenüber der von P2-K2 und P3-I8 ersichtlich. Mit einer ADH-Aktivität der Hefen in P2-K2 und P3-I8 von

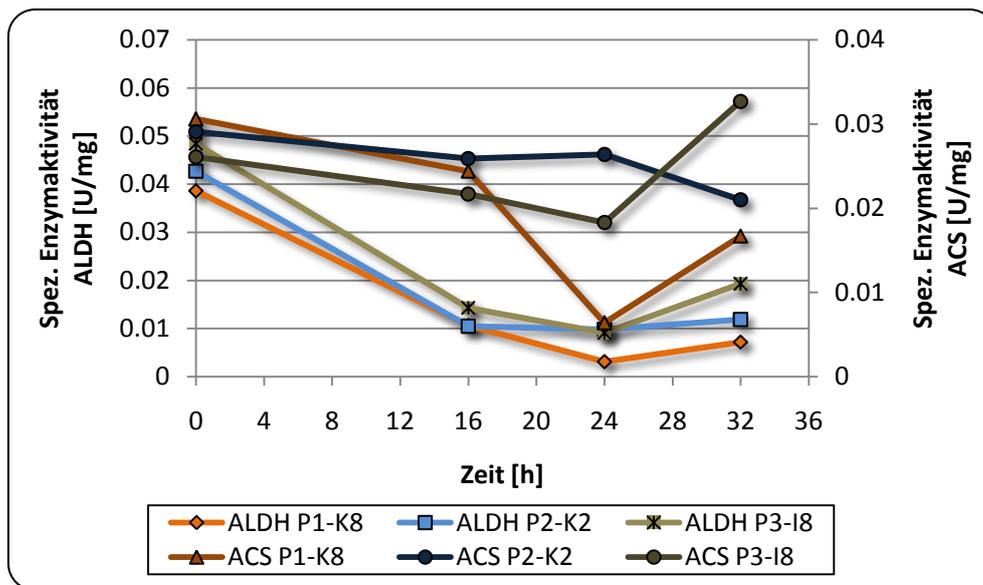
0,53 und 0,49 U/mg fiel der Unterschied zu der Hefe in P1-K8 mit 0,34 U/mg allerdings geringer aus als im Falle der PDC.



**Abbildung 48: ADH-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8ständiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

Über die Dauer der Propagationen zeigten die ADH-Aktivitäten einen mit der Entwicklung bei der PDC vergleichbaren Verlauf. Die ADH-Aktivitäten nahmen in den ersten 16 bis 24 h auf ein Minimum ab. Während sich die Aktivitäten der Hefen von P1-K8 und P2-K2 im Weiteren nicht mehr veränderten und zum Ende bei 0,10 bzw. 0,14 U/mg lagen, konnte auch hier eine gesteigerte Expression der ADH bei den Hefen von P3-I8 beobachtet werden, die wiederum auf die anaerobe Phase im letzten Drittel des Prozessverlauf zurückzuführen war.

Die über den Propagationsverlauf gemessenen Aktivitäten der Enzyme des PDH-Bypasses sind in der Abbildung 49 zusammengefasst. Dabei wiesen im Gegensatz zu den Enzymen PDC und ADH die Ausgangsaktivitäten zwischen den Anstellhefen keine deutlichen Unterschiede auf. Die ALDH-Aktivität der Hefen entwickelte sich während den Propagationen vergleichbar mit denen unter Kapitel 4.3.1 beschriebenen Aktivitäten der Versuche PK2 und PK8. Ausgehend von ALDH-Aktivitäten zwischen 0,039 und 0,049 U/mg fielen diese innerhalb von 24 h bis auf ein jeweiliges Minimum. Je geringer die Sauerstoffversorgung desto weitreichender wurde die Aktivität der ALDH bei den einzelnen Hefen reprimiert. Zum Ende hin stieg die Expression der ALDH aller Hefen wieder leicht an, wobei mit 0,019 U/mg die Hefen aus P3-I8 die höchste ALDH-Aktivität erreichten.



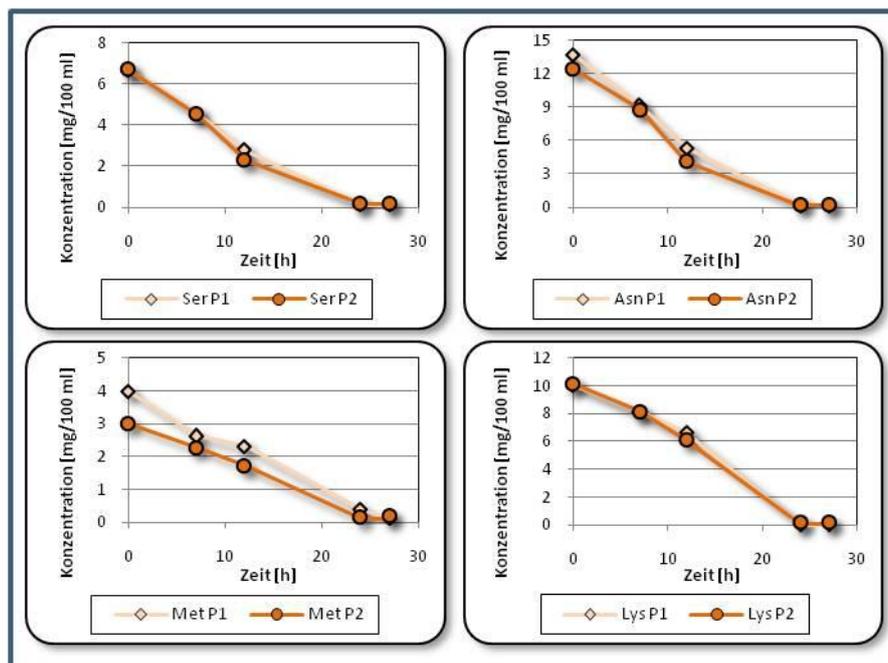
**Abbildung 49: ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

Die Verläufe der ACS-Aktivitäten bei den 3 Propagationen wichen gegenüber den anderen Enzymaktivitäten am deutlichsten von einander ab. Zwar wiesen die Anfangsaktivitäten geringe Unterschiede auf und nahmen in den ersten 16 h nur leicht ab, aber im Folgenden fiel die Aktivität der Hefen aus P1-K8 bis auf ein Minimum von 0,006 U/mg ab und lag damit nach 24 h um 0,012 U/mg unter den Aktivitäten der Hefen aus P2-K2 und um 0,020 U/mg unter der Aktivität der Hefen aus P3-I8. Im weiteren Verlauf der Propagation stieg die Aktivität zwar wieder leicht an, wies aber im Vergleich auch am Ende den niedrigsten Wert auf. Die bis zu einem Zeitpunkt von 24 h nahezu konstanten ACS-Aktivitäten der Hefen aus P2-K2 fielen zum Ende hin auf ein Minimum von 0,020 U/mg. Die mit der niedrigsten Ausgangsaktivität in P3-I8 propagierten Hefen zeigten über die im letzten Drittel der Propagation eingehaltene anaerobe Phase keine mit der in Versuch P18 vergleichbare Expression der Enzymaktivität. Dennoch wiesen die Hefen zum Ende hin ein Maximum von 0,033 U/mg auf und besaßen nach 32 h damit die höchste Enzymaktivität der drei Propagationshefen.

### 4.3.3 Die Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe bei der Propagation

Ein für den physiologischen Zustand der Hefe entscheidender Faktor ist die ausreichende Versorgung der Hefezellen mit FAN. Die aus der Literatur unter Gärungsbedingungen bekannte Gruppierung bei der Aufnahme der Aminosäuren sollte anhand der Versuche PK8 und PK2 hinsichtlich ihrer Gültigkeit unter Propagationsbedingungen untersucht werden. Dabei zeigte die Analyse der einzelnen Aminosäuren über den Propagationsverlauf ein ungleiches Verhalten gegenüber der unter Gärungsbedingungen postulierten Aufnahme. Dennoch war eine Einteilung der Aminosäuren anhand ihrer Konzentrationsverläufe und der damit verbunden Aufnahme durch die Hefe, auch unabhängig von der erfolgten Belüftungsstrategie, in sechs Gruppen möglich. Auf die Bestimmung von Cystein musste aufgrund der für diese Aminosäure nicht eindeutigen Signifikanz der verwendeten Analyseverfahren mittels HPLC verzichtet werden.

Bei den Aminosäuren Serin, Asparagin, Methionin und Lysin konnte eine unmittelbar nach Propagationsbeginn eingesetzte Aufnahme durch die Hefe beobachtet werden, die bis zur vollständigen Zehrung gegen Ende der Propagation andauerte. Die Abbildung 50 verdeutlicht den Konzentrationsverlauf dieser vier Aminosäuren über den Propagationsprozess.

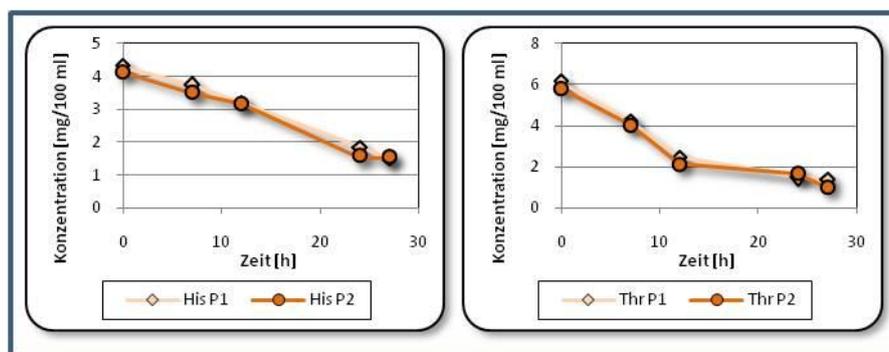


**Abbildung 50: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Die Aufnahme dieser Aminosäuren der 1. Gruppe zeigte dabei keinen direkten Zusammenhang mit der jeweiligen Ausgangskonzentration in der Würze. Die Aminosäuren lagen zu Beginn in einem Konzentrationsbereich von 3 mg/100 ml im Falle von Methionin bis hin zu 12,5 mg/100 ml bei Asparagin vor. Bei Asparagin und Lysin ist in der Kohlenstoffkette eine zusätzlich Aminogruppe gebunden und Methionin hat, neben dem nicht erfassten Cystein, eine Schlüsselrolle in der Versorgung der Hefe mit schwefelhaltigen Aminosäuren.

Bei Serin handelt es sich um eine kurzkettige Aminosäure, die mit ihrer Hydroxylgruppe ebenfalls eine leicht zugängliche funktionale Gruppe beinhaltet. Diese Faktoren könnten für die schnellere Aufnahme dieser Aminosäuren mitverantwortlich sein. Die Einflussnahme der bei dieser Betrachtungsweise vernachlässigten Zunahme der ZIS wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels aufgezeigt, stellt jedoch einen für alle Aminosäuren gleichbedeutenden Faktor dar.

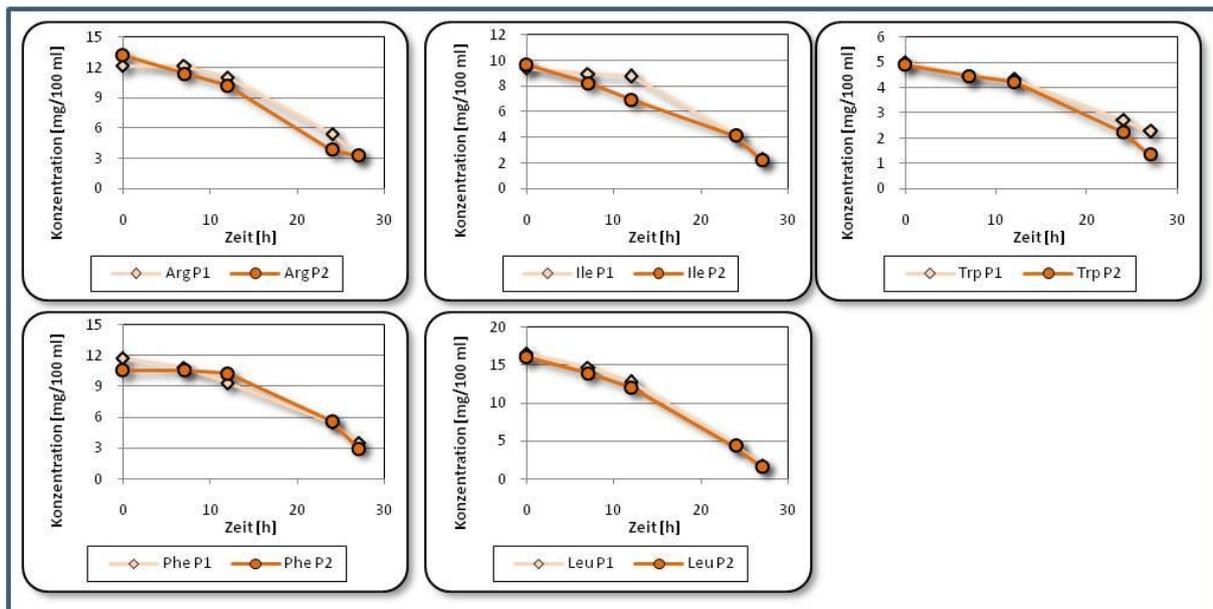
In der zweiten Gruppe wurden diejenigen Aminosäuren zusammengefasst, die ebenfalls von Beginn an von der Hefe aufgenommen wurden, aber deren Abnahme mit fortschreitender Propagation nachließ bzw. zum Erliegen kam. Die Abbildung 51 gibt einen Überblick über die Konzentrationsverläufe der Aminosäuren Histidin und Threonin während der Propagation, die damit die 2. Gruppe bilden.



**Abbildung 51: Aminosäuren mit unmittelbarer und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Innerhalb dieser Gruppe nahm die Hefe Threonin, das eine dem Serin aus Gruppe 1 verwandte Struktur aufweist, zu Beginn deutlich schneller auf als Histidin. Gleichzeitig hatte die Hefe aber bereits nach 12 h die Assimilation von Threonin fast vollständig beendet, obwohl noch ca. 2 mg/100 ml zu Verfügung standen. Die Aufnahme von Histidin stagnierte erst in den letzten 4 h des Propagationsprozesses. Auch in der Seitenkette dieser Aminosäuren liegen zusätzliche Stickstoffatome vor, die eventuell ebenfalls von Beginn an eine wesentliche Bedeutung für die Proteinbiosynthese der Hefe unter den Propagationsbedingungen in der Brauerei haben.

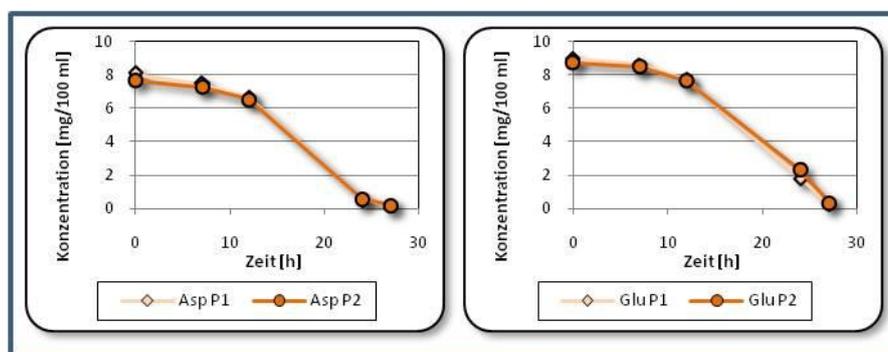
Die nach dem Aufnahmeverhalten durch die Hefe in die 3. Gruppe eingeteilten Aminosäuren sind in der Abbildung 52 zusammengefasst. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Tryptophan, Phenylalanin und Leucin, die im Laufe der Propagation eine beschleunigte Abnahme in ihrer Konzentration aufwiesen.



**Abbildung 52: Aminosäuren mit schwacher Repressionsphase und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Im Falle von Isoleucin erfolgte die Einteilung in diese Gruppe anhand des Mittelwertes beider Propagationen, bei denen ein geringer Unterschied im Verlauf der Konzentration festgestellt werden konnte. Während die Hefen aus PK8 direkt mit der Assimilation von Isoleucin begannen, kam es in PK2 zu einer verzögerten Aufnahme. Eine generelle Abhängigkeit von der spezifischen Belüftungsrate bei der Propagation ließ sich auch im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren daraus allerdings nicht ableiten.

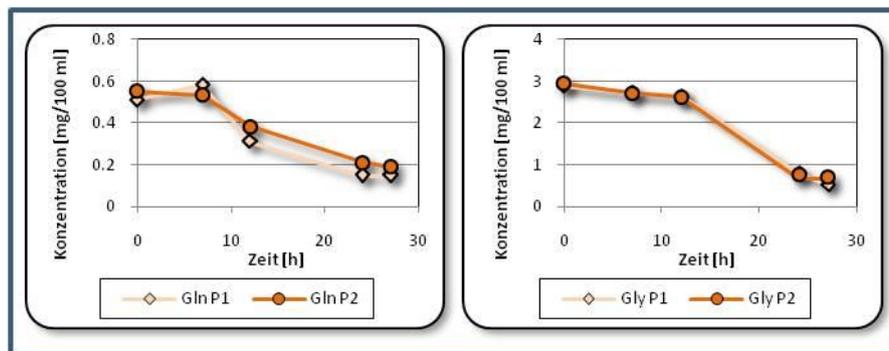
Die teilweise, wie im Falle von Leucin und Isoleucin oder Phenylalanin und Tryptophan, strukturähnlichen Aminosäuren scheinen somit erst im weiteren Verlauf, eventuell bedingt durch die Limitierung der Aminosäuren der 1. und 2. Gruppe, an Bedeutung für den Metabolismus der Hefe zuzunehmen. Die Abbildung 53 zeigt die Aminosäuren Asparagin und Glutamin, bei denen zwar zu Beginn der Propagation eine Repression in der Aufnahme vorzuliegen schien, aber im weiteren Verlauf von der Hefe vollständig aus der Würze aufgenommen wurden.



**Abbildung 53: Aminosäuren mit ausgeprägter Repressionsphase und vollständiger Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Der Hauptanteil der ebenfalls in der Struktur nah verwandten Aminosäuren Asparagin und Glutamin ist dabei maßgeblich im Zeitraum von 12 bis 24 bzw. 28 h aufgenommen worden. Beide Aminosäuren hatten in der verwendeten hellen Ausschlagwürze mit ca. 8 mg/100 ml ebenfalls eine vergleichbare Ausgangskonzentration.

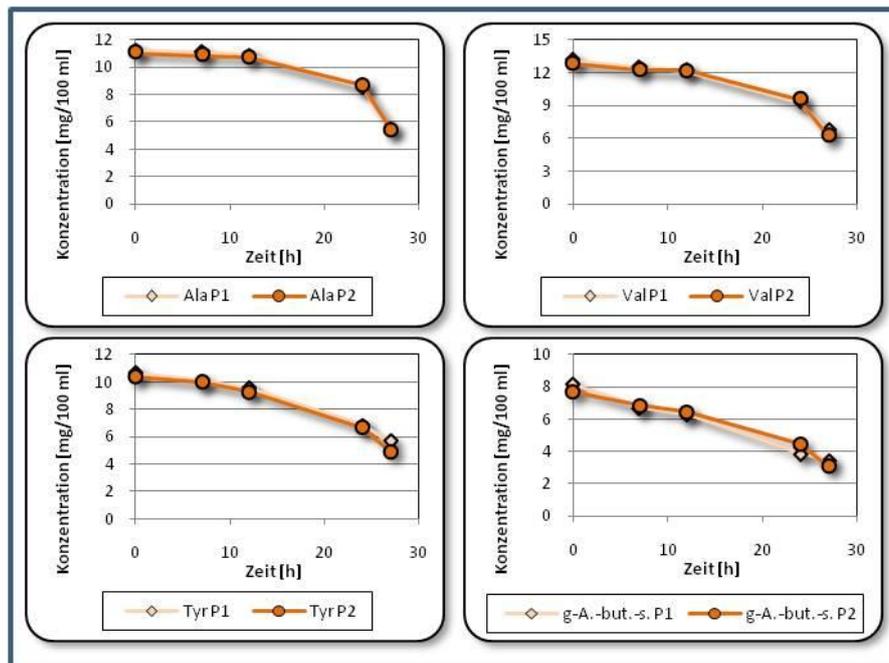
Die in beiden Fällen mit einer Hydroxylgruppe endenden Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin zeichneten sich durch eine zu Beginn der Propagation relative konstant bleibende Konzentration aus. Anhand der in der Abbildung 54 aufgezeigten Konzentrationen wird ersichtlich, dass die Hefe im Falle von Glutaminsäure über die ersten 8 h und bei Glycin über 12 h nahezu keine dieser Verbindungen aufnahm. Somit spielten diese beiden Aminosäuren für den Hefestoffwechsel zu diesem Zeitpunkt eine scheinbar untergeordnete Rolle.



**Abbildung 54: Aminosäuren mit Repressionsphase und sinkender Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Erst mit fortschreitender Propagation der Hefezellen fand eine teilweise Verwertung dieser Aminosäuren durch die Hefe statt. Dies kann u.a. auf die Limitierung anderer Aminosäuren zurückgeführt werden. Die Aufnahme wurde jedoch nicht über die gesamte restliche Propagationszeit aufrechterhalten. In den letzten 4 h kam die Aufnahme beider Aminosäuren wieder zum Erliegen.

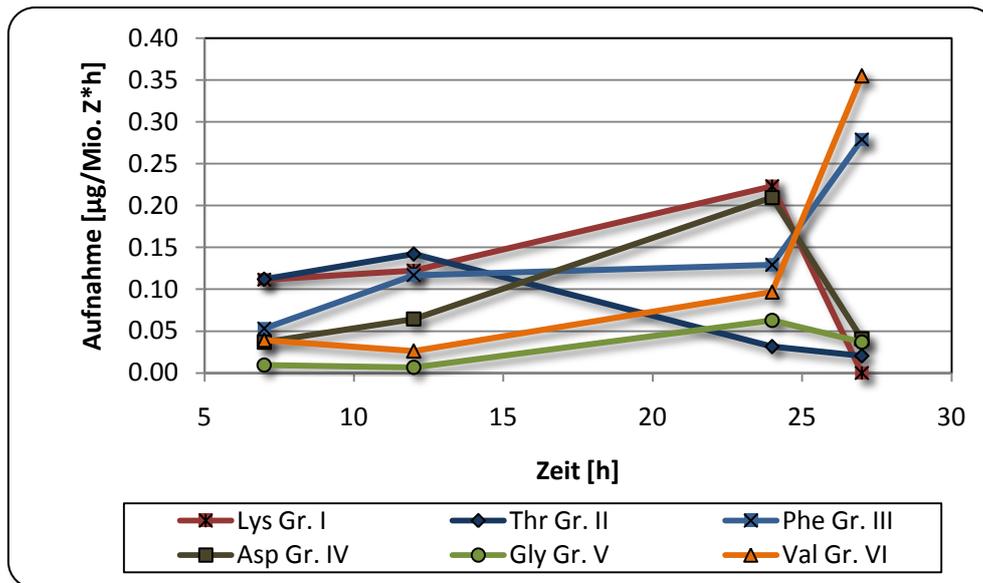
Die letzte Gruppe der Aminosäuren setzt sich aus Alanin, Valin, Tyrosin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure zusammen, deren Konzentrationen über den Propagationsprozess in der Abbildung 55 dargestellt sind. Die Konzentrationen dieser vier Aminosäuren lassen ebenfalls auf eine ausgeprägte Repressionsphase zu Beginn der Propagation schließen und weisen auch auf eine im weiteren Verlauf geringe Verwertung durch die Hefe hin.



**Abbildung 55: Aminosäuren mit ausgeprägter Repressionsphase und geringer Aufnahme durch die Hefe bei der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l**

Erst in den letzten 4 h, in denen bereits eine weitgehende Limitierung des FAN eintrat, nahm die Hefe noch größere Teile der Aminosäuren Alanin und Valin auf. Alle diese Aminosäuren lagen in einer Konzentration von 8 bis 12 mg/100 ml in der Würze vor und machten somit einen großen Teil des für die Hefe verfügbaren Stickstoffs aus.

Die bisher aufgeführten Konzentrationsverläufe sind ohne die Berücksichtigung der Hefezellzahlentwicklung betrachtet worden. Um die effektive Aufnahmerate der Hefezellen zu ermitteln, wurde am Beispiel jeweils einer Aminosäure aus den o.g. Gruppen die Mengendifferenz zwischen den Zeitpunkten der Analysen auf die gemittelte Hefezellzahlkonzentration bezogen. Daraus ergibt sich die aufgenommene Menge der jeweiligen Aminosäure in  $\mu\text{g}/\text{Mio. Z}^*\text{h}$ . In der Abbildung 56 sind die Aufnahmeraten von Lysin (Gruppe I), Threonin (Gruppe II), Phenylalanin (Gruppe III) Asparaginsäure (Gruppe IV) Glycin (Gruppe V) und Valin (Gruppe VI) dargestellt.



**Abbildung 56: Aufnahme der Aminosäuren während der Propagation in Abhängigkeit der Hefezellkonzentration**

Die Aufnahmerate von Lysin als Vertreter der 1. Gruppe war während der ersten 12 h konstant. Im weiteren Verlauf nahm die Aufnahme pro Mio. Z\*h bis zum Zeitpunkt von 24 h auf ein Maximum zu und zeigte im Vergleich mit den übrigen Aminosäuren die höchste Aufnahmerate. Erst aufgrund der fortschreitenden Limitierung von Lysin sank die Aufnahme zum Ende der Propagation auf ein Minimum ab. Threonin als Vertreter der 2. Gruppe wurde in den ersten 12 h ebenfalls fast gleichbleibend durch die Hefe aufgenommen. Im Folgenden nahm die assimilierte Menge trotz andauernder Verfügbarkeit stetig bis auf ein Minimum von 0,02 µg/Mio. Z\*h ab.

Die Aufnahmerate von Phenylalanin nahm über die ersten 12 h zu, blieb im Zeitraum von 12 bis 24 h konstant und wurde zum Ende der Propagation von der Hefe nochmals deutlich gesteigert und erreichte am Ende der Propagation mit 0,28 µg/Mio. Z\*h den zweithöchsten Wert der hier dargestellten Aminosäuren. Asparaginsäure als Vertreter der 4. Gruppe wurde im Verlauf der Propagation bis zur ihrer vollständigen Zehrung zunehmend durch die Hefe assimiliert. Zum Zeitpunkt von 24 h betrug die Aufnahmerate 0,21 µg/Mio. Z\*h und war damit mit der von Lysin vergleichbar. Die Aminosäuren Glycin, die der 5. Gruppe zugeordnet wurde, und Valin aus der 6. Gruppe zeigten bis zum Zeitpunkt von 12 h die geringste Aufnahme durch die Hefe. Erst mit fortschreitender Prozessdauer wurden sie vermehrt aufgenommen. Während die Aufnahmerate von Glycin zum Ende hin wieder abfiel, wurde Valin in den letzten 3 h der Propagation ebenso verstärkt von der Hefe assimiliert wie Phenylalanin und erfuhr zum Ende mit einem Maximum von 0,36 µg/Mio. Z\*h die höchste Aufnahmerate.

Der Aminosäurestoffwechsel ist unter Fermentationsbedingungen direkt mit der Bildung der höheren Alkohole und Ester verknüpft. Um den Einfluss der Prozessbedingungen und der Aminosäureaufnahme auf die Bildung der GNP bei der Propagation zu untersuchen, ist deren

Konzentration zum Ende der Propagationen PK2 und PK8 bestimmt worden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13: GNP-Spektrum des Propagationsbieres in Abhängigkeit der Belüftung von 2 und 8 mg/l O<sub>2</sub>-Konzentration**

|                        | P1 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l)<br>[mg/l] | P2 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l)<br>[mg/l] |
|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Acetaldehyd            | 112,1                                  | 75,8                                   |
| Ethylacetat            | 2,0                                    | 1,9                                    |
| n-Propanol             | 15,6                                   | 17,4                                   |
| i-Butanol              | 11,4                                   | 13,3                                   |
| i-Amylacetat           | 0,2                                    | 0,2                                    |
| Amylalkohole           | 40,7                                   | 43,1                                   |
| Diacetyl, gesamt       | 0,29                                   | 0,23                                   |
| 2,3-Pentandion, gesamt | 0,22                                   | 0,20                                   |
| Σ höhere Alkohole      | 67,0                                   | 73,8                                   |
| Σ Ester                | 2,2                                    | 2,1                                    |
| Σ VDKs                 | 0,51                                   | 0,43                                   |

Die Analyse der GNP zeigte einen deutlichen Einfluss des Propagationsprozesses und damit der spezifischen Belüftungsrate auf die Konzentrationen an Acetaldehyd, der höheren Alkohole und der VDK, während die Ester keine signifikante Beeinflussung erfuhren. Dabei betrug z.B. der Konzentrationsunterschied zwischen PK2 und PK8 an Acetaldehyd 36,3 mg/l. Die höheren Alkohole wiesen eine Differenz von 6,8 mg/l und auch die Konzentration der VDK in PK2 erreichte mit 0,51 mg/l eine um 0,08 mg/l höheren Wert. Dabei konnten die erhöhten Konzentrationen von PK2 gegenüber PK8 nicht auf einzelne Substanzen zurückgeführt werden, sondern betrafen jeweils die in der Summe der höheren Alkohole und VDK zusammengefassten Einzelkomponenten. Dies lässt eher auf eine unterschiedlich starke Austreibung aufgrund der in PK8 erhöhten Luftmenge zwischen den beiden Propagationen als auf eine durch den Metabolismus der Hefe bedingte Veränderung der GNP schließen.

## 4.4 Der physiologische Zustand der Hefe in der Gärung

### 4.4.1 Vergleich der Gärverhalten und Enzymaktivitäten verschiedener Hefestämme

Die in vielen Forschungsarbeiten zur Optimierung des Hefemanagements diskutierte Fragestellung, ob der Einsatz eines anderen Hefestammes eine höhere Bedeutung besitzt als die technologische Beeinflussung des physiologischen Zustands der verwendeten Hefe, war Anlass zu einer Versuchsreihe mit insgesamt sechs Hefestämmen. Zu dem in den übrigen Versuchen verwendeten Stamm W34/78 wurden die fünf weiteren Stämme W128, W34/70, W69, W194 und der als Staubhefe charakterisierte Stamm W66/70 eingesetzt und auf Unterschiede im physiologischen Zustand, bei den Gäreigenschaften und den resultierenden Qualitätsmerkmalen der Biere untersucht. Bei drei der Stämme wurde zum Abgleich mit den übrigen Versuchsreihen die Verhaltensweise der Enzymaktivitäten während der Gärung analysiert.

In der Abbildung 57 sind die Entwicklungen der ZiS der einzelnen Hefestämmen während den Gärungen abgebildet. Dabei sind trotz analoger Prozessbedingungen und einer vergleichbaren Anstellkonzentration zwischen 16 Mio. Z/ml und 21 Mio. Z/ml deutliche Unterschiede in der Zellzahlentwicklung der Stämme W34/78 und W66/70 gegenüber den restlichen Stämmen aufgetreten.

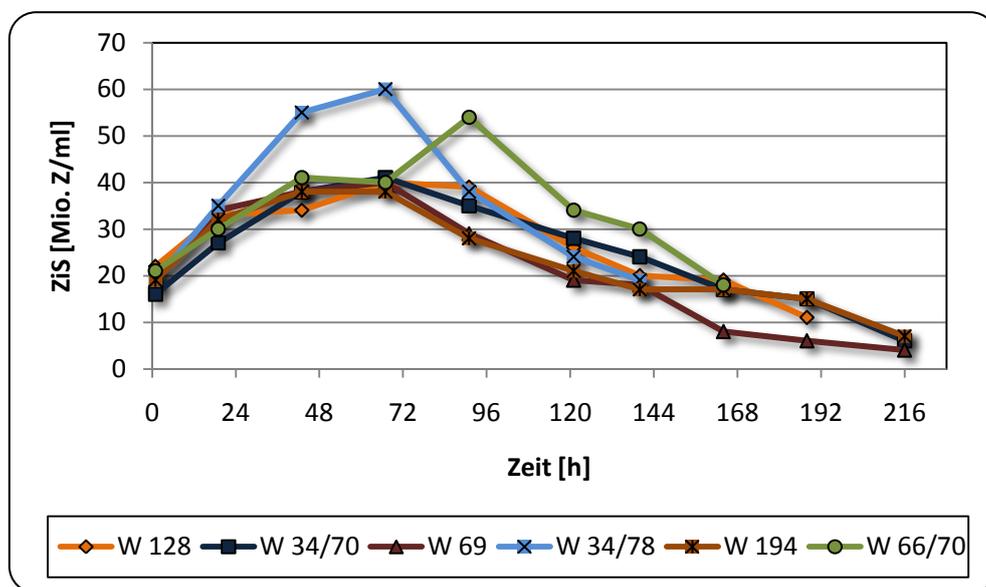


Abbildung 57: Hefezellzahlentwicklung verschiedener Hefestämmen während der Gärung

Im Gegensatz zu den Hefestämmen W128, W34/70, W69 und W194, die jeweils ein Maximum von ca. 40 Mio. Z/ml am 2. und 3. Gärtag aufwiesen, vermehrte sich die Hefen vom Stamm W34/78 in dem gleichen Zeitraum bis auf 60 Mio. Z/ml und erreichten damit eine 50% höhere Vermehrungsrate. Ebenfalls eine höhere Vermehrungsrate zeigte der Stamm W66/70. Allerdings wurde die maximale Konzentration der ZiS hierbei erst am 4. Gärtag erreicht. Beim Absetzverhalten zeigten nur die Hefen vom Stamm W69 eine

weiterreichende Klärung zum Ende der Hauptgärung. Auch der als Staubhefe geltende Stamm W66/70 präsentierte ein vergleichbares Absetzverhalten und erreichte am 6. Gärtag noch eine mit denen in den anderen Gärungen vergleichbare Zellkonzentration von 18 Mio. Z/ml.

Auch im Extraktverlauf und somit in der Gärzeit sind Unterschiede nicht zuletzt aufgrund der beschriebenen Hefezellzahlentwicklungen aufgetreten. Die Abbildung 58 gibt einen Überblick über den Extraktabbau der verwendeten Hefestämme während der Gärung.

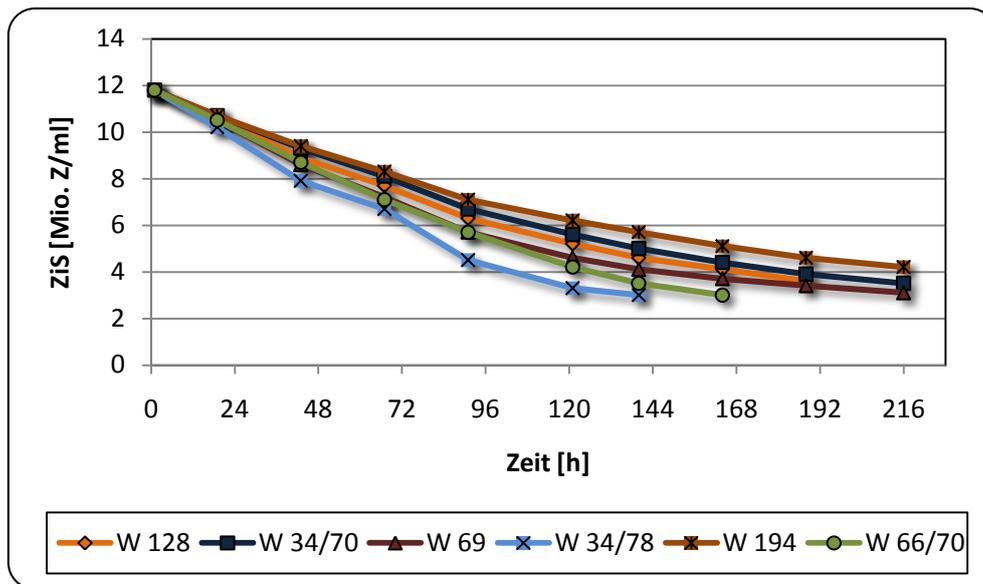
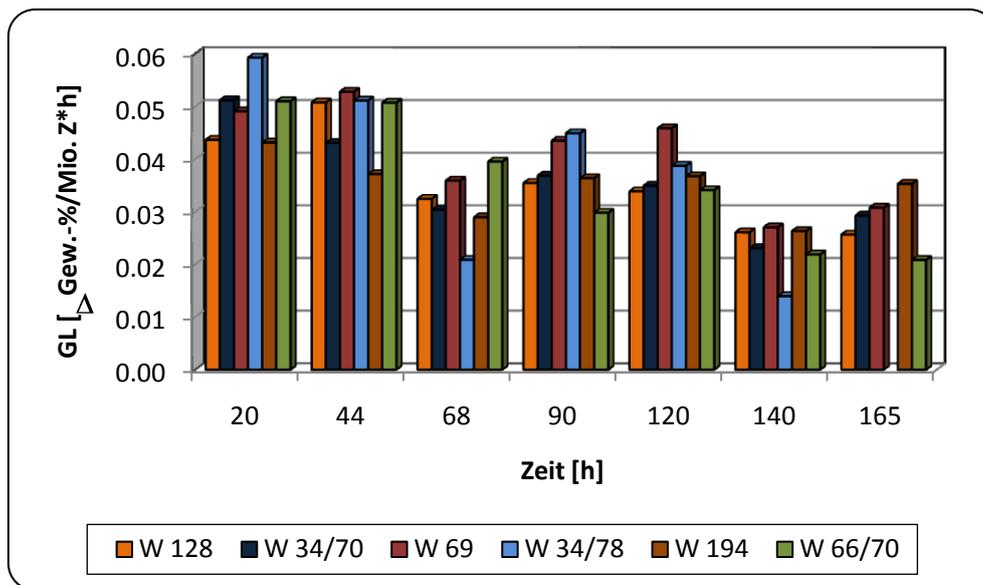


Abbildung 58: Extraktabbau während der Gärung mit verschiedenen Hefestämme

Die Hefen vom Stamm W34/78 erreichten den vorgesehenen GVG mit einem scheinbaren Restextrakt von 3,0 Gew.-% innerhalb von 140 h und zeigten damit den zügigsten Gärverlauf. Die Hefen vom Stamm W69 konnten den Extrakt am zweitschnellsten umsetzen und den angestrebten GVG in einem Zeitraum von 164 h erreichen. Bei den mit einer Hauptgärtemperatur von 10 °C durchgeführten Gärungen konnten nur zwei weitere Stämme den GVG in einer angemessenen Zeit erreichen. Die Hefen der Stämme W69 und W128 kamen nach einer Gärzeit von 216 h auf einen scheinbaren Restextrakt von 3,1 Gew.-%. Die Gärungen mit den Stämmen W34/70 und W194 wurden jedoch zur selben Zeit geschlaucht, aber konnten trotz des erhöhten Restextraktes von 3,5 und 4,2 Gew.-% in der folgenden Reifungs- und Lagerungsphase einen mit denen der anderen Stämmen vergleichbaren AVG von 79 und 74% erreichen (vgl. Kapitel 4.8.2).

Um einen Vergleich zwischen den Gärungen anzustellen und die effektive Umsetzung der Würzeinhaltsstoffe unter Eliminierung der Zellzahlen zu beurteilen, ist die Betrachtung der GL erforderlich. Diese sind in der Abbildung 59 über die Gärdauer dargestellt und können gleichzeitig Aufschluss über Unterschiede im gärungsphysiologischen Charakter der verschiedenen Hefen geben.



**Abbildung 59: Resultierende Gärleistung verschiedener Hefestämme während der Gärung**

In den ersten 44 h wurde in allen Gärungen am meisten Extrakt pro Hefezelle umgesetzt. Mit dafür verantwortlich könnte die Aufnahme eines großen Teils der vorliegenden Nähr- und Wachstumsstoffe (Aminosäuren, Lipide, etc.) für die Vermehrung gewesen sein. Die Hefen vom Stamm W34/78, welche die zügigste Gärung und weitreichendste Vermehrung aufwiesen, zeigten dabei auch höchste GL mit einem Umsatz von 0,059 bzw. 0,051  $\Delta$ Gew.-%/Mio. Z\*h.

Zum Ende der jeweiligen Wachstumsphase trat bei allen Hefen ein Minimum im Stoffumsatz pro Hefezelle ein. Dies könnte ein Anhaltspunkt für die Umstellung von einem ausgeprägten vermehrungsphysiologischen zu einem gärungsphysiologischen Charakter sein. Danach nahm die GL der Hefen aller Stämme wieder zu und führte zum anteilmäßig größten Extraktabbau über die Hauptgärphase im Zeitraum von 68 bis 120 h. Die Hefen der Stämme W69 und W34/78 hatten die höchsten GL. Somit war der zügige Extraktabbau in der Gärung mit dem Stamm W34/78 sowohl auf die weitreichendere Vermehrung, als auch auf die Höhe der GL zurückzuführen. Die Gärung mit den Hefen des Stammes W69 zeigte im Vergleich zu denen mit einer identischen Zellzahlentwicklung ebenfalls einen schnelleren Extraktabbau und spiegelt somit die Bedeutung einer hohen GL für eine kurze Gärzeit wider. Mit fortschreitender Gärdauer und der beginnenden Limitierung des Würzextraktes kam es zu einer Verringerung der GL. Bei den Hefen der Stämme W128, W34/70, W69 und W66/70 stieg die GL jedoch zum Ende der Gärung nochmals an, da sich erst die Hefen mit geringerer Vitalität abgesetzt hatten und die gärkräftigen und hochaktiven Hefen noch in Schwebe verblieben.

Zum Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen den verschiedenen Hefen wurden die Stämme W128, W69 und der dem Stamm W34/78 eng verwandte W34/70 ausgewählt. Die Ergebnisse der PDC- und ADH-Aktivitäten über den Gärverlauf dieser drei Hefestämme sind in der Abbildung 60 dargestellt.

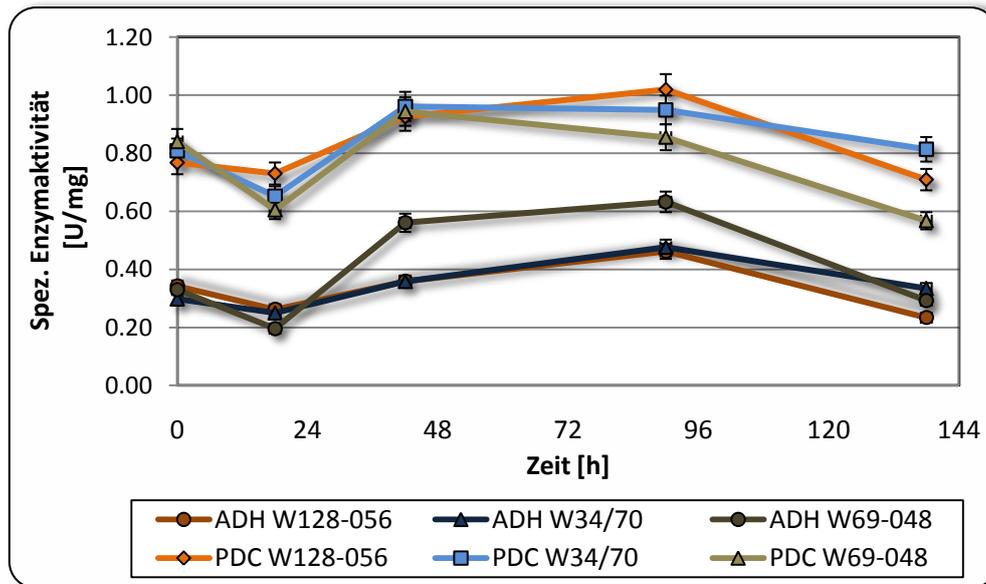


Abbildung 60: PDC- und ADH-Aktivität verschiedener Hefestämme während der Gärung

Die in einem klassischen Herführungsverfahren bis zu einer anstelltauglichen Zellzahl von 15 Mio. Z/ml hergezogenen Hefen besaßen zu Beginn der Gärungen somit einen eher gärungsphysiologischen Charakter, was sich in den Ergebnissen der Enzymaktivitätsmessung widerspiegelte. Zum Zeitpunkt des Anstellens lagen sowohl die PDC-Aktivitäten mit 0,77 U/mg für den Stamm W128, 0,81 U/mg für den Stamm W34/70 und 0,84 U/mg für den Stamm W69, als auch die ADH-Aktivität mit 0,30 U/mg für W34/70, 0,33 U/mg Stamm W69 und 0,34 U/mg für W128 in einem eng beieinander liegenden Bereich und somit über dem Niveau der bisher untersuchten Propagationshefen. Die Entwicklung der PDC-Aktivitäten über den Verlauf der Gärung war ebenfalls tendenziell vergleichbar. Nach einer kurzen Repressionsphase in den ersten 22 h stiegen die PDC-Aktivitäten am 2. Gärtag auf ein Maximum zwischen 0,93 U/mg für die Hefen des Stammes W128 und 0,96 U/mg für die des Stammes W34/70 an und behielten diese Aktivität nahezu konstant bis zum 4. Gärtag bei. Während die Aktivitäten bis dahin noch keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, sanken diese am 5. Gärtag heterogen ab. Die PDC-Aktivität der Hefen des Stammes W69 fiel am stärksten und wies nach 96 h einen Wert von 0,57 U/mg auf. Unterdessen erreichten die Hefen der Stämme W128 und W34/70 Werte von 0,71 U/mg und 0,81 U/mg und zeigen somit einen geringeren Aktivitätsverlust.

Die ADH-Aktivitäten der Hefen aller Stämme wurden in den ersten 22 h ebenfalls leicht reprimiert und sanken von durchschnittlich 0,33 auf ca. 0,22 U/mg ab. Gegenüber den PDC-Aktivitäten verhielten sich im Folgenden nicht alle drei Stämme über die Hauptgärung gleich. Zwar nahm die Aktivität der Hefen von Stamm W69 ebenfalls wie die der anderen über die Hauptgärung zu und flachte gegen Ende wieder ab, jedoch lagen die maximalen Enzymaktivitäten mit 0,56 U/mg am 2. und 0,63 U/mg am 4. Gärtag deutlich über denen der anderen beiden Stämme mit 0,36 U/mg am 2. und 0,48 U/mg am 4. Gärtag. Gegen Ende der

Gährung fielen die ADH-Aktivitäten der verschiedenen Hefen wieder auf ein mit dem Ausgangszustand vergleichbares Niveau zurück.

Aufgrund der vergleichbaren ZiS der hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten untersuchten Hefestämme während der Gärungen war eine entsprechend analoge ALDH- und ACS-Aktivität der Hefen zu erwarten. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung der Enzyme des PDH-Bypasses sind in der Abbildung 61 zusammenfasst.

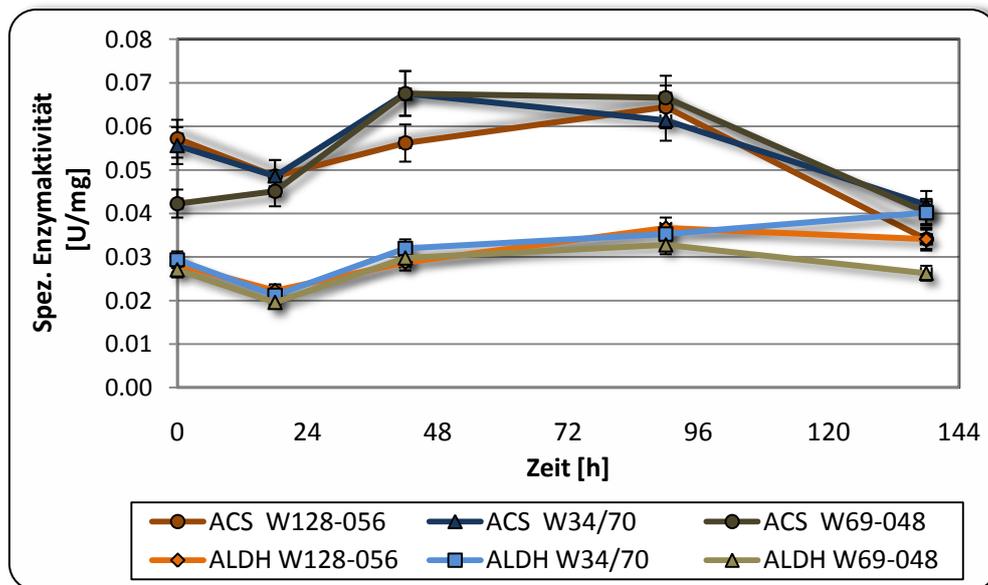


Abbildung 61: ALDH- und ACS-Aktivität verschiedener Hefestämme während der Gährung

Die ALDH-Aktivitäten der Hefen lagen zu Beginn der Gährung ebenfalls eng beieinander. Mit einem Stoffumsatz von 0,027 U/mg zeigten die Hefen vom Stamm W69 die niedrigste und die vom Stamm W34/70 mit von 0,029 U/mg die höchste Ausgangsaktivität. Auch der Verlauf der ALDH-Aktivitäten bis zum 4. Gärtag zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hefen. Die ALDH-Aktivitäten wiesen eine bereits unter Kapitel 4.2.2 beschriebene Repressionsphase im Anfangsstadium der Gährung auf. Erst zum Ende der Hauptgahrung kam es bei den Hefen der untersuchten Stämme zu Differenzen in den ALDH-Aktivitäten. Während die Hefen vom Stamm W128 weiterhin eine konstante ALDH-Aktivität von 0,034 U/mg aufwiesen, stiegen die Aktivitäten der Hefen vom Stamm W34/70 bis auf 0,040 U/mg. Im Gegensatz dazu sank die Aktivität bei den Hefen vom Stamm W69 zum Ende der Hauptgahrung bis auf einen Wert von 0,026 U/mg ab.

Bei der ACS waren die Differenzen in den Ausgangsaktivitäten, anderes als bei den übrigen Enzymen, breiter gestreut. Während die Hefen vom Stamm W34/70 und W128 zum Anstellzeitpunkt eine Aktivität von 0,056 und 0,057 U/mg aufwiesen, lag die der Hefen vom Stamm W69 mit 0,042 U/mg deutlich darunter. Die Unterschiede hoben sich allerdings bereits in den ersten 22 h auf. Während die Hefen vom Stamm W37/70 und W128 leicht sanken, stieg die ACS-Aktivität der Hefen vom Stamm W69, so dass zu diesem Zeitpunkt alle in einem Bereich um 0,047 U/mg lagen. Während im weiteren Verlauf die ACS-Aktivitäten

der Hefen der Stämme W69 und W34/70 auf einen Wert von 0,068 U/mg stiegen, entwickelte sich die ACS-Aktivität der Hefe vom Stamm W128 vergleichsweise schleppend, bis am 4. Gärtag die Aktivitäten aller Hefen wieder auf einem vergleichbaren Niveau lagen. Auch zum Ende der Hauptgärung, bei der die ACS-Aktivitäten erwartungsgemäß sanken, verlief die Aktivitätsabnahme tendenziell gleich und lag zwischen 0,040 U/mg bei den Stämmen W34/70 und W69 und 0,034 U/mg bei dem Stamm W128.

#### 4.4.2 Veränderungen des vermehrungs- und gärungsphysiologischen Zustandes über die Anzahl der Führungen

Die in der Literatur zur besseren Vergärung empfohlene Mischung aus Propagations- und Erntehefe ist vermutlich auf die Vorteile des jeweilig vorliegenden vermehrungs- bzw. gärungsphysiologischen Zustands der Hefen zurückzuführen. Während die an Gärungsbedingungen adaptieren Hefen in der Regel einen höheren Extraktumsatz und einen gesteigerten SO<sub>2</sub>-Gehalt im Bier hervorrufen, zeichnen sich die Hefen aus der Propagation in der Regel durch eine erhöhte Vermehrungsaktivität aus.

Um die Entwicklung im physiologischen Zustand über die Anzahl der Führungen in Abhängigkeit der Steuerungsparameter besser beurteilen zu können, wurden die Gärungsparameter und die Enzymaktivitäten einer Hefepopulation über vier Führungen hinweg untersucht. Die in einem konventionellen Verfahren propagierte Hefe wurde im Drauflassverfahren unter konstanten Versuchsbedingungen angestellt. Die Extraktverläufe und die Entwicklung der ZIS der Hefen in den unterschiedlichen Führungen sind der Abbildung 62 dargestellt.

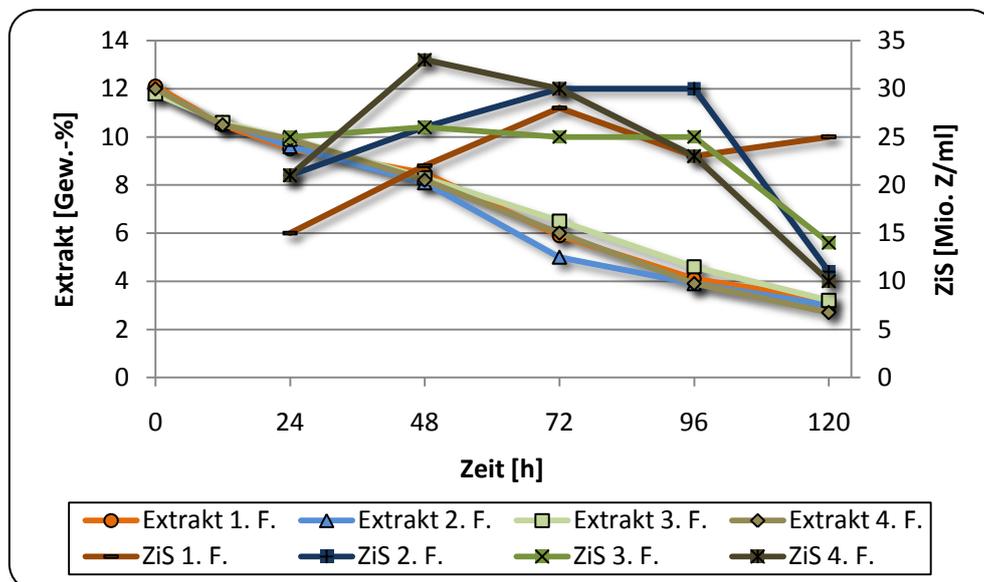


Abbildung 62: Extraktabnahme und Hefezellzahlentwicklung während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung

Der Extraktabbau während der Gärungen ergab über die vier Führungen nur geringfügige Unterschiede. Zwar wiesen die Hefen in der 2. Führung am 3. Gärtag einen etwas zügigeren

Extraktabbau auf und gaben damit einen Hinweis auf eine schnellere Umstellung von einem vermehrungsphysiologischen zu einem ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand, jedoch wurde dieser Vorsprung nicht bis zur Schlauchreife des Jungbieres aufrecht erhalten. Im Gegensatz dazu verlief die Gärung in der 3. Führung insgesamt etwas schleppender, so dass hier ein aus brautechnologischer Sicht eventuell unzureichender physiologischer Zustand der Hefen vorlag.

Die auf die geometrischen Verhältnisse in den Gärtanks der Pilotanlage zurückzuführenden Schichtungen der einzelnen Sude ließen besonders zu Beginn der Gärungen keine aussagefähigen Ergebnisse der gemessenen Hefezellzahlen zu. Jedoch zeigten auch die Hefen in der 4. Führung ein vergleichbares Wachstum und ließen somit auf einen ausreichenden vermehrungsphysiologischen Zustand der Erntehefen im Anfangsstadium der Gärung schließen. Insgesamt zeigte sich in allen Drauflassverfahren eine vergleichsweise geringe Hefevermehrung und die ermittelten Zellkonzentrationen lagen im Verlauf der Hauptgärung in einem Bereich von 25 bis 30 Mio. Z/ml. Zum Ende der Hauptgärungen zeigten vor allem die Erntehefen ein ausgeprägtes Absetzverhalten, während die ZiS in der 1. Führung am 5. Gärtag weiterhin 25 Mio. Z/ml betragen.

Die im Folgenden aufgezeigten Enzymaktivitäten des Hefestoffwechsels machen jedoch signifikante Unterschiede in der Hefephysiologie in Abhängigkeit der Generationszeit deutlich. Bei der Betrachtung der in Abbildung 63 dargestellten PDC-Aktivitäten wird eine kontinuierliche Entwicklung von der 1. bis zur 4. Führung ersichtlich.

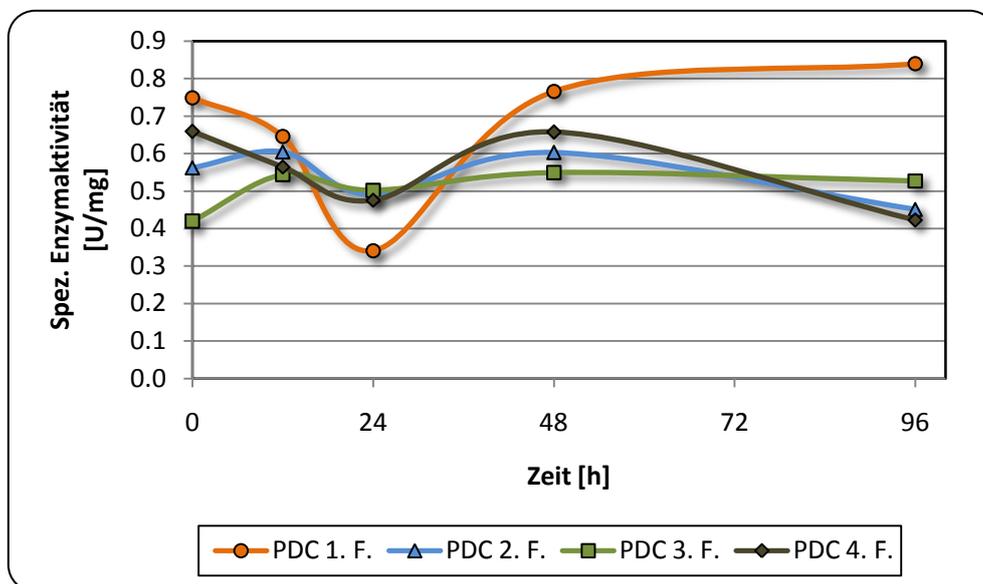
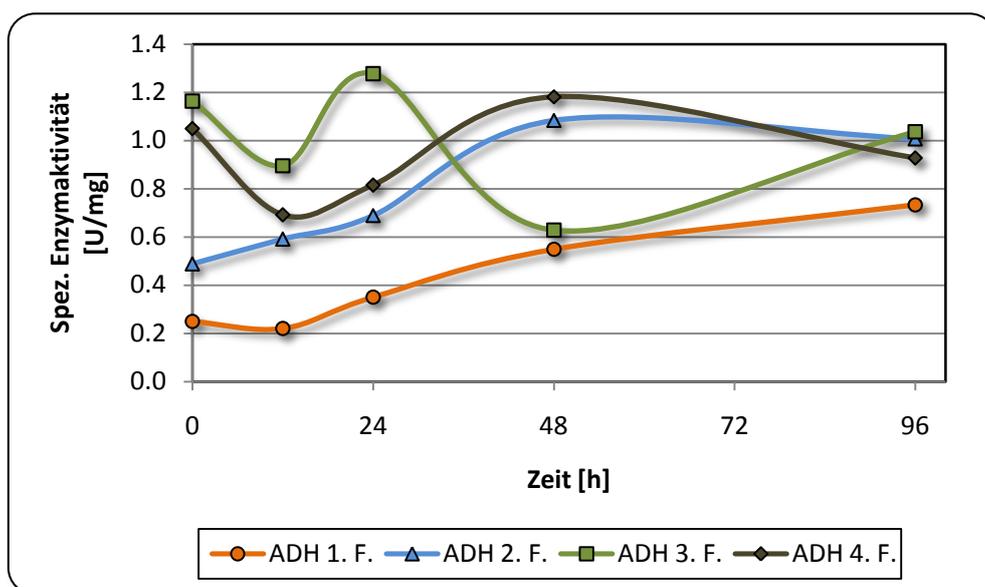


Abbildung 63: Entwicklung der PDC-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung

Die spezifische PDC-Aktivität der Hefen in der 1. Führung zeigte im Vergleich der 4 Gärungen in den ersten 24 h eine am deutlichsten ausgeprägte Repression und fiel von 0,75 U/mg auf ein Minimum von 0,34 U/mg ab. Im weiteren Verlauf wurde die Aktivität dieser Hefen im Vergleich der 4 Führungen jedoch wiederum überdurchschnittlich exprimiert und stieg auf

ein absolutes Maximum von 0,84 U/mg. Über die Lagerdauer konnten die Hefen diese Aktivität nicht vollständig konservieren, so dass die Hefen in der 2. Führung eine verringerte PDC-Aktivität von 0,56 U/mg zum Zeitpunkt des Anstellens aufwiesen. Auch die während der Adaption an die frische Würze und über die Vermehrungsphase beobachtete Repression der PDC-Aktivität fiel im Vergleich zur 1. Führung geringer aus. Zudem kam es im weiteren Gärverlauf nur zu einer geringeren Expression der PDC-Aktivität der Hefen in dieser 2. Führung. Zwar konnte in den darauf folgenden Führungen kein stetiges Absinken der PDC-Aktivitäten über die Lagerperioden der Hefen zwischen den Führungen beobachtet werden, dennoch zeigte keine der Hefen in der 2., 3., und 4. Führung eine gesteigerte Expression der PDC im 2. Abschnitt der Hauptgärung. Zudem schien die Ausgangsaktivität der Hefe generell mit der Intensität der Repression am 1. Gärtag zu korrelieren. Je höher die gemessene Ausgangsaktivität lag, desto deutlicher wurde diese reprimiert. Im Falle der Hefen in der 3. Führung, bei der mit 0,42 U/mg die niedrigste Ausgangsaktivität bestimmt wurde, führte dies sogar zu einem nahezu konstanten Verlauf über die Angärphase.

Die ADH-Aktivität der Hefen veränderte sich ebenfalls über das mehrmalige Führen und ließ somit ebenfalls eine Veränderung in der Hefephysiologie erkennen. Die ADH-Aktivitäten der Hefen in den einzelnen Führungen sind in der Abbildung 64 wiedergegeben.



**Abbildung 64: Entwicklung der ADH-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung**

Die ADH der Hefen in der 1. Führung zeigte trotz klassischer Herführung im Batch-Verfahren eine bereits von den Propagationen bekannte, geringe Ausgangsaktivität von 0,25 U/mg und wurde über den gesamten Gärverlauf bis zu einem Maximum von 0,73 U/mg am 5. Gärtag exprimiert. Die ADH-Aktivität konnte von der Hefe über die Lagerung ebenfalls nicht vollständig konserviert werden, so dass auch die ADH-Aktivität der Stellhefe in der 2. Führung mit 0,49 U/m vergleichsweise gering war. In der Folge kam es zu einer stetigen Expressionszunahme bis zum 2. Gärtag. Im Weiteren blieb die ADH-Aktivität dann auf einem konstanten Niveau von ca. 1,05 U/mg. In den beiden darauffolgenden Führungen wiesen die

Hefen mit 1,05 und 1,16 U/mg eine deutlich höhere Ausgangsaktivität auf. So kam es in diesen Führungen auch erstmals zu einer partiellen Repression der Aktivitäten während der Gärung. Die Hefen aus der 3. Führung wiesen sowohl nach der Angärphase als auch am 3. Gärtag ein Minimum auf, wobei die ADH-Aktivitäten der Hefen in der 4. Führung vor allem in den ersten 24 h reprimiert wurden. Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den Hefen in der 1. Führung und den übrigen Erntehefen zum Ende der Gärung. Während die Erntehefen hier ADH-Aktivitäten zwischen 0,93 und 1,04 U/mg aufwiesen, lag die Aktivität der aus der Herführung stammenden Hefe mit 0,73 U/mg um fast 25% tiefer. Dieses den PDC-Aktivitäten gegenläufige Verhalten macht weitreichende Unterschiede zwischen frisch hergeführter und wiederverwendeter Hefe deutlich und gibt damit einen Hinweis auf die unterschiedliche Stoffwechsellausprägungen von Hefen in einem vermehrungs- bzw. gärungsphysiologischen Zustand.

Nicht nur die Schlüsselenzyme der Alkoholischen Gärung entwickelten sich in ihren Ausprägungen über die Führungen. Auch die in der Abbildung 65 zusammengefassten ALDH-Aktivitäten machen eine Veränderung in der Hefephysiologie deutlich

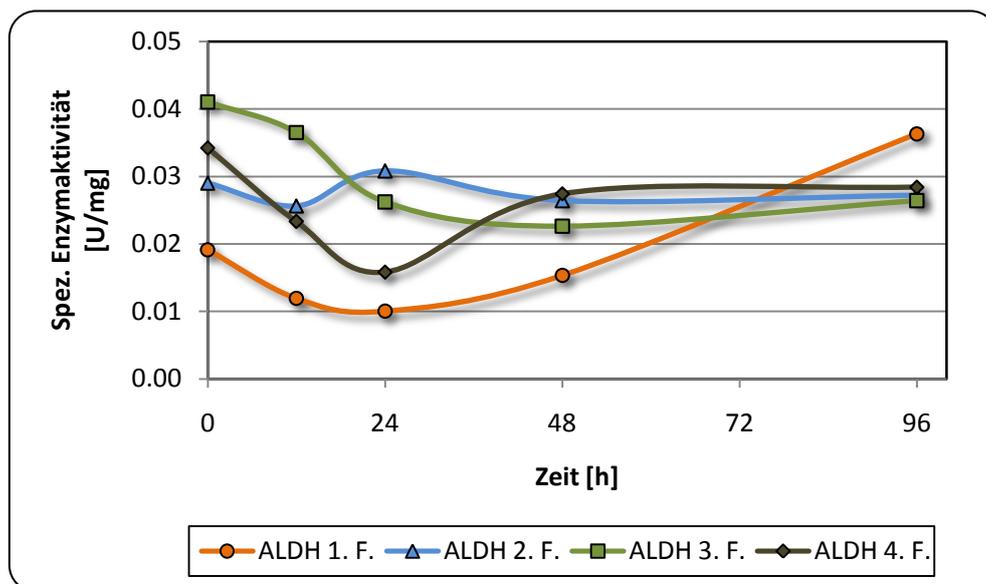


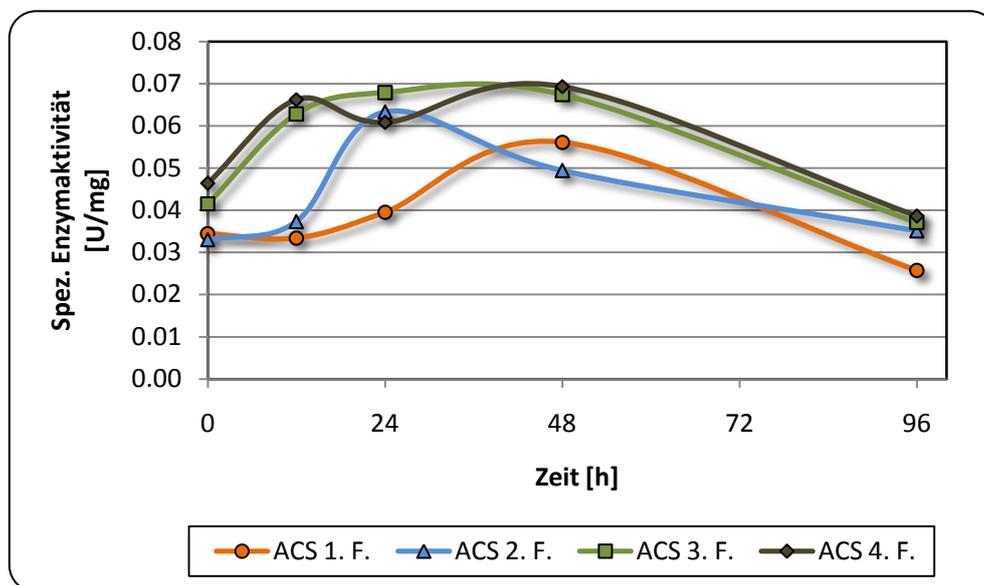
Abbildung 65: Entwicklung der ALDH-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung

Die Hefen in der 1. Führung zeigten ähnlich der ADH die geringste Ausgangsaktivität der ALDH, die während der folgenden Vermehrungsphase einer zusätzlichen Repression unterlag und auf ein Minimum von 0,010 U/mg fiel. Im weiteren Verlauf stieg die ALDH-Aktivität dieser Hefen jedoch auf ein absolutes Maximum von 0,036 U/mg zum Ende der Gärung an. Die ALDH-Aktivität der Hefen in der 2. Führung lag zu Beginn wiederum leicht unter dem zum Ende der 1. Führung gemessenem Wert. Zudem konnte keine ausgeprägte Repression der ALDH-Aktivität in dieser Gärung festgestellt werden, so dass die Aktivität der Hefen in der 2. Führung einen relativ konstanten Verlauf zeigten. Die Hefen in der 3. und 4. Führung wiesen mit 0,034 und 0,041 U/mg im Vergleich die höchsten Ausgangsaktivitäten auf und erfuhren gleichzeitig eine ausgeprägte Repression der ALDH in der ersten 24 h. Während die

Hefen der 3. Führung im weiteren Verlauf konstant blieben, wurde die ALDH-Aktivität der Hefen in der 4. Führung in der Folge wieder leicht exprimiert.

Auch bei der Betrachtung der ALDH-Aktivitäten konnten somit besonders zum Ende der jeweiligen Gärung Unterschiede in den absoluten Aktivitäten und folglich in der Hefephysiologie zwischen einer frisch hergeführten Hefe und den Erntehefen beobachtet werden. Während die Aktivitäten der Erntehefen nach 120 h im Bereich von 0,026 und 0,028 U/mg lagen, erreichten die Hefen aus der 1. Führung mit 0,036 U/mg eine deutlich höhere Aktivität, die hinsichtlich der Acetaldehydreduktion von Bedeutung sein könnte und eventuell eine verkürzte Reifungsphase unterstützen.

Das im PDH-Bypass zu Generierung von Acetyl-CoA nach der ALDH fungierende Enzym ACS erfuhr ebenfalls eine Veränderung in seiner Expression über die 4 untersuchten Führungen hinweg. Die ACS-Aktivitäten der Hefen sind in der Abbildung 66 zusammengefasst.



**Abbildung 66: Entwicklung der ACS-Aktivität der Hefe während der Gärung von der 1. bis zur 4. Führung**

Die ACS-Aktivität der Hefen in der 1. Führung verlief vergleichbar mit der unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen Entwicklung einer zuvor propagierten Hefe. Vor allem während der Wachstumsphase kam es zu einer deutlichen Expression und einem Maximum am 2. Gärtag und im Weiteren zu einem Abfall bis zum Ende der Gärung. Die ACS-Aktivität der Hefen in der 2. Führung wies einen tendenziell vergleichbaren Verlauf auf. Jedoch wurde das mit 0,063 U/mg stärker ausgeprägte Maximum bereits am 1. Gärtag erreicht. Im weiteren Verlauf fiel die Aktivität bis zum Ende der Gärung dann wieder kontinuierlich ab. Das frühere Erreichen des Aktivitätsmaximums der Hefen setzte sich auch in der 3. und 4. Führung fort. Hier wurde das jeweilige Aktivitätsmaximum bereits nach 12 h erreicht. Zusätzlich hielt die in einem Bereich von 0,066 bis 0,069 U/mg gemessene, erhöhte Aktivität der ACS über einen Zeitraum von 36 h und damit deutlich länger an, bis die ACS-Aktivitäten beider Hefen zum Ende parallel auf 0,039 U/mg sanken. Die Unterschiede der Hefen im schlauchreifen Jungbier

waren hingegen nicht so ausgeprägt wie bei den übrigen Enzymen. Dennoch wich auch hier vor allem die ACS-Aktivität der Hefen in der 1. Führung von denen der Erntehefen nach unten ab.

#### 4.4.3 Bedeutung des Sudrhythmus auf den physiologischen Zustand der Hefe

Neben der Belüftungsstrategie spielt der Einfluss der Anstelltechnologie hinsichtlich des Sudrhythmus eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Hefephysiologie und deren potentielle Beeinflussung. Um die Auswirkungen des zeitlichen Abstands zwischen den einzelnen Suden und damit zwischen der Versorgung mit frischen Würzenährstoffen und insbesondere der neu eingebrachten Glucose zu untersuchen, wurden Sudrhythmen von 3 (Bez. **SR3-3-3-6**) und 6 h (Bez. **SR3-3-6-6**) in einem Kräusenverfahren gegenüber einem Rhythmus von 3 h (Bez. **SR3-3-3-3**) in einem konventionellen Drauflassverfahren getestet. Die Unterschiede in der Entwicklung der PDC-Aktivität in Abhängigkeit der Drauflasszeitpunkte sind in der Abbildung 67 zusammengefasst.

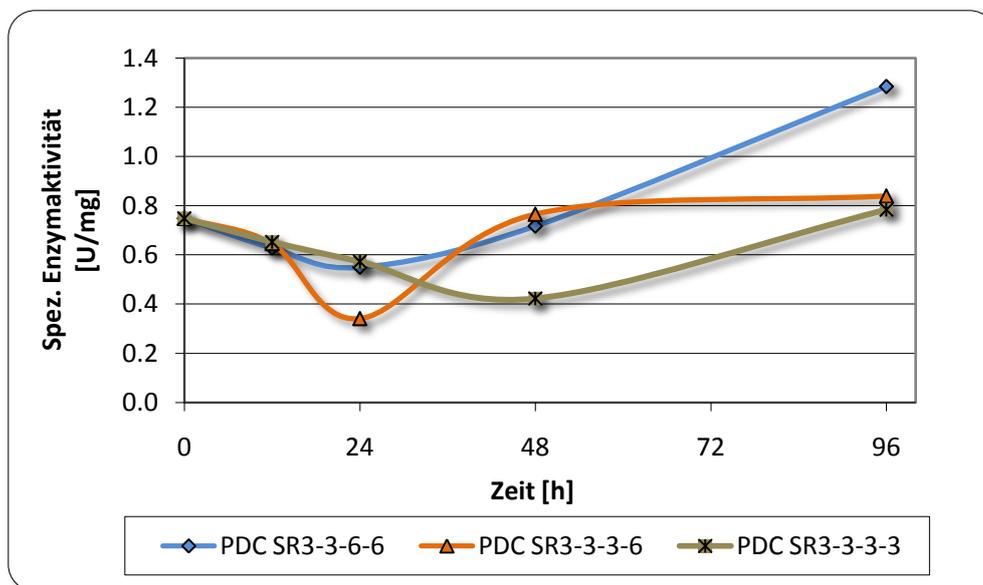
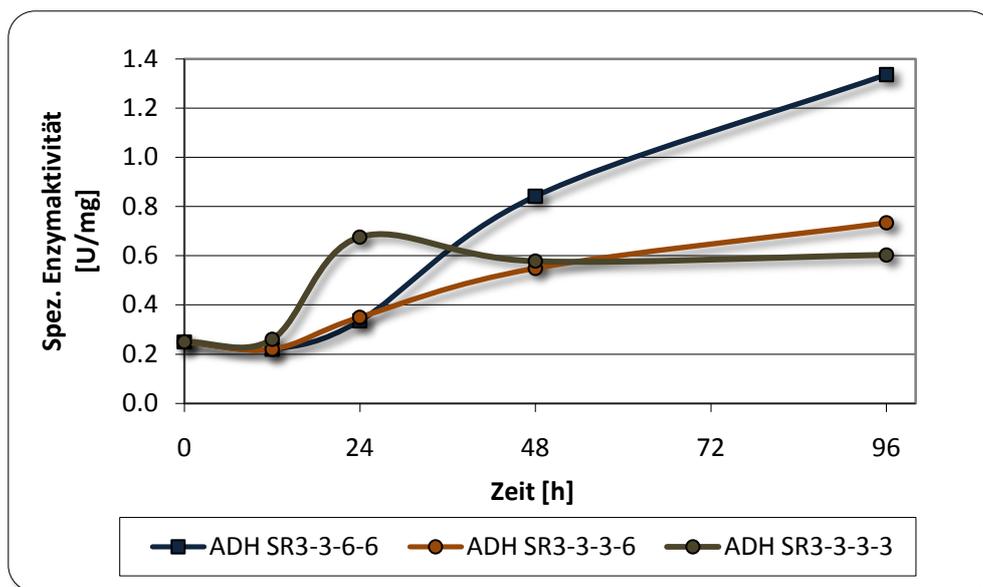


Abbildung 67: Einfluss des Sudrhythmus auf die PDC-Aktivität der Hefe

Die verschiedenen Anstelltechnologien zeigten in den ersten 12 h nach gleichen Sudabständen erwartungsgemäß keine Effekte auf die PDC-Aktivität der jeweiligen Hefen. Erst im weiteren Verlauf der Gärung machten sich die Unterschiede in der Anstelltechnologie hinsichtlich der Hefephysiologie bemerkbar. Die im konventionellen Drauflassverfahren mit zwei belüfteten und zwei unbelüfteten Suden angestellten Hefen aus SR3-3-3-3 zeigten eine ausgeprägte Repression der PDC-Aktivität über die ersten 48 h der Gärung. Mit Ende der Vermehrungsphase kam es bei den Hefen von SR3-3-3-3 zu einer erneuten Expression der PDC-Aktivität und nach 96 h erreichte diese ein Maximum von 0,78 U/mg, das allerdings nur leicht über der Ausgangsaktivität von 0,75 U/mg lag. Die PDC-Aktivität der Hefen aus dem mit kurzer Sudfolge angestellten Kräusenverfahren SR3-3-3-6 zeigte ebenfalls eine ausgeprägte Repression am 1. Gärtag. Die Aktivität wurde aber in den folgenden 24 h wieder

auf das Ausgangsniveau gesteigert und blieb dann bis zum Ende der Gärung konstant. Bei den Hefen mit einem verlängerten Sudrhythmus gegen Ende des Kräusenverfahrens wies die PDC-Aktivität die geringste Repression während der Vermehrungsphase auf. Nachdem die Aktivität in den ersten 24 h nur leicht abfiel, entwickelte sich diese stetig über die Hauptgärphase und erreichte nach 96 h mit 1,28 U/mg ein absolutes Maximum im Vergleich aller Hefen dieser Versuchsreihe.

Auch die Ergebnisse aus der Enzymaktivitätsmessung der ADH zeigten einen entscheidenden Einfluss des Sudrhythmus auf die Stoffwechselausprägung der Hefe. Die Unterschiede in den ADH-Aktivitäten der Hefen sind in der Abbildung 68 zusammengefasst.



**Abbildung 68: Einfluss des Sudrhythmus auf die ADH-Aktivität der Hefe**

Die Anstellhefe besaß eine aus der Herführung bekannte niedrige Ausgangsaktivität der ADH. In den ersten 12 h war vergleichbar mit dem Verlauf der PDC-Aktivität kein Einfluss der Anstelltechnologie auf die Entwicklung der ADH-Aktivität messbar. Aber im weiteren Verlauf fand eine unterschiedlich starke Expression der ADH-Aktivitäten der Hefen in Abhängigkeit der Draufflasstechnik statt. Während die Hefen im konventionellen Drauflassverfahren bereits nach 24 h ein Aktivitätsmaximum von 0,67 U/mg zeigten und im Vergleich die ADH deutlich stärker exprimierte und diese Aktivität über den Gärverlauf aufrecht erhielt, unterlag die ADH-Aktivität der Hefen aus dem Kräusenverfahren einer ständig zunehmenden Expression über die Gärzeit. Die Hefen aus SR3-3-3-6 wiesen zum Ende der Gärung mit 0,73 U/mg eine mit der aus SR3-3-3-3 vergleichbare spezifische Aktivität auf. Die Hefen aus SR3-3-6-6 hingegen zeigten eine um fast 180% höhere Aktivität und erreichten einen Wert von 1,33 U/mg.

Die Abbildung 69 zeigt die ACS- und ALDH-Aktivitäten der Hefen aus den jeweiligen Drauflassverfahren. Auch die Aktivität der ACS wurde dabei deutlich von den verwendeten Anstellverfahren beeinflusst. Während die Hefen aus SR3-3-3-3 nur ein geringes

Aktivitätsmaximum von 0,046 U/mg am 1. Gärtag aufwiesen, wurden die ACS-Aktivitäten der der im Kräusenverfahren angestellten Hefen aus den Gärungen SR3-3-3-6 und SR3-3-6-6 davon stark abweichend exprimiert.

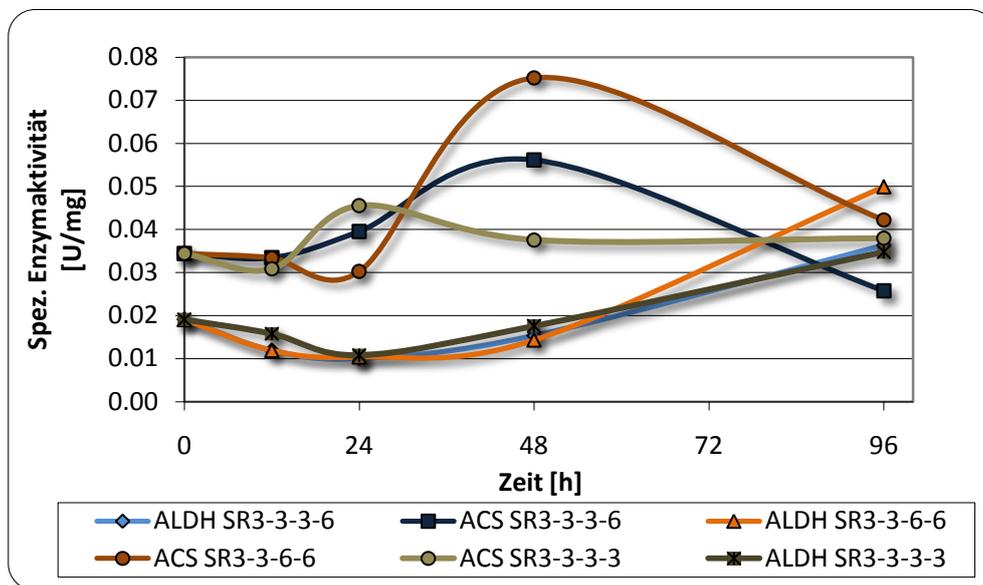


Abbildung 69: Einfluss des Sudrhythmus auf die ALDH- und ACS-Aktivität der Hefe

Die in den ersten 12 h bei allen Hefen fast konstante ACS-Aktivität von ca. 0,031 U/mg erfuhr bei den Hefen von SR3-3-3-6 eine kontinuierliche Steigerung auf 0,056 U/mg bis zum 2. Gärtag und fiel im weiteren Verlauf der Gärung wieder bis unter die Ausgangsaktivität ab. Die ACS-Aktivitäten der Hefen aus SR3-3-6-6 wiesen hingegen eine gesteigerte Expression über die Gärung auf. Das zwar ebenfalls am 2. Gärtag gemessene Aktivitätsmaximum lag jedoch mit 0,075 U/mg um annähernd 45% höher, bevor die Aktivität dann im weiteren Verlauf wieder auf das Ausgangsniveau absank.

Die ALDH-Aktivitäten spiegelten im Gegensatz zu den übrigen Enzymen nur einen geringeren Einfluss der Sudrhythmen auf die Hefephysiologie wider und zeigten einen aus den Kapiteln 4.2.2 und 4.4.2 bekannten Verlauf. Nach einer über die Vermehrungsphase andauernden Repression wurden die ALDH-Aktivitäten der Hefen aus SR3-3-3-3 und SR3-3-3-6 bis auf durchschnittlich 0,038 U/mg und die der Hefen in SR3-3-6-6 auf 0,050 U/mg zum Ende der Gärung gesteigert.

## 4.5 Der physiologische Zustand und das Gärverhalten der Hefe in Abhängigkeit des Propagationsprozesses und der Würzebelüftung

### 4.5.1 Einfluss der Belüftungsstrategie bei der Propagation auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in der 1. Führung

Die erreichte Manipulation des physiologischen Zustands der aus der Propagation P18 wurde in einem nachfolgenden Gärversuch gegenüber einer kontinuierlich belüfteten Hefe auf die resultierenden Gäreigenschaften getestet. Dabei erfolgte zusätzlich eine Variation der Würzebelüftung der im Batch-Verfahren durchgeführten Gärungen. Mit jeder der beiden Propagationshefen wurde eine belüftete (Bez. **G10-B** und **G18-B**) und eine unbelüftete Gärung (Bez. **G10-U** und **G18-U**) angestellt. Die Abbildung 70 zeigt die Entwicklung der ZiS und den Extraktabbau bei den Gärungen G10-B und G10-U, die mit Hefe aus der kontinuierlich belüfteten Propagation angestellt wurden.

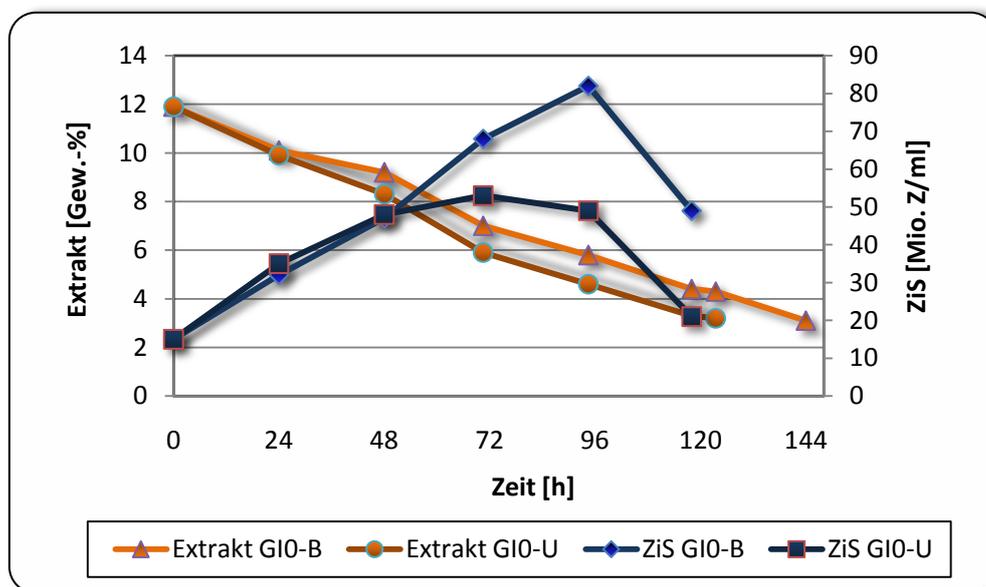
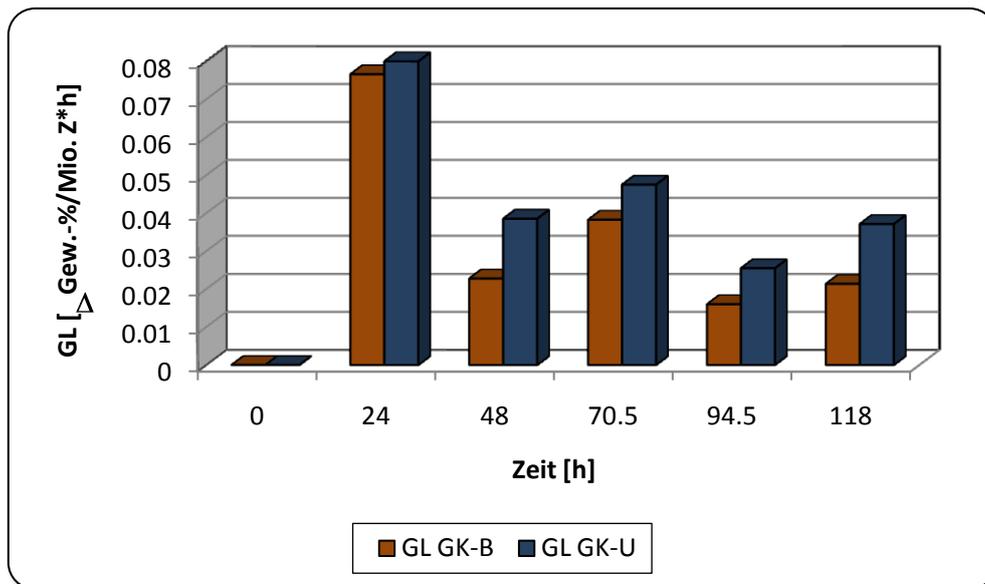


Abbildung 70: Extraktabbau und Zellzahlentwicklung einer kontinuierlich belüfteten Propagationshefe während Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung

Die Hefezellzahlentwicklungen in denen mit 15 Mio. Z/ml angestellten Gärungen zeigten nach einer vergleichbaren Zunahme in den ersten 48 h einen deutlichen Einfluss der Würzebelüftung. Während die ZiS in G10-U auf ein Maximum von 53 Mio. Z/ml am 3. Gärtag stiegen, erreichten die zusätzlich zu Beginn der Gärung mit Sauerstoff versorgten Hefen in G10-B eine deutlich höhere Zellzahl von 68 Mio. Z/ml am 3. und 82 Mio. Z/ml am 4. Gärtag. Wie allerdings die Kurven des Extraktgehalts zeigen, hatten die höheren Hefezahlen in G10-B keinen positiven Einfluss auf den Extraktabbau während der Gärung. Als sich die Hefen in G10-B am 2. Gärtag scheinbar noch in einem ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Charakter befanden, hatten die Hefen in G10-U nach 48 h bereits 0,9 Gew.-% mehr Extrakt umgesetzt. Auch die wesentlich höheren Zellzahlen von G10-B in der zweiten Hälfte der Gärung konnten diese Differenz nicht mehr beeinflussen. Damit konnte in G10-U der

angestrebte GVG von 10% über EVG in 124 h erreicht werden, wo hingegen das Jungbier in GI0-B erst nach 144 h die Schlauchreife erlangte.

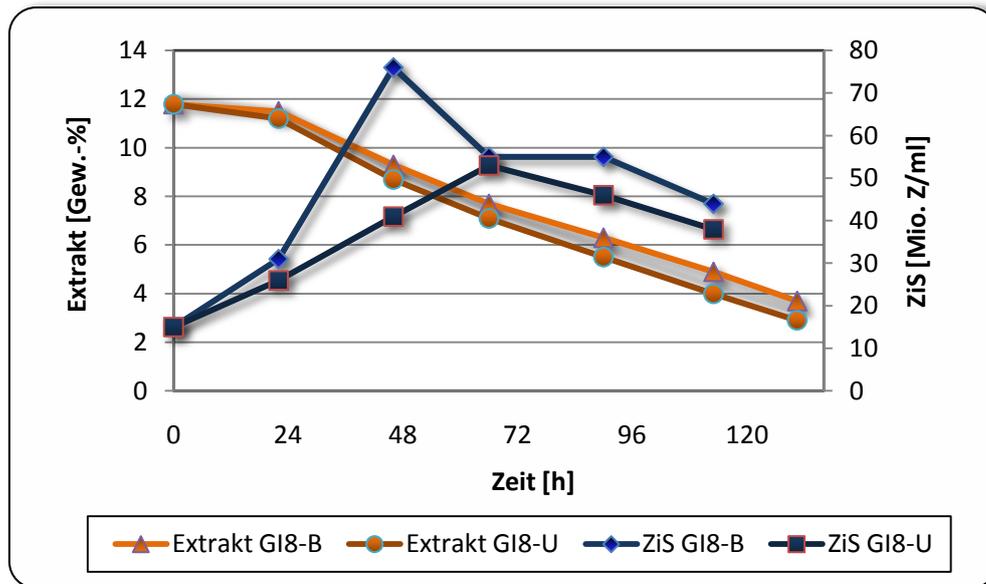
Der Unterschied zwischen den beiden Hefen lag folglich in der effektiven Umsetzung des Würzeextraktes pro Hefezelle. Die Ungleichheiten in der GL zwischen den Hefen in GI0-B und GI0-U sind in der Abbildung 71 ersichtlich. In Korrelation mit dem Extraktabbau und der Hefevermehrung ergab sich auch bei der GL in den ersten 24 h kein signifikanter Unterschied zwischen den Hefen in GI0-B und GI0-U.



**Abbildung 71: GL einer kontinuierlich belüfteten Propagationshefe während der Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung**

Die Hefen der Gärung GI0-U zeigten jedoch eine schnellere und weitreichendere Umstellung von der Wachstumsphase auf einen gärungsphysiologischen Zustand. Über die gesamte Hauptgärung von 48 bis 118 h erreichten die Hefen in GI0-U eine deutlich höhere GL. Da der Extraktabbau in der zweiten Hälfte der Gärung nahezu parallel verlief, waren somit vor allem die GL am 2. Gärtag entscheidend für den zügigeren Gärverlauf von GI0-U.

Die während der Propagation durch eine 8stündige Belüftungspause in ihrem physiologischen Zustand manipulierten Hefen aus PI8 zeigten in den nachfolgenden Gärversuchen GI8-B und GI8-U bezogen auf den Einfluss der zusätzlichen Belüftung eine vergleichbare Tendenz in der Zellzahlentwicklung und dem Extraktabbau. Der jeweilige Verlauf während der Gärung ist in Abbildung 72 dargestellt.



**Abbildung 72: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf den Extraktabbau und die Zellzahlentwicklung der Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Würzebelüftung**

Jedoch erreichten die ZIS in GI8-B im Gegensatz zu GI0-B ihr Maximum mit 76 Mio. Z/ml bereits am 2. Gärtag. Auch in diesem Versuch zeigten die unbelüfteten Hefen in GI8-U gegenüber den belüfteten ein deutlich geringeres Hefewachstum und vermehrten sich innerhalb von 66 h auf nur 53 Mio. Z/ml. Der Extraktabbau verlief allerdings wiederum in der unbelüfteten Gärung zügiger. Nach 130 h erreichte die Gärung GI0-U die Schlauchreife. Der Unterschied in der Gärintensität erstreckte sich zudem über die gesamte Gärdauer und beschränkte sich nicht alleine auf die Phase bei dem Wechsel von einem vermehrungs- auf einen ausgeprägten gärungsphysiologischen Charakter der Hefe. Da die in dieser Versuchsreihe eingesetzte Würze einen leicht höheren EVG aufwies, lag der erforderliche Restextrakt um 0,3 Gew.-% niedriger als in den Gärungen GI0-B und GI0-U und bedingte somit eine insgesamt verlängerte Hauptgärphase.

Die aus dem Extraktabbau und der Zellzahlentwicklung berechneten GL sind in der Abbildung 73 dargestellt. Einerseits war zwar zu Beginn eine geringere GL der Hefen in GI8-B und GI8-U gegenüber denen aus GI0-B und GI0-U zu beobachten, aber andererseits fiel das Maximum der GL in GI8-U bereits auf den 2. Gärtag, sodass zu diesem Zeitpunkt deutlich mehr Hefezellen vorhanden waren um den Extrakt umzusetzen als zum Zeitpunkt des Maximums der GL in GI0-U. Gleichzeitig konnte wiederum eine zügigere Umstellung in der Hefephysiologie in der unbelüfteten Gärung GI8-U beobachtet werden.

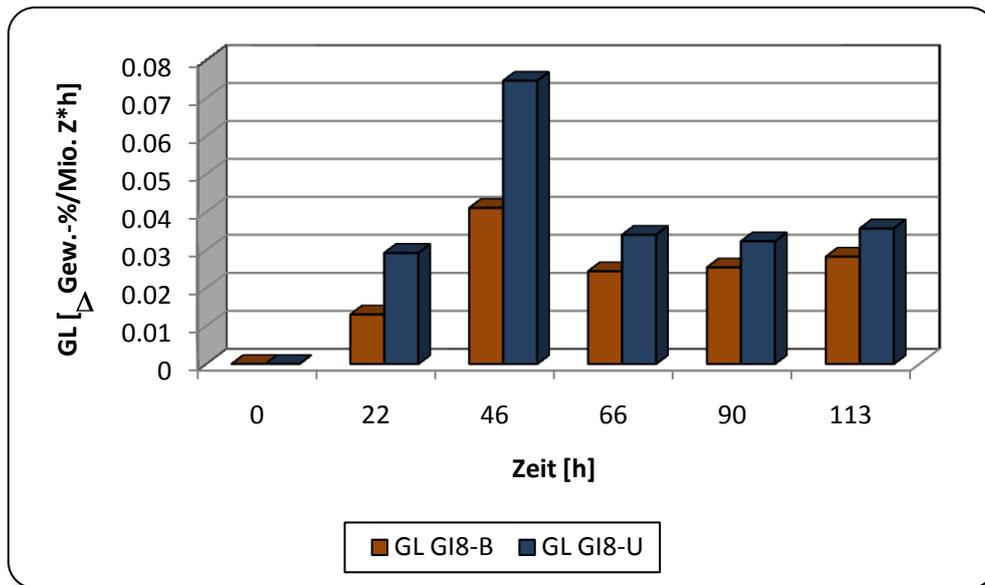
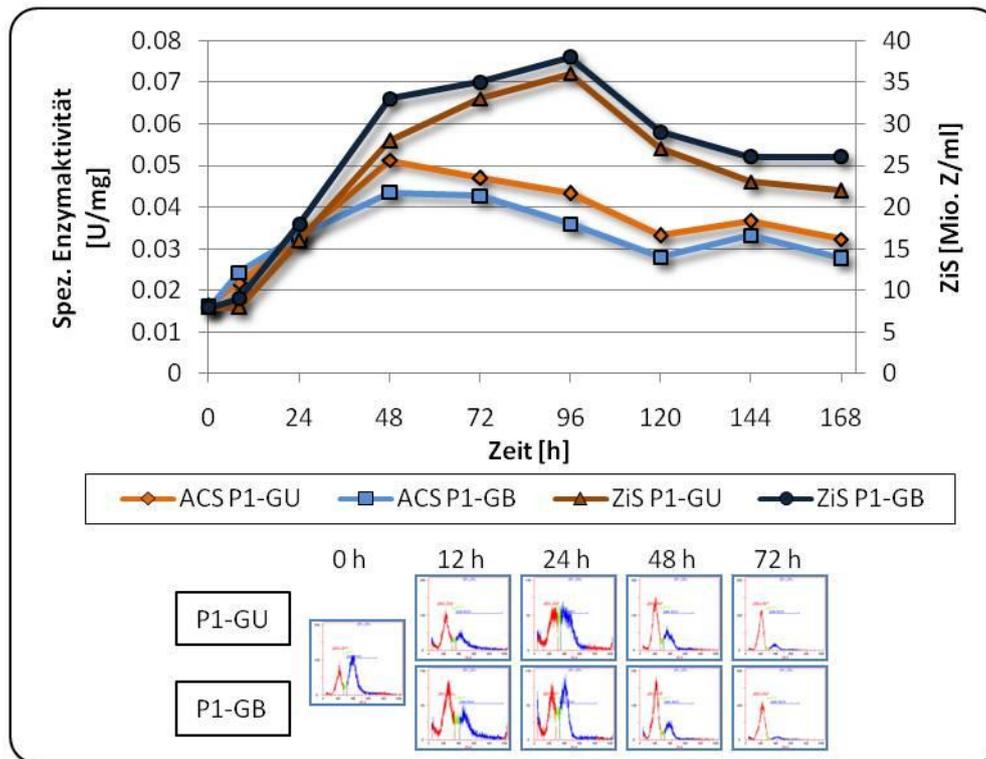


Abbildung 73: GL einer intervallbelüfteten Propagationshefe in Abhängigkeit der Würzebelüftung

Hinzu kam, dass die Differenz in den GL der Hefen zwischen den Gärungen aufgrund der zusätzlichen Versorgung mit Sauerstoff ausgeprägter war. Dies macht die Notwendigkeit deutlich, die Würzebelüftung generell auf den physiologischen Zustand der Hefe zu Gärbeginn abzustimmen, um eine optimale Gäraktivität der Hefen zu gewährleisten. Die aufgeführten Ergebnisse geben zudem einen Hinweis darauf, dass eine allgemeine Aussage zur spezifischen Belüftungsrate nur in der Gesamtbetrachtung des Hefemanagements stattfinden kann. Dies macht die weitere Untersuchung der Hefephysiologie in den zentralen Prozessen der Propagation und Gärung notwendig, um einen tiefen Einblick in die Auswirkungen der einzelnen Parameter zu bekommen und unter Berücksichtigung der Qualitäts- und Stabilitätskriterien eine Empfehlung zur Sauerstoffversorgung in der Brauerei vornehmen zu können.

Die aus der 2. Serie von Propagationsversuchen, mit dem Ziel eine bessere Adaption des physiologischen Zustands der Hefen an die nachfolgenden Gärungsbedingungen durch eine 8stündige Belüftungspause zu schaffen, stammenden Hefen wurden ebenfalls auf die resultierenden Gäreigenschaften in Abhängigkeit der Würzebelüftung untersucht. Dazu wurden aus den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 jeweils wiederum Gärungen in belüfteter (Bez. **P1-GB**, **P2-GB** und **P3-GB**) und unbelüfteter Würze (Bez. **P1-GU**, **P2-GU** und **P3-GU**) angestellt. Neben den Routine-Analysen zur Gärungskontrolle wurde die Erfassung der Hefephysiologie mittels Enzymaktivitätsmessung durch die flusszytometrische Analyse des Zellzyklus erweitert.

In der Abbildung 74 sind die ACS-Aktivitäten der aus Propagation P1-K8 stammenden Hefen zusammen mit den ZiS und den Histogrammen der DNA-Verteilung über den Gärverlauf aufgetragen. Im Gegensatz zu den Versuchen GI0-B und GI0-U, die ebenfalls mit einer kontinuierlich belüfteten Hefe angestellt wurden, war in diesen Gärungen der Einfluss der zusätzlichen Belüftung nicht ausreichend signifikant.



**Abbildung 74: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung**

Zwar zeigten auch in dieser Versuchsreihe die Hefen in der vor Beginn belüfteten Würze eine tendenziell höhere Zellzahlentwicklung, die allerdings aufgrund der Messtoleranz der eingesetzten Thoma-Zählkammer nicht als absolut betrachtet werden kann. Ausgehend von einer Hefezellzahl von 10 Mio. Z/ml stiegen die ZiS auf ca. 35 Mio. Z/ml in der Hauptgärphase am 3. und 4. Gärtag. Auch das Absetzverhalten der Hefen beider Gärungen war vergleichbar, wobei die Hefen aus P1-GU zum Ende der Gärung mit ca. 20 Mio. Z/ml eine um 5 Mio. Z/ml geringere, dennoch unter dem Gesichtspunkt der Klärung vergleichsweise hohe Zellzahl zum Schlauchzeitpunkt aufwiesen. Auch die ACS-Aktivitäten zeigten einen nahezu übereinstimmenden Verlauf. Die ACS-Aktivität der Hefen beider Gärungen erreichte am 2. Gärtag ein Maximum zwischen 0,045 und 0,051 U/mg. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, korrelierte die Hefezellzahlentwicklung unter Berücksichtigung einer zeitlichen Verzögerung von der Bereitstellung des Acetyl-CoA bis zu der resultierenden Biomassebildung. Auch die in dieser Versuchsreihe vergleichsweise nur langsam abgefallene ACS-Aktivität korreliert mit der über die gesamte Hauptgärphase hohen Konzentration an ZiS.

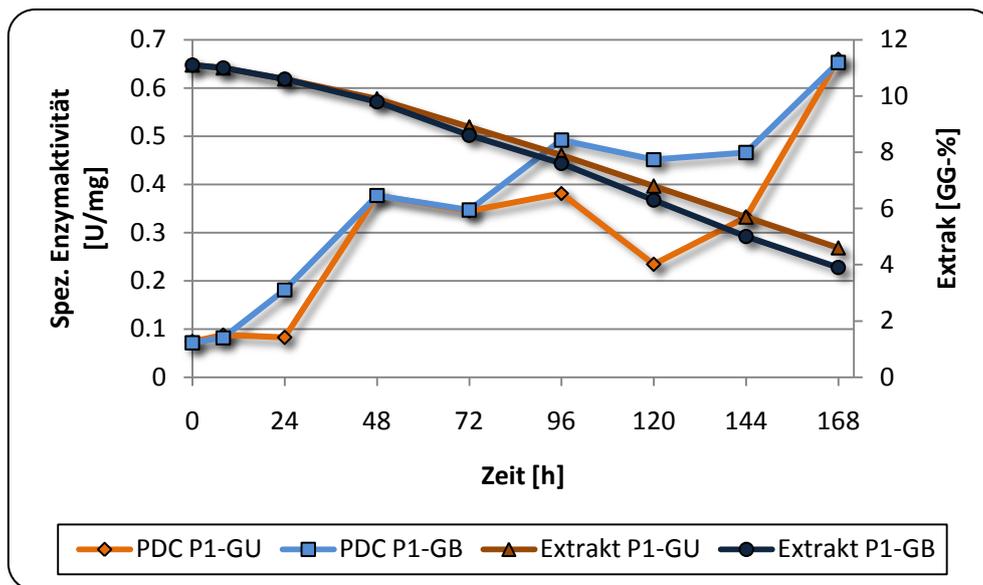
Die Histogramme der DNA-Verteilung in der Abbildung 74 lieferten keinen Hinweis auf eine höhere Hefevermehrung in der zuvor belüfteten Würze. Aufgrund der breiteren Peaks der  $G_2$ -/M-Phase in den unbelüfteten Gärungen ließ sich tendenziell sogar eine gesteigerte Vermehrung in P1-GU annehmen. Diese Unterschiede bestätigten sich in den prozentualen Verteilungen der Vermehrungsphasen. Die Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse während der Gärungen in Abhängigkeit der Belüftung zusammen.

**Tabelle 14: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung**

|                         | 0 h   |       | 12 h  |       | 24 h  |       | 48 h  |       | 72 h  |  |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                         | P1-G  | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB |  |
| <b>G0-/G1-Phase [%]</b> | 28,5% | 49,8% | 51,9% | 35,9% | 36,1% | 60,9% | 67,5% | 80,2% | 85,9% |  |
| <b>S-Phase [%]</b>      | 6,0%  | 8,1%  | 11,6% | 10,8% | 11,9% | 5,2%  | 4,8%  | 2,0%  | 3,0%  |  |
| <b>G2-/M-Phase [%]</b>  | 65,5% | 42,1% | 36,5% | 53,3% | 52,0% | 33,9% | 27,6% | 17,8% | 11,1% |  |

Zum Zeitpunkt des Anstellens befanden sich 65,5% der mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l propagierten Hefen in der G<sub>2</sub>-/M-Phase. Nach 12 h waren mit 42,1% in der unbelüfteten Gärung ca. 6,6% mehr Hefen in der abschließenden Teilungsphase als in der belüfteten Gärung P1-GB. Während zum Zeitpunkt von 24 h beide Populationen mit knapp über 50% einen vergleichbaren Anteil in der G<sub>2</sub>-/M-Phase aufwiesen, zeigte die zusätzliche Belüftung der Hefen in P1-GB auch im weiteren Verlauf keinen positiven Einfluss auf die Vermehrungseigenschaft. Auch am 3. und 4. Gärtag vermehrten sich in P1-GU noch ca. 6% mehr Hefen. Der in diesem Versuch sogar teilweise negative Einfluss der Belüftung hinsichtlich der Hefevermehrung spiegelte sich ebenfalls in den niedrigeren Anteilen der Hefen in der Synthesephase von P1-GB wider.

Insgesamt betrachtet, fand ein Großteil der Vermehrung in den ersten 48 h der Gärung statt und war bereits nach 72 h weitgehend abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt befanden 80% der Hefen in P1-GU und 85% in P1-GB in der Ruhe- bzw. Wachstumsphase. Allerdings findet ein Hauptanteil des Extraktabbau in dieser Phase des Zellzyklus statt und gibt damit bereits einen Hinweis auf einen zügigeren Gärverlauf in P1-GB. Dies bestätigte die Extraktmessung über den Gärverlauf. Hinsichtlich des Extraktabbau konnte der positive Einfluss einer unbelüftet angestellten Gärung für die in P1-K8 hergeführten Hefen nicht bestätigt werden. Anders als in den aus P10 und P18 angestellten Gärungen zeigten die zu Beginn zusätzlich mit Sauerstoff versorgten Hefen einen leicht zügigeren Gärverlauf. Die Abbildung 75 stellt den Extraktabbau und die Enzymaktivitäten der PDC, als das für die Umsetzung der Würzezucker nach der Glykolyse entscheidende Enzym, dar.



**Abbildung 75: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung**

Zwar waren erst ab dem 3. Gärtag Unterschiede im Extraktverlauf erkennbar, dennoch führte dies zu einer Differenz von 0,7 Gew.-% am Ende der Hauptgärung nach 168 h. Die insgesamt relativ langsam verlaufenden Gärungen könnten vor allem auf die niedrige Hauptgärtemperatur von 10 °C zurückgeführt werden. Die im Vergleich zu den Gärungen G10 und G18 um 2 °C abgesenkte Gärtemperatur sollte, durch eine daraus resultierende Verlangsamung der Stoffwechselreaktionen, dazu beitragen die Unterschiede in der Hefephysiologie in Abhängigkeit des Propagationsprozess und der Würzebelüftung weiter zu verdeutlichen.

Ausgehend von der unter Propagationsbedingungen bis auf 0,07 U/mg stark reprimierten PDC-Aktivität entwickelte sich diese über die ersten 72 h unabhängig von der Würzebelüftung bei den Hefen beider Gärungen nahezu parallel. Dabei stieg die PDC-Aktivität zunächst auf 0,38 U/mg am 2. Gärtag und blieb in den nächsten 24 h konstant. Erst im weiteren Verlauf bildeten sich Unterschiede zwischen den PDC-Aktivitäten beider Hefen aus. Während die PDC-Aktivität der Hefen in der belüfteten Gärung P1-GB in der zweiten Hälfte der Hauptgärung weiter stieg und nach 168 h ein absolutes Maximum von 0,65 U/mg erreichte, sank die Aktivität der Hefen in der unbelüfteten Gärung P1-GU zunächst auf ein temporäres Minimum, bis diese zum Ende der Gärung ebenfalls 0,065 U/mg erreichte. Dieser Verlauf der PDC-Aktivität unterstützt die Annahme aus der Zellzyklusanalyse des tendenziell höheren Extraktumsatzes der Hefen in P1-GB.

Aufgrund der gemessenen höheren Zellzahlen der belüfteten Hefen in der Gärung P1-GB und deren leicht zügigeren Extraktabbau sind die resultierenden Kurven der berechneten GL beider Hefen über die gesamte Hauptgärungen vergleichbar. Erst mit Erreichen des GVG fiel die GL der belüfteten Hefen unter die der unbelüfteten Hefen. Die Abbildung 76 stellt neben den GL auch die ADH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P1-GU und P1-GB gegenüber.

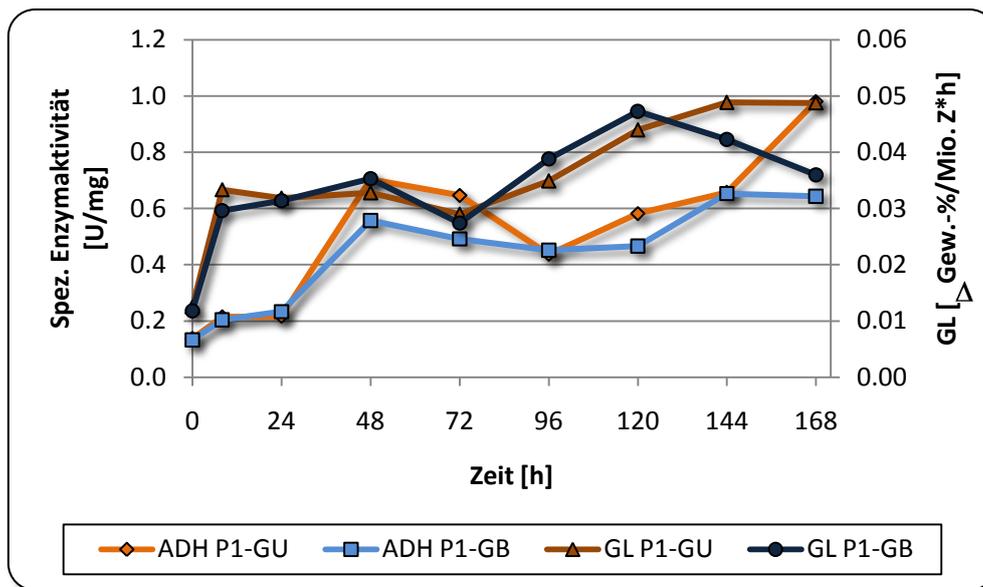


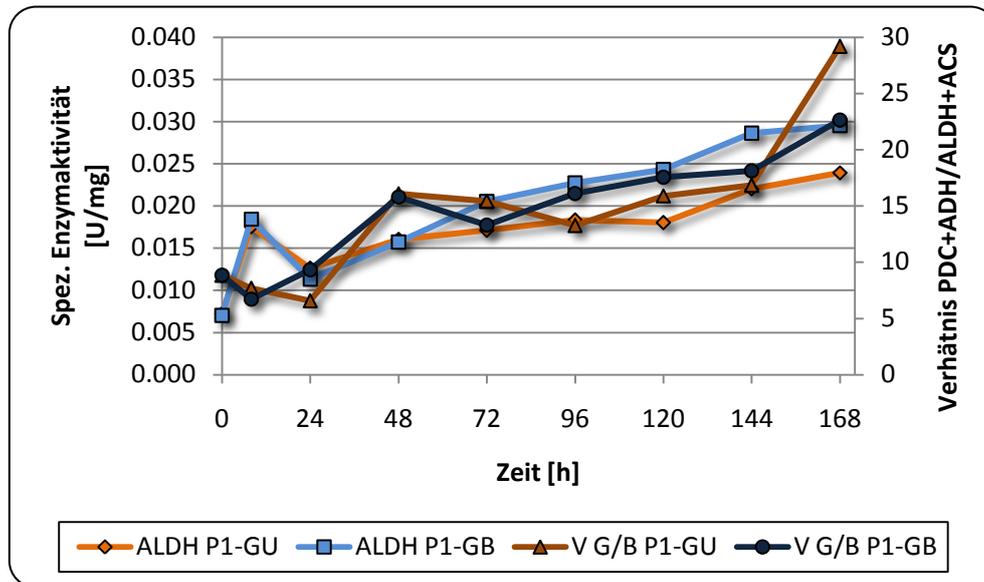
Abbildung 76: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung

Vergleichbar mit den PDC-Aktivitäten der Hefen in den beiden Gärungen waren auch die ADH-Aktivitäten zu Beginn aufgrund des vorangegangenen Propagationsprozesses stark reprimiert und besaßen eine Ausgangsaktivität von 0,13 U/mg. Die grundlegende Entwicklung der ADH-Aktivität verlief in beiden Gärungen ebenfalls parallel, wobei die Hefen in P1-GU am 2. und 3. Gärtag eine geringfügig höhere Aktivität aufwiesen. Tendenziell blieb die Aktivität nach einer Expression in den ersten 48 h über die weitere Hauptgärung mit Werten im Bereich von 0,56 bis 0,65 U/mg nahezu konstant und wurde erst in den letzten zwei Gärtagen nochmals weiter gesteigert. Somit scheint die ADH-Aktivität in dieser Versuchsreihe stärker an die Aktivität der PDC gekoppelt gewesen zu sein als in den vorangegangenen Versuchsreihen beobachtet werden konnte.

Die GL der Hefen in P1-GU und P1-GB verhielten sich über den gesamten Gärverlauf ebenfalls nahezu identisch. Nur gegen Ende der Gärungen flachte die GL der Hefen in P1-GB nicht zuletzt aufgrund des geringen Restextraktes ab. Die Hefen zeigten anders als in den Gärungen G10 und G18 kein absolutes Maximum während der Vermehrungsphase, sondern stiegen ebenfalls in den ersten 24 h stark an, blieben aber während dem ersten Teil der Hauptgärung konstant. Im zweiten Teil stiegen die GL beider Hefen nochmals leicht an und korrelierten so mit der Entwicklung der PDC- und ADH-Aktivität.

Die ALDH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P1-GU und P1-GB, die zusammen mit dem Verhältnis aus den Schlüsselenzyme der Gärung und den Enzymen des PDH-Bypasses in der Abbildung 77 dargestellt sind, zeigten in den ersten 72 h ebenfalls eine mit der PDC und ADH vergleichbare Entwicklung. Nach einem temporären Maximum in den ersten 12 h fielen die Aktivitäten zunächst bis zum 1. Gärtag leicht ab. In der Folge wurden die ALDH-Aktivitäten beider Hefen kontinuierlich über den gesamten Gärverlauf gesteigert. Dabei erfuhr die ALDH

der Hefen in P1-GB jedoch eine weitgehendere Expression und hatte gegen Ende eine um durchschnittlich 25% höhere Aktivität.



**Abbildung 77: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung**

Das Verhältnis der Gärungsenzyme PDC und ADH zu den für die Generierung von Acetyl-CoA verantwortliche Enzyme ALDH und ACS macht die Umstellung von einem vermehrungsphysiologischen Zustand zu Beginn der Gärung hin zu einem ausgeprägten gärungsphysiologischen Charakter deutlich. Die Berechnung dieses Verhältnis soll im Folgenden dazu beitragen, die Auswirkungen der Prozessparameter auf den physiologischen Zustand der Hefe unter Berücksichtigung der Ausgangslage besser analysieren zu können. Die maßgebliche Umstellung in der Hefephysiologie fand demnach zwischen dem 1. und 2. Gärtag statt. Dabei stieg das Verhältnis ausgehend von 6,7 während der Angärphase auf 13,3 bei den Hefen in P1-GB bzw. 15,4 in P1-GU. Über die Hauptgärung blieb dieses Verhältnis dann nahezu konstant und wurde erst gegen Ende vergleichbar mit der Entwicklung der PDC- und ADH-Aktivitäten weiter zu Gunsten der Gärungsenzyme verschoben.

Die Abbildung 78 fasst sowohl die ACS-Aktivitäten und die Zellzahlentwicklungen der mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l bei der Propagation hergeführten Hefen, als auch die Histogramme der Zellzyklusanalysen über den Gärverlauf zusammen. Aus den Kurven der ACS-Aktivitäten und der Hefezellzahlentwicklungen wird ersichtlich, dass trotz einer maßgeblich höheren ACS-Aktivität der Hefen in P2-GU von 0,068 U/mg gegenüber 0,039 U/mg in P2-GB zum Zeitpunkt von 48 h die ZiS beider Gärungen über den Gärverlauf vergleichbar waren. Die während der Vermehrungsphase sogar tendenziell höheren ZiS in der belüfteten Gärung P2-GB lassen aufgrund der aus dem vorangegangenen Versuch gewonnenen Ergebnisse in erster Linie auf eine fehlerhafte Messung der ACS-Aktivität als auf eine untypische Besonderheit im Hefestoffwechsel schließen. Generell war allerdings eine geringere Hefevermehrung in diesen beiden Gärungen zu beobachten, trotz einer mit

den Gärungen P1-GU und P1-GB vergleichbaren Anstellkonzentration. Die maximal erreichte Hefekonzentration von ca. 25 Mio. Z/ml lag ca. 10 Mio. Z/ml niedriger als in den Gärungen P1-GB und P1-GU, blieb aber über den gesamten Gärverlauf fast konstant.

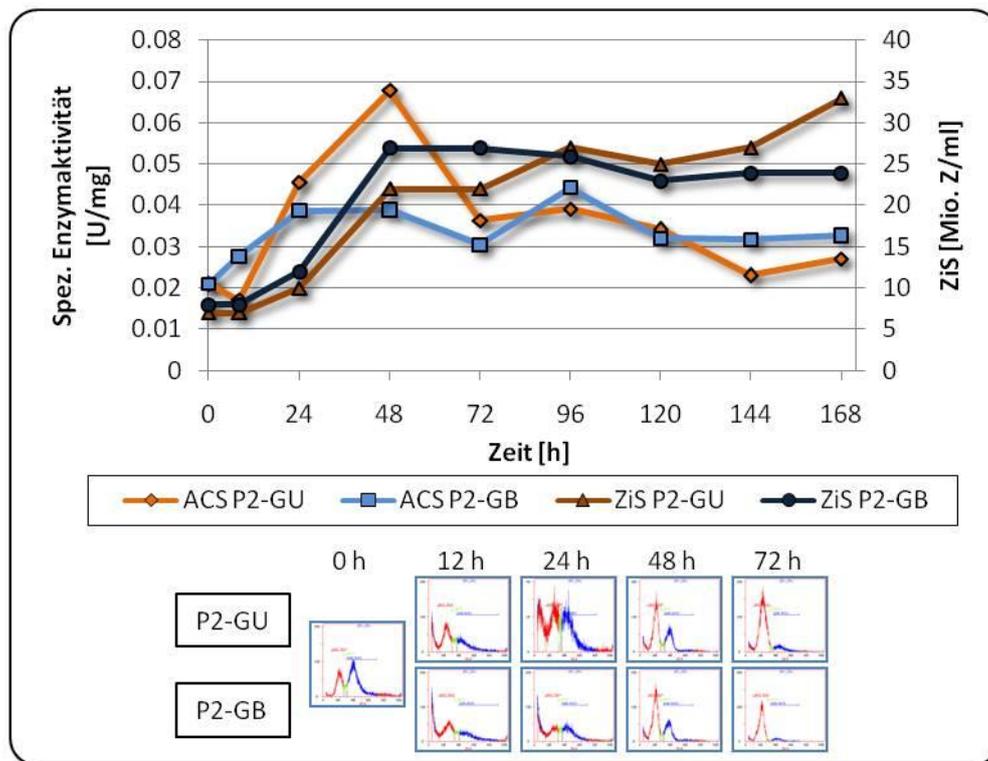


Abbildung 78: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung

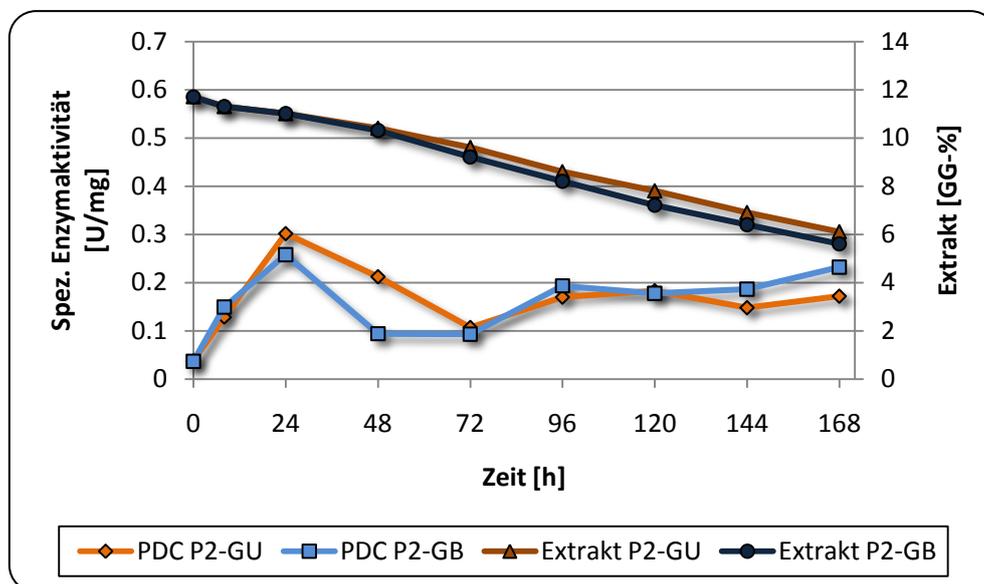
Die Histogramme der Zellzyklusanalyse ließen bereits geringere Unterschiede in den beiden Gärungen P2-GU und P2-GB gegenüber P1-GU und P1-GB erkennen. Allerdings sind zu den Zeitpunkten 12 und 24 h aufgrund eines hohen Grades an Verunreinigungen im Bereich von 0 bis 2  $\mu\text{m}$ , bei denen es sich um Anteile des Kühltrubes handeln könnte, allein optisch keine eindeutige Aussage zu treffen. Die numerische Auflistung der prozentualen Verteilungen der einzelnen Vermehrungsphasen der Hefen, die in der Tabelle 15 zusammengefasst ist, macht die Entwicklung der Hefen hinsichtlich ihres Zellzyklus deutlich.

Tabelle 15: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung

|                  | 0 h   |       | 12 h  |       | 24 h  |       | 48 h  |       | 72 h  |  |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                  | P1-G  | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB | P1-GU | P1-GB |  |
| G0-/G1-Phase [%] | 29,0% | 47,3% | 49,4% | 42,2% | 35,3% | 57,9% | 62,4% | 85,2% | 88,0% |  |
| S-Phase [%]      | 6,8%  | 13,8% | 11,9% | 7,1%  | 13,2% | 5,9%  | 4,4%  | 2,3%  | 1,5%  |  |
| G2-/M-Phase [%]  | 64,2% | 38,9% | 38,6% | 50,7% | 51,6% | 36,2% | 33,1% | 12,5% | 10,5% |  |

Wie teilweise bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, wies die Stellhefe der Gärungen P2-GU und P2-GB zu Beginn eine Verteilung von 29,0% an Zellen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase und 64,2% in der  $G_2$ -/ $M$ -Phase auf und hatte damit annähernd die gleiche Ausgangssituation wie die in den Gärungen P1-GB und P1-GU eingesetzte Hefe. Zum Zeitpunkt von 12 h verhielten sich die beiden Populationen etwa gleich. Auch die Messung am 1. Gärtag ergab keinen Unterschied im Anteil der Hefen in der  $G_2$ -/ $M$ -Phase, sondern ließ nur einen steigenden Anteil der Hefen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase in P2-GU erkennen, während die Hefen in P2-GB einen höheren Anteil in der S-Phase zeigten. Diese Tendenz bestätigte sich allerdings nicht über den weiteren Gärverlauf, so dass gesamt betrachtet beide Populationen eine identische Entwicklung bezüglich der Vermehrung durchliefen. Die im Gegensatz zu P1-GU und P1-GB nur geringfügig niedrigeren Werte für die Hefen in der abschließenden Vermehrungsphase begründen nur unzureichend die um fast 10 Mio. Z/ml geringere HZZ während der Hauptgärphase. Wenn die erhöhte ACS-Aktivität der Hefezellen in P2-GU nach 48 h nicht berücksichtigt wird, ergeben die tendenziell geringeren Werte der ACS-Aktivität zusammen mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse jedoch einen Hinweis auf eine geringere Vermehrungsaktivität der Hefen aus der Propagation P2-K2.

Die Abbildung 79 zeigt die zu den Gärungen P2-GU und P2-GB aufgezeichneten Extraktverläufe und PDC-Aktivitäten. Auch in diesem Versuch zeigten die Hefen aus der zuvor belüfteten Gärung einen etwas zügigeren Extraktabbau, so dass in P2-GB nach 168 h ca. 0,5 Gew.-% mehr Extrakt umgesetzt wurde.



**Abbildung 79: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung**

Der Unterschied im Extraktabbau ergab sich hierbei durch einen scheinbar kontinuierlich höheren Zuckerumsatz in P2-GB während der Hauptgärphase vom 3. bis 5. Gärtag. Insgesamt verliefen die Gärungen jedoch schleppender als die Gärungen P1-GB und P1-GU. Dies macht der Restextraktgehalt von 6,1% in P2-GU und 5,6% in P2-GB am 7. Gärtag deutlich. Somit

scheint in diesem Versuch die geringere Belüftung in P2-K2 gegenüber P1-K8 keinen positiven Einfluss auf die Hefe gehabt zu haben. Allerdings muss bei der Evaluierung dieser Versuchsreihen die Tatsache berücksichtigt werden, dass die Versuche aufgrund der anlagentechnischen Gegebenheiten nicht wie im Falle von P10 und P18 parallel durchgeführt werden konnten und somit Unterschiede im jeweiligen Ausgangszustand der Hefen die resultierenden Ergebnisse beeinflussen konnten.

Die PDC-Aktivität der Stellhefe aus P2-K2 zeigte wiederum eine auf den Propagationsprozess zurückzuführende stark reprimierte Aktivität. Ausgehend von 0,04 U/mg fand bei beiden Hefen eine zunehmende Expression bis zum 1. Gärtag auf ein Maximum von ca. 0,30 U/mg statt. Diese im Vergleich zu den Gärungen aus P1-K8 frühzeitigere Expression setzte sich allerdings nicht über den weiteren Gärverlauf fort. Anders als im vorangegangenen Versuch fiel die Aktivität bis zum 3. Gärtag wieder ab und stagnierte im 2. Abschnitt der Hauptgärung auf einem vergleichsweise niedrigem Niveau von ca. 0,2 U/mg. Diese Entwicklung der PDC-Aktivität könnte ein Grund für den schleppenden Gärverlauf von P2-GU und P2-GB gegenüber den Gärungen aus P1-K8 gewesen sein.

Die ADH-Aktivitäten und die GL der Hefen aus P2-GU und P2-GB verhielten sich ebenfalls abweichend von denen mit der Hefe aus P1-K8 angestellten Gärungen. Die Abbildung 80 stellt die Ergebnisse aus den Enzymaktivitätsmessungen der ADH und die aus dem Extraktabbau und der HZZ-Entwicklung berechneten GL der Gärungen P2-GB und P2-GU dar.

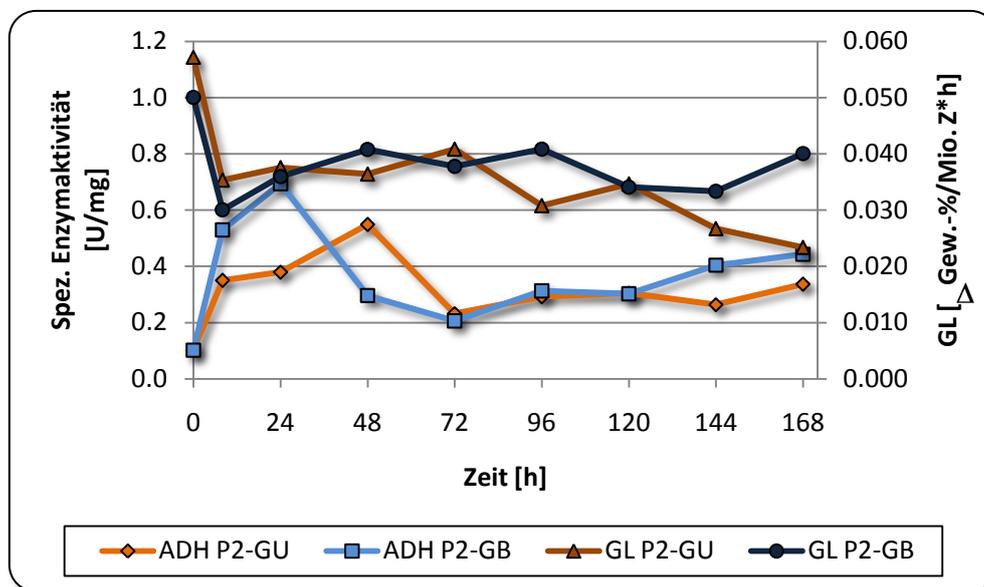


Abbildung 80: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l in der 1. Führung

Im Vergleich zu den ADH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P1-GU und P1-GB stiegen die Aktivitäten in P2-GU und P2-GB ausgehend von 0,10 U/mg bereits innerhalb von 24 h stark an. Dabei erreichte die Aktivität der Hefen in P2-GB 0,70 U/mg am 1. Gärtag und die der Hefen in P2-GU am 2. Gärtag 0,55 U/mg. Jedoch waren dies gleichsam die absoluten Aktivitätsmaxima. Vergleichbar mit der Entwicklung der PDC dieser beiden Gärungen

erfahren auch die ADH-Aktivitäten keine weitere Expression und blieben auf einem konstant niedrigen Niveau über den restlichen Gärverlauf. Somit spiegelte sich auch bei der ADH eine mit der Gärgeschwindigkeit korrelierende negative Entwicklung wider.

Die direkt zum Zeitpunkt des Anstellens deutlich erhöhte GL der beiden Hefepopulationen war vermutlich auf eine Abweichung in der Stammwürzemessung zwischen Sudhaus und Gärkeller zurückzuführen. Eine bedingt durch Mangelerscheinungen gesteigerte Nährstoffaufnahme kann aufgrund des vorangegangenen Propagationsprozess, bei dem keine von den übrigen Propagationen abweichende Limitierung der Würzeinhaltsstoffe beobachtet wurde, nicht angenommen werden. Die GL beider Hefen blieben ähnlich wie die Aktivitäten der Gärungsenzyme über den gesamten Gärverlauf konstant und zeigten keine deutliche Veränderung in der Hefephysiologie. Somit scheint die in den übrigen Gärungen beobachtete intensive Umstellung zwischen vermehrungs- und gärungsphysiologischem Charakter hier unzureichend gewesen zu sein.

Einzig die ALDH-Aktivitäten der Hefen in P2-GB und P2-GU zeigten eine mit denen aus der Propagation P1-K8 angestellten Gärungen vergleichbare Entwicklung. Nach einem temporären Maximum innerhalb der ersten 12 h folgte eine während der Vermehrungsphase andauernde Repression. Bis zum Ende der Gärung fand dann eine zunehmende Expression statt, wie sie auch bei den vorangegangenen Versuchsreihen zu beobachten war. Diese war jedoch in der belüfteten Gärung deutlich stärker ausgeprägt und mit 0,038 U/mg gegenüber 0,024 U/mg zum Ende der Gärung um fast 150% erhöht. In der Abbildung 81 sind sowohl die ALDH-Aktivitäten der Hefen aus P2-GU und P2-GB als auch das Verhältnis zwischen den Aktivitäten der PDC und ADH zu denen der ALDH und ACS ersichtlich.

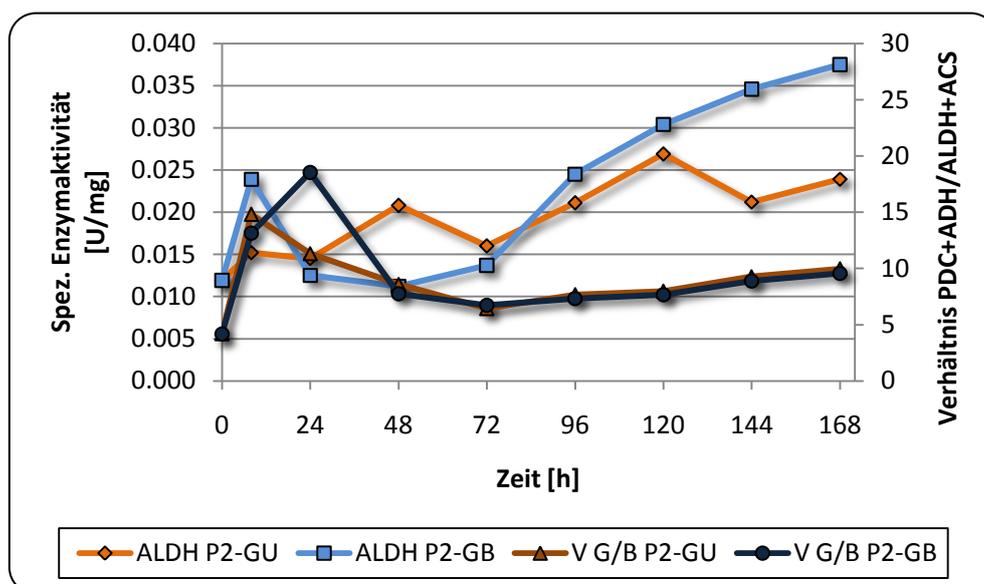
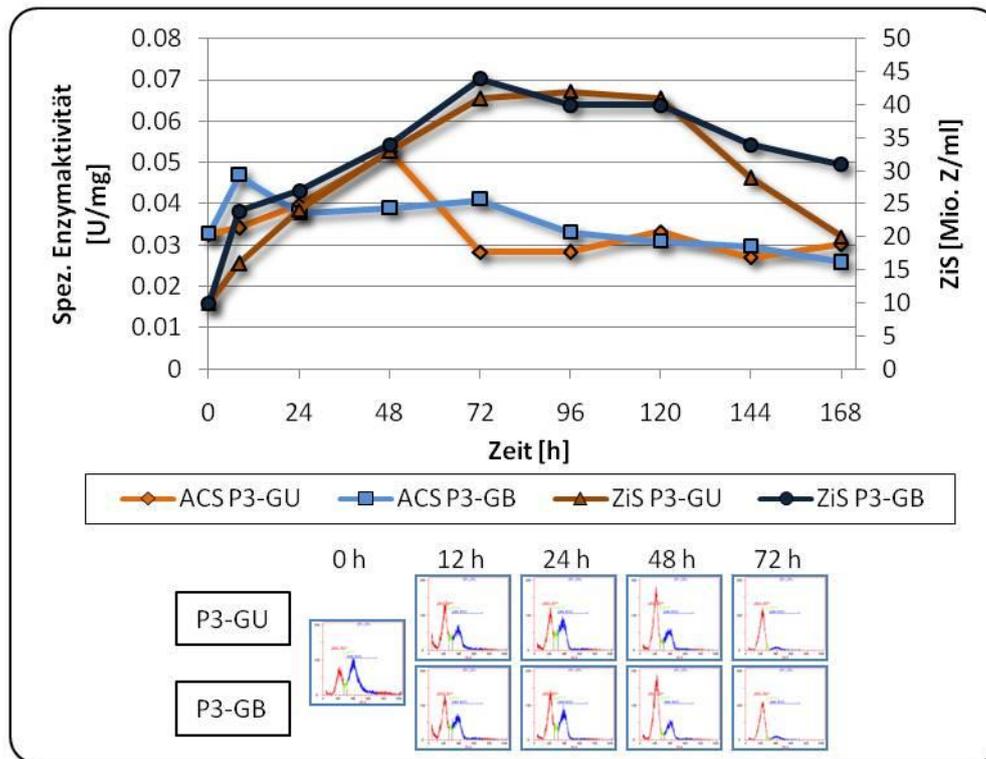


Abbildung 81: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 1. Führung

Auch das Verhältnis zwischen den Schlüsselenzymen der Gärung und denen des PDH-Bypasses belegt den insgesamt scheinbar schlechten gärungsphysiologischen Charakter der Hefen in P2-GU und P2-GB über den gesamten Gärverlauf. Unabhängig von der Belüftung fand in der Vermehrungsphase eine unerwartete Steigerung zu Gunsten der Gärungsenzyme statt. Am 1. Gärtag stieg das Verhältnis auf einen Wert von 14,8 für die Hefen in P2-GU und auf 18,5 für die in P2-GB. Dieser Wert war vergleichbar mit dem Verhältnis in P1-GU und P1-GB gegen Ende der Gärung und lässt eher auf einen ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand dieser Hefen schließen. Somit scheint es hier zu einer Irritation im Hefemetabolismus gekommen zu sein. Da dies einzig auf die mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mg/l durchgeführte Propagation zurückzuführen ist, widersprechen sich die aus der Propagation PK2 gewonnenen Ergebnisse. Dennoch hat sich der hier vorgelegene physiologische Zustand negativ auf den Gärverlauf ausgewirkt. Somit ließen sich aus den bisher durchgeführten Versuchsreihen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration während des Propagationsprozesses keine eindeutigen Ergebnisse ableiten, um eine Aussage zur notwendigen Belüftung zu treffen.

Die im Vergleich zu P18 nochmals variierte Belüftungsstrategie der Intervall-belüfteten Propagation P3-I8 zeigte hingegen einen mit dem in den Gärungen G18-U und G18-B vergleichbaren Einfluss des Propagationsprozess in Kombination mit der Würzebelüftung. Die im Kontrast zu den Gärungen aus P1-K8 und P2-K2 bereits zu Beginn durch die Intervallbelüftung bei der Propagation gesteigerte ACS-Aktivität der Hefen aus P3-I8 zeigte allerdings nur in der unbelüfteten Gärung P3-GU eine zusätzlich Expression während der Vermehrungsphase. Trotz der unterschiedlichen Expression entwickelte sich die HZZ in den Gärungen P3-GU und P3-GB zueinander parallel. Insgesamt kam es in beiden Gärungen zu einer, im Vergleich zu den übrigen Gärungen der 1. Führung, verstärkten Hefevermehrung. Die ACS-Aktivitäten und die ZiS sind in der Abbildung 82 über den Gärverlauf dargestellt.



**Abbildung 82: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

Während die ACS-Aktivität der Hefe in P3-GB nach einem kurzzeitigen Maximum von 0,047 U/mg nach 12 h über den ersten Teil der Hauptgärung mit 0,040 U/mg fast konstant blieb, entwickelte sich die Aktivität der Hefen in P3-GU nach dem aus den vorangegangenen Versuchsreihen bereits bekannten Muster und erreichte ein absolutes Maximum von 0,053 U/mg am 2. Gärtag. Im weiteren Verlauf fiel die ACS-Aktivität der Hefen in P3-GU wieder ab, so dass die Aktivitäten der Hefen in beiden Gärungen zum Ende der Gärung auf einem vergleichbaren Niveau von ca. 0,030 U/mg lagen.

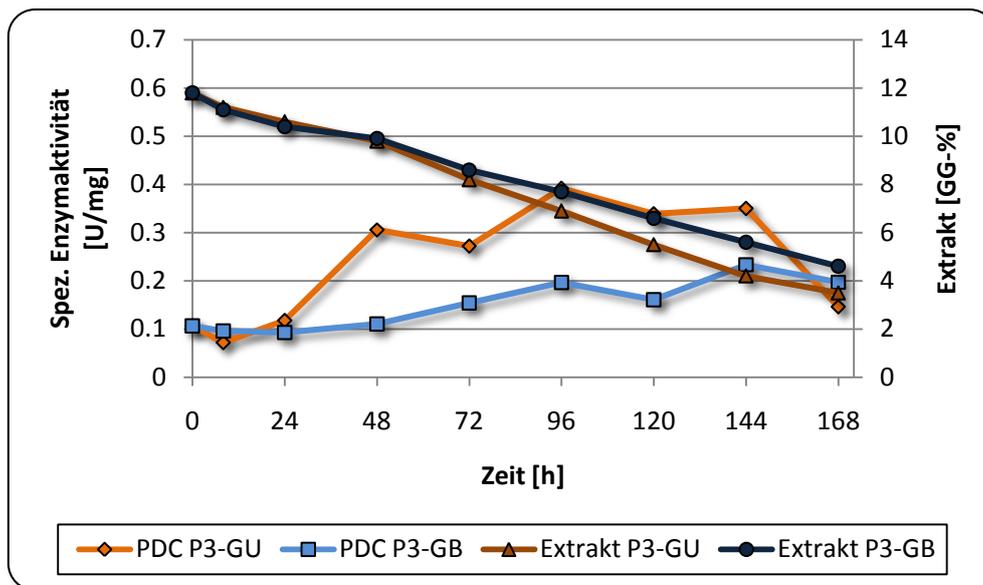
Ausgehend von einer Anstellkonzentration von 10 Mio. Z/ml nahmen die Zellzahlen in beiden Gärungen kontinuierlich bis auf 45 Mio. Z/ml am 3. Gärtag zu. Damit lagen während der Hauptgärphase in beiden Gärungen bis zu 10 Mio. Z/ml mehr Hefen vor, als in den Gärungen von P1 und P2. Wie die Histogramme der Zellzyklusanalyse von P3-GU und P3-GB in der Abbildung 82 zeigen, ließ sich im Gegensatz zu den ACS-Aktivitäten in dieser Versuchsreihe kein signifikanter Einfluss der Würzebelüftung ableiten. Die prozentuale Verteilung der Vermehrungsphasen der Hefen in P3-GU und P3-GB ist in der Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

|                         | 0 h   |       | 12 h  |       |       | 24 h  |       | 48 h  |       | 72 h  |       |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                         | P1-G  | P1-GU | P1-GB |
| <b>G0-/G1-Phase [%]</b> | 33,7% | 49,9% | 50,6% | 40,2% | 48,5% | 62,0% | 67,8% | 86,5% | 85,7% |       |       |
| <b>S-Phase [%]</b>      | 6,0%  | 9,6%  | 8,0%  | 13,4% | 9,1%  | 5,8%  | 4,5%  | 3,8%  | 3,0%  |       |       |
| <b>G2-/M-Phase [%]</b>  | 60,2% | 40,5% | 41,4% | 46,4% | 42,4% | 32,2% | 27,7% | 9,7%  | 11,3% |       |       |

Ausgehend von einer mit den Hefen aus P1-K8 und P2-K2 vergleichbaren Verteilung der Vermehrungsphasen zum Ende der Propagationen, konnte 12 h nach dem Anstellen mit knapp über 40% an Hefen in der G<sub>2</sub>-/M-Phase ein im Vergleich zu den Gärungen P1-G und P2-G etwas größerer Anteil gemessen werden. Jedoch zeigten die Messungen am 1. und 2. Gärtag mit 46,4 bzw. 32,2% für P3-GU und 46,4 bzw. 27,7% für P3-GB einen bis zu 10% niedrigeren Anteil der in der Teilungsphase befindlichen Zellen. Diese Messwerte ergeben somit keinen Anhaltspunkt für die deutlich stärkere Hefevermehrung in den Gärungen aus P3-I8. Damit scheint hier die Zellzyklusanalyse, vermutlich aufgrund der stichpunktartigen Probenahme, eine evtl. exponentielle Wachstumsphase nicht erfasst zu haben und würde für eine zeitlich verkürzte Probenfolge in weiteren Forschungsarbeiten sprechen.

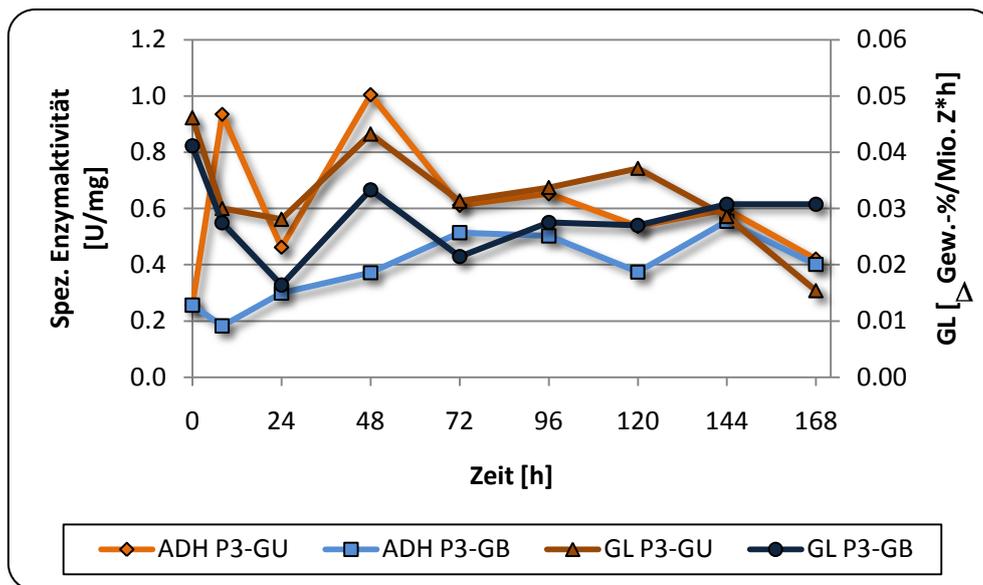
Die Abbildung 83 zeigt den Extraktabbau und die Entwicklung der PDC-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P3-GB und P3-GU über die Gärdauer. Dabei machen die Unterschiede im Extraktumsatz zwischen P3-GB und P3-GU erneut die hohe Bedeutung des physiologischen Zustands der Hefen für verbesserte Gäreigenschaften und den Einfluss der angepassten Belüftung an den gesamten Prozess des Hefemanagements deutlich. Trotz identischer Zellzahlen zeigten die Hefen in P3-GU ab dem 2. Gärtag eine deutlich höhere Gärintensität, was durch die verstärkte Expression der PDC gestützt wurde.



**Abbildung 83: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

Die Hefen in P3-GU erreichten nach 168 h einen scheinbaren Restextraktgehalt von 3,5 Gew.-% und damit den angestrebten GVG. Damit ergab sich gegenüber der belüfteten Gärung P3-GB zu diesem Zeitpunkt eine Differenz von 1,1 Gew.-%. Auch im Vergleich zu den jeweilig zügigeren Gärungen aus P1-K8 und P2-K2 konnten die Hefen aus P3-GU im gleichen Zeitraum 0,5 Gew.-% bzw. 2,1 Gew.-% mehr Extrakt umgesetzt. Die PDC-Aktivitäten zeigten wie die ACS-Aktivitäten ebenfalls eine signifikante Abhängigkeit von der Würzelbelüftung. Während die PDC in der belüfteten Gärung nur unterdurchschnittlich exprimiert wurde und nur gegen Ende der Gärung leicht zunahm, erfuhr die PDC bei den Hefen in der Gärung P3-GU eine deutlich gesteigerte Expression ab dem 2. Gärtag und stieg von 0,12 auf 0,31 U/mg. Dieses Aktivitätsniveau behielt die Hefe bis 24 h vor Ende der Hauptgärung bei.

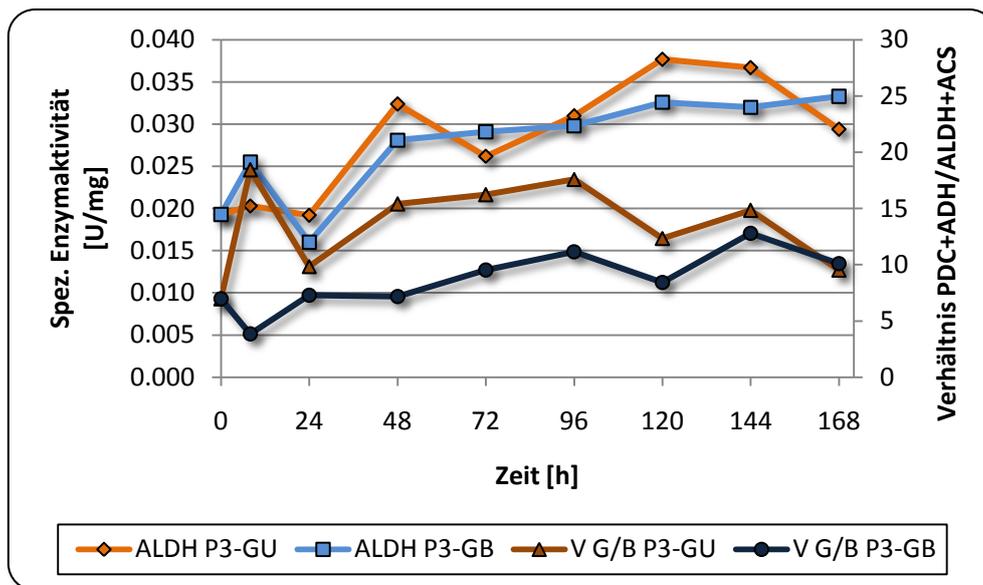
Die ADH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P3-GU und P3-GB entwickelten sich tendenziell vergleichbar mit den Aktivitäten der PDC und ACS. Auch hier zeigten die unbelüfteten Hefen eine deutlich ausgeprägtere Expression der Enzymaktivität über den Verlauf der An- und Hauptgärung. Die Resultate aus den Enzymaktivitätsmessungen der ADH und die aus der Zellkonzentration und dem Extraktumsatz errechnete GL sind zusammen in der Abbildung 84 aufgetragen.



**Abbildung 84: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

Die Ausgangsaktivität der Anstellhefe aus der intervallbelüfteten Propagation P3-I8 war mit 0,26 U/mg deutlich weniger reprimiert als dies aufgrund der kontinuierlichen Belüftung in den Propagationen P1-K8 und P2-K2 der Fall gewesen war. In der belüfteten Gärung P3-GB stieg diese dann nur schleppend über den ersten Teil der Hauptgärphase und erreichte nach 72 h ein Maximum von 0,51 U/mg. Die ADH-Aktivität blieb im weiteren Verlauf der Gärung annähernd konstant auf diesem Niveau. Dahingegen wurde die ADH-Aktivität der unbelüfteten Hefen bereits direkt nach dem Anstellen innerhalb von 8 h bis auf einen Wert von 0,94 U/mg gesteigert. Nach einem temporären Minimum am 1. Gärtag, das vermutlich auf die Umstellungen im Metabolismus von einem ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Zustand hin zu einem gärungsphysiologischen Zustand zurückzuführen war, erreichte die ADH-Aktivität der Hefen in P1-GU am 2. Gärtag ein erneutes, auch im Vergleich zu den übrigen Gärungen in der 1. Führung absolutes Maximum von 1,00 U/mg. Zwar fiel die Aktivität im weiteren Verlauf wieder ab, dennoch blieb diese über den gesamten Gärverlauf über den ADH-Aktivitäten der Hefen in der Gärung P1-GB. Auf Grund der vergleichbaren HZZ und der zügigeren Extraktabnahme in P1-GU zeigen auch die in der Abbildung 84 dargestellten GL die Vorteile im physiologischen Zustand der Hefen in P3-GU gegenüber den belüfteten Hefen von P3-GB. Über den gesamten Gärverlauf konnte eine um bis zu 60% gesteigerte GL beobachtet werden.

Die ALDH-Aktivitäten der Hefen in den beiden Gärungen P3-GU und P3-GB verhielten sich im Gegensatz zu den übrigen Enzymaktivitäten nicht kontrovers und zeigten eine für Hefen in der ersten Führung bekannte Entwicklung. Nach einem kurzzeitigen Minimum am 1. Gärtag stieg die Aktivität kontinuierlich über den gesamten Gärverlauf. Die ALDH-Aktivitäten der Hefen und das Verhältnis der Schlüsselenzyme aus dem Gärungsstoffwechsel und des PDH-Bypasses sind in der Abbildung 85 dargestellt.



**Abbildung 85: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDC-Bypasses aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

Auch am Verhältnis der Enzymaktivitäten, das eine Gesamtbetrachtung der Stoffwechsellausprägung möglich macht, wird der Unterschied im physiologischen Zustand zwischen den belüfteten und unbelüfteten Hefen deutlich. Der ausgeprägte Gärungsstoffwechsel der Hefen in P3-GU führte dazu, dass das Verhältnis zwischen PDC und ADH zu ALDH und ACS über die entscheidende Phase der Hauptgärung bei den unbelüfteten Hefen um zeitweilig bis zu 60% zugunsten des Extraktumsatzes durch die PDC und ADH höher lag als bei den zusätzlich belüfteten Hefen aus P3-GB.

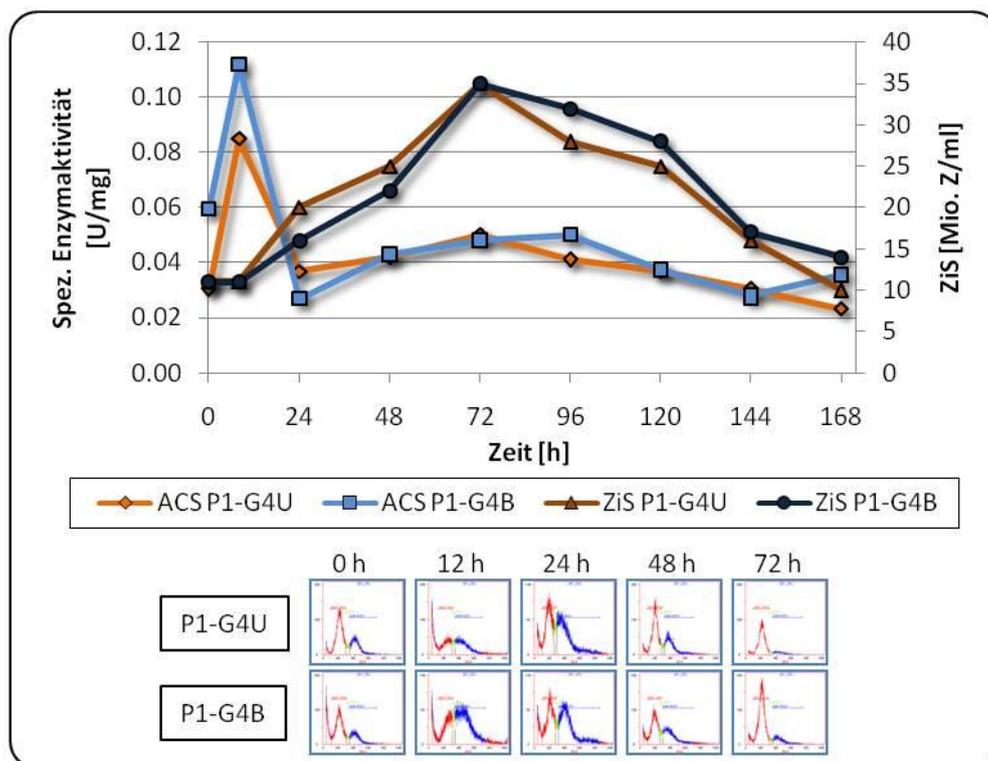
Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus den Gärungen GI8-U und GI8-B, die ebenfalls mit Hefe aus einer intervallbelüftete Propagation angestellt wurden, bestätigt sich die mittels Belüftungspausen erreichte, bessere Adaption der Propagationshefen an die nachfolgenden Gärungsbedingungen. Bei einer Abstimmung der Würzebelüftung auf die Hefephysiologie kann zudem eine deutliche Verbesserung in den Gäreigenschaften erreicht werden. Gleichzeitig wurde deutlich, dass eine nicht auf die Hefephysiologie abgestimmte Belüftung über die Würze wie am Bsp. P3-GU zumindest in der 1. Führung eher einen negativen Einfluss haben kann.

#### **4.5.2 Einfluss der Belüftungsstrategie bei der Propagation auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in der 4. Führung**

Die jeweils, entsprechend der Versuchsanordnung, in belüfteten und unbelüfteten Würzen weiter geführten Erntehefen aus P1-G, P2-G und P3-G wurden in der 4. Führung (Bez. **P1-G4**, **P2-G4** und **P3-G4**) wiederum hinsichtlich ihrer Vermehrungsaktivität und Gäreigenschaften untersucht. Dazu wurden, wie in der 1. Führung, die Zellzahlentwicklung und DNA-Verteilung, der Extraktabbau sowie die Aktivitäten der Schlüsselenzyme über den Gärverlauf

analysiert. Ziel war es, die Auswirkungen des Propagationsprozesses und der Würzebelüftung für die Wiederverwendung der Hefe deutlich zu machen.

In der Abbildung 86 sind die ACS-Aktivitäten und die ZiS, sowie die Histogramme der DNA-Verteilung der Hefen aus den Gärungen P1-G4B und P1-G4U in der 4. Führung dargestellt. Eine gesteigerte Expression der ACS-Aktivitäten beider Hefepopulationen konnte, wie bei der in Kapitel 4.4.2 erfolgten Untersuchung zur Entwicklung der Enzymaktivitäten über mehrere Führungen, nur in der Anstellphase beobachtet werden. Dabei lagen die Aktivitäten der Hefen in der belüfteten Gärung P1-G4B nach 12 h mit 0,121 um ca. 0,030 U/mg über der Aktivität der Hefen in P1-G4U. Die zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise hohe Aktivität der Hefen in P1-G4B war nicht zuletzt auf die ebenfalls höhere Ausgangsaktivität von 0,060 gegenüber 0,031 U/mg der unbelüfteten Hefe in P1-G4U zurückzuführen.



**Abbildung 86: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

Im weiteren Verlauf fielen die ACS-Aktivitäten beider Hefen auf einen vergleichbaren Wert von 0,040 U/mg zurück und blieben über die restliche Hauptgärung nahezu konstant auf diesem Niveau. Die Entwicklung der ZiS hingegen zeigte, wie auch in der 1. Führung zu beobachten war, keinen positiven Einfluss der zusätzlichen Belüftung auf die Hefen in der Gärungen P1-G4B. Zwar war tendenziell sogar eine schnellere Zunahme in der HZZ von P1-G4U festzustellen, aber am 3. Gärtag wiesen beide Gärungen eine identische Hefezellzahl von 35 Mio. Z/ml auf. Auch das Absetzverhalten der Hefen in den beiden Gärungen war wiederum vergleichbar, sodass auch in der 4. Führung anhand der ZiS keine Aussage über die Notwendigkeit einer zusätzlichen Würzebelüftung für die aus der Propagation P1-K8

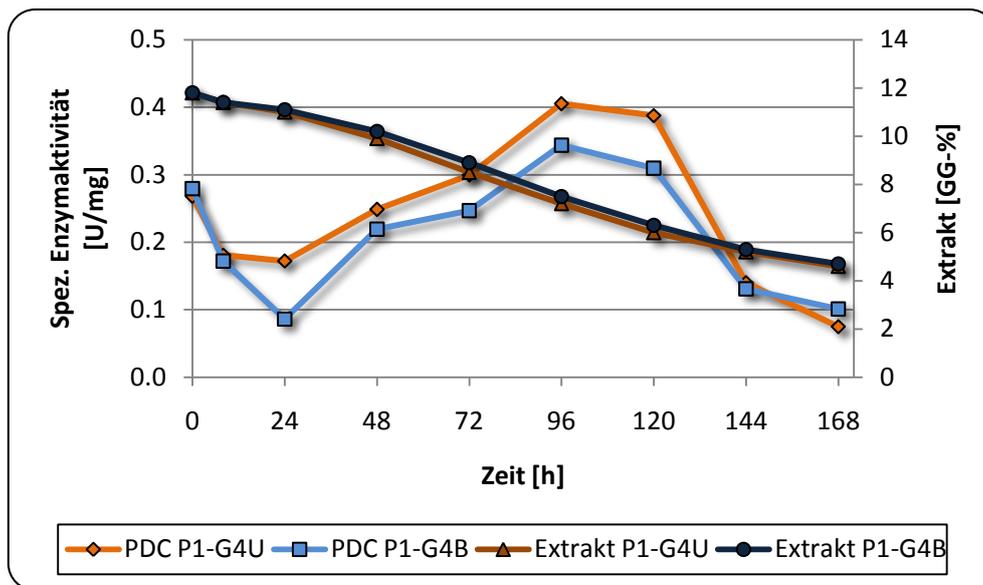
stammenden Hefe getroffen werden kann. Auch die Betrachtung der Histogramme in der Abbildung 86, die die DNA-Verteilung der Hefen in den beiden Gärungen zeigen, geben keinen Hinweis auf einen signifikanten Einfluss der Würzebelüftung.

Erst bei der Umrechnung in die prozentualen Anteile der einzelnen Vermehrungsphasen, die in der Tabelle 17 dargestellt sind, werden die geringen Unterschiede zwischen den Populationen deutlich. Ausgehend von einer vergleichbaren Ausgangssituation der Anstellhefen mit ca. 2/3 in der  $G_1$ -/ $G_0$ -Phase und 1/3 in der  $G_2$ -/ $M$ -Phase, waren die Anteile der Hefen in der abschließenden Vermehrungsphase der zusätzlich belüfteten Hefen über den Gärverlauf teilweise deutlich größer. So befanden sich nach 12 h in der Gärung P1-G4B ca. 11% und nach 48 h ca. 8% mehr Hefen in der  $G_2$ -/ $M$ -Phase, was sich allerdings nicht mit der Entwicklung der gemessenen ZiS deckt. Signifikante Unterschiede der sich in der S-Phase befindlichen Hefezellen konnten nicht festgestellt werden.

**Tabelle 17: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

|                         | 0 h    |        | 12 h   |        | 24 h   |        | 48 h   |        | 72 h   |        |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                         | P1-G4U | P1-G4B |
| <b>G0-/G1-Phase [%]</b> | 62,1%  | 65,0%  | 37,3%  | 27,5%  | 39,9%  | 37,5%  | 60,4%  | 49,6%  | 85,3%  | 81,2%  |
| <b>S-Phase [%]</b>      | 6,5%   | 5,8%   | 10,8%  | 9,2%   | 8,1%   | 7,8%   | 5,9%   | 8,3%   | 3,0%   | 3,0%   |
| <b>G2-/M-Phase [%]</b>  | 31,4%  | 29,2%  | 51,9%  | 63,3%  | 52,0%  | 54,7%  | 33,7%  | 42,1%  | 11,7%  | 15,8%  |

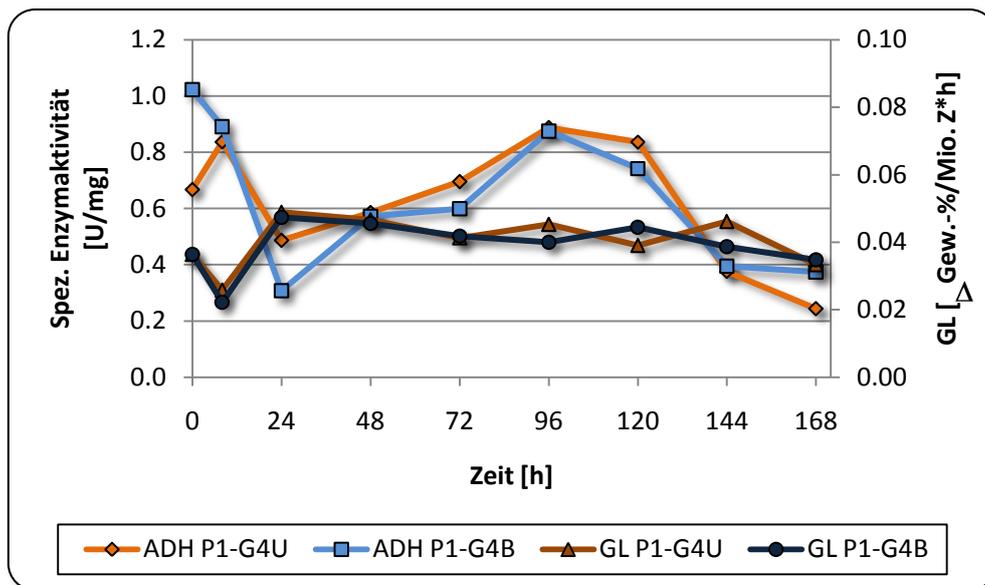
Der höhere Anteil an Zellen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase der Hefen in P1-G4U, besonders in dem für die Umstellung im Hefemetabolismus entscheidenden Zeitraum vom 1. bis zum 2. Gärtag, sollte somit einen Hinweis für einen wiederum zügigeren Extraktumsatz in der unbelüfteten Gärung geben. Der Extraktverlauf und die PDC-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P1-G4U und P1-G4B sind in der Abbildung 87 dargestellt. Bei der Beachtung des Extraktverlaufs war zu beobachten, dass im zuvor beschriebenen Zeitraum von 24 bis 48 h die Hefen in P1-G4U tatsächlich effektiv mehr Extrakt umsetzten und somit eine etwas zügigere Hauptgärung zeigten. Gegen Ende der Gärung jedoch nivellierten sich die Extraktgehalte beider Gärungen und die Jungbiere erreichten gleichzeitig ihre Schlauchreife.



**Abbildung 87: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

Die PDC-Aktivitäten der Hefen zeigten kontrovers zur 1. Führung eine verstärkte Expression in der unbelüfteten Gärung P1-G4U. Begründet könnte dies durch die weitreichendere Repression der PDC-Aktivität der Hefen in P1-G4B am 1. Gärtag sein. Dies wiederum ist vermutlich auf die zusätzliche Versorgung mit Sauerstoff zu Beginn der Gärung zurückzuführen. Fast parallel entwickelten sich die PDC-Aktivitäten über den weiteren Verlauf der Hauptgärung, sodass die Hefen in P1-G4U mit 0,41 U/mg ein um 0,07 U/mg höheres, absolutes Aktivitätsmaximum nach 96 h erreichten.

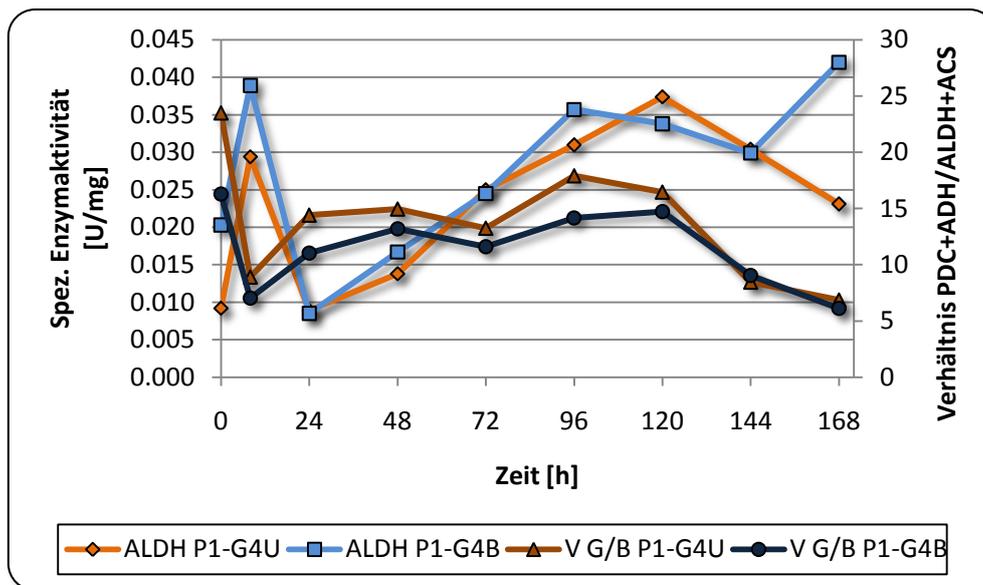
Die ADH-Aktivitäten der Hefen in den beiden Gärungen hingegen zeigten keinen Einfluss der Würzebelüftung. So waren, wie aus der Abbildung 88 ersichtlich, die aus der Aktivitätsmessung resultierenden Kurven über den gesamten Gärverlauf nahezu deckungsgleich. Ähnlich der PDC-Aktivitäten der beiden Hefepopulationen konnte auch bei der ADH eine ausgeprägte Repression am 1. Gärtag beobachtet werden. Zudem fielen die ADH-Aktivitäten im Gegensatz zu denen aus der 1. Führung zum Ende der Gärung deutlich ab und zeigten nach 168 h ein erneutes Minimum von 0,37 U/mg für die Hefen in P1-G4B und 0,24 U/mg für die in P1-G4U.



**Abbildung 88: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

Aufgrund der nur geringen Unterschiede in den gemessenen HZZ und des Extraktabbaus in den beiden Gärungen wiesen auch die resultierenden GL, die ebenfalls in der Abbildung 88 dargestellt sind, keine signifikanten Abweichungen zwischen P1-G4U und P1-G4B auf. Die Hefen beider Gärungen zeigten, wie schon in vorangegangenen Versuchsreihen beobachtet, eine deutliche Steigerung der GL am 1. Gärtag, blieben allerdings im weiteren Verlauf nahezu konstant auf einem durchschnittlichen Niveau von ca. 0,042  $\Delta$ Gew.-%/Mio. Z\*h.

Auch die Ergebnisse der Aktivitätsmessung der ALDH, die zusammen mit dem Verhältnis der Gärungsenzyme zu denen des PDH-Bypasses aus der Abbildung 89 ersichtlich sind, ergaben nur geringfügige Unterschiede in den Expressionen zwischen den unterschiedlich behandelten Hefen über den Gärverlauf. Allerdings lag vergleichbar mit den ACS-Aktivitäten bei den Hefen in P1-G4B mit 0,020 U/mg eine fast doppelt so hohe Ausgangsaktivität vor. Auch die in den ersten 12 h bei beiden Populationen gemessene starke Zunahme in den ALDH-Aktivitäten und die darauffolgende Repression waren nahezu deckungsgleich mit der Entwicklung der ACS-Aktivitäten.

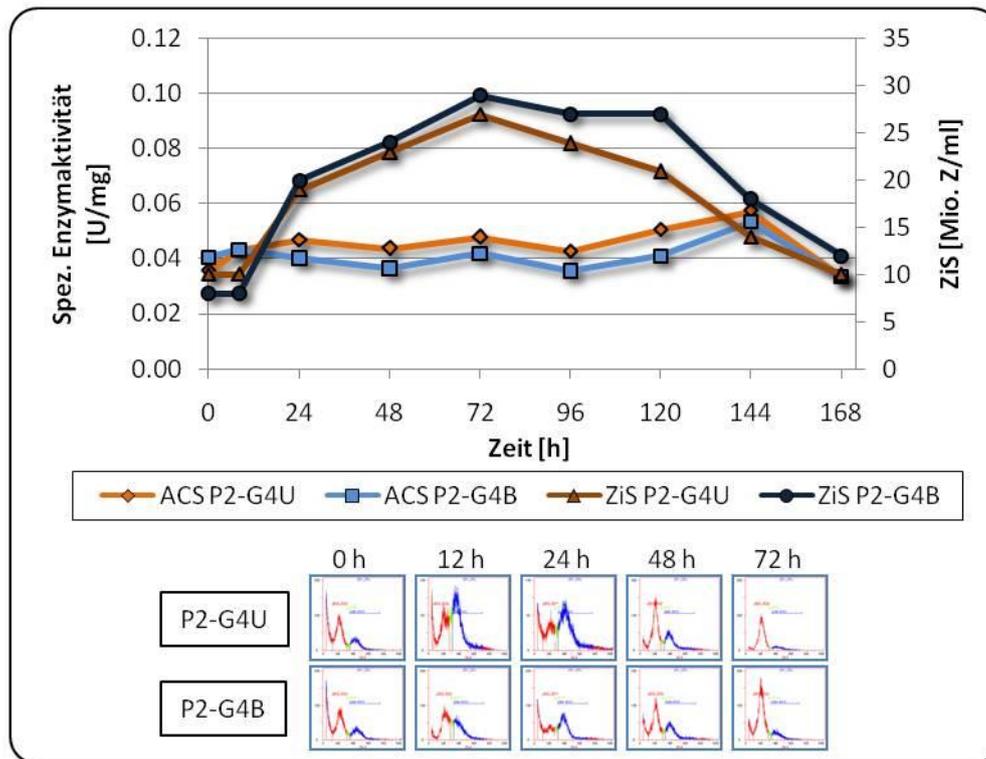


**Abbildung 89: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

Somit schien in diesen beiden Gärungen kein ausreichender Pool an Acetat für die Synthese von Acetyl-CoA durch die ACS vorhanden gewesen zu sein, sodass beide Enzyme des PDH-Bypasses von der Hefe für eine ausreichende Versorgung deutlich exprimiert werden mussten. Im weiteren Verlauf entwickelten sich ALDH-Aktivitäten nach dem bekannten Muster und nahmen über den Gärverlauf stetig zu. Während die Aktivität der Hefen in P1-G4U zum Ende der Gärung jedoch wieder absank, stieg die ALDH-Aktivität der Hefen in P1-G4B nochmals an. Falls es in der 3. Führung zu einem ähnlichen Verlauf der ALDH-Aktivitäten gekommen war, wäre dies eine Erklärung für die unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten zu Beginn der 4. Führung.

Somit ergaben sich für die Hefen in P1-G4B und P1-G4U mit Ausnahme der bei den unbelüfteten Hefen erhöhten PDC-Aktivität keine Unterschiede in den Enzymaktivitäten. Dem entsprechend beschreibt auch das Verhältnis zwischen PDC und ADH zu ALDH und ACS, wie am Beispiel des Maximums nach 96 h von 17,9 gegenüber 14,2 ersichtlich, eine zu Gunsten des Gärungsstoffwechsels verschobene Gewichtung im Hefemetabolismus in der unbelüfteten Gärung P1-G4U, was sich mit dem in diesem Zeitraum zügigeren Extraktabbau deckt.

Die Abbildung 90 zeigt die ACS-Aktivitäten und die Entwicklung der ZiS der Hefen aus der mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 2 mg/l durchgeführten Propagation P2-K2. Auch hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den belüfteten und unbelüfteten Gärungen festgestellt werden. Nur im 2. Teil der Hauptgärung schienen die Hefen in P2-G4U sich tendenziell schneller abzusetzen.



**Abbildung 90: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung**

Trotz einer vergleichbaren Ausgangsaktivität konnte bei den Gärungen P2-G4B und P2-G4U, anders als bei den Hefen in P1-G4B und P1-G4U, keine gesteigerte Expression der ACS in der Angärphase gemessen werden. Die ACS-Aktivitäten der Hefen blieben über den gesamten Gärverlauf nahezu konstant auf einem Niveau von 0,040 U/mg. Diese fehlende Bereitstellung an Acetyl-CoA schien sich negative auf die Vermehrung der Hefen ausgewirkt zu haben. So wurde über die Hauptgärphase ca. 5 Mio. Z/ml weniger gemessen als in den aus P1-K8 angestellten Gärungen. Erst nachdem schon ein weitgehender Extraktabbau stattgefunden hat, war eine geringe Steigerung in den ACS-Aktivitäten gegen Ende der Hauptgärung zu beobachten. Dies könnte wiederum mit dem schnelleren Absetzen der gärschwächeren Hefen in Zusammenhang gebracht werden.

Trotz der fast identischen Zellzahlen in den ersten 2 Gärtagen zeigte die Analyse der DNA-Verteilung Unterschiede zwischen den beiden Populationen. Dabei wiesen die unbelüfteten Hefen in P2-G4U 12 h nach der Angärung, wie anhand der ebenfalls in der Abbildung 90 dargestellten Histogramme der Zellzyklusanalyse zu sehen, einen größeren Peak der blau markierten G<sub>2</sub>/M-Phase auf. Diese Tendenz lässt sich ebenfalls aus den Histogrammen der DNA-Verteilung nach 24 h ablesen. Bei dem Vergleich der in der Tabelle 18 zusammengefassten prozentualen Verteilung der Vermehrungsphasen wurde deutlich, dass sich zu diesen Zeitpunkt über 10 bzw. 5% mehr Zellen der unbelüfteten Gärung in der Teilungsphase befanden als in der belüfteten Gärung P2-G4B.

Tabelle 18: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung

|                                           | 0 h    |        | 12 h   |        | 24 h   |        | 48 h   |        | 72 h   |        |
|-------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                           | P2-G4U | P2-G4B |
| G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase [%] | 66,1%  | 62,2%  | 35,2%  | 46,6%  | 27,2%  | 31,1%  | 59,9%  | 57,3%  | 82,3%  | 78,5%  |
| S-Phase [%]                               | 4,2%   | 5,3%   | 10,5%  | 11,7%  | 6,8%   | 8,5%   | 5,5%   | 6,4%   | 2,9%   | 3,9%   |
| G <sub>2</sub> /M-Phase [%]               | 29,6%  | 32,5%  | 54,2%  | 41,7%  | 66,0%  | 60,4%  | 34,6%  | 36,3%  | 14,8%  | 17,6%  |

Diese Ergebnisse korrelieren jedoch nicht mit den gemessenen ZiS und den Enzymaktivitäten der ACS. Die nur punktuelle Betrachtung zu den jeweiligen Messzeitpunkten könnte ein Grund für die jeweiligen Abweichungen sein und würde eine kontinuierliche Erfassung des Hefemetabolismus notwendig machen.

Diese Verteilung der Vermehrungsphase würde auf einen von Beginn an schnelleren Extraktabbau der Hefen in P2-G4B schließen lassen, da mehr Zellen in der für den Extraktabbau verantwortlichen G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase vorlagen. Da dies, wie aus den Kurven des Extraktverlaufs in der Abbildung 91 ersichtlich, nicht der Fall gewesen war, wird die Annahme einer nicht repräsentativen DNA-Messung gestützt.

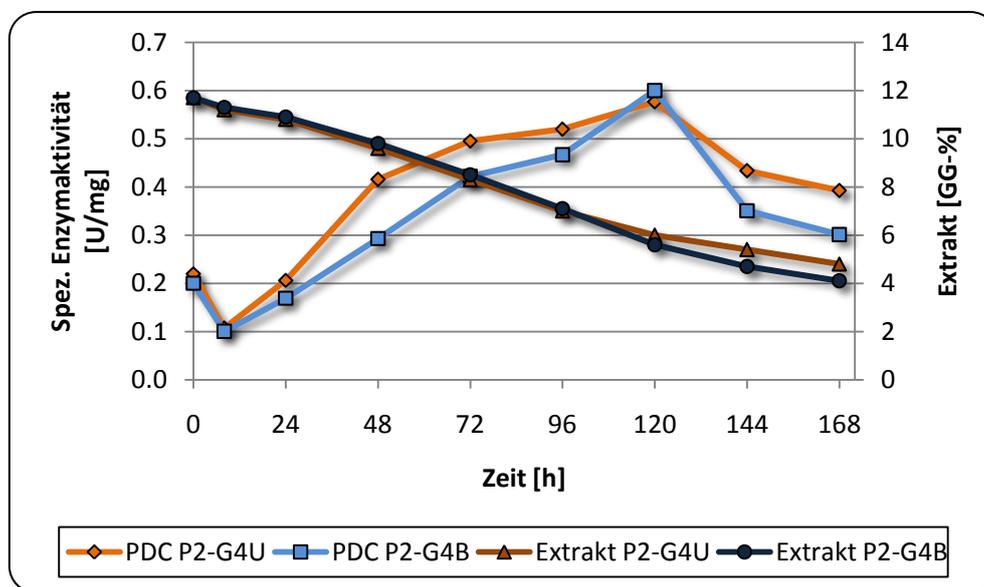


Abbildung 91: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung

Erst gegen Ende der Hauptgärphase kam es zu Unterschieden im Extraktabbau der Hefen in den Gärungen P2-G4B und P2-G4U. Im Zeitraum vom 4. Gärtag bis zum Schlauchzeitpunkt, in dem auch mehr Zellen in P2-G4B gemessen wurden, setzten die belüfteten Hefen insgesamt mehr Extrakt um. Dies führte nach 168 h zu einer Differenz im Extraktgehalt der beiden

Gärungen von 0,7 Gew.-%. Die ebenfalls in der Abbildung 91 dargestellten PDC-Aktivitäten der Hefen weisen auf einen nur geringfügigen Unterschied im physiologischen Zustand der Hefe in den Gärungen P2-G4B und P2-G4U hin, da die tendenzielle Entwicklung der PDC-Aktivitäten bei beiden Populationen gleich verlief. Die ähnlich wie in den Gärungen P1-G4B und P1-G4U für eine Erntehefe vergleichsweise geringe Ausgangsaktivität von 0,20 U/mg erfuhr zu Beginn zudem eine bereits mehrfach beschriebene Repression. Der in diesem Fall, vermutlich aufgrund der ohnehin schon geringen PDC-Aktivität, zeitlich sehr kurzen Repressionsphase folgte eine für beide Gärungen kontinuierlich gesteigerte Expression der PDC bis zum 5. Gärtag auf ein Maximum von ca. 0,60 U/mg. Dabei wurden für die Hefen aus P2-G4U vom 2. bis zum 4. Gärtag geringfügig höhere Werte gemessen. Gegen Ende der Gärung sanken die PDC-Aktivitäten der Hefen in beiden Gärungen wieder ab, wobei auch hier die unbelüfteten Hefen eine etwas höhere Endaktivität aufwiesen. Insgesamt konnte in den Gärungen von P2 gegenüber denen aus P1 ein um 0,20 U/mg höheres Maximum erreicht werden.

Die in der Abbildung 92 zusammen mit den GL dargestellten ADH Aktivitäten bestätigen den bereits bei den PDC- und ACS-Aktivitäten beobachteten, geringen Unterschied im physiologischen Zustand der Hefen in den Gärungen P2-G4B und P2-G4U, da auch hier die Kurven nahezu deckungsgleich verliefen. Gleichsam war die Entwicklung der ADH-Aktivitäten mit denen der PDC vergleichbar. Nach einem temporären Minimum in den ersten 12 h wurde auch die ADH bis zum 5. Gärtag nahezu kontinuierlich gesteigert. Nur zwischen dem 2. und 3. Gärtag stagnierten die ADH-Aktivitäten beider Hefepopulationen. Wie bei der PDC lag das Aktivitätsmaximum mit 0,93 U/mg für die Hefen in P2-G4U und 1,04 U/mg für die in P2-G4B nach 120 h auf einem höheren Niveau als in den Gärungen aus P1.

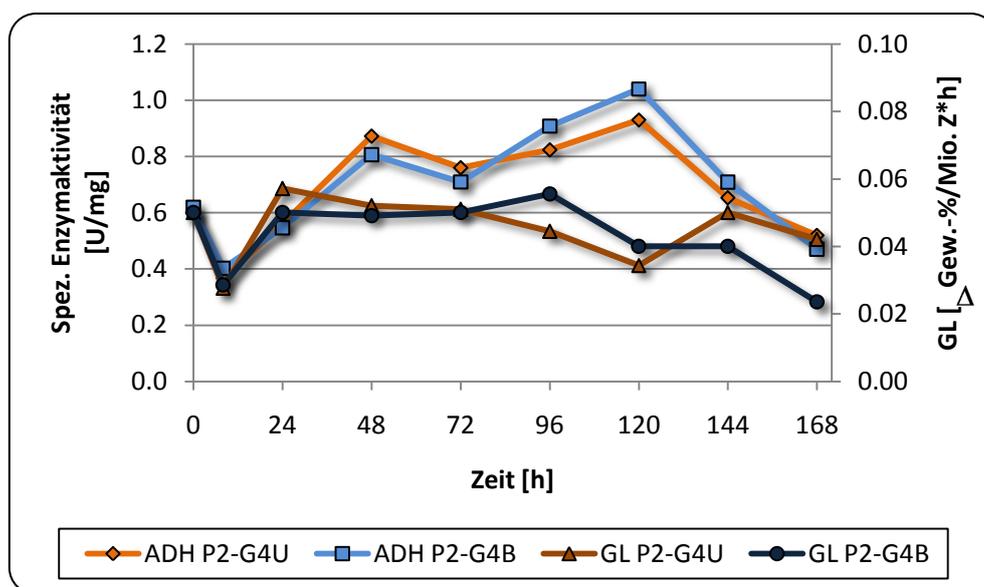
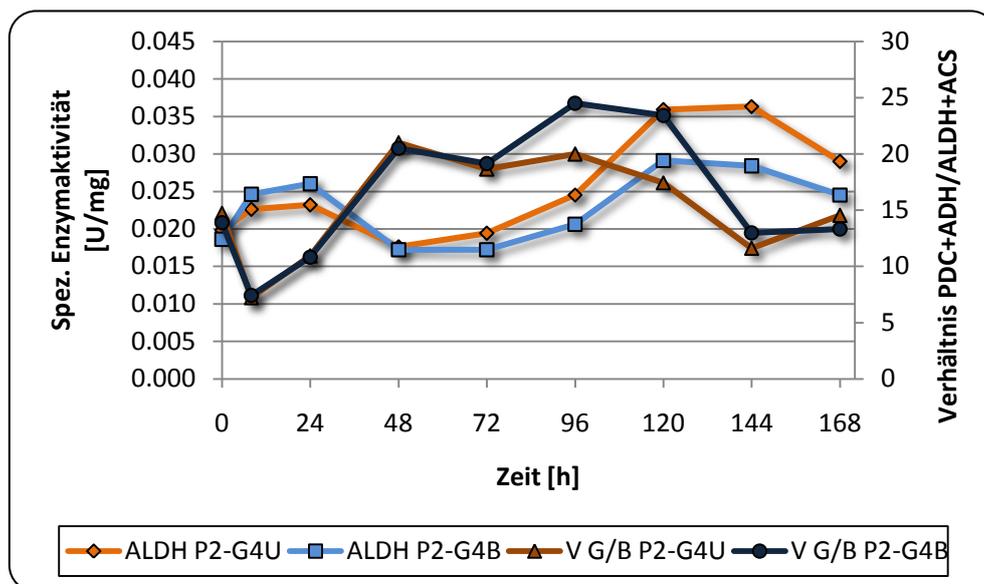


Abbildung 92: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mg/l in der 4. Führung

Mit zunehmenden VG fielen die ADH-Aktivitäten, wie bei den Gärungen aus P1 wieder kontinuierlich ab, blieben aber weiterhin über den für die Gärungen P1-G4B und P2-G4U ermittelten Werten. Die Berechnung der GL machte deutlich, dass die leicht höheren Enzymaktivitäten der Gärungen von P2-G4 auch einen höheren Extraktumsatz pro Hefezelle bewirkten. Zwar war auch hier kein deutlicher Einfluss der zusätzlichen Belüftung der Hefen in P2-G4B zu erkennen, aber in der Phase des insgesamt zügigeren Extraktabbaus in P2-G4B lag auch die GL in dieser Gärung tendenziell etwas über der in P2-G4U. Gegen Ende konnten die Hefen in P2-G4U zwar dann einen etwas höheren Extraktumsatz aufweisen, was sich aufgrund der niedrigeren ZiS jedoch nicht mehr positiv auf den Gärverlauf auswirkte.

Die ALDH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P2-G4B und P2-G4U, die zusammen mit dem Verhältnis der Gärungsenzyme zu den Enzymen des PDH-Bypasses in der Abbildung 93 dargestellt sind, besaßen trotz der unterschiedlichen Belüftungsstrategie in den ersten 3 Führungen die identische Ausgangsaktivität von 0,012 U/mg. Die zudem vergleichbare Entwicklung über den Gärverlauf machte wiederum den geringen Unterschied im physiologischen Zustand der beiden Hefepopulationen in der 4. Führung deutlich.

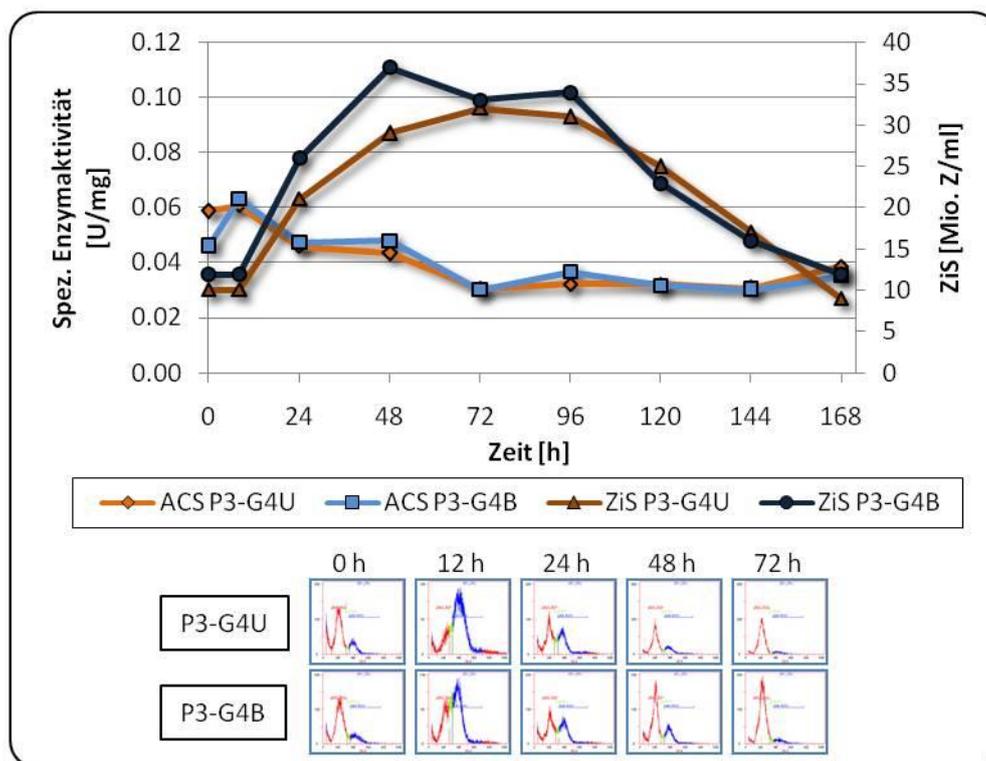


**Abbildung 93: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit einer kontinuierlichen  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l in der 4. Führung**

Nach einem temporären Maximum der ALDH-Aktivitäten in den ersten 24 h der Gärung setzte eine vermutlich auf die steigende Konzentration an Acetaldehyd im Jungbier zurückzuführende Repression ein. Die nach dem 2. Gärtag wieder steigende Expression war bei den Hefen in P2-G4U dann allerdings stärker ausgeprägt und so waren hier über den restlichen Gärverlauf höhere ALDH-Aktivitäten zu beobachten. Ob dies eine weitreichendere Reduktion der Acetaldehydkonzentration im fertigen Bier zur Folge hatte, wird anhand der in Kapitel X.X dargestellten Analyse der GNP ersichtlich.

Trotz der im Einzelnen nahezu identischen Enzymaktivitäten liefert das Verhältnis der Enzyme PDC und ADH zu ALDH und ACS eine Erklärung für den in P2-G4B am 4. und 5. Gärtag beobachteten zügigeren Extraktabbau. Während im übrigen Gärverlauf das Verhältnis identisch war, konnte in diesem Zeitraum eine deutliche Verschiebung zu Gunsten der Gärungsenzyme bei den Hefen in P2-G4B festgestellt werden. Das Verhältnis von 24,5 am 4. und 23,4 am 5. Gärtag stellte zudem einen der höchsten bisher berechneten Werte dar. Somit war es möglich, trotz der scheinbar geringen Unterschiede im physiologischen Zustand der Hefen in P2-G4B und P2-G4B mit der Gesamtbetrachtung der Enzymaktivitäten einen für die Gäreigenschaften relevanten Unterschied sichtbar zu machen.

Die aus der Abbildung 94 zusammen mit den Histogrammen der Zellzyklusanalyse ersichtlichen ZiS und ACS-Aktivitäten der Gärungen P3-G4B und P3-G4U zeigten eine gegenüber den anderen Gärungen aus P1 und P2 deutlich intensivere Vermehrung der Hefen in den ersten 48 h der Gärung. Vor allem die Hefen in P3-G4U wiesen dabei mit 0,059 U/mg eine vergleichsweise hohe Ausgangsaktivität der ACS auf. Allerdings konnte auch hier, wie bei den Hefen aus den Gärungen von P2-G4 und im Gegensatz zu den Gärungen von P1-G4, keine zusätzliche Expression in der Angärphase gemessen werden.



**Abbildung 94: ACS-Aktivität und Zellvermehrung der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

Während die ACS-Aktivitäten nur eine geringfügige Steigerung aufwiesen und dann über den gesamten Gärverlauf abnahmen, zeigten die Histogramme der Zellzyklusanalyse, dass bereits nach 12 h ein Großteil der Hefen beider Gärungen in die abschließende Teilungsphase eintrat. Dies führte in P3-G4U nach 48 h zu einer HZZ von über 35 Mio. Z/ml, die damit auch

absolut betrachtet die höchste Konzentration an ZiS aller in der 4. Führung untersuchten Gärungen dargestellte. Die HZZ in der Gärung P3-G4B entwickelte sich zwar ebenfalls schneller im Vergleich zu den Gärungen aus P1 und P2, aber hier konnten die Hefen erst am 3. Gärtag ihr Maximum von 32 Mio. Z/ml erreichen. Dabei ist die um ca. 2 Mio. Z/ml leicht geringere Anstellkonzentration mit zu berücksichtigen.

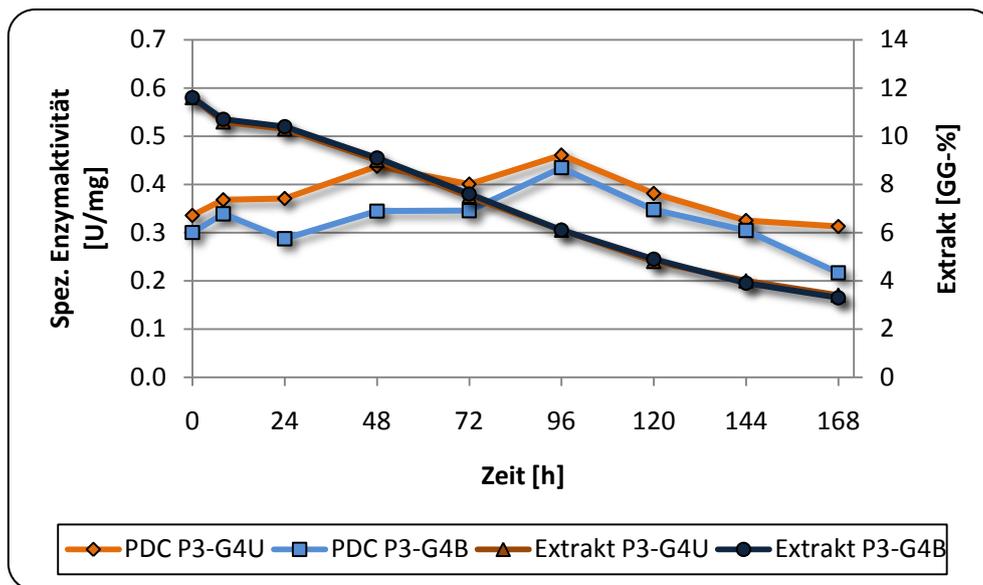
Anhand der in der Tabelle 19 zusammengefassten prozentualen Verteilung der einzelnen Vermehrungsphasen der Hefen in den Gärungen P3-GB und P3-GU wird ersichtlich, dass der Anteil an Hefen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase zum Zeitpunkt des Anstellens im Vergleich zu den Gärungen P1-G4 und P2-G4 sogar deutlich höher lag und ca. 75% ausmachte. Dennoch erreichten die Hefen in P3-G4B nach 12 h einen Anteil von 57,3% und die in P3-G4U sogar von 76,2% an Zellen in der  $G_2$ -/M-Phase. Dieser Wert lag deutlich über den bisher gemessenen Werten der Hefen in den Gärungen von P1-G4 und P2-G4.

**Tabelle 19: Zellzyklusanalyse der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

|                                               | 0 h    |        | 12 h   |        | 24 h   |        | 48 h   |        | 72 h   |        |
|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                               | P3-G4U | P3-G4B |
| <b>G<sub>0</sub>-/G<sub>1</sub>-Phase [%]</b> | 74,2%  | 76,53% | 15,4%  | 29,4%  | 47,2%  | 45,5%  | 69,7%  | 67,2%  | 90,0%  | 89,2%  |
| <b>S-Phase [%]</b>                            | 4,2%   | 4,53%  | 8,4%   | 13,4%  | 9,7%   | 9,2%   | 4,6%   | 5,1%   | 1,9%   | 2,8%   |
| <b>G<sub>2</sub>-/M-Phase [%]</b>             | 21,6%  | 18,9%  | 76,2%  | 57,3%  | 43,1%  | 45,3%  | 25,7%  | 27,7%  | 8,1%   | 8,0%   |

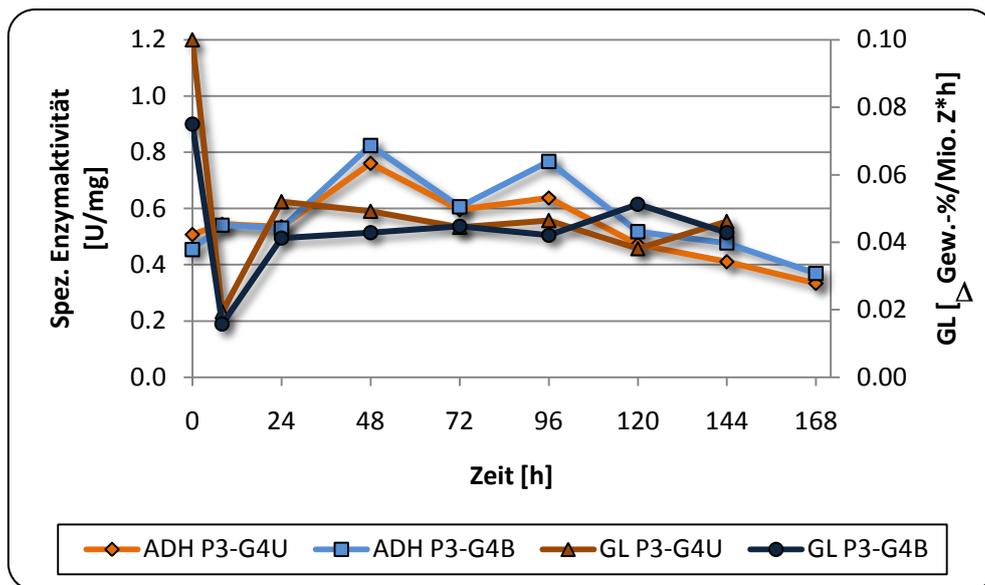
Diese früh erreichte Zellvermehrung führte bei beiden Gärung dazu, dass sich zu den nachfolgenden Messzeitpunkten deutlich weniger Zellen teilten. Nach 24 h und 48 h lagen mit 43,1 bzw. 45,3% und 25,7 bzw. 27,7% deutlich weniger Zellen in der  $G_2$ -/M-Phase vor, als in den Gärung aus P1 und P2 zum selben Zeitpunkt. Diese synchrone und schnelle Umstellung in der gesamten Population sollte allerdings dazu beigetragen haben, dass auch die Umstellung von einem vermehrungsphysiologischen zu einem gärungsphysiologischen Zustand zügiger verlief und sich aufgrund des resultierenden, hohen Anteils an Zellen in der  $G_0$ -/ $G_1$ -Phase positiv auf den Gärverlauf auswirkte.

Wie in der Abbildung 95 anhand der Extraktgehalte in den Gärungen P3-G4B und P3-G4U abzulesen, hatte die schnelle Hefevermehrung und die zügige Umstellung in der Hefephysiologie tatsächlich einen positiven Einfluss auf den Extraktabbau. Zwar verlief der Extraktabbau wiederum unabhängig von der Würzebelüftung in beiden Gärungen parallel, dennoch wurden nach 168 h insgesamt ca. 0,7 bis 1,2 Gew.-% mehr Extrakt umgesetzt und somit ein deutlich zügigerer Gärverlauf erreicht als den Gärungen P1-G4 und P2-G4.



**Abbildung 95: Extraktabbau und PDC-Aktivität der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

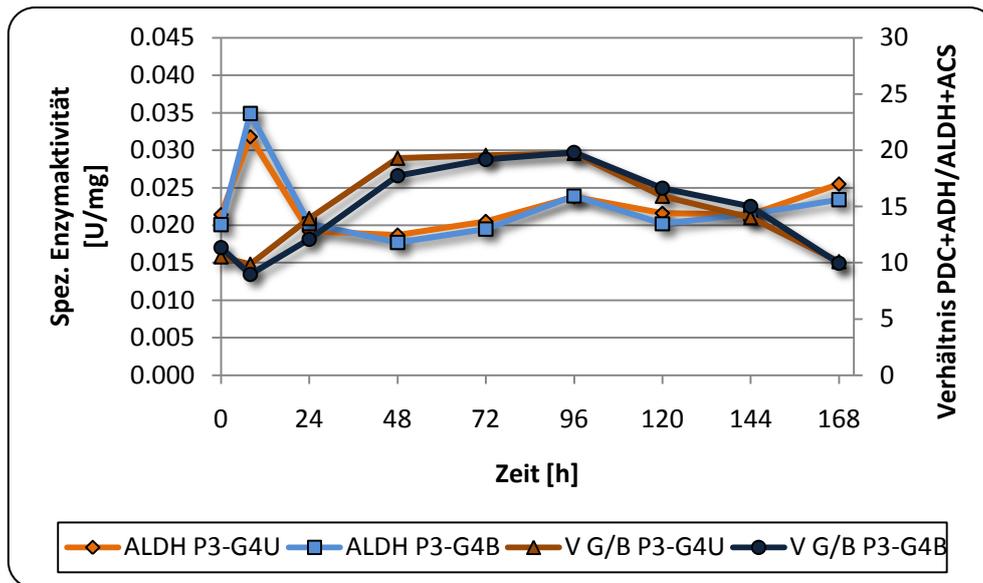
Die ebenfalls in der Abbildung 95 dargestellten PDC-Aktivitäten der Hefen lieferten hingegen keinen direkten Hinweis auf die besseren Gäreigenschaften in P3-G4B und P3-G4U. Zwar zeigten beide Populationen eine für die hier untersuchten Hefen in der 4. Führung vergleichsweise hohe Ausgangsaktivität, aber es fand anderes als in den zuvor betrachteten Gärungen nur eine geringe zusätzliche Expression im weiteren Gärverlauf statt. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse aus den Gärungen P3-G4B und P3-G4U ließen ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den beiden mit und ohne Würzebelüftung geführten Hefen erkennen. Vielmehr wurden, anders als in den übrigen Gärungen, über den Gärverlauf nahezu konstante Enzymaktivitäten gemessen, so zeigten auch die ADH-Aktivitäten, die in der Abbildung 96 dargestellt sind, vor allem gegen Ende der Hauptgärung nur geringe Expressionsraten.



**Abbildung 96: ADH-Aktivität und GL der Hefe aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

Zwar waren am 2. und 4. Gärtag jeweils temporäre Maxima in den ADH-Aktivitäten zu beobachten, die in der belüfteten Gärung leicht höher ausfielen. Aber insgesamt lagen die Werte nicht über denen in den Gärungen P1-G4 und P2-G4 gemessenen Werten. Nur die mit dem schnellen Eintreten in die Vermehrungsphase des Zellzyklus korrelierende GL bestätigt den von den übrigen Gärungen abweichenden physiologischen Zustand der Hefen in den Gärungen P3-G4.

Auch die aus der Abbildung 97 ersichtliche Entwicklung der ALDH-Aktivitäten der Hefen in den Gärungen P3-G4B und P3-G4U zeigt keine signifikante Abweichung zu dem in den übrigen Gärungen beobachtetem Verhalten. So kam es auch hier erst zu einem temporären Maximum während der Angärphase und nach einer Repression zwischen dem 1. und 3. Gärtag zu einer erneuten, allerdings sehr geringen Zunahme.



**Abbildung 97: ALDH-Aktivität der Hefe und das Aktivitätsverhältnis der Enzyme der Alkoholischen Gärung und des PDH-Bypasses aus der Propagation mit 8stündiger Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

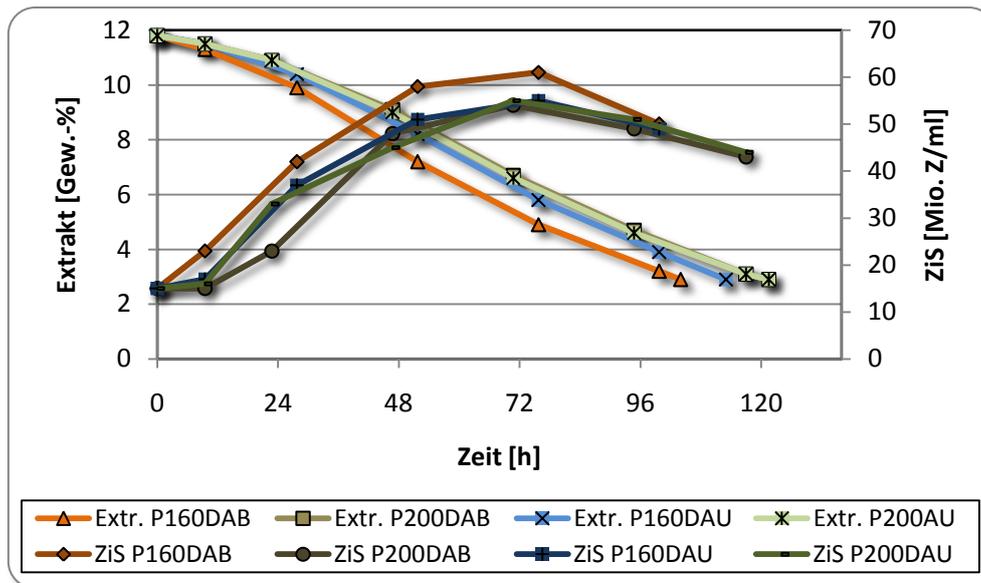
Auch das Verhältnis von den Gärungsenzymen PDC und ADH zu den Enzymen ALDH und ACS der Biosynthese machte keinen Einfluss der zusätzlichen Würzelbelüftung in P3-G4B deutlich und gab ebenso keinen Hinweis auf die zu Beginn der Gärung verbesserten Vermehrungseigenschaften der Hefen in P3-G4U. Auch im Vergleich zu den übrigen Gärungen in der 4. Führung konnte keine erhöhte Verschiebung zu Gunsten der Gärungsenzyme beobachtet werden, sodass der in beiden Gärungen zügigere Gärverlauf allein auf die zu Beginn bei beiden Gärungen deutlich höhere Zellvermehrung zurückzuführen war. Ob die besseren Vermehrungseigenschaften jedoch auf die Propagationsbedingungen in P3-I8 zurückzuführen sind, müsste in weiteren Versuchen bestätigt werden. Eine allgemein gültige Aussage über den Einfluss der Propagation auf den physiologischen Zustand der Hefe in der 4. Führung zu treffen, ist unter Anbetracht der vielen vor allem im Pilotmaßstab vorhandenen Variablen nicht zulässig.

### 4.5.3 Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf den physiologischen Zustand und das Gärverhalten der Hefe in Abhängigkeit der Würzebelüftung

Die in Kapitel 4.5.1 und 4.5.2 beschriebenen Hefen aus dem Propagationsprozess lagen trotz der beobachteten Unterschiede und Verschiebungen im Metabolismus generell in einem verhältnismäßig guten physiologischen Zustand vor. Dennoch beeinflusste vor allem die Prozessführung bei der Propagation und die Anzahl der Führungen zusätzlich deren physiologischen Zustand. Die nachfolgende Versuchsreihe sollte zeigen, in wie weit sich eine zu intensiv betriebene Propagation auf die Hefephysiologie auswirkt, und welchen Einfluss dann die möglichen Belüftungsvariationen in einem anschließenden Drauflassverfahren ausüben. Dazu wurden Hefen im 5 l-Maßstab auf Zellzahlen bis zu 200 Mio. Z/ml propagiert und bei jeweils 160 (**Bez. P160**), 180 und 200 Mio. Z/ml (**Bez. P200**) wurde Hefe zum Anstellen von Gärungen entnommen.

In einer ersten Evaluierung der verschiedenen Belüftungsvariationen ergaben sich sowohl positive, nicht erkennbare und negative Einflüsse der zusätzlichen Sauerstoffversorgung hinsichtlich der Zellzahlentwicklung, des Extraktabbaus und der pH-Wert Entwicklung. Aus denen im Vorversuch getesteten Variationen der Würzebelüftung wurden die Randbedingungen der vollständig belüfteten (**Bez. P160DAB und P200DAB**) und unbelüfteten (**Bez. P160DAU und P200DAU**) Anstellverfahren ausgewählt, um diese im 20 l-Maßstab eingehender zu untersuchen. Zugleich wurde eine Gärtemperatur von 12 °C gewählt, um ein mögliches Steckenbleiben der Gärungen zu vermeiden.

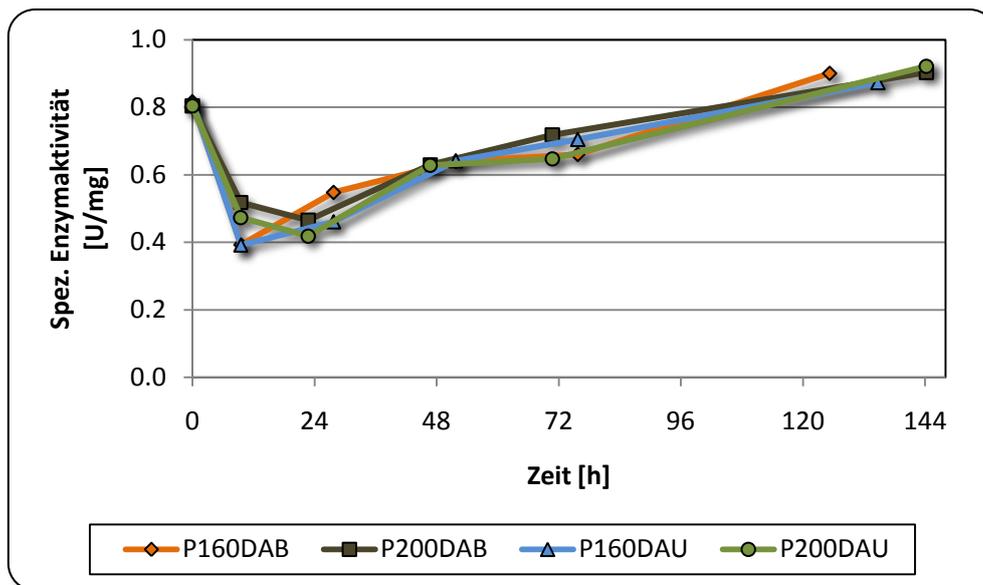
Die Abbildung 98 zeigt das Verhalten der unterschiedlich behandelten Hefepopulationen hinsichtlich des Extraktumsatzes und der Zellzahlentwicklung über den Gärverlauf. Während sich zwischen den Hefen der Gärungen P160DAU, P200DAB und P200DAU nur geringfügige Unterschiede feststellen ließen, wiesen die Hefen in P160DAB leicht bessere Gäreigenschaften auf. So erreichten die Hefen in dieser Gärung mit 60 Mio. Z/ml eine um fast 5 Mio. Z/ml höhere Konzentration über die Hauptgärphase.



**Abbildung 98: Die Zellzahlentwicklung einer intensiv propagierten Hefe und der resultierende Extraktabbau während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens**

Dies war vor allem auf die bereits nach 8 h ermittelte Zunahme von 15 auf 23 Mio. Z/ml zurückzuführen, wohingegen bei den übrigen Gärungen eine längere Adaptionsphase bestand. Dieser Unterschied trug dazu bei, dass auch der Extraktabbau in P160DAB bereits ab dem 1. Gärtag zügiger verlief als in den übrigen Gärungen. Somit schienen sich der frühere Entnahmezeitpunkt und die zusätzliche Belüftung aller 4 Sude positiv auf die Hefephysiologie und der resultierenden Gäreigenschaften ausgewirkt zu haben. Dennoch erreichten alle Gärungen innerhalb von 5 bis 6 Gärtagen die Schlauchreife und wiesen trotz der bis zur Nährstoffverarmung durchgeführten Propagation keine signifikanten Nachteile in ihren Gäreigenschaften auf.

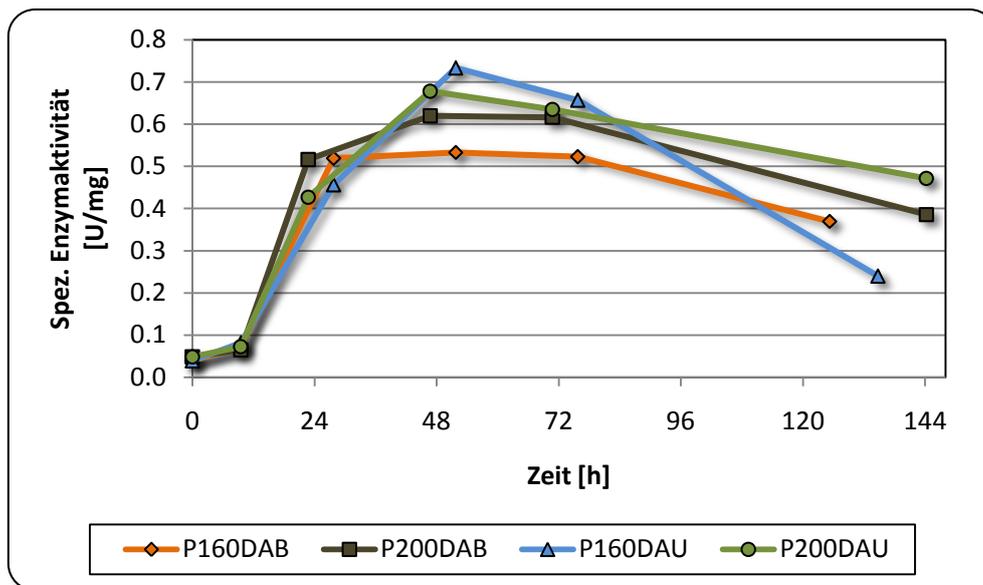
Die Unterschiede in der Zellzahlentwicklung und des Extraktabbaus waren aber nicht auf Unterschiede in den Aktivitäten der PDC zurückzuführen. Wie die Abbildung 99 zeigt, entwickelte sich die PDC-Aktivität der Hefen in allen Gärungen fast gleichermaßen. Nach der bekannten Repression in der Angärphase stiegen diese über den gesamten Gärverlauf konstant bis zum Ende der Gärung.



**Abbildung 99: Die PDC-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens**

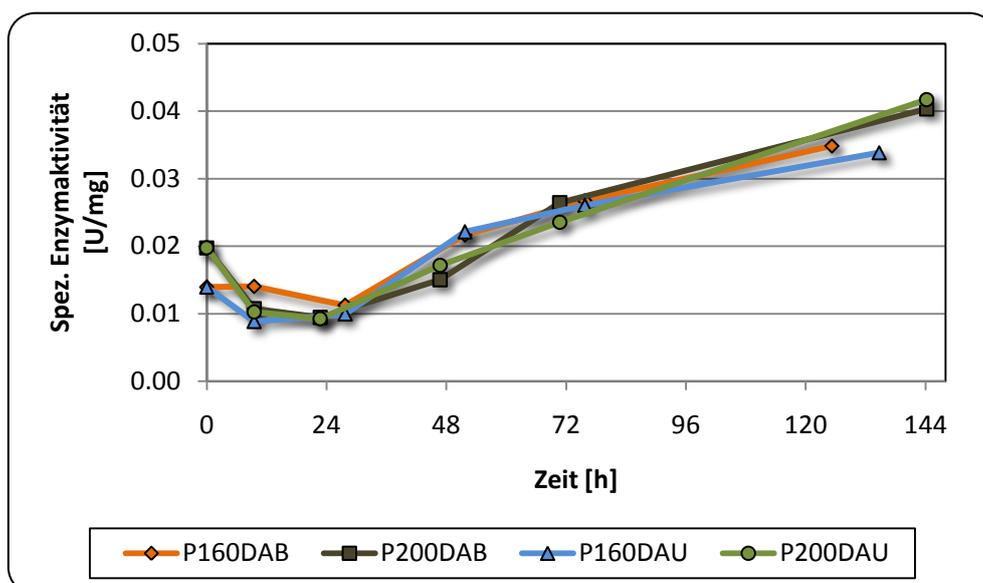
Allerdings konnte zum Zeitpunkt des Anstellens für beide Propagationshefen eine vergleichsweise hohe PDC-Aktivität von ca. 0,80 U/mg gemessen werden, die auf die weitreichende Vermehrung bei der Propagation zurückzuführen war. Die Sauerstoffzehrung im Propagator war durch die hohe Konzentration an Hefezellen besonders groß, sodass eine sonst angestrebte Sauerstoffsättigung der Würze nicht mehr möglich war. Die trotz ständiger Belüftung partiell anaeroben Bedingungen führten vermutlich zu gärungsähnlichen Bedingungen. Auch die zum Ende der Gärung von den Hefen erreichten PDC-Aktivitäten von ca. 0,90 U/mg sind auf dem Niveau einer Erntehefe.

Zwar waren auch die ADH-Aktivitäten aller Hefen tendenziell vergleichbar, dennoch kam es zu Unterschieden zwischen den Gärungen. Ausgehend von einer im Gegensatz zur PDC-Aktivität für eine Propagationshefe durchschnittliche Expression von ca. 0,05 U/mg wurde diese von den Hefen, wie aus der Abbildung 100 ersichtlich, in den ersten 24 h auf Werte zwischen 0,43 U/mg für P200DAU und 0,52 U/mg für P200DAB gesteigert. Während sich die ADH-Aktivitäten der unbelüfteten Hefen bis zum 2. Gärtag weiter steigerten, blieb die Expression in den Hefen der belüfteten Gärungen fast konstant auf dem Niveau vom 1. Gärtag.



**Abbildung 100:** Die ADH-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens

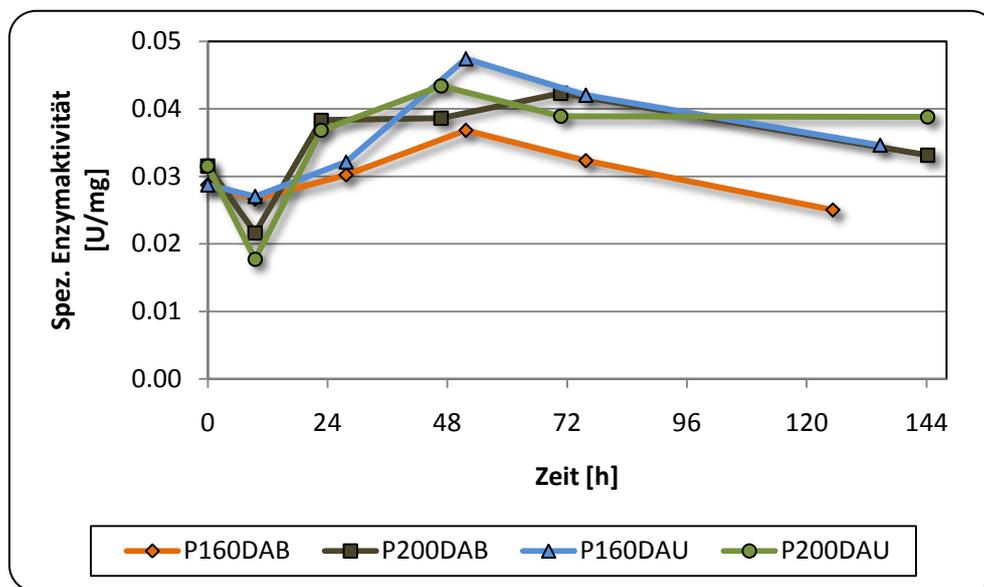
Die Hefen aus P160DAB, die den zügigsten Extraktumsatz aufwiesen, zeigten dabei die niedrigste ADH-Aktivität über den gesamten Gärverlauf. Zum Zeitpunkt der Schlauchreife hingegen lagen die gemessenen ADH-Aktivitäten der jeweils zusätzlichen mit Sauerstoff versorgten Hefen unter denen der Unbelüfteten. Gleichzeitig waren die Aktivitäten von P160DAB und P160DAU mit 0,24 und 0,37 U/mg etwas geringer als die von P200DAB und P200DAU mit 0,39 und 0,47 U/mg. Bei den ALDH-Aktivitäten zeigten die 4 unterschiedlich behandelten Hefen wiederum keine signifikanten Unterschiede und die aus der Abbildung 101 ersichtlichen Kurven ergaben einen mit den PDC-Aktivitäten vergleichbaren Verlauf auf dem für dieses Enzym charakteristischen Aktivitätsniveau.



**Abbildung 101:** Die ALDH-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens

Die für die 1. Führung nach der Propagation bereits in den vorangegangenen Versuchsreihen wiederholt beobachtete Repression im Anfangsstadium fiel für alle Hefen gleichermaßen aus. Und auch die Steigerung in der Aktivität erfolgte, analog zu denen der PDC, nahezu konstant bis zum Erreichen des Schlauchzeitpunktes.

Die mit dem Zellwachstum in engem Zusammenhang stehenden ACS-Aktivitäten lieferten, wie grundlegend bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, keinen direkten Zusammenhang zwischen der höheren HZZ der Gärung P160DAB und dem absolut gemessenen Stoffumsatz. Die Hefen aus P160DAB wiesen im Vergleich sogar das niedrigste Aktivitätsmaximum während der Vermehrungsphase am 1. und 2. Gärtag auf. Die Abbildung 102 zeigt die ACS-Aktivitäten der Hefen in den Drauflassverfahren über die Gärdauer.



**Abbildung 102: Die ACS-Aktivität einer intensiv propagierten Hefe während der Gärung in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie des Drauflassverfahrens**

Da aber auch im Verlauf und im Vergleich der ACS-Expression keine Erklärung für die höheren HZZ der Gärung P160DAB ersichtlich ist, sollte eine eventuell nicht erfasste, höhere Anstellzellzahl mit in die Betrachtung der gewonnenen Ergebnisse einbezogen werden. Aus den ACS-Aktivitäten wird zusätzlich ersichtlich, dass die bei einer HZZ von 200 Mio. Z/ml entnommenen Zellen 9,5 h nach dem Anstellen eine intensivere Repression aufwiesen als dies bei den Hefen in den Gärungen P160DAB und P160DAU zu beobachten war. Deren Aktivität blieb zum gleichen Zeitpunkt mit 0,027 U/mg annähernd auf demselben Niveau wie zum Ende der Propagation.

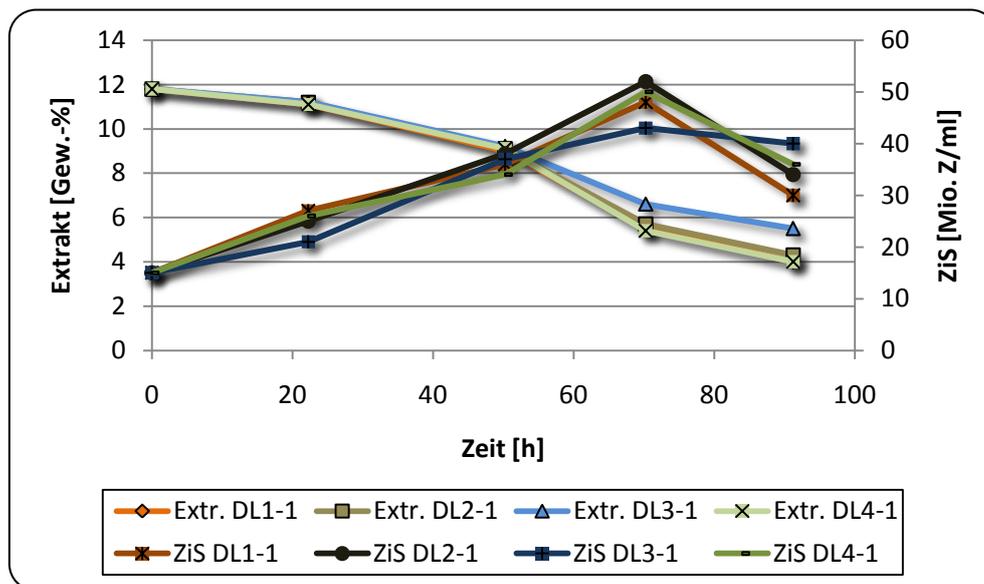
Über den weiteren Gärverlauf war nicht, wie in den vorangegangenen Versuchsreihen bei der Verwendung von Propagationshefen in der 1. Führung beobachtet, eine signifikante Abnahme in der ACS-Aktivität nach der Vermehrungsphase zu beobachten. Nur die Aktivität der Hefen in P160DAB fiel leicht ab, während die übrigen Hefen eine konstante Expression der ACS-Aktivität aufwiesen. Diese Entwicklung der ACS gibt einen zusätzlichen Hinweis auf die bereits vor Ende der Propagation eingetretenen Gärungsbedingungen während der

Herführung und der damit verbundenen Veränderung im Hefestoffwechsel. Die aus den Daten der Gärungskontrolle und der Enzymaktivitätsmessung nicht ersichtlichen negativen Auswirkungen einer zu intensiv durchgeführten Propagation auf die sensorischen Qualitätseigenschaften der resultierenden Biere werden in Kapitel 4.7 erläutert.

## 4.6 Die Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe während der Gärung

### 4.6.1 Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren

Die unter Propagationsbedingungen in Kapitel 4.3.2 dargestellte Gruppierung zur Aufnahme der Aminosäuren durch die Hefe wich stark von dem in der Literatur anhand einer o.g. Ale-Hefe unter Gärungsbedingungen beschriebenen Aufnahmeverhalten ab. Die im Anschluss an die Propagationen PK8 und PK2 unternommenen Gärversuche sollten die Möglichkeit überprüfen, ob eine generelle Übertragung der Reihenfolge bei der Aufnahme auf den u.g. Hefestamm W34/78 erfolgen kann, oder in wie weit die Aufnahme von der Anstelltechnologie beeinflusst ist. Im Folgenden werden die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren in Gärungen nach dem Drauflassverfahren in Abhängigkeit der Belüftung dargestellt. Dabei wurden aus den o.g. Propagationen jeweils zwei Gärungen mit je 3 Suden bei einem Sudrhythmus von 2,5 h angestellt. In den Gärungen **DL1-1** und **DL3-1** erfolgte nur die Belüftung der jeweils ersten Sude und in den Gärungen **DL2-1** und **DL4-1** eine Belüftung aller Sude. Um die Aufnahme der Aminosäuren in der hier untersuchten 1. Führung im Zusammenhang mit dem Gärverlauf bewerten zu können, sind in der Abbildung 103 die Entwicklung der ZiS und die Extraktverläufe der Gärungen zusammengefasst.

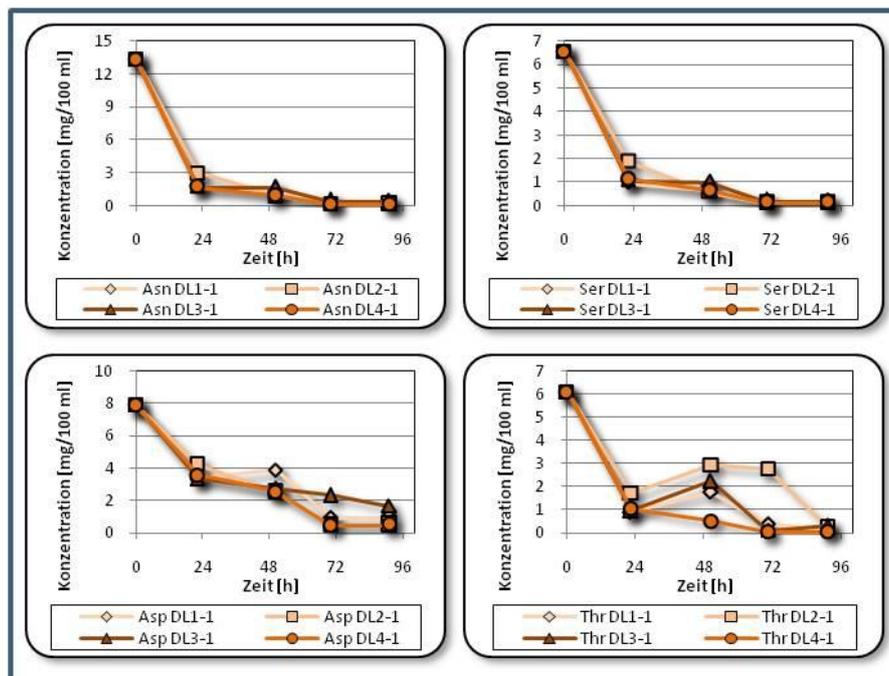


**Abbildung 103: Extraktabbau und Hefezellzahlentwicklungen der Versuchsgärungen zur Ermittlung der Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren in der 1. Führung**

Dabei zeigten die Gärungen DL1-1, DL2-1, die mit Hefe aus der Propagation PK2 angestellt wurden, und die Gärung DL4-1 mit einer Hefegabe aus PK8 vergleichbare Kurven des Extraktabbaus und der ZiS über den Gärverlauf. Die jeweils maximale HZZ von ca. 50 Mio. Z./ml wurden dabei am 3. Gärtag erreicht und nach 91 h wiesen die Gärungen noch einen scheinbaren Restextraktgehalt von ca. 4 Gew.-% auf. Nur die Hefen in DL3-1, die ebenfalls aus PK8 stammten, zeigten mit 10% weniger ZiS während der Hauptgärphase und mit einem nach 91 h um ca. 10% niedrigeren VG ein schwächeres Gärverhalten. Dieser

schlechtere physiologische Zustand der Hefen in DL3-1 wirkte sich tendenziell auch negativ auf die Verwertung des FANs aus, wie die Konzentrationsverläufe der Aminosäuren Asparaginsäure, Phenylalanin, Leucin und Valin in den nachfolgenden Diagrammen zeigen werden.

Ähnlich wie unter Propagationsbedingungen erfolgte auch bei den hier untersuchten Gärungen eine Gruppierung der Aminosäuren anhand ihrer Konzentrationsabnahmen über den Gärverlauf. Dabei ergab sich wiederum nur eine begrenzte Übereinstimmung mit der in der Literatur vorgenommenen Einteilung und auch die in der Propagation beobachtete Aufnahme war nur teilweise auf die Aufnahme in der Gärung übertragbar. Die Abbildung 104 zeigt die Konzentrationsabnahmen der hier in Gruppe 1 zusammengefassten Aminosäuren Asparagin, Serin, Asparaginsäure und Threonin, die alle eine sehr zügige Aufnahme von Beginn der Gärung an erfuhren und fast vollständig von der Hefe verwertet wurden. Diese 4 Aminosäuren werden auch in der Literatur den am zügigsten von der Hefe aufgenommenen Aminosäuren zugeteilt.

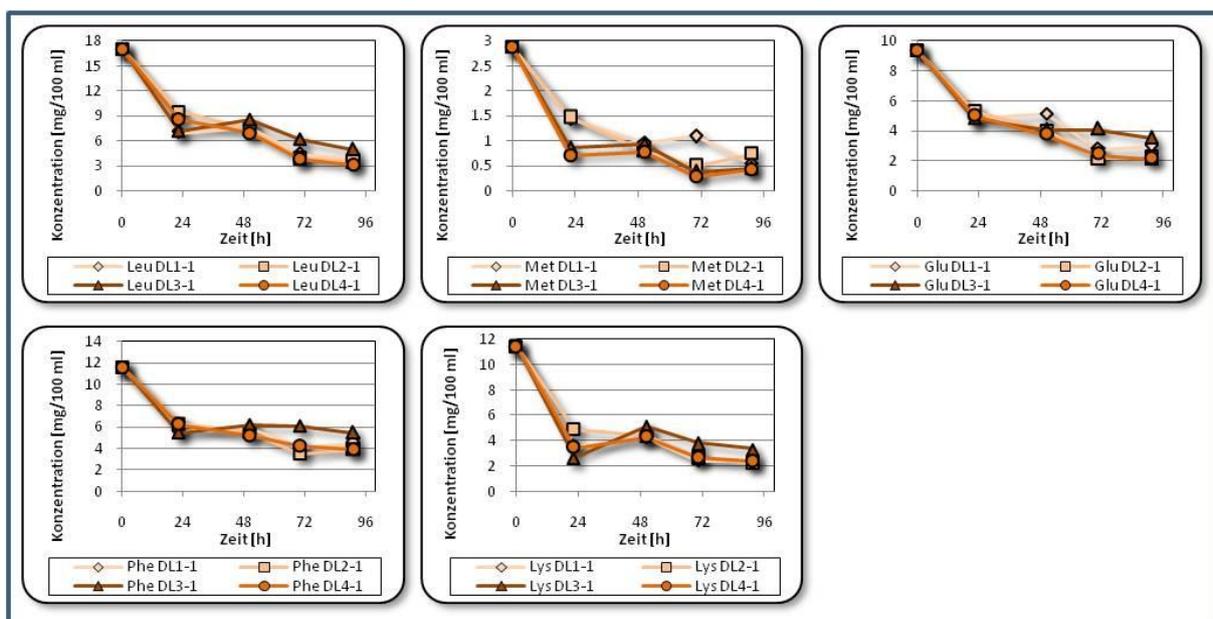


**Abbildung 104: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung**

Die Aminosäuren Asparagin und Serin, welche die Hefe vermutlich aufgrund ihrer zusätzlichen funktionellen Gruppen auch bei der Propagation von Beginn an assimilierte, wurden dabei ausgehend von Konzentrationen von 13,4 und 6,6 mg/100 ml in der Anstellwürze bereits in den ersten 24 h fast vollständig von der Hefe verwertet. Die Aufnahme von über 50% der Menge an Asparaginsäure erfolgte ebenfalls in den ersten 24 h, wurde aber im weiteren Verlauf der Gärung trotz steigender Zellzahlen reduziert. Im Falle der Aminosäure Threonin kam es zwischen den einzelnen Gärungen zu unterschiedlichen Konzentrationsverläufen. So war nach Abnahme in den Gärungen DL1-1, DL2-1 und DL3-1 in

den ersten 24 h eine erneute Zunahme in der Konzentration über den Verlauf der Gärungen zu beobachten. Dies könnte entweder auf die Möglichkeit der Hefe Aminosäuren in begrenztem Rahmen wieder aus der Zelle zu schleusen oder auf eine Schichtung der Sude im Gärtank und damit auf eine nicht repräsentative Probe zurückzuführen sein. Dennoch wurde diese Aminosäure zum Ende in allen Gärungen vollständig von der Hefe aufgenommen.

Die Aminosäuren Leucin, Methionin, Glutamin, Phenylalanin und Lysin bildeten die 2. Gruppe. Diese Aminosäuren wurden ebenfalls, wie aus der Abbildung 105 anhand der Konzentrationen über die Gärung ersichtlich, von Beginn an durch die Hefe verwertet. Während in der Literatur Glutamin und Lysin ebenfalls der 1. Gruppe zugeteilt sind, werden die Aminosäuren Leucin und Methionin, wie auch in dieser Versuchsreihe, der 2. Gruppe zugeschrieben. Das Aufnahmeverhalten von Phenylalanin wird in der Literatur hingegen als langsamer beschrieben und soll nur in Abhängigkeit der Aufnahme der Aminosäure der 1. Gruppe erfolgen. Bei den Aminosäuren Glutaminsäure, Arginin, Valin, Isoleucin und Histidin konnte in dieser Versuchsreihe hingegen keine forcierte Aufnahme durch die Hefe festgestellt werden, obwohl auch diese Aminosäuren nach der klassischen Einteilung in der 1. und 2. Gruppe zu finden sind.

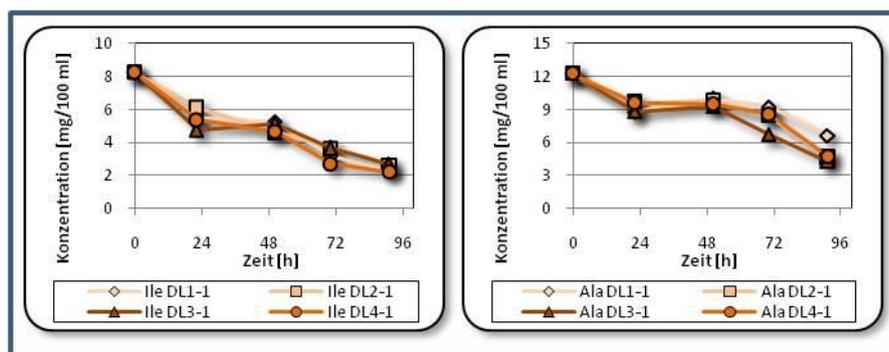


**Abbildung 105: Aminosäuren mit unmittelbarer und sinkender Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung**

Allerdings wurden diese fünf Aminosäuren hauptsächlich in den ersten 24 h von der Hefe aufgenommen und im weiteren Verlauf fand eine deutlich eingeschränkte Verwertung statt, was wiederum nicht mit der bisher bekannten Beschreibung zum Aufnahmeverhalten der Hefe übereinstimmt. Keine der hier dargestellten Aminosäuren wurde vollständig von den Hefen aufgenommen. Wie die DNA-Verteilungen der in Kapitel 4.5.1 und 4.5.2 untersuchten Hefen zeigten, fand ein Großteil der Hefevermehrung in den ersten 24 bis 48 h statt, sodass die Aminosäuren der 1. und 2. scheinbar eine vorrangige Bedeutung für die Proteinbiosynthese der Hefe haben. In DL3-1 waren gegen Ende der Hauptgärung leicht

höhere Konzentrationen der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Glutaminsäure zu beobachten, was mit der geringeren Hefevermehrung in dieser Gärung DL3-1 zusammenhängen könnte. Ein Hinweis auf eine zusätzliche Bedeutung der Würzelbelüftung für die Assimilation der einzelnen Aminosäuren konnte nicht festgestellt werden.

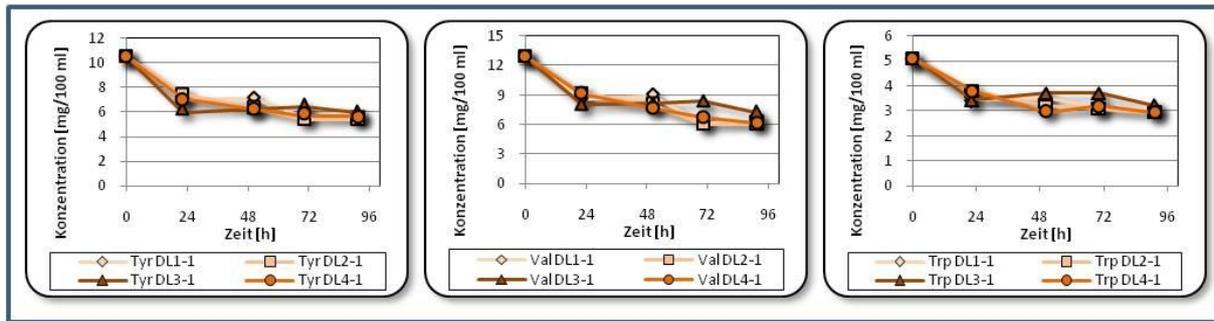
Die Aminosäuren Isoleucin und Alanin bildeten unter gärungstechnologischen Bedingungen die 3. Gruppe, die sich durch eine nahezu konstante Aufnahme über die Gärung auszeichnete. Jedoch zeigten die jeweiligen Konzentrationsabnahmen im Zeitraum von 24 bis 48 h eine leichte Stagnation. Beide Aminosäuren weisen eine vollständig mit Kohlenstoffatomen besetzten Seitenketten auf und könnten damit ähnliche Funktionen im Stoffwechsel erfüllen. Die Konzentrationen der beiden Aminosäuren sind in der Abbildung 106 dargestellt.



**Abbildung 106: Aminosäuren mit konstanter und nicht vollständiger Aufnahme durch die Hefe im Drauflassverfahren in der 1. Führung**

Bei einer Ausgangskonzentration von 12,2 und 8,2 mg/100 ml für Isoleucin und Alanin sind im Verlauf der Gärung ca. 60 bzw. 70% dieser Aminosäuren von der Hefe aufgenommen worden. Da diese auch über die Vermehrungsphase hinweg von der Hefe verwertet worden sind, scheinen beide zwar eine für die Vermehrung zweitrangige Bedeutung für die Hefevermehrung zu haben, aber dennoch für andere Funktionen im Metabolismus der Hefe eine wichtige Rolle zu spielen.

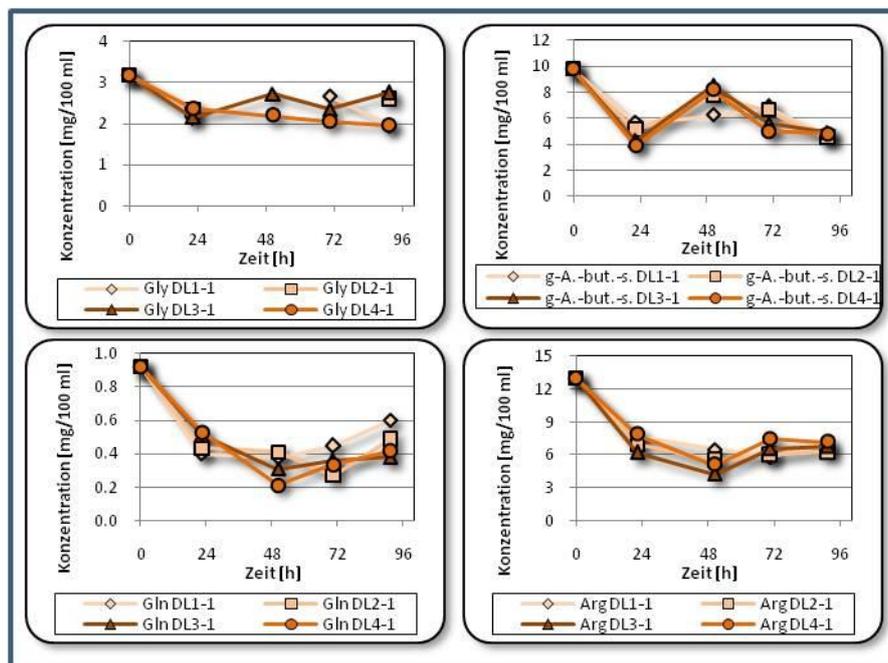
Die Aminosäuren Tyrosin, Valin und Tryptophan wurden nur zu Beginn der Gärung, also während der für die Hefevermehrung maßgeblichen Phase, aufgenommen und zeigten über die restliche Hauptgärphase keine weiteren, signifikanten Veränderungen in ihren Konzentrationen. In der Abbildung 107 sind die Konzentrationsverläufe dieser drei Aminosäuren im Drauflassverfahren dargestellt.



**Abbildung 107: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch die Hefe im Draufflasverfahren in der 1. Führung**

Insgesamt nahm die Hefe nur einen Anteil von ca. 40% dieser Aminosäuren auf. Dies entspricht einer kumulierten Menge von ca. 11 mg/100 ml. Wird eine Konzentration von 25 mg/100 ml zu Beginn der Gärung zu Grunde gelegt, machen diese drei Aminosäuren mit den restlichen 15 mg/100ml bereits ca. 15 % des im Bier verbleibenden FAN aus.

Die Aminosäuren Glycin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure, die auch unter Propagationsbedingungen nur bei der Limitierung des FAN von der Hefe assimiliert wurden, sowie Glutaminsäure und Arginin zeigten unter den Versuchsbedingungen gegenüber den übrigen Aminosäuren abnorme Konzentrationsverläufe und bildeten die 5. Gruppe. Die Abbildung 108 stellt die Konzentrationen im Verlauf der Gärung gegenüber.



**Abbildung 108: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch die Hefe im Draufflasverfahren in der 1. Führung und teils steigenden Konzentrationen im zweiten Teil der Hauptgärung**

Zwar konnten auch in der 4. und 5. Gruppe mit Glycin, Tryptophan und Tyrosin Vertreter der in der Literatur in Gruppe 3 zusammenfassten Aminosäuren gefunden werden, aber trotz dieser Übereinstimmungen konnte in diese Versuchsreihe keine in der Angärphase reprimierte Aufnahme beobachtet werden.

Dabei zeigte die Aminosäure Glycin zwar einen ähnlichen Verlauf derer aus Gruppe 4, allerdings stiegen die Konzentrationen über den weiteren Gärverlauf in 2 Tanks wieder an. Da dies in den Drauflassverfahren mit nur einer Belüftung des ersten Sudes zu beobachten war, könnte auch dies auf eine Schichtung im Gärtank zurückzuführen sein und weniger auf eine Exkretion durch die Hefe oder auf Unterschiede in der Hefephysiologie. Auch bei den Aminosäuren Glutamin und Arginin kam es nach einer Abnahme in den ersten 48 h im weiteren Verlauf der Gärung zu einem erneuten Anstieg im Medium. Mit einer Konzentration von  $>1$  mg/ 100ml lag Glutamin allerdings bereits in sehr niedrigen Mengen vor, sodass hier evtl. auch die Messtoleranz der HPLC zu diesen Kurvenverläufen beitrug.

#### 4.6.2 Veränderungen der Aminosäureaufnahme der Hefe über die Führungen in Abhängigkeit der Anstelltechnologie

Um Veränderungen im Aminosäurebedarf und im Aufnahmeverhalten der Hefe in Abhängigkeit des physiologischen Zustands zu ermitteln, wurden die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren zusätzlich in der 3. Führung untersucht. Die aus DL1-1 bis DL4-1 weiter geführten Hefen sollen somit einerseits Aufschluss über den Bedarf einer im ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand befindlichen Hefe an den einzelnen Aminosäuren geben und andererseits eine mögliche Abhängigkeit von der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren aufzeigen.

Die zu DL2-3 und DL4-3 unterschiedliche Belüftungsstrategie der Tanks DL1-3 und DL3-3, bei der jeweils nur der 1. Sud belüftet wurde, wirkte sich in erster Linie auf die Entwicklung der ZiS und die resultierenden Gäreigenschaften aus. So ist anhand der in Abbildung 109 zusammen mit dem Extraktgehalt dargestellten HZZ zu erkennen, dass sich die Hefen in diesen Gärungen deutlich geringer vermehrt haben als die vollständig belüfteten Hefen in DL2-3 und DL4-3.

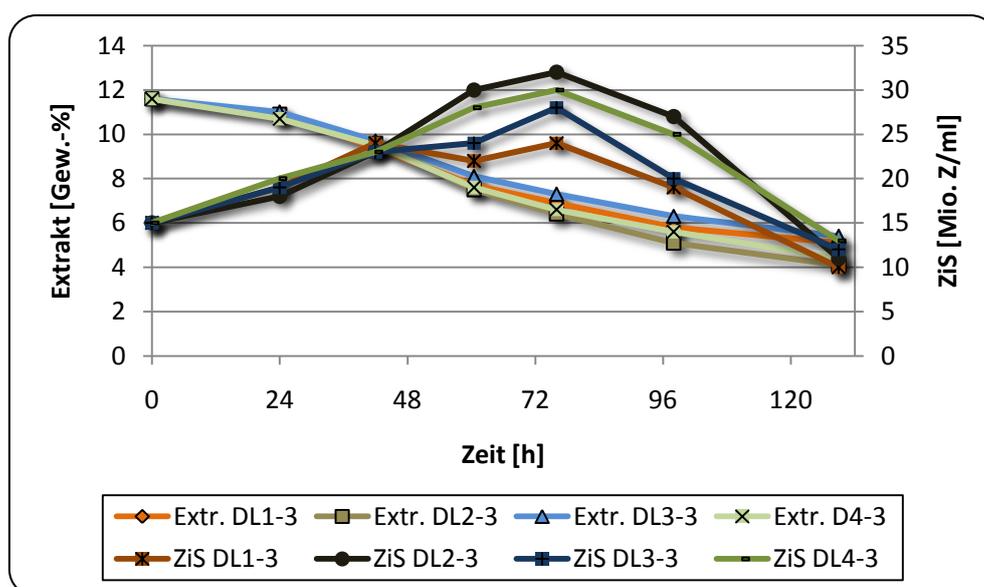
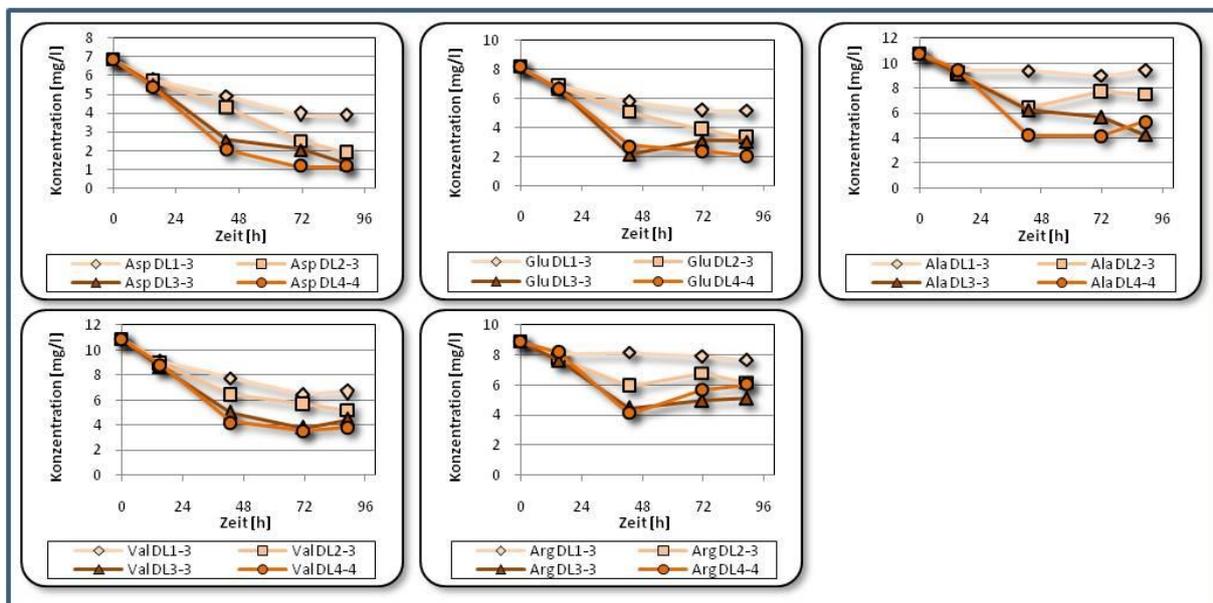


Abbildung 109: Extraktabnahme und Hefezellzahlentwicklungen der Versuchsgärungen zur Ermittlung der Aminosäureaufnahme durch die Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren in der 3. Führung

Die erhöhten ZiS der Gärungen DL2-3 und DL4-3 führten zudem dazu, dass auch der Extraktumsatz in den verstärkt belüfteten Gärungen zügiger verlief und nach 5 Gärtagen ca. 1 Gew.-% mehr Extrakt vergoren war als in DL1-3 und DL3-3.

Allerdings wirkten sich diese Unterschiede in den Gäreigenschaften scheinbar nicht generell auf die Aminosäureverwertung aus. Vielmehr schienen die unterschiedlichen  $O_2$ -Konzentrationen von 2 und 8 mg/l während des vorangegangenen Propagationsprozesses verantwortlich für Abweichungen in der Assimilation der Aminosäuren zu sein. Zwar waren bei den meisten Aminosäuren keine Unterschiede zwischen der 1. und 3. Führung sowie zwischen den einfach und komplett belüfteten Gärungen zu beobachten, aber bei den in Abbildung 110 dargestellten Konzentrationen der Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Valin und Arginin zeigten die Hefen in den Gärungen aus der Propagation PK8 (DL1-3 und DL2-3) unabhängig von der vorgenommenen Gruppierung eine teilweise deutlich geringere Aufnahme



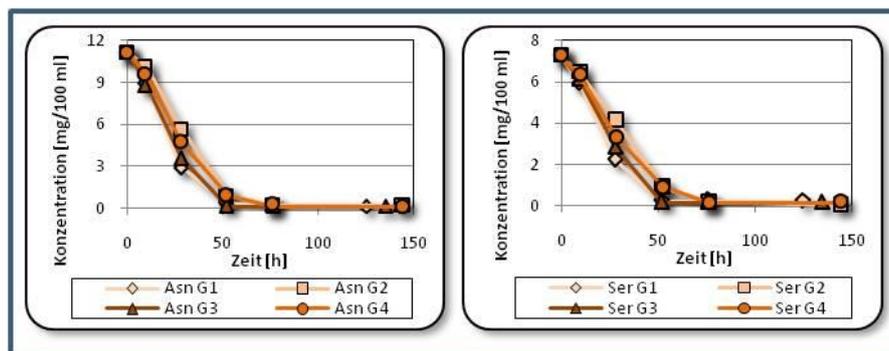
**Abbildung 110: Aminosäuren mit veränderter Aufnahme durch die Hefe in der 3. Führung in Abhängigkeit der Anstelltechnologie**

Dabei blieben die grundlegenden Aufnahmeeigenschaften der Hefe größtenteils auch in der 3. Führung im Vergleich zur ersten Führung erhalten, allerdings kam es korrelierend mit der etwas geringeren Zellzahlentwicklung zu einer leicht schleppenderen Aufnahme des gesamten FAN. Nur im Falle von Valin konnte in den Gärungen DL3-3 und DL3-4 eine generell verstärkte Aufnahme in der 3. Führung der aus der Propagation PK2 stammenden Hefen beobachtet werden.

#### 4.6.3 Aufnahme der Aminosäuren durch eine intensiv propagierte Hefe bei der Gärung im Drauflassverfahren

Die Aminosäuren der Würze stellen anders als die Zucker den limitierenden Faktor bei der Hefepropagation in der Brauerei dar und sollten in einem auf die Hefephysiologie abgestimmten Prozess nicht vollständig aufgezehrt werden. Um das Aufnahmeverhalten einer Hefe, die über den Zeitpunkt der vollständigen Zehrung der Aminosäuren weiter propagiert wurde und damit einem Mangel an FAN ausgesetzt wurde, zu beschreiben, wurden bei den Versuchsreihen zum Gärverhalten einer solchen intensiv propagierten Hefe auch die Aminosäurekonzentrationen in den jeweiligen Drauflassverfahren erfasst.

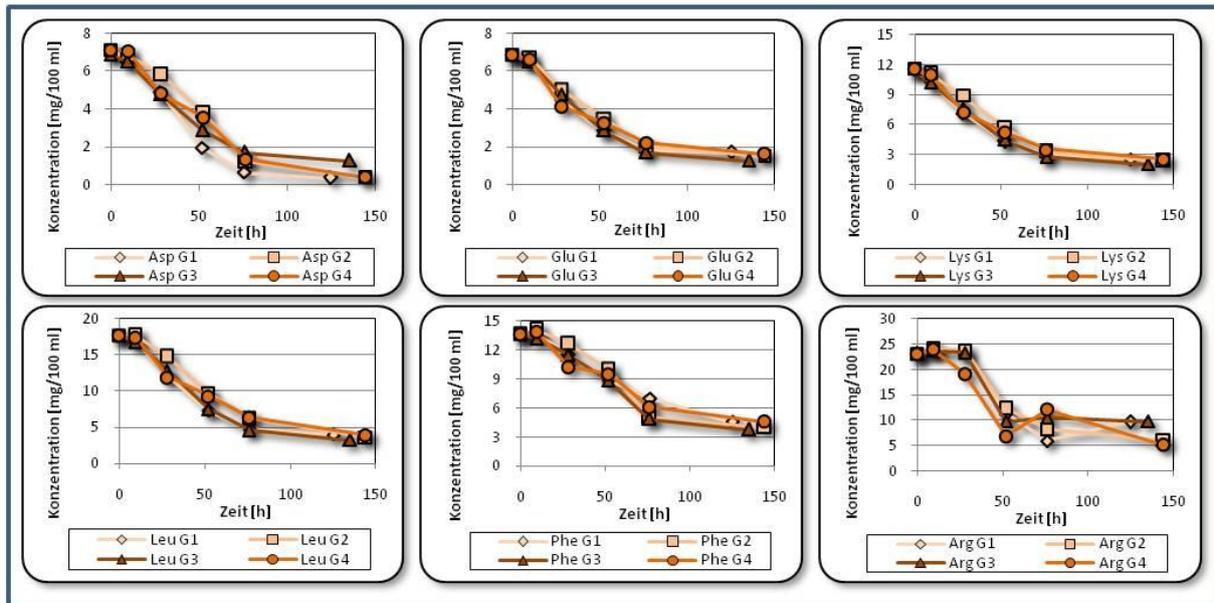
Obwohl auch in dieser Versuchsreihe nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit der gewählten Belüftungsvariationen zu beobachten waren, wurde bei einigen Aminosäuren ein abweichendes Assimilationsverhalten der über die Nährstofflimitierung hinaus propagierten Hefen gegenüber den Hefen in den Gärungen DL1-1 bis DL1-4 deutlich. So kam es generell zu einer langsameren Aufnahme fast aller Aminosäuren im Vergleich zu den in Kapitel 4.7.1 und 4.7.2 beschriebenen Drauflassverfahren. Dennoch wurden die Aminosäuren Asparagin und Serin, die auch zuvor unter Propagationsbedingungen in die 1. Gruppe eingeteilt wurden, am schnellsten und wie aus der Abbildung 111 ersichtlich, vollständig von der Hefe verwertet.



**Abbildung 111: Aminosäuren mit unmittelbarer und vollständiger Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren**

Diese beiden Aminosäuren scheinen somit von enormer Bedeutung für die Proteinbiosynthese der Hefe zu sein. Während allerdings die Hefen aus einem optimalen Propagationsprozess diese beiden Aminosäuren bereits nach 24 h fast vollständig aufgenommen hatten, brauchten die intensiv propagierten Hefen dazu ca. 24 h länger.

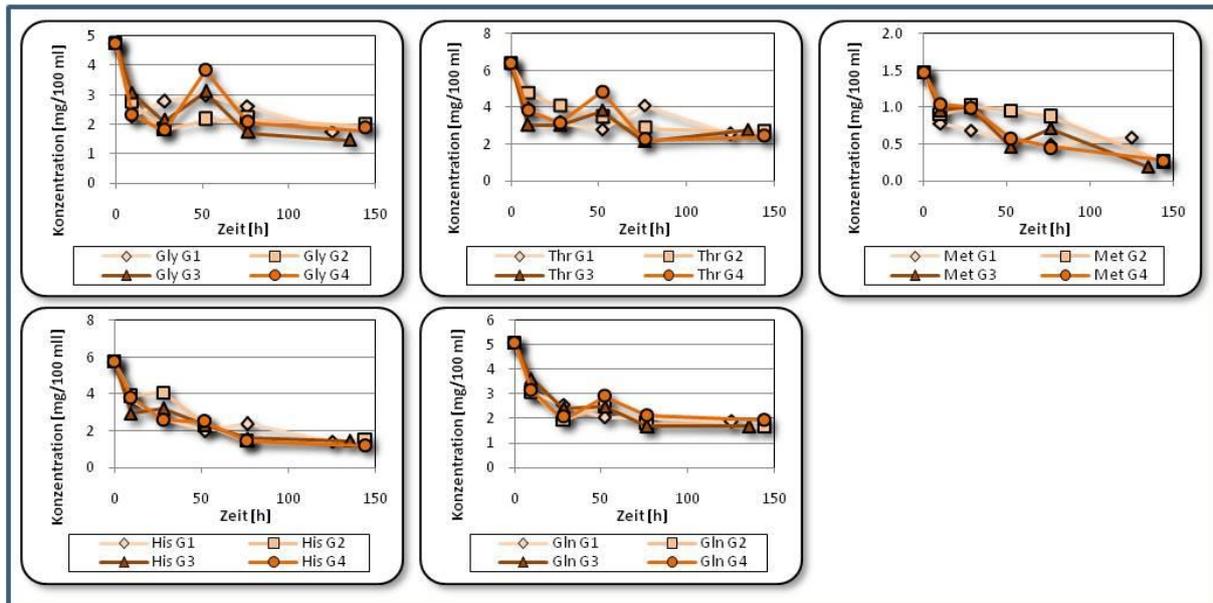
Die in der vorangegangenen Versuchsreihe ebenfalls von der Hefe zügig und vollständig aufgenommene Aminosäure Asparaginsäure wurde zwar ebenfalls von Beginn an assimiliert, allerdings erfolgte die vollständige Zehrung bei den hier untersuchten Hefen teilweise erst am 5. Gärtag. Die Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Leucin, Phenylalanin und Arginin zeigten einen, wie aus der Abbildung 112 ersichtlich, vergleichbaren Konzentrationsverlauf und bilden hier die 2. Gruppe.



**Abbildung 112: Aminosäuren mit kurzer Repressionsphase und weitreichender Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Draußassverfahren**

Allerdings wurde keine der o.g. Aminosäuren vollständig von der vorliegenden Hefe verwertet. Aber wie in den Gärungen DL1-1 bis DL1-4 konnten 4 der hier dargestellten Aminosäuren (Glutaminsäure, Lysin, Leucin, und Phenylalanin) ebenfalls in die 2. Gruppe eingeteilt werden und scheinen damit von besonderer Bedeutung für den Metabolismus der Hefe zu sein. Dahingegen schien Arginin mit seinen zusätzlichen Aminogruppen für die vorliegende Hefe an Wertigkeit zugenommen zu haben, da es in den Gärungen DL1-1 bis DL1-4 besonders in der 2. Hälfte der Hauptgärung nicht mehr assimilierte wurde. Auch Glutaminsäure wurde in dieser Versuchsreihe deutlich schneller von der Hefe verwertet, sodass sich hier eine weitaus größere Übereinstimmung mit der aus der Literatur bekannten Einteilung ergab. Dies könnte darauf schließen lassen, dass die früheren Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten an Hefe in einem schlechten physiologischen Zustand erfolgten.

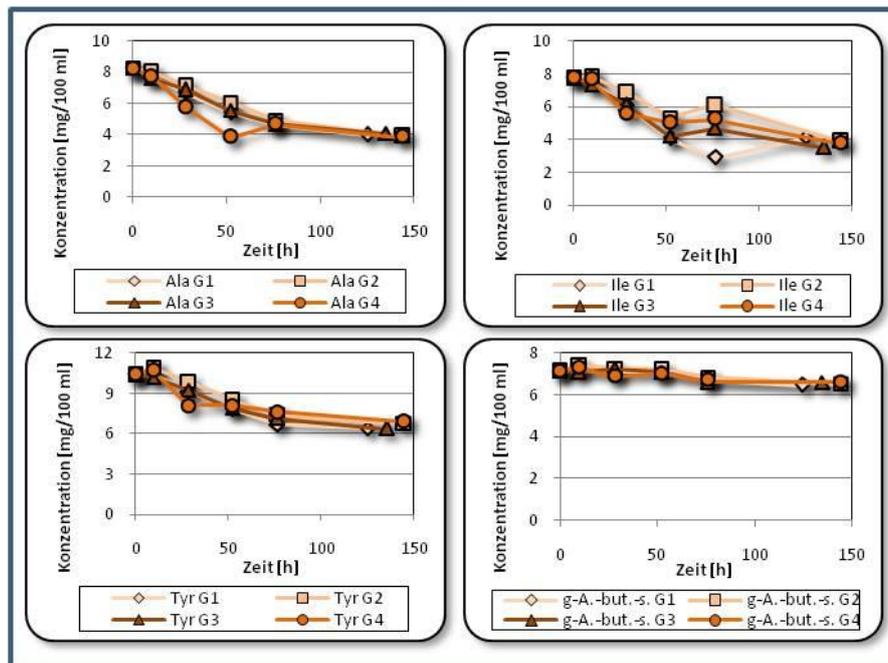
Die Abbildung 113 fasst die Aminosäuren zusammen, die zwar ebenfalls zu Beginn der Gärung von den Hefen aufgenommen wurden, aber im weiteren Verlauf nur noch eine geringe Veränderung in der Konzentration erfuhren. Auch Threonin, das von der optimal propagierten Hefe noch vollständig aufgezehrt wurde, fiel in dieser Versuchsreihe in diese Gruppe.



**Abbildung 113: Aminosäuren mit unmittelbarer und weitreichender Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren**

Allerdings konnte wiederum keine forcierte Aufnahme von Glutaminsäure nachgewiesen werden und demnach scheint die in der Literatur vorgenommen Einteilung dieser Aminosäure in die 1. Gruppe auch unter Berücksichtigung der Verschiebungen in Abhängigkeit der Hefephysiologie nicht zutreffend zu sein. Gleichzeitig scheint die Steuerung der Transportsysteme für die Aminosäuren nicht einer gleichbleibenden Regulation zu folgen, sondern kann von der Hefe in gewissem Maße an die Bedürfnisse des Eiweißstoffwechsels angeglichen werden.

Bei den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Tyrosin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure konnte nur eine vergleichsweise geringe Aufnahme durch die bis zum FAN-Mangel popagierte Hefe über den gesamten Gärprozess festgestellt werden. Die Konzentrationen dieser 4 Aminosäuren sind in der Abbildung 114 ebenfalls über den Gärverlauf dargestellt.



**Abbildung 114: Aminosäuren mit geringer Aufnahme durch eine intensiv propagierte Hefe während der Gärung im Drauflassverfahren**

Wie auch bei den bis zu einer HZZ von 100 bis 120 Mio. Z/ml ohne Limitierung des FAN durchgeführten Propagationen PK8 und PK2 scheint die tertiäre  $\gamma$ -Aminobuttersäure keine besondere Bedeutung für den Hefestoffwechsel unter Gärungsbedingungen zu haben. Demnach sollte diese Aminosäure, anders als in der Mebak Vorschrift zu FAN-Analyse mittels HPLC beschrieben, nicht weiter in die Berechnung des FAN einbezogen werden.

Insgesamt ergeben sich aus den in dieser Forschungsarbeit präsentierten Ergebnissen Hinweise darauf, die Bewertung der FAN Ausstattung sowohl hinsichtlich der Hefestämme als auch in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes der Hefe zu betrachten. Zudem ergeben die aufgezeigten Unterschiede in der Bedeutung der einzelnen Aminosäuren Ansätze, die bis dato postulierten Regeln zu überarbeiten. Ein Vorschlag zur Einteilung der Aminosäuren wird in den Kapiteln 5.3 und 5.4 dargestellt.

## 4.7 Einfluss der Hefephysiologie und der Steuerungsparameter auf das GNP-Spektrum, die Bierqualität und Bieralterung

### 4.7.1 Einfluss verschiedener Hefestämme auf das GNP-Spektrum der Biere

Der brauereieigene Biergeschmack wird maßgeblich über den verwendeten Hefestamm beeinflusst. Die Möglichkeiten, die Hefephysiologie und damit die Ausprägungen im Stoffwechsel über die Gärungsparameter weiterhin zu steuern, wurden in den vorangegangenen Kapiteln deutlich gemacht. Dennoch ergeben vor allem die Analysen der resultierenden Bierqualität dieser Versuchsreihe, die mit unterschiedlichen Hefestämmen unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, zusammen mit resultierenden Bierqualität aus den übrigen Versuchsreihen einen Aufschluss über die Gewichtung zwischen eingesetztem Hefestamm und der verwendeten Technologie.

Die Tabelle 20 zeigt die Zusammensetzung der GNP und deren Unterschiede auf, die allein auf die Hefestämme zurückzuführen sind. Dabei wird deutlich, dass meist nicht das vollständige Spektrum der GNP variiert, sondern vielmehr einzelne Komponenten von den jeweiligen Hefestämmen verstärkt oder weniger intensiv gebildet wurden.

Tabelle 20: Einfluss des Hefestammes auf das GNP-Spektrum des Bieres

| GNP [mg/l]                            | W 128       | W 34/70     | W 69        | W 34/78     | W 194       | W 66/70     |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Acetaldehyd                           | 8,20        | 7,60        | 8,50        | 5,40        | 8,00        | 8,10        |
| Ethylacetat                           | 14,1        | 15,2        | 10,5        | 16,5        | 14,9        | 13,4        |
| n-Propanol                            | 6,0         | 5,9         | 6,5         | 6,4         | 6,0         | 6,6         |
| i-Butanol                             | 6,5         | 5,5         | 5,7         | 5,5         | 5,8         | 4,0         |
| i-Amylacetat                          | 1,4         | 1,6         | 1,1         | 1,6         | 1,2         | 1,1         |
| Amylalkohol                           | 32,0        | 28,8        | 30,1        | 29,2        | 28,2        | 24,3        |
| 2-Phenylethanol                       | 27,9        | 25,0        | 20,7        | 28,0        | 22,2        | 22,2        |
| Diacetyl, <small>gesamt</small>       | 0,07        | 0,05        | 0,08        | 0,04        | 0,08        | 0,08        |
| 2,3-Pentandion, <small>gesamt</small> | 0,04        | 0,03        | 0,04        | 0,03        | 0,05        | 0,04        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b>              | <b>72,4</b> | <b>65,2</b> | <b>63,0</b> | <b>69,1</b> | <b>62,2</b> | <b>57,1</b> |
| <b>Σ Ester</b>                        | <b>15,5</b> | <b>16,8</b> | <b>11,6</b> | <b>18,1</b> | <b>16,1</b> | <b>14,5</b> |
| <b>Σ VDKs</b>                         | <b>0,11</b> | <b>0,08</b> | <b>0,12</b> | <b>0,07</b> | <b>0,13</b> | <b>0,12</b> |

Die entsprechende Acetaldehydkonzentration im fertigen Bier lässt auf einen besonders weitreichenden Abbau durch die Hefen vom Stamm W34/78 schließen. Während in den übrigen Bieren Konzentrationen von 7,6 bis 8,5 mg/l gemessen wurden, wies das aus der Gärung mit dem Stamm W34/78 stammende Bier einen deutlich geringeren Gehalt von 5,4 mg/l auf. Dabei sollte jedoch die höhere Gärintensität dieses Hefestammes berücksichtigt werden, da aufgrund des zügigeren Extraktumsatzes vermutlich auch die CO<sub>2</sub>-Wäsche und damit ein Austreiben des Acetaldehyds verstärkt wurde.

Beim Stamm W 69 wirkte sich vor allem die geringere Konzentration an Ethylacetat auf eine generell niedrigere Esterkonzentration aus. So konnten bei den Estern insgesamt Werte zwischen 11,6 und 18,1 mg/l festgestellt werden. Dies zeigt, dass mit einer Variation des Hefestammes eine Veränderung von bis zu ca. 30% erreicht werden kann. Auch die höheren Alkohole wiesen Unterschiede von bis zu 25% auf ohne dass eine Korrelation zwischen niedrigen Estergehalten und den Konzentrationen der höheren Alkohole zu beobachten war. So wies das Bier aus der Gärung mit dem Stamm W 66/70 die im Vergleich zu den übrigen Resultaten geringste Konzentration an i-Butanol und Amyalkohol auf, was auch die niedrigste Summe an höheren Alkoholen zu Folge hatte, dennoch lag mit 14,5 mg/l ein durchschnittlicher Estergehalt vor. Dem gegenüber konnte im Bier aus der Gärung mit dem Stamm W 128 ein Gehalt an höheren Alkoholen von 72,4 mg/l festgestellt werden, was gleichzeitig das Maximum der vorliegenden Versuchsbiere darstellte. Da aber nur bei dem generell in niedrigen Konzentrationen vorliegenden 2,3-Butandiol ein signifikant höherer Wert festgestellt werden konnte, wird deutlich, dass dieser Hefestamm zu einer insgesamt verstärkten Bildung an höheren Alkoholen neigt.

Die VDK waren bei allen Bieren bis unterhalb der geforderten Grenzwerte abgebaut und wurden auch in den nachfolgenden sensorischen Analysen nicht beanstandet. Die weitgehendste Reduktion an Diacetyl und Pentandion wurde bei den beiden eng verwandten Stämmen W34/70 und W34/78 beobachtet, die sich allerdings in den übrigen GNP doch teilweise deutlich voneinander unterschieden. So ergab sich insgesamt eine geringfügig höhere GNP-Bildung des Stammes W 34/78.

Da der physiologische Zustand der Hefe in engem Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel steht, wurden in dieser Versuchsreihe zudem die Konzentrationen der freien FS und FS-Ester in den fertigen Bieren analysiert. Dies sollte Erkenntnisse über mögliche Wechselwirkungen zwischen den Vermehrungs- und Gärungseigenschaften der einzelnen Hefestämme und den resultierenden Lipidgehalten im Bier ermöglichen. Die jeweiligen Konzentrationen sind in der Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Einfluss des Hefestammes auf die Konzentrationen der Fettsäuren und Fettsäureester im Bier

| Fettsäure und Fettsäureester [mg/l] | W 128       | W 34/70     | W 69        | W 34/78     | W 194       | W 66/70     |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| i-Valerinsäure                      | 1,2         | 1,0         | 0,8         | 0,9         | 1,0         | 0,7         |
| Hexansäure                          | 3,6         | 4,9         | 3,6         | 4,6         | 4,1         | 3,7         |
| Octansäure                          | 5,9         | 8,2         | 6,5         | 6,9         | 6,3         | 6,7         |
| Decansäure                          | 1,2         | 2,0         | 1,4         | 0,8         | 0,9         | 0,7         |
| <b>Summe Fettsäuren</b>             | <b>11,9</b> | <b>16,1</b> | <b>12,3</b> | <b>13,2</b> | <b>12,3</b> | <b>11,8</b> |
| Buttersäureethylester               | 0,12        | 0,12        | 0,09        | 0,14        | 0,14        | 0,13        |
| Essigsäureisobutylester             | 0,08        | 0,09        | 0,06        | 0,10        | 0,09        | 0,05        |
| Essigsäure-2-Phenylethylester       | 0,80        | 0,91        | 0,57        | 0,94        | 0,71        | 0,73        |
| Hexansäureethylester                | 0,22        | 0,32        | 0,23        | 0,28        | 0,27        | 0,24        |
| Octansäureethylester                | 0,26        | 0,32        | 0,29        | 0,33        | 0,29        | 0,34        |
| Decansäureethylester                | 0,04        | 0,10        | 0,07        | 0,04        | 0,02        | 0,04        |
| <b>Summe Fettsäureester</b>         | <b>1,52</b> | <b>1,86</b> | <b>1,31</b> | <b>1,83</b> | <b>1,52</b> | <b>1,53</b> |

Trotz geringer Schwankungen bei den einzelnen freien FS war mit Ausnahme vom Stamm W 34/70 kein Einfluss der verschiedenen Hefepopulationen sichtbar. Während die übrigen Konzentrationen in einem engen Bereich von 11,8 bis 13,2 mg/l vorlagen, erreichte die Konzentration der freien FS in dem aus der Gärung mit dem Stamm W 34/78 resultierenden Bier in der Summe einen Wert von 16,1 mg/l und lag damit deutlich höher.

Bei den FS-Estern hingegen fielen die Unterschiede größer aus. Dabei konnten in den Bieren aus den Gärungen mit den Stämmen W 128, W 194 und W 66/70 jeweils nahezu identische Konzentrationen gemessen werden, die gleichzeitig mit 1,52 bzw. 1,53 mg/l einen Mittelwert für die hier untersuchten Biere darstellten. Aufgrund der niedrigeren Konzentrationen an Estern mit kurzkettigen FS und dem Essigsäure-2-Phenylethylester lag die Gesamtkonzentration bei der Verwendung des Stammes W 69 mit 1,31 mg/l deutlich darunter. Unterdessen zeigten die Stämme W 34/70 und W34/78 mit 1,86 und 1,83 mg/l die höchsten Konzentrationen, die in diesem Fall vorwiegend auf die längerkettigen FS-Ester zurückzuführen waren. Da sich aus den Konzentrationen der freien FS und FS-Estern in dieser Versuchsreihe keine signifikante Abhängigkeit von den Gäreigenschaften und dem physiologischen Zustand der Hefen ableiten ließ, wurde in den nachfolgenden Versuchen auf diese aufwendige und teure Analyse verzichtet. Vielmehr scheinen die Konzentrationen der Lipide eine Größe für den jeweilig verwendeten Hefestamm zu repräsentieren.

#### 4.7.2 Einfluss des Hefestammes auf die Bierqualität und Bialterung

Neben den GNP spielen für die Qualität der Biere auch die chemisch-technischen Analysenparameter und die sensorische Beurteilung eine bedeutende Rolle. Zudem soll in diesem Kapitel anhand der Alterungsindikatoren in den einzelnen Bieren auch der Einfluss des Hefestammes auf die Geschmacksstabilität aufgezeigt werden und damit wiederum die Grundlage geschaffen werden, die technologischen Möglichkeiten zur Verbesserung der Stabilitätseigenschaften zu evaluieren. Die Ergebnisse der klassischen chemisch-technischen Bieranalysen aus mit den verschiedenen Hefestämmen durchgeführten Gärungen sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

**Tabelle 22: Einfluss des Hefestammes auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres**

|                                   | W 128 | W 34/70 | W 69  | W 34/78 | W 194 | W 66/70 |
|-----------------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| <b>Stammwürze [Gew. %]</b>        | 11,43 | 11,62   | 11,56 | 11,51   | 11,56 | 11,46   |
| <b>Alkohol [Vol. %]</b>           | 4,69  | 4,76    | 4,74  | 4,79    | 4,47  | 4,87    |
| <b>Extrakt scheinbar [Gew. %]</b> | 2,59  | 2,66    | 2,65  | 2,50    | 3,17  | 2,29    |
| <b>Ausstoß-V° scheinbar [%]</b>   | 78    | 78      | 78    | 79      | 74    | 81      |
| <b>pH-Wert</b>                    | 4,37  | 4,43    | 4,31  | 4,36    | 4,43  | 4,29    |

Nicht zuletzt aufgrund der unterschiedlichen Gäreigenschaften der einzelnen Hefestämme wiesen auch die resultierenden Biere Unterschiede im scheinbaren VG und den damit verbundenen Restextrakt- und Alkoholgehalten auf. So lag der VG im Bier aus der Gärung mit dem Stamm W 194, der auch die schlechtesten Gäreigenschaften zeigte, mit 74% ca. 4% unter dem der anderen Biere. Der als Staubhefe charakterisierte Stamm W 66/70 hingegen erreichte erwartungsgemäß mit 81% den höchsten VG und damit auch den höchsten Alkoholgehalt von 4,87 Vol.-%. In diesem Bier wurde gleichfalls mit 4,29 der niedrigste pH-Wert gemessen. Während die mit den Stämmen W 128, W 69 und W 34/78 hergestellten Biere ebenfalls niedrige pH-Werte im Bereich von 4,31 bis 4,37 erreichten, lagen die Biere, bei denen die Stämme W 34/70 und W 194 eingesetzt wurden, leicht darüber, wiesen aber mit 4,43 einen immer noch sehr guten pH Sturz auf, und somit unterschritten alle Biere den angestrebten pH Wert von 4,50.

Die Bedeutung des Hefestammes für die Bialterung wurde in der Vergangenheit hauptsächlich mit der Bildung und der resultierenden SO<sub>2</sub>-Konzentrationen im fertigen Bier in Zusammenhang gebracht. Allerdings bleibt bei dieser Vorgehensweise stets zu bedenken, dass durch eine Fokussierung auf die SO<sub>2</sub> Gehalte die eigentliche Qualitätsbeurteilung meist eine untergeordnete Rolle spielte. Deswegen standen bei den vorliegenden Bieren die sensorische Beurteilung der Qualität und die allgemeine Zusammensetzung der Alterungsindikatoren in den frischen und forciert gealterten Bieren im Vordergrund. Die Tabelle 23 fasst die Resultate der mittels GC-Analysen durchgeführten Bestimmung der Alterungsindikatoren zusammen.

Tabelle 23: Einfluss des Hefestammes auf die Konzentrationen der Alterungsindikatoren

| Alterungsindikatoren<br>[µg/l]    | W 128      | W 34/70    | W 69       | W 34/78    | W 194      | W 66/70    |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 2-Methyl-Butanal                  | 5          | 4          | 7          | 4          | 5          | 8          |
| 3-Methyl-Butanal                  | 18         | 14         | 19         | 13         | 20         | 20         |
| 2-Furfural                        | 119        | 89         | 123        | 109        | 120        | 122        |
| 5-Methyl-Furfural                 | <1         | <1         | <1         | <1         | <1         | <1         |
| Benzaldehyd                       | <1         | <1         | <1         | <1         | <1         | <1         |
| 2-Phenyl-Ethanal                  | 27         | 23         | 27         | 26         | 32         | 31         |
| Bernsteinsäure-Diethyl-<br>Ester  | 12         | 9          | 10         | 15         | 10         | 12         |
| Nicotinsäure-Ethyl-Ester          | 93         | 88         | 90         | 99         | 84         | 100        |
| Phenyllessigsäure-Ethyl-<br>Ester | 2          | 2          | 2          | 3          | 2          | 2          |
| 2-Propionyl-Furan                 | n.b.       | n.b.       | n.b.       | n.b.       | n.b.       | n.b.       |
| 2-Acetyl-Furan                    | <1         | <1         | <1         | <1         | <1         | 3          |
| γ-Nonalacton                      | 95         | 93         | 68         | 72         | 62         | 71         |
| <b>Σ Wärmeindikatoren</b>         | <b>214</b> | <b>182</b> | <b>191</b> | <b>181</b> | <b>182</b> | <b>193</b> |
| <b>Σ Sauerstoffindikatoren</b>    | <b>50</b>  | <b>41</b>  | <b>53</b>  | <b>43</b>  | <b>57</b>  | <b>59</b>  |
| <b>Σ Alterungskomponenten</b>     | <b>273</b> | <b>230</b> | <b>249</b> | <b>238</b> | <b>246</b> | <b>261</b> |

Die Konzentrationen der Alterungsindikatoren lagen insgesamt betrachtet bei alle Bieren in einem tendenziell vergleichbaren Bereich. Die größten Unterschiede konnten bei denen als Wärmeindikatoren geltenden 2-Furfural und  $\gamma$ -Nonalacton sowie in der Summe der Sauerstoffindikatoren gemessen werden. Die niedrigste Konzentration an 2-Furfural wies dabei das mit dem Stamm W 34/70 hergestellte Bier auf. Dies kann allerdings aufgrund der parallelen Prozessführung nicht auf Unterschiede in der thermischen Belastung der Würze zurückgeführt werden. Nur die höhere Gärintensität und die daraus resultierende kürzere Hauptgärphase könnte in Zusammenspiel mit dem Reduktionsvermögen dieser Hefen hierfür ausschlaggebend gewesen sein. Obwohl in diesem Bier mit 93 µg/l die zweithöchste Konzentration an  $\gamma$ -Nonalacton gemessen wurde, war es das mit der niedrigsten Gesamtkonzentration an Alterungsindikatoren, was auch auf die niedrigen Konzentrationen der Sauerstoffindikatoren zurückzuführen ist. Auch das Bier aus der Gärung mit dem Stamm W34/78 zeigte eine vergleichsweise niedrige Konzentration an Wärme- und Sauerstoffindikatoren und gibt aufgrund der engen Verwandtschaft zum Stamm W34/70 einen Hinweis auf die Bedeutung des Hefestammes. Da auch die Würzebelüftung für alle Gärungen identisch durchgeführt wurde, sind die Unterschiede maßgeblich auf den Einfluss des Hefestammes zurückzuführen. Die höchsten Konzentrationen an Alterungsindikatoren wurden hingegen bei den Stämmen W 128 und W 66/70 gemessen, die beide eine durchschnittliche Gärintensität zeigten.

Auch die Ergebnisse der sensorischen Beurteilung zeigen das überaus große Potential aller getesteten Hefestämme ein qualitativ hochwertiges Endprodukt herzustellen. So wurden die frischen Biere mit hervorragenden DLG-Noten von 4,4 bis zu 4,7 bewertet. Nur das aus der Fermentation mit dem Stamm W 69 hergestellte Bier wurde, wie aus der Tabelle 24 ersichtlich, geringfügig schlechter bewertet und nach der forcierten Reifung nicht mehr von allen Verkostern als rein beschrieben. Insgesamt zeigten jedoch alle Biere eine gute Alterungsstabilität.

**Tabelle 24: Einfluss des Hefestammes auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres**

|                                | W 128      |            | W 34/70    |            | W 69       |            | W 34/78    |            | W 194      |            | W 66/70    |            |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                | frisch     | gealt.     |
| <b>Reinheit des Geruchs</b>    | 4,5        | 4,3        | 4,3        | 4,3        | 4,3        | 3,8        | 4,3        | 4,0        | 4,8        | 4,3        | 4,4        | 3,9        |
| <b>Reinheit des Geschmacks</b> | 4,8        | 4,3        | 4,5        | 4,0        | 4,6        | 3,8        | 4,8        | 4,4        | 5,0        | 4,5        | 4,8        | 4,6        |
| <b>Vollmundigkeit</b>          | 4,8        | 4,5        | 5,0        | 4,5        | 3,9        | 3,8        | 4,8        | 4,8        | 5,0        | 4,5        | 4,9        | 4,9        |
| <b>Rezenz</b>                  | 5,0        | 5,0        | 4,8        | 4,8        | 3,8        | 3,8        | 4,8        | 4,8        | 5,0        | 5,0        | 4,9        | 4,9        |
| <b>Qualität der Bittere</b>    | 4,0        | 4,0        | 4,0        | 4,0        | 4,2        | 3,9        | 4,4        | 4,4        | 4,0        | 3,8        | 4,6        | 4,3        |
| <b>Gesamtnote</b>              | <b>4,6</b> | <b>4,3</b> | <b>4,4</b> | <b>4,2</b> | <b>4,2</b> | <b>3,8</b> | <b>4,6</b> | <b>4,4</b> | <b>4,7</b> | <b>4,3</b> | <b>4,7</b> | <b>4,4</b> |

Dass allerdings der Hefestamm scheinbar auch Auswirkungen auf die Wahrnehmung der Bittere hat, zeigte das mit dem Stamm W 66/70 hergestellte Bier. Trotz der für alle Biere identischen Anstellwürze wurde die Qualität der Bittere um bis zu 0,5 Punkte besser bewertet als bei den Vergleichsbieren.

#### **4.7.3 Die Bedeutung des Propagationsprozesses für das GNP Spektrum des Bieres in Anhängigkeit der Würzebelüftung**

Die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.8.1 und 4.8.2 sollten dazu beitragen, den Einfluss der Technologie, insbesondere des Sauerstoffs bei Propagation und Gärung, in einem besseren Rahmen bewerten zu können. In wie weit sich unterschiedliche O<sub>2</sub>-Konzentrationen in kontinuierlich oder intervallbelüfteten Propagationen in Abhängigkeit der Würzebelüftung auf das GNP-Spektrum der resultierende Biere auch über mehrere Führungen auswirkten, zeigen die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse.

Die Tabelle 25 stellt die GNP-Spektren der Biere aus denen im Anschluss an die Propagationen PK2 und PK8 durchgeführten Gärungen gegenüber. Die mit jeweils 3 Suden im Drauflassverfahren angestellten Gärungen DL1-1 bis DL4-1 unterschieden sich, wie bereits im Kapitel 3.4.1 beschrieben, einerseits in der O<sub>2</sub>-Konzentration während der kontinuierlich belüfteten Propagationsprozesse und andererseits in der Belüftungsstrategie bei Anstellen.

**Tabelle 25: Die GNP-Spektren des Bieres in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration bei der Propagation und der Belüftungsstrategie beim Drauflassverfahren in der 1. Führung**

| GNP [mg/l]               | PK2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |             | PK8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |             |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
|                          | DL1-1                         | DL2-1       | DL3-1                         | DL4-1       |
| Acetaldehyd              | 5,3                           | 5,3         | 6,7                           | 5,0         |
| Ethylacetat              | 12,6                          | 11,3        | 12,2                          | 11,4        |
| n-Propanol               | 15,0                          | 13,4        | 14,8                          | 15,6        |
| i-Butanol                | 9,2                           | 8,5         | 9,1                           | 9,7         |
| i-Amylacetat             | 1,0                           | 0,9         | 1,0                           | 0,9         |
| Amylalkohol              | 46,2                          | 43,7        | 45,7                          | 47,1        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,04                          | 0,04        | 0,04                          | 0,04        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,02                          | 0,02        | 0,02                          | 0,02        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b> | <b>70,4</b>                   | <b>65,6</b> | <b>69,6</b>                   | <b>72,4</b> |
| <b>Σ Ester</b>           | <b>13,6</b>                   | <b>12,2</b> | <b>13,2</b>                   | <b>12,3</b> |
| <b>Σ VDKs</b>            | <b>0,06</b>                   | <b>0,06</b> | <b>0,06</b>                   | <b>0,06</b> |

Die Konzentrationen in den GNP lassen nur im Falle des Ethylacetats einen signifikanten Einfluss der Würzebelüftung erkennen. Hier wirkte sich die Belüftung aller Sude in den Gärungen DL2-1 und DL4-1 auf eine um ca. 1 mg/l geringere Bildung an Ethylacetat aus. Der vorgeschaltete Propagationsprozess schien hingegen keinen ausreichenden Einfluss auf den Hefemetabolismus in Zusammenhang mit der Bildung der GNP gehabt zu haben. Dennoch kam es zwischen den einzelnen Bieren zu Unterschieden bei den höheren Alkoholen von bis zu 7 mg/l.

Die Ergebnisse aus der 1. Führung der Gärungen DL1-1 bis DL1-4 zeigten die scheinbar doch geringe Bedeutung der Würzebelüftung für das Bieraroma im Drauflassverfahren. Die in der Tabelle 26 zusammengefassten Analysen der GNP der aus der 2. Führung stammenden Biere machen jedoch die Bedeutung eines ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustands für das Aromaprofil eines Bieres deutlich. So konnten z.B. bei Ethylacetat deutlich höhere Werte gemessen werden, während die Konzentrationen an n-Propanol als Teil der höheren Alkohole bei allen Bieren sanken.

**Tabelle 26: Die GNP-Spektren des Bieres in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration bei der Propagation und der Belüftungsstrategie beim Drauflassverfahren in der 2. Führung**

| GNP [mg/l]               | PK2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |             | PK8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |             |
|--------------------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------|
|                          | DL1-2                         | DL2-2       | DL3-2                         | DL4-2       |
| Acetaldehyd              | 4,9                           | 3,2         | 4,1                           | 5,3         |
| Ethylacetat              | 18,4                          | 22,2        | 21,8                          | 16,7        |
| n-Propanol               | 11,3                          | 11,8        | 11,6                          | 10,7        |
| i-Butanol                | 8,8                           | 9,4         | 8,4                           | 8,1         |
| i-Amylacetat             | 1,5                           | 1,8         | 1,8                           | 1,5         |
| Amylalkohol              | 43,0                          | 44,1        | 41,6                          | 41,0        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,05                          | 0,04        | 0,03                          | 0,03        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,04                          | 0,03        | 0,02                          | 0,03        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b> | <b>63,1</b>                   | <b>65,3</b> | <b>61,6</b>                   | <b>59,8</b> |
| <b>Σ Ester</b>           | <b>19,9</b>                   | <b>24,0</b> | <b>23,6</b>                   | <b>18,2</b> |
| <b>Σ VDKs</b>            | <b>0,05</b>                   | <b>0,07</b> | <b>0,05</b>                   | <b>0,06</b> |

Die Konzentrationen an Ethylacetat stiegen von 11,3 bis 12,6 mg/l in der 1. Führung auf 16,7 bis 22,2 mg/l in der 2. Führung. Trotz der großen Abweichung zwischen den einzelnen Bieren konnte allerdings kein signifikanter Einfluss der untersuchten Prozessparameter mehr festgestellt werden. Auch die Konzentrationen an i-Amylacetat stiegen in der 2. Führung teilweise um über 50%, sodass insgesamt eine Steigerung der Ester von durchschnittlich 12 mg/l auf über 20 mg/l gemessen wurde. Dem gegenüber sind nicht nur die Konzentrationen an i-Butanol gesunken, sondern auch die der übrigen höheren Alkohole sind tendenziell zurückgegangen. Nur bei der Gärung DL2-1 konnte insgesamt kein Unterschied zwischen der 1. und 2. Führung festgestellt werden.

Somit fand insgesamt eine Verschiebung in der Synthese der GNP durch die Erntehefen in den hier untersuchten Gärungen statt. Die Tabelle 27 stellt das stark abweichende Verhältnis zwischen den Estern und höheren Alkoholen der Biere aus 1. und 2. Führung gegenüber.

**Tabelle 27: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in der 1. und 2. Führung des Drauflassverfahrens**

|                                           | PK2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |     | PK8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |     |
|-------------------------------------------|-------------------------------|-----|-------------------------------|-----|
|                                           | DL1                           | DL2 | DL3                           | DL4 |
| <b>Höhere Alkohole/Ester (1. Führung)</b> | 5,2                           | 5,4 | 5,3                           | 5,9 |
| <b>Höhere Alkohole/Ester (2. Führung)</b> | 3,2                           | 2,7 | 2,6                           | 3,3 |

Die aus dem Hefemetabolismus abgeleitete Variation in der Belüftungsstrategie des Propagationsprozess, die in den Versuchen PI0 und PI8 untersucht wurden, hatte aufgrund des veränderten physiologischen Zustands der Hefe neben der positiven Entwicklung in den Gäreigenschaften ebenfalls Veränderungen in der Zusammensetzung der GNP zur Folge. Wie

die Tabelle 28 zeigt, überwog der Einfluss der Propagation deutlich gegenüber dem der Belüftung.

**Tabelle 28: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation und der Würzebelüftung beim Anstellen auf das GNP-Spektrum des Bieres**

| GNP [mg/l]               | PI0 (kontinuierlich) |             | PI8 (Intervall 8h) |             |
|--------------------------|----------------------|-------------|--------------------|-------------|
|                          | GI0-B                | GI0-U       | GI8-B              | GI8-U       |
| Acetaldehyd              | 4,8                  | 3,5         | 3,4                | 3,8         |
| Ethylacetat              | 8,3                  | 9,1         | 12,6               | 12,5        |
| n-Propanol               | 10,1                 | 10,9        | 9,3                | 9,4         |
| i-Butanol                | 6,6                  | 7,2         | 6,4                | 6,5         |
| i-Amylacetat             | 0,9                  | 1,0         | 1,7                | 1,8         |
| Amylalkohol              | 48,0                 | 49,3        | 54,6               | 55,4        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,04                 | 0,04        | 0,02               | 0,02        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,02                 | 0,02        | 0,01               | 0,01        |
| <b>∑ höhere Alkohole</b> | <b>64,7</b>          | <b>67,4</b> | <b>70,3</b>        | <b>71,3</b> |
| <b>∑ Ester</b>           | <b>9,2</b>           | <b>10,1</b> | <b>14,3</b>        | <b>14,3</b> |
| <b>∑ VDKs</b>            | <b>0,06</b>          | <b>0,06</b> | <b>0,03</b>        | <b>0,03</b> |

Dabei zeigten die aus der Intervall-Propagation stammenden Hefen aufgrund ihres ausgeprägteren gärungsphysiologischen Charakters eine insgesamt erhöhte Bildung an GNP. So konnte vor allem bei den Estern eine Steigerung von bis zu 50% der Hefen in GI8 festgestellt werden. Zusammen mit den ebenfalls um bis zu 10% leicht erhöhten Konzentrationen an höheren Alkoholen in den mit intervallpropagierten Hefen angestellten Gärungen kann die hohe Bedeutung technologischer Maßnahmen bei der Propagation auf die Bildung der GNP abgeleitet werden. Die zusätzliche Würzebelüftung in den Gärungen GI0-B und GI8-U hatte tendenziell eine leicht niedrigere Bildung an GNP zur Folge, was anhand der niedrigeren Konzentrationen an Estern und höheren Alkoholen in GI0-B und der niedrigeren Konzentration an höheren Alkoholen in GI8-B ersichtlich ist.

Das in der Tabelle 29 dargestellte Verhältnis der höheren Alkohole zu den Estern macht den Einfluss der Hefephysiologie in den untersuchten Gärungen GI0 und GI8 nochmals deutlich und zeigt, wie weit der Propagationsprozess zur Steuerung der GNP herangezogen werden kann.

**Tabelle 29: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in Abhängigkeit der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation und der Würzebelüftung beim Anstellen**

| Höhere Alkohole/Ester | PI0 (Kontinuierlich) |       | PI8 (Intervall 8h) |       |
|-----------------------|----------------------|-------|--------------------|-------|
|                       | GI0-B                | GI0-U | GI8-B              | GI8-U |
|                       | 7,0                  | 6,4   | 4,9                | 5,0   |

Während bei den Hefen aus der kontinuierlich belüfteten Propagation ein Verhältnis von 7,0 für die zusätzlich über die Würze belüfteten Hefen und 6,4 für die unbelüfteten Hefen errechnet wurde, lag das Verhältnis bei den intervallbelüfteten Hefen bei 4,9 bzw. 5,0. Dieses niedrigere Verhältnis aus den Gärungen GI8 stimmte allerdings mit den Werten aus der 1. Führung im Drauflassverfahren überein. Somit scheint das Drauflassverfahren ebenfalls einen gärungsphysiologischeren Zustand der Hefe zu fördern und zu einer vermehrten Bildung an GNP beizutragen.

Die aus der 2. Versuchsreihe - mit dem Ziel die durch Intervallbelüftung erreichte Adaption der Hefephysiologie an die Gärungsbedingungen zu überprüfen und zu optimieren - stammenden Biere wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Konzentrationen an GNP untersucht. Wie die Tabelle 30 zeigt, waren die Unterschiede vermutlich aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Ausgangszustände der jeweiligen Propagationshefen und der zeitlich verschobenen Belüftungspause während der Propagation P3-I8 nicht aussagekräftig.

**Tabelle 30: Die GNP-Spektren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

| GNP [mg/l]               | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |             | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |             | P3-I8 (Intervall 8h) |             |
|--------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|----------------------|-------------|
|                          | P1-GU                           | P1-GB       | P2-GU                           | P2-GB       | P3-GU                | P3-GB       |
| Acetaldehyd              | 9,8                             | 9,8         | 10,7                            | 10,7        | 11,3                 | 10,3        |
| Ethylacetat              | 14,3                            | 15,4        | 15,7                            | 17,6        | 16,2                 | 15,1        |
| n-Propanol               | 14,2                            | 14,7        | 13,2                            | 13,7        | 12,6                 | 12,8        |
| i-Butanol                | 6,6                             | 6,7         | 6,1                             | 6,5         | 8,7                  | 7,1         |
| i-Amylacetat             | 1,3                             | 1,3         | 1,2                             | 1,3         | 1,3                  | 1,1         |
| Amylalkohol              | 44,4                            | 45,0        | 39,3                            | 41,9        | 48,3                 | 43,6        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,07                            | 0,07        | 0,06                            | 0,06        | 0,07                 | 0,06        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,03                            | 0,03        | 0,02                            | 0,02        | 0,03                 | 0,02        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b> | <b>65,2</b>                     | <b>66,4</b> | <b>58,6</b>                     | <b>58,6</b> | <b>69,6</b>          | <b>63,5</b> |
| <b>Σ Ester</b>           | <b>15,6</b>                     | <b>16,7</b> | <b>16,9</b>                     | <b>18,9</b> | <b>17,5</b>          | <b>16,2</b> |
| <b>Σ VDKs</b>            | <b>0,10</b>                     | <b>0,10</b> | <b>0,08</b>                     | <b>0,08</b> | <b>0,10</b>          | <b>0,08</b> |

Besonders die Ergebnisse aus P1-GU und P1-GB, bei denen zur Propagation aufgrund der Versuchsanordnung Hefe aus einer anderen Charge als bei den Propagationen P2-K2 und P3-I8 eingesetzt werden musste, schränken die Möglichkeit eine Aussage, zum Einfluss der Propagation und Würzebelüftung treffen zu können, stark ein. In beiden Gärungen wurden mit 65,2 bzw. 66,4 mg/l für diese Versuchsreihe durchschnittliche Konzentrationen an höheren Alkoholen erreicht. Jedoch schien sich hier die zusätzliche Würzebelüftung in P1-GB positiv auf die Entwicklung der Ester ausgewirkt zu haben, die mit 16,7 mg/l eine um 1,1 mg/l höhere Konzentration erreichte als in P1-GU.

Einen Hinweis auf den angestrebten gärungsphysiologischeren Charakter der intervallbelüfteten Hefen aus P3-I8 lieferten allerdings die Unterschiede zwischen den GNP-Spektren der Biere aus P2-G und P3-G, bei denen die Ausgangshefen zur Propagation aus der identischen Charge stammten. In den Bieren aus den Gärungen P3-GU und P3-GB konnte mit 69,6 und 65,5 mg/l eine um bis zu 11,0 mg/l höhere Konzentration an höheren Alkoholen gemessen werden als in den Bieren aus den Gärungen P2-GU und P2-GB. Die Estergehalte in den Bieren ließen hingegen keinen Einfluss des Propagationsprozesses erkennen. Vielmehr schien auch hier die zusätzliche Belüftung der Hefen in P2-GB zu einer verstärkten Bildung an Estern geführt zu haben, wohingegen die Belüftung in P3-GB vermutlich aufgrund des veränderten physiologischen Zustand dieser Hefe zu Beginn der Gärung negative Auswirkungen auf die resultierende Esterkonzentration gehabt hat.

Zudem wurde in allen Bieren eine deutlich erhöhte Acetaldehydkonzentration gemessen, die mit Werten von 9,8 bis 11,3 mg/l auch den in der Literatur beschriebenen Geruchs- und Geschmacksschwellenwert von ca. 8 mg/l überstiegen. Allerdings wurde dies in der sensorischen Beurteilung nicht explizit beanstandet. Die VDK hingegen erfuhren in allen Gärungen eine Reduktion bis unterhalb der Schwellenwerte.

Auch in der 4. Führung konnten nur geringe Unterschiede im GNP-Spektrum zwischen den einzelnen Bieren festgestellt werden. Die Tabelle 31 fasst die Ergebnisse aus den GNP-Analysen zusammen.

**Tabelle 31: Die GNP-Spektren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

| GNP [mg/l]               | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |             | P2-K8 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |             | P3-I8 (Intervall 8h) |             |
|--------------------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|----------------------|-------------|
|                          | P1-G4U                          | P1-G4B      | P2-G4U                          | P2-G4B      | P3-G4U               | P3-G4B      |
| Acetaldehyd              | 11,9                            | 11,4        | 13,1                            | 10,6        | 12,0                 | 11,1        |
| Ethylacetat              | 19,2                            | 17,1        | 20,1                            | 17,0        | 19,7                 | 18,3        |
| n-Propanol               | 12,3                            | 12,6        | 12,4                            | 12,8        | 12,2                 | 12,0        |
| i-Butanol                | 9,9                             | 9,5         | 9,8                             | 10,1        | 11,1                 | 10,7        |
| i-Amylacetat             | 1,9                             | 1,6         | 1,9                             | 1,5         | 2,0                  | 1,9         |
| Amylalkohol              | 53,1                            | 51,1        | 50,9                            | 54,1        | 53,8                 | 55,3        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,11                            | 0,13        | 0,09                            | 0,07        | 0,06                 | 0,07        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,04                            | 0,04        | 0,04                            | 0,03        | 0,03                 | 0,03        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b> | <b>75,3</b>                     | <b>73,2</b> | <b>73,1</b>                     | <b>77,0</b> | <b>77,1</b>          | <b>78,0</b> |
| <b>Σ Ester</b>           | <b>21,1</b>                     | <b>18,7</b> | <b>22,0</b>                     | <b>18,5</b> | <b>21,7</b>          | <b>20,2</b> |
| <b>Σ VDKs</b>            | <b>0,15</b>                     | <b>0,17</b> | <b>0,13</b>                     | <b>0,10</b> | <b>0,09</b>          | <b>0,10</b> |

Die höheren Alkohole in den resultierenden Bieren lagen bei den Bieren aus der 4. Führung in einem engeren Konzentrationsbereich, wobei die Gärungen P3-GU und P3-GB tendenziell mit 77,1 und 78,0 mg/l die höchsten Konzentrationen aufwiesen. Insgesamt konnte somit im

Vergleich zur 1. Führung eine deutlich stärkere Bildung an höheren Alkoholen durch die mehrfach geführten Hefen festgestellt werden. So stiegen die Konzentrationen von 58,6 bis 69,6 mg/l bei den frisch propagierten Hefen auf Werte von 73,1 bis 78,0 mg/l bei den Hefen in der 4. Führung. Zudem konnten in allen Gärungen wiederum Konzentrationen an Acetaldehyd über dem Geschmacksschwellenwert gemessen werden, die dazu oberhalb der Konzentrationen in den Bieren aus der 1. Führung lagen. Dies könnte mit der über die Führungen zum Ende der Gärungen nachlassende Expression der ALDH in Zusammenhang gebracht werden.

Auch bei den Estern konnte eine tendenzielle Zunahme in den Konzentrationen der Biere beobachtet werden. Allerdings schien die zusätzliche Belüftung in den Gärungen P1-G4B, P2-G4B und P3-G4B die Estergehalte in den resultierenden Bieren nicht weiter zu erhöhen, sondern trug eher dazu bei, dass diese auf einem konstanten Niveau blieben.

Wie aus den jeweiligen Summen an höheren Alkoholen und Estern in den einzelnen GNP-Spektren abzuleiten ist, kam es in dieser Versuchsreihe bei den resultierenden Bieren nur zu geringen und teilweise zu den vorangegangenen Versuchen abweichenden Verhältnissen zwischen den höheren Alkoholen und Estern. In der Tabelle 32 sind die Verhältnisse aller Biere in Abhängigkeit des Propagationsprozess, der Führungen und der Würzebelüftung zusammengefasst.

**Tabelle 32: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in der 1. und 4. Führung in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses**

|                                           | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |        | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |        | P3-I8 (Intervall 8h) |        |
|-------------------------------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------|--------|
|                                           | P1-G4U                          | P1-G4B | P2-G4U                          | P1-G4B | P1-G4U               | P1-G4B |
| <b>Höhere Alkohole/Ester (1. Führung)</b> | 4,2                             | 4,0    | 3,5                             | 3,1    | 4,0                  | 3,9    |
| <b>Höhere Alkohole/Ester (4. Führung)</b> | 3,6                             | 3,9    | 3,3                             | 4,2    | 3,6                  | 3,9    |

Die für die 1. Führung berechneten Verhältnisse von 3,1 bis 4,2 lassen unter Berücksichtigung der aus den vorangegangenen Versuchen gewonnenen Ergebnisse auf einen bereits ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand der verwendeten Hefen zum Zeitpunkt des Anstellens schließen. Dies könnte auf die in dieser Versuchsreihe eingesetzte Propagationsanlage zurückzuführen sein, bei der aufgrund der anlagentechnischen Konstruktion bei hohen HZZ teilweise keine ausreichende Sauerstoffversorgung mehr gewährleistet werden kann. Die im gleichen Bereich liegenden Verhältnisse der Biere aus den 4. Führungen mit Werten von 3,3 bis 4,2 stützen diese Annahme. Dass allerdings die zusätzliche Belüftung bei den frisch propagierten Hefen eher zu einer Steigerung der Esterkonzentration führt und bei mehrmaligem Führen diese Bildung durch die zusätzliche Versorgung mit Sauerstoff konstant gehalten wird, zeigen die Unterschiede im Verhältnis zwischen den jeweilig belüfteten und unbelüfteten Gärungen aus der 1. und 4. Führung.

Die aus den auf einen optimalen physiologischen Zustand ausgerichteten Propagationen PK2, PK8, P1-K8, P2-K2 und P3-I8 hergestellten Biere ergaben nur einen tendenziellen Hinweis auf Veränderungen in den GNP in Abhängigkeit der Hefephysiologie. Der Einfluss einer intensiveren Hefepropagation bis hin zu Zellzahlen von 200 Mio. Z/ml auf das GNP-Spektrum der Biere ist ebenfalls in Abhängigkeit der Würzebelüftung untersucht worden. Die resultierenden Ergebnisse der GNP-Analysen sind in der Tabelle 33 dargestellt.

**Tabelle 33: Einfluss erhöhter Propagationsintensität und der Würzebelüftung im Drauflassverfahren auf die GNP-Spektren der Biere**

| GNP [mg/l]               | P160                  |             | P200                  |             |
|--------------------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
|                          | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U       | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U       |
| Acetaldehyd              | 3,7                   | 4,3         | 4,5                   | 4,7         |
| Ethylacetat              | 20,4                  | 20,8        | 19,3                  | 19,2        |
| n-Propanol               | 14,9                  | 14,0        | 14,2                  | 13,6        |
| i-Butanol                | 8,3                   | 8,4         | 8,9                   | 7,8         |
| i-Amylacetat             | 1,5                   | 1,8         | 1,6                   | 1,6         |
| Amylalkohol              | 52,7                  | 53,4        | 55,8                  | 51,1        |
| Diacetyl, gesamt         | 0,04                  | 0,04        | 0,04                  | 0,04        |
| 2,3-Pentandion, gesamt   | 0,01                  | 0,02        | 0,02                  | 0,02        |
| <b>Σ höhere Alkohole</b> | <b>75,9</b>           | <b>75,8</b> | <b>78,9</b>           | <b>72,5</b> |
| <b>Σ Ester</b>           | <b>21,9</b>           | <b>22,6</b> | <b>20,9</b>           | <b>20,8</b> |
| <b>Σ VDKs</b>            | <b>0,05</b>           | <b>0,06</b> | <b>0,06</b>           | <b>0,06</b> |

Dabei wurden die Auswirkungen einer intensiv betriebenen Propagation bei allen hier untersuchten Einzelkomponenten der GNP ersichtlich. Vor allem bei der Betrachtung des Ethylacetats zeigte sich der starke Einfluss der so „erzeugten“ Hefephysiologie. Während in den vorangegangenen Gärungen mit Propagationshefe aus vergleichbaren Propagationsanlagen Konzentrationen im fertigen Bier von 8,3 bis 12,6 mg/l gemessen wurden, produzierten die Hefen in diesen Gärungen mit 19,2 bis 20,8 mg/l deutlich mehr Ethylacetat. Dabei konnten trotz der Variation von unbelüftetem Drauflassen und einer Belüftung aller 4 Sude keine Unterschiede durch die Sauerstoffversorgung festgestellt werden. Vielmehr zeigten sowohl die belüfteten Hefen als auch die Unbelüfteten von P200 eine leicht niedrigere Bildung an Ethylacetat.

Auch die höheren Alkohole lagen in vergleichsweise hohen Konzentrationen in den fertigen Bieren vor. Dem gegenüber konnte, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt der Hefen aus dem Propagationsprozess und der Belüftung, eine gute Reduktion an Acetaldehyd und den VDK beobachtet werden. Die Reduktion des Acetaldehyds könnte unter anderem auf die deutlichen Expression der ALDH-Aktivität zum Ende der Gärung zurückzuführen sein.

Die in der Tabelle 34 dargestellten Verhältnisse zwischen den höheren Alkoholen und Estern lassen ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Belüftung bei Propagation und Gärung

erkennen. Vielmehr deutet auch das Verhältnis mit Werten von 3,4 bis 3,8 auf einen eher gärungsphysiologischen Charakter der intensiv propagierten Hefen hin.

**Tabelle 34: Das Verhältnis von höheren Alkoholen zu Estern in Abhängigkeit erhöhter Propagationsintensität und der Würzebelüftung im Drauflassverfahren**

|                              | P160                  |       | P200                  |       |
|------------------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
|                              | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U |
| <b>Höheren Alkohol/Ester</b> | 3,5                   | 3,4   | 3,8                   | 3,5   |

Da sich bei einer HZZ von 200 Mio. Z/ml trotz einer optimalen Belüftungseinrichtung und intensiver Belüftung scheinbar partiell anaerobe Bedingungen einstellen, wird aus diesen Ergebnissen zugleich eine unzureichende Sauerstoffversorgung der Hefen in den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 deutlich. Das jeweils niedrige Verhältnis der höheren Alkohole und Ester weist trotz niedrigerer HZZ zum Ende der Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 auf einen bereits ausgeprägten gärungsphysiologischen Charakter der Hefen in P1-G, P2-G und P3-G hin. Somit müssen die in der Praxis genutzten Propagationseinrichtungen für eine optimale Steuerung der Hefephysiologie auf eine optimale Versorgung der Hefe mit Sauerstoff untersucht und ausgerichtet werden.

#### **4.7.4 Die Bierqualität und Bieralterung in Abhängigkeit der Hefepropagation und Würzebelüftung**

Neben den GNP sind sowohl die chemisch-technischen als auch die sensorischen Eigenschaften für die Qualität der fertigen Biere ausschlaggebend. In den folgenden Kapiteln werden die Auswirkungen der Variationen in den Propagationsprozessen P10, P18, P1-K8, P2-K2 und P3-I8 sowie der Einfluss der nachfolgenden Belüftungsstrategie beim Anstellen auf die resultierende Bierqualität beschrieben. Dabei werden sowohl die klassischen Analyseparameter Alkohol- und Extraktgehalt sowie pH-Wert als auch die sensorische Bewertung der frischen und forciert gealterten Biere nach DLG betrachtet. Zusammen mit den Konzentrationen der Alterungsindikatoren, die bei den Bieren aus den Gärungen G10 und G18 nach 6monatiger Lagerzeit und in den übrigen Bieren nach forcierter Alterung bestimmt wurden, findet auch eine Beurteilung der Geruchs- und Geschmacksstabilität statt.

Die fertigen Biere aus den Gärungen G10 und G18 unterschieden sich bei den chemisch-technischen Messgrößen vor allem hinsichtlich des VG. Die intervallpropagierten Hefen in G18-B und G18-U erreichten dabei vermutlich auch aufgrund des zügigeren Gärverlaufs mit 84% einen leicht höheren VG als die Hefen in den Gärungen G10-B und G10-U. Wie die Tabelle 35 zeigt, ergab sich daraus auch ein um ca. 0,1 Vol.-% gesteigerter Alkoholgehalt in den Bieren aus G18-B und G18-U, wobei für die Beurteilung der Biere die Verwendung unterschiedlicher Ausschlagwürzen aus zwei verschiedenen großtechnischen Suden berücksichtigt werden muss.

**Tabelle 35: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen**

|                                   | GI0-B | GI0-U | GI8-B | GI8-U |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Stammwürze [Gew. %]</b>        | 12,14 | 12,06 | 11,98 | 12,1  |
| <b>Alkohol [Vol. %]</b>           | 5,26  | 5,26  | 5,33  | 5,37  |
| <b>Extrakt scheinbar [Gew. %]</b> | 2,27  | 2,18  | 1,95  | 2,02  |
| <b>Ausstoß-V° scheinbar [%]</b>   | 82    | 83    | 84    | 84    |
| <b>pH-Wert</b>                    | 4,27  | 4,25  | 4,22  | 4,22  |

Die zusätzliche Belüftung der Gärungen GI0-B und GI8-B schien hingegen keinen Einfluss auf die chemisch-technischen Parameter der fertigen Biere gehabt zu haben. Die pH-Werte aller Biere lagen mit Werten von 4,22 bis 4,27 in einem ausgezeichneten Bereich.

Die Alterungsindikatoren der Biere GI0 und GI8 wurden, wie bereits beschrieben, nach sechsmonatiger Lagerzeit gemessen. Dabei wurden die Biere im Dunklen bei ca. 20° aufbewahrt. Deshalb sind die absoluten Konzentrationen in den Alterungsindikatoren nur bedingt mit denen der forciert gealterten Biere aus den anderen Versuchsreihen zu vergleichen. Aus der Tabelle 36 sind die Konzentrationen der Alterungsindikatoren in den Bieren aus den Gärungen GI0 und GI8 in Abhängigkeit der Würzebelüftung ersichtlich.

**Tabelle 36: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die Konzentration der Alterungsindikatoren des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen**

| Alterungsindikatoren<br>[µg/l]        | PI0 (kontinuierlich) |            | PI8 (Intervall 8h) |            |
|---------------------------------------|----------------------|------------|--------------------|------------|
|                                       | GI0-B                | GI0-U      | GI8-B              | GI8-U      |
| <b>2-Methyl-Butanal</b>               | 8                    | 8          | 2                  | <1         |
| <b>3-Methyl-Butanal</b>               | 16                   | 16         | 6                  | 5          |
| <b>2-Furfural</b>                     | 376                  | 386        | 245                | 200        |
| <b>5-Methyl-Furfural</b>              | <1                   | <1         | <1                 | <1         |
| <b>Benzaldehyd</b>                    | 2                    | 2          | <1                 | <1         |
| <b>2-Phenyl-Ethanal</b>               | 41                   | 41         | 33                 | 32         |
| <b>Bernsteinsäure-Diethyl-Ester</b>   | 81                   | 71         | 132                | 138        |
| <b>Nicotinsäure-Ethyl-Ester</b>       | 326                  | 325        | 187                | 181        |
| <b>Phenylelessigsäure-Ethyl-Ester</b> | 9                    | 9          | 9                  | 10         |
| <b>2-Propionyl-Furan</b>              | n.b.                 | n.b.       | n.b.               | n.b.       |
| <b>2-Acetyl-Furan</b>                 | 5                    | 5          | 9                  | 15         |
| <b>γ-Nonalacton</b>                   | 42                   | 42         | 52                 | 55         |
| <b>∑ Wärmeindikatoren</b>             | <b>418</b>           | <b>428</b> | <b>297</b>         | <b>255</b> |
| <b>∑ Sauerstoffindikatoren</b>        | <b>67</b>            | <b>68</b>  | <b>41</b>          | <b>37</b>  |
| <b>∑ Alterungskomponenten</b>         | <b>572</b>           | <b>573</b> | <b>486</b>         | <b>455</b> |

Die größten Unterschiede in der Alterung konnten dabei zwischen den Bieren aus den verschiedenen Propagationen beobachtet werden. Obwohl die verwendeten Ausschlagwürzen aus 2 verschiedenen Suden einer großtechnischen Anlage stammten, ließen sich dennoch tendenzielle Einflüsse der verwendeten Anstellhefen ableiten. So zeigten die Biere aus den Gärungen G10-B und G10-U zwar einerseits deutlich höhere Konzentrationen des Wärmeindikators 2-Furfural gegenüber den Bieren aus G18-B und G18-U aber andererseits auch niedrigere Konzentrationen an  $\gamma$ -Nonalacton, das ebenfalls als Wärmeindikator herangezogen wird. Somit scheint sich, wie auch bei den Bieren aus den Gärungen mit verschiedenen Hefestämmen beobachtet, die Gärung und damit der physiologische Zustand der Hefe auf die resultierende Konzentrationen an 2-Furfural auszuwirken.

Auch bei den Konzentrationen an 3-Methyl-Butanal, Benzaldehyd und 2-Phenyl-Ethanal, die als Indikatoren für die sauerstoffabhängige Alterung gelten, wiesen die Biere mit Hefen aus der intervallbelüfteten Propagation P18 deutlich geringe Konzentrationen auf, wobei auch hier dem Einfluss der Würzebelüftung eine untergeordnete Rolle zukam. Dem gegenüber konnten in den Bieren aus G18-B und G18-U höhere Konzentrationen an Bernsteinsäure-Diethyl-Ester und 2-Acetyl-Furan gemessen werden. Beide gelten als allgemeine Leitsubstanzen für den Alterungsprozess im Bier.

Die leicht bessere Alterungsstabilität der Biere aus den Gärungen mit den intervallpropagierten Hefen konnte in den Verkostungen tendenziell bestätigt werden. Allerdings erreichten die frischen Biere aus den Gärungen mit kontinuierlicher Belüftung hergeführten Hefen eine mit 4,3 um 0,1 geringfügig bessere Beurteilung. Die Tabelle 37 stellt die Verkostungsergebnisse nach DLG gegenüber.

**Tabelle 37: Einfluss der 8stündigen Intervallbelüftung bei der Propagation auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres in Abhängigkeit der Würzebelüftung beim Anstellen**

|                                | G10-B      |            | G10-U      |            | G18-B      |            | G18-U      |            |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                | frisch     | gealt.     | frisch     | gealt.     | frisch     | gealt.     | frisch     | gealt.     |
| <b>Reinheit des Geruchs</b>    | 4,2        | 3,9        | 4,3        | 3,9        | 4,1        | 3,9        | 4,1        | 3,8        |
| <b>Reinheit des Geschmacks</b> | 4,2        | 3,9        | 4,3        | 4,0        | 4,1        | 4,0        | 4,2        | 4,0        |
| <b>Vollmundigkeit</b>          | 4,3        | 4,3        | 4,4        | 4,4        | 4,3        | 4,3        | 4,4        | 4,3        |
| <b>Rezenz</b>                  | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Qualität der Bittere</b>    | 4,2        | 4,0        | 4,2        | 4,1        | 4,1        | 4,0        | 4,2        | 4,1        |
| <b>Gesamtnote</b>              | <b>4,3</b> | <b>4,1</b> | <b>4,3</b> | <b>4,1</b> | <b>4,2</b> | <b>4,1</b> | <b>4,2</b> | <b>4,1</b> |

Trotz der leicht besseren Bewertung der frischen Biere schnitten die forciert gealterten Biere nahezu identisch ab. Dabei zeigten alle Biere nur geringe Alterungserscheinungen. Auch hier konnte kein Einfluss der Würzebelüftung bei den Bieren aus G10-B und G18-B festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Analyse der Biere aus den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 sind in der Tabelle 38 zusammengefasst. Zusätzlich wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Prozessbedingungen auf die Schaumstabilität und Bierfarbe untersucht.

**Tabelle 38: Die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

|                                           | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |       | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |       | P3-I8 (Intervall 8h) |       |
|-------------------------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|-------|----------------------|-------|
|                                           | P1-GU                           | P1-GB | P2-GU                           | P2-GB | P3-GU                | P3-GB |
| <b>Stammwürze [Gew. %]</b>                | 11,22                           | 11,18 | 11,62                           | 11,60 | 11,61                | 11,70 |
| <b>Alkohol [Vol. %]</b>                   | 4,96                            | 4,92  | 4,81                            | 4,80  | 4,96                 | 4,98  |
| <b>Extrakt scheinbar [Gew. %]</b>         | 1,86                            | 1,89  | 2,56                            | 2,58  | 2,27                 | 2,35  |
| <b>Ausstoß-V° scheinbar [%]</b>           | 84                              | 84    | 79                              | 79    | 81                   | 81    |
| <b>Farbe</b>                              | 5,6                             | 5,2   | 5,6                             | 5,6   | 5,6                  | 5,3   |
| <b>Schaum nach SFT-Foamtester [SKZs]</b>  | 115                             | 117   | 115                             | 115   | 110                  | 115   |
| <b>Schaum nach SFT-Foamtester [HLTs]]</b> | 96                              | 97    | 96                              | 96    | 92                   | 96    |
| <b>pH-Wert</b>                            | 4,31                            | 4,28  | 4,37                            | 4,37  | 4,35                 | 4,32  |

Hierbei zeigten, im Gegensatz zu den vorangegangenen Gärungen, die mit den Hefen aus der kontinuierlich belüfteten Propagation P1-K8 angestellten Biere den höchsten VG. Allerdings bleibt auch hier zu berücksichtigen, dass es sich einerseits wieder um Würzen aus verschiedenen Suden handelte und andererseits die Ausgangshefen aus zwei unterschiedlichen Chargen stammten. Unter der Annahme einer weitgehend vergleichbaren Würzezusammensetzung wird erneut die große Bedeutung des Ausgangszustandes der Hefe vor der Propagation deutlich und gibt somit erneut einen Hinweis darauf, dass eine Optimierung des Hefemanagements kollektiv erfolgen muss.

Bei den mit der gleichen Ausgangshefe und Ausschlagwürze angestellten Gärungen P2-G und P3-G zeigten die intervallpropagierten Hefen einen um 2% höheren VG und somit auch einen leicht höheren Alkoholgehalt von 4,96 und 4,98 Vol.-% gegenüber 4,81 und 4,80 Vol.-% in den Bieren der Gärungen P2-GU und P2-GB. Die resultierende Bierfarbe gab anhand der Biere aus den belüfteten Gärungen P1-GB und P3-GB einen Hinweis auf eine geringfügig stärkere Aufhellung der Farbe, während die Gärungen am Anschluss an P2-K2 keine Unterschiede aufzeigten. Die Schaumstabilität scheint weder durch eine Variation des Propagationsprozess noch durch die Würzebelüftung beeinflusst worden zu sein. Nur das aus der unbelüfteten Gärung P3-GU stammende Bier wies eine um 5 SKZs geminderte Stabilität auf.

In dieser Versuchsreihe wurden zusätzlich die SO<sub>2</sub>-Gehalte in den fertigen Bieren analysiert. Dabei zeigten die Biere aus den jeweils unbelüfteten Gärungen entgegen den Erwartungen teilweise einen niedrigeren SO<sub>2</sub>-Gehalt im Vergleich zu den zusätzlich beim Anstellen

belüfteten Bieren. Aus der Tabelle 39 sind die jeweiligen  $\text{SO}_2$ -Konzentrationen der Biere aus den Gärungen im Anschluss an die Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 ersichtlich.

**Tabelle 39: Die  $\text{SO}_2$ -Konzentration der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen  $\text{O}_2$ -Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

|                              | P1-K8 ( $\text{O}_2 = 8 \text{ mg/l}$ ) |       | P2-K2 ( $\text{O}_2 = 2 \text{ mg/l}$ ) |       | P3-I8 (Intervall 8h) |       |
|------------------------------|-----------------------------------------|-------|-----------------------------------------|-------|----------------------|-------|
|                              | P1-GU                                   | P1-GB | P2-GU                                   | P2-GB | P3-GU                | P3-GB |
| $\text{SO}_2 \text{ [mg/l]}$ | 2                                       | 6     | 5                                       | 4     | 2                    | 3     |

Die mit 6 mg/l höchste Konzentration an  $\text{SO}_2$  produzierten dabei die während der Propagation mit 8 mg/l kontinuierlich belüfteten Hefen in der Gärung P1-GB. In dem parallel hergestellten Bier aus der unbelüfteten Gärung konnten nur 2 mg/l nachgewiesen werden. Bei den Hefen aus der intervallbelüfteten Propagation wurden trotz des ausgeprägten gärungsphysiologischeren Zustands während der Gärung mit 2 und 3 mg/l ebenfalls sehr niedrige  $\text{SO}_2$ -Gehalte im Bier gemessen. Mit 5 und 4 mg/l  $\text{SO}_2$  wiesen die Biere aus P2-GU und P2-GB eine für diese Versuchsreihe durchschnittliche Konzentration auf. Insgesamt lassen die niedrigen  $\text{SO}_2$ -Konzentrationen der Biere auf einen sehr guten physiologischen Zustand aller Hefen schließen.

Die Tabelle 40 stellt die Konzentrationen der Alterungsindikatoren in den Bieren gegenüber, die mit den Hefen aus den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 in der 1. Führung hergestellt wurden. Anhand dieser Versuchsreihe ließ sich im Gegensatz zu den Gärungen G10 und G18 eine eindeutige Tendenz zum Einfluss der Würzebelüftung ableiten. Allerdings zeigten die Biere aus den belüfteten Gärungen sowohl bei den Wärmeindikatoren als auch bei Sauerstoffindikatoren die jeweils niedrigere Konzentration.

**Tabelle 40: Die Konzentrationen der Alterungsindikatoren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

| Alterungsindikatoren<br>[µg/l] | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |           | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |           | P3-I8 (Intervall 8h) |           |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|----------------------|-----------|
|                                | P1-GU                           | P1-GB     | P2-GU                           | P2-GB     | P3-GU                | P3-GB     |
| 2-Methyl-Butanal               | 4                               | 4         | 6                               | 5         | 4                    | 3         |
| 3-Methyl-Butanal               | 11                              | 10        | 21                              | 18        | 14                   | 11        |
| 2-Furfural                     | 8                               | 7         | 4                               | 4         | 5                    | 1         |
| 5-Methyl-Furfural              | <1                              | <1        | <1                              | <1        | <1                   | <1        |
| Benzaldehyd                    | <1                              | <1        | <1                              | <1        | <1                   | <1        |
| 2-Phenyl-Ethanal               | 12                              | 9         | 19                              | 19        | 17                   | 9         |
| Bernsteinsäure-Diethyl-Ester   | <1                              | <1        | <1                              | <1        | <1                   | <1        |
| Nicotinsäure-Ethyl-Ester       | 5                               | 5         | <1                              | 3         | 2                    | 1         |
| Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester  | <1                              | <1        | <1                              | <1        | <1                   | <1        |
| 2-Propionyl-Furan              | <1                              | <1        | <1                              | <1        | <1                   | <1        |
| 2-Acetyl-Furan                 | n.b.                            | n.b.      | n.b.                            | n.b.      | n.b.                 | n.b.      |
| γ-Nonalacton                   | 44                              | 40        | 22                              | 21        | 18                   | 21        |
| <b>Σ Wärmeindikatoren</b>      | <b>52</b>                       | <b>47</b> | <b>26</b>                       | <b>25</b> | <b>23</b>            | <b>22</b> |
| <b>Σ Sauerstoffindikatoren</b> | <b>27</b>                       | <b>23</b> | <b>46</b>                       | <b>42</b> | <b>35</b>            | <b>23</b> |
| <b>Σ Alterungskomponenten</b>  | <b>75</b>                       | <b>66</b> | <b>66</b>                       | <b>62</b> | <b>54</b>            | <b>42</b> |

Bei den vergleichsweise sehr niedrigen Konzentrationen wiesen die Biere, die mit der intervallpropagierten Hefe hergestellt wurden, die geringste Bildung an alterungsrelevanten Substanzen auf, was allerdings nicht mit den geringen Konzentrationen an SO<sub>2</sub> korreliert.

Dem hingegen zeigte das Bier mit der höchsten SO<sub>2</sub>-Konzentration in den Verkostungen die geringste Veränderung zwischen der frischen und der forciert gealterten Probe. Wie aus der Tabelle 41 ersichtlich, wurde das gealterte Bier aus der Gärung P1-GB nur 0,1 Noten schlechter beurteilt als das frische Bier. Auch die Biere aus den Gärungen P3-GB und P3-GU wiesen in Korrelation zu den Alterungsindikatoren sehr gute Ergebnisse auf. Beide Biere wurden nach der forcierten Alterung ebenfalls nur geringfügig schlechter bewertet.

**Tabelle 41: Die sensorische Bewertung der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 1. Führung**

|                                | P1-GU      |            | P1-GB      |            | P2-GU      |            | P2-GB      |            | P3-GU      |            | P3-GB      |            |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                | frisch     | gealt.     |
| <b>Reinheit des Geruchs</b>    | 4,3        | 3,8        | 4,2        | 4,0        | 4,4        | 3,8        | 4,4        | 3,2        | 4,4        | 4,1        | 4,3        | 4,0        |
| <b>Reinheit des Geschmacks</b> | 4,3        | 3,8        | 4,3        | 4,1        | 4,4        | 3,6        | 4,4        | 3,6        | 4,4        | 4,1        | 4,3        | 4,1        |
| <b>Vollmundigkeit</b>          | 4,5        | 4,5        | 4,4        | 4,4        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Rezenz</b>                  | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Qualität der Bittere</b>    | 4,2        | 4,0        | 4,3        | 4,2        | 4,2        | 4,0        | 4,4        | 4,0        | 4,3        | 4,2        | 4,4        | 4,0        |
| <b>Gesamtnote</b>              | <b>4,3</b> | <b>3,8</b> | <b>4,3</b> | <b>4,2</b> | <b>4,4</b> | <b>4,0</b> | <b>4,4</b> | <b>3,8</b> | <b>4,4</b> | <b>4,2</b> | <b>4,4</b> | <b>4,2</b> |

Nur in den Bieren aus den unbelüfteten Gärungen P1-GU und P2-GU wurden von dem Verkoster-Panel Alterungserscheinungen wahrgenommen und demnach mit 3,8 bewertet. Die von den frischen Bieren erreichten Noten von 4,3 bzw. 4,4 machen wiederum den positiven Einfluss eines guten physiologischen Zustands der Hefe deutlich, den alle Propagationshafen aufwiesen.

Die über 4 Führungen untersuchten Hefen aus den Propagationen P1-K8, P2-K2 und P3-I8 zeigten auch in der 4. Führung nur geringfügige Unterschiede in Abhängigkeit der Prozessbedingungen. Dabei wiesen, wie die Tabelle 42 zeigt, die Biere aus den belüfteten Gärungen leicht bessere Ergebnisse hinsichtlich VG, pH-Wert auf.

**Tabelle 42: Die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

|                                          | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |        | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |        | P3-I8 (Intervall 8h) |        |
|------------------------------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------|--------|
|                                          | P1-G4U                          | P1-G4B | P2-G4U                          | P2-G4B | P3-G4U               | P3-G4B |
| <b>Stammwürze [Gew. %]</b>               | 11,43                           | 11,66  | 11,41                           | 11,65  | 11,48                | 11,38  |
| <b>Alkohol [Vol. %]</b>                  | 4,86                            | 4,81   | 4,77                            | 4,99   | 4,85                 | 4,84   |
| <b>Extrakt scheinbar [Gew. %]</b>        | 2,63                            | 2,72   | 2,42                            | 2,27   | 2,36                 | 2,26   |
| <b>Ausstoß-V° scheinbar [%]</b>          | 78                              | 79     | 80                              | 81     | 80                   | 81     |
| <b>Farbe</b>                             | 5,0                             | 5,6    | 5,2                             | 5,3    | 5,5                  | 5,3    |
| <b>Schaum nach SFT-Foamtester [SKZs]</b> | 108                             | 114    | 102                             | 105    | 112                  | 109    |
| <b>Schaum nach SFT-Foamtester [HLTs]</b> | 90                              | 95     | 85                              | 88     | 93                   | 92     |
| <b>pH-Wert</b>                           | 4,49                            | 4,42   | 4,43                            | 4,37   | 4,39                 | 4,37   |

Die im Vergleich zur 1. Führung leicht höheren pH-Werte der Biere von 4,37 bis 4,49 lassen sich auf den nicht zugegebenen Anteil an Propagator-Bier zurückführen. Dennoch lagen alle Biere damit in einem guten Bereich. Im Vergleich zur 1. Führung konnte nur bei der

Schaumstabilität der Biere mit der Hefe aus der Propagation P2-K2 eine Verschlechterung beobachtet werden, die mit 102 und 105 SKRz ca. 10 Schaumpunkte weniger aufwiesen.

Die von den Hefen produzierte SO<sub>2</sub>-Menge stieg im Vergleich zur 1. Führung vor allem in den Gärungen P3-G4U und P3-G4B deutlich an, während die Veränderungen in den übrigen Gärungen geringer ausfielen. Allerdings wiesen die Biere aus unbelüfteten Gärungen in der 4. Führung tendenziell eine höhere SO<sub>2</sub>-Konzentration auf (siehe Tabelle 43).

**Tabelle 43: Die SO<sub>2</sub>-Konzentration der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

|                        | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |        | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |        | P3-I8 (Intervall 8h) |        |
|------------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------|--------|
|                        | P1-G4U                          | P1-G4B | P2-G4U                          | P2-G4B | P3-G4U               | P3-G4B |
| SO <sub>2</sub> [mg/l] | 5                               | 4      | 6                               | 3      | 7                    | 5      |

Dies schien sich auch auf die Bildung an Alterungsindikatoren im Bier ausgewirkt zu haben. Wie die Tabelle 44 zeigt, wiesen die Biere aus den Gärungen P1-G4U, P2-G4U und P3-G4U jeweils einen geringeren Gehalt an Alterungsindikatoren auf als die zusätzlich zu Gärbeginn belüfteten Biere.

**Tabelle 44: Die Konzentrationen der Alterungsindikatoren der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

| Alterungsindikatoren<br>[µg/l] | P1-K8 (O <sub>2</sub> = 8 mg/l) |           | P2-K2 (O <sub>2</sub> = 2 mg/l) |            | P3-I8 (Intervall 8h) |            |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|------------|----------------------|------------|
|                                | P1-G4U                          | P1-G4B    | P2-G4U                          | P2-G4B     | P3-G4U               | P3-G4B     |
| 2-Methyl-Butanal               | 3                               | 4         | 4                               | 4          | 4                    | 4          |
| 3-Methyl-Butanal               | 11                              | 11        | 12                              | 12         | 13                   | 14         |
| 2-Furfural                     | 1                               | 4         | 76                              | 90         | 104                  | 129        |
| 5-Methyl-Furfural              | <1                              | <1        | <1                              | <1         | <1                   | <1         |
| Benzaldehyd                    | <1                              | <1        | <1                              | <1         | <1                   | <1         |
| 2-Phenyl-Ethanal               | 10                              | 18        | 21                              | 19         | 26                   | 33         |
| Bernsteinsäure-Diethyl-Ester   | <1                              | <1        | <1                              | <1         | <1                   | <1         |
| Nicotinsäure-Ethyl-Ester       | 2                               | <1        | 12                              | 11         | 12                   | 13         |
| Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester  | <1                              | <1        | <1                              | <1         | <1                   | <1         |
| 2-Propionyl-Furan              | <1                              | <1        | <1                              | <1         | <1                   | <1         |
| 2-Acetyl-Furan                 | n.b.                            | n.b.      | n.b.                            | n.b.       | n.b.                 | n.b.       |
| γ-Nonalacton                   | 32                              | 25        | 28                              | 52         | 59                   | 57         |
| <b>Σ Wärmeindikatoren</b>      | <b>33</b>                       | <b>29</b> | <b>104</b>                      | <b>142</b> | <b>163</b>           | <b>186</b> |
| <b>Σ Sauerstoffindikatoren</b> | <b>24</b>                       | <b>36</b> | <b>37</b>                       | <b>35</b>  | <b>43</b>            | <b>51</b>  |
| <b>Σ Alterungskomponenten</b>  | <b>54</b>                       | <b>61</b> | <b>137</b>                      | <b>173</b> | <b>202</b>           | <b>233</b> |

Allerdings ist dies wiederum nicht nur allein auf die als Sauerstoffindikatoren geltenden Substanzen zurückzuführen, sondern auch auf die reduzierten Konzentrationen der Wärmeindikatoren 2-Furfural und 2-Phenyl-Ethanal. Die erheblich niedrigeren Werte in der Summe der Alterungsindikatoren in den Gärungen P1-G4 sind vermutlich auf die aus einer anderen Produktionscharge stammende Ausschlagwürze zurückzuführen.

In der Tabelle 45 sind die Verkostungsergebnisse der Biere aus der 4. Führung dargestellt. Dabei konnten die Biere die guten Ergebnisse aus der 1. Führung nur bedingt bestätigen. Zwar zeigten die frischen Biere mit Noten zwischen 4,1 bis 4,3 weiterhin gute Ergebnisse, aber die forciert gealterten Biere wiesen teilweise deutlichere Alterungserscheinungen auf.

**Tabelle 45: Die sensorische Bewertung der Biere aus belüfteten und unbelüfteten Würzen in Abhängigkeit der Propagationen mit einer kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 und 8 mg/l und einer 8stündigen Belüftungspause im letzten Drittel des Propagationsprozesses in der 4. Führung**

|                                | P1-G4U     |            | P1-G4B     |            | P2-G4U     |            | P2-G4B     |            | P3-G4U     |            | P3-G4B     |            |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                | frisch     | gealt.     |
| <b>Reinheit des Geruchs</b>    | 3,9        | 3,6        | 4,2        | 3,8        | 4,0        | 3,0        | 4,0        | 3,7        | 4,2        | 3,8        | 4,1        | 3,0        |
| <b>Reinheit des Geschmacks</b> | 4,2        | 3,9        | 4,2        | 3,7        | 4,0        | 3,0        | 4,0        | 3,7        | 4,2        | 3,8        | 4,2        | 3,0        |
| <b>Vollmundigkeit</b>          | 4,5        | 4,5        | 4,6        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Rezenz</b>                  | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Qualität der Bittere</b>    | 4,0        | 3,8        | 4,3        | 4,0        | 4,0        | 3,7        | 4,0        | 4,0        | 4,0        | 3,9        | 4,2        | 3,5        |
| <b>Gesamtnote</b>              | <b>4,2</b> | <b>4,0</b> | <b>4,3</b> | <b>4,0</b> | <b>4,1</b> | <b>3,6</b> | <b>4,1</b> | <b>4,0</b> | <b>4,2</b> | <b>4,0</b> | <b>4,3</b> | <b>3,5</b> |

Vor allem das forciert gealterte Bier aus der Gärung P3-I8 wurde mit einer Gesamtnote von 3,5 (Geschmack und Geruch jeweils 3,0; Bittere 3,5) aufgrund massiver Alterungserscheinungen stark abgewertet. Die mit 4,3 bewertete sensorische Qualität des frischen Bieres und die im Vergleich zu P3-G4B niedrigere Konzentration an Alterungsindikatoren lässt allerdings eher auf eine Unregelmäßigkeit bei der Abfüllung schließen als auf einen tatsächlich derartig hohen Qualitätsverlust, was auf den verwendeten Pilotmaßstab zurückzuführen sein könnte.

Die Analysen der mittels verschiedenen Propagationsvarianten hergestellten Biere lassen nur eine begrenzte Aussage zum Einfluss der Propagation und Würzebelüftung auf die resultierende Bierqualität zu. Die Ergebnisse der chemisch-technischen Analysen, der Verkostung sowie die Bestimmung der Alterungsindikatoren der Biere, die mit besonders intensiv propagierten Hefen hergestellt wurden, sollen den Einfluss eines Mangels an Nährstoffe während der Hefeherführung auf die Bierqualität aufzeigen.

Wie aus der Tabelle 46 ersichtlich, erreichten die Hefen aus P160 und P200 einen VG von 82% und zeigten damit eine durchschnittliche Umsetzung des Extrakts. Die niedrigen pH-Werte aller Biere im Bereich von 4,16 bis 4,19 lassen sich auf die weitreichende Propagation zurückführen. Das mit ca. 10% in die Gärung eingebrachte Propagationsbier mit einem pH-

Wert von <3,5 säuerte die Biere zusätzlich an, so dass der pH-Sturz nicht allein auf die Gärung zurückzuführen war.

**Tabelle 46: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die chemisch-technischen Qualitätsmerkmale des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren**

|                                   | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U |
|-----------------------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-------|
| <b>Stammwürze [Gew. %]</b>        | 11,60                 | 11,64 | 11,67                 | 11,58 |
| <b>Alkohol [Vol. %]</b>           | 4,99                  | 5,03  | 5,03                  | 4,99  |
| <b>Extrakt scheinbar [Gew. %]</b> | 2,21                  | 2,17  | 2,20                  | 2,18  |
| <b>Ausstoß-V° scheinbar [%]</b>   | 82                    | 82    | 82                    | 82    |
| <b>pH-Wert</b>                    | 4,19                  | 4,16  | 4,18                  | 4,17  |

Zudem wiesen die Biere keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt aus der Propagation oder der Würzebelüftung auf. Insgesamt gaben die chemisch-technischen Qualitätskriterien keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss der intensiven Hefepropagation. Die so hergestellten Biere zeigten nach der forcierten Alterung ebenfalls vergleichsweise niedrige Konzentrationen an Alterungsindikatoren. Wie aus der Tabelle 47 ersichtlich, lagen die Summen mit 143 bis 169 µg/l teilweise sogar unter den Konzentrationen der Biere aus den vorangegangenen Versuchsreihen.

**Tabelle 47: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die Konzentration der Alterungsindikatoren des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren**

| Alterungsindikatoren<br>[µg/l]       | P160                  |            | P200                  |            |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|-----------------------|------------|
|                                      | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U      | GDL-B <sub>1234</sub> | GDL-U      |
| <b>2-Methyl-Butanal</b>              | 8                     | 7          | 5                     | 7          |
| <b>3-Methyl-Butanal</b>              | 9                     | 6          | 9                     | 6          |
| <b>2-Furfural</b>                    | 100                   | 84         | 102                   | 92         |
| <b>5-Methyl-Furfural</b>             | <1                    | <1         | <1                    | <1         |
| <b>Benzaldehyd</b>                   | <1                    | <1         | <1                    | <1         |
| <b>2-Phenyl-Ethanal</b>              | <1                    | <1         | <1                    | <1         |
| <b>Bernsteinsäure-Diethyl-Ester</b>  | 3                     | 2          | 3                     | 5          |
| <b>Nicotinsäure-Ethyl-Ester</b>      | 5                     | 9          | 10                    | 7          |
| <b>Phenyllessigsäure-Ethyl-Ester</b> | 12                    | 12         | 13                    | 14         |
| <b>2-Propionyl-Furan</b>             | 4                     | 3          | 7                     | 5          |
| <b>2-Acetyl-Furan</b>                | <1                    | <1         | <1                    | <1         |
| <b>γ-Nonalacton</b>                  | 22                    | 20         | 20                    | 23         |
| <b>∑ Wärmeindikatoren</b>            | <b>122</b>            | <b>104</b> | <b>122</b>            | <b>115</b> |
| <b>∑ Sauerstoffindikatoren</b>       | <b>9</b>              | <b>6</b>   | <b>9</b>              | <b>6</b>   |
| <b>∑ Alterungskomponenten</b>        | <b>163</b>            | <b>143</b> | <b>169</b>            | <b>159</b> |

In dieser Versuchsreihe machte sich die Belüftungsstrategie in den Drauflassverfahren deutlich stärker bemerkbar. Sowohl die auf insgesamt niedrigem Niveau befindlichen Sauerstoffindikatoren als auch die Wärmeindikatoren zeigten geringere Konzentrationen in den unbelüfteten Bieren. Dabei wird deutlich, dass sich die Belüftung wiederum auch auf die resultierende Konzentration an 2-Furfural auswirkte. Dies deutet darauf hin, dass die anaeroben Bedingungen während des Anstellens direkt mit den niedrigeren Konzentrationen an 2-Furfural in Zusammenhang stehen oder die unbelüfteten Hefen ein ausgeprägteres Reduktionsvermögen über den Gärverlauf aufweisen. Dies wird durch das für alle Biere vergleichbare Niveau des Wärmeindikators  $\gamma$ -Nonalacton bestätigt.

Die Verkostungsergebnisse lassen bei der Betrachtung der Gesamtnote ebenfalls keinen maßgeblich negativen Einfluss der intensiven Hefepropagation erkennen. Die in der Tabelle 48 zusammengefassten Verkostungsergebnisse zeigten, dass die frischen Biere mit Noten von 4,1 und 4,2 auf einem durchaus akzeptablen Qualitätsniveau lagen

**Tabelle 48: Einfluss erhöhter Propagationsintensität auf die sensorischen Eigenschaften des Bieres in Abhängigkeit der Belüftungsstrategie im Drauflassverfahren**

|                                | GDL-B <sub>1234</sub> |            | GDL-U      |            | GDL-B <sub>1234</sub> |            | GDL-U      |            |
|--------------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|------------|
|                                | frisch                | gealt.     | frisch     | gealt.     | frisch                | gealt.     | frisch     | gealt.     |
| <b>Reinheit des Geruchs</b>    | 3,9                   | 3,5        | 4,3        | 3,8        | 4,0                   | 3,7        | 4,0        | 3,6        |
| <b>Reinheit des Geschmacks</b> | 4,1                   | 3,6        | 4,1        | 3,8        | 4,2                   | 3,7        | 4,2        | 3,6        |
| <b>Vollmundigkeit</b>          | 4,5                   | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5                   | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Rezenz</b>                  | 4,5                   | 4,5        | 4,5        | 4,5        | 4,5                   | 4,5        | 4,5        | 4,5        |
| <b>Qualität der Bittere</b>    | 3,8                   | 4,0        | 4,0        | 3,8        | 4,0                   | 3,8        | 4,0        | 3,9        |
| <b>Gesamtnote</b>              | <b>4,1</b>            | <b>3,9</b> | <b>4,2</b> | <b>4,0</b> | <b>4,2</b>            | <b>3,9</b> | <b>4,2</b> | <b>3,9</b> |
| <b>Teilnote*</b>               | <b>3,9</b>            | <b>3,7</b> | <b>4,1</b> | <b>3,8</b> | <b>4,1</b>            | <b>3,7</b> | <b>4,1</b> | <b>3,7</b> |

\*(ohne Vollmundigkeit und Rezenz)

Da jedoch bei allen Bieren die Rezenz und Vollmundigkeit mit durchschnittlich 4,5 als sehr gut bewertet wurde, macht erst die Betrachtung der Teilnoten von Reinheit des Geschmacks und Geruchs den teilweise unzureichenden physiologischen Charakter der intensiv propagierten Hefen deutlich. Nur in den frischen Proben der Biere aus den unbelüfteten Drauflassverfahren wurden keine Unreinheiten vom Verkoster-Panel festgestellt. Die forciert gealterten Biere hingegen zeigten alle eine deutliche Alterung und wurden mit Noten zwischen 3,7 und 3,8 bewertet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit und O<sub>2</sub>-Zehrung während des Anstellens als Grundlage für optimale Gäreigenschaften und Bierqualität

Um optimale Voraussetzungen für die Gäreigenschaften der Hefe zu schaffen, ist es von größter Bedeutung, die Würzebelüftung auf den physiologischen Zustand der Hefe und die verwendete Anstelltechnologie abzustimmen. Zudem kann durch eine derartige Maßnahme die Schädigung des antioxidativen Potentials der Würze minimiert und eine bessere Voraussetzung für die Stabilität des Bieres geschaffen werden. Dafür muss sowohl die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit als auch die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe während des Anstellvorgangs bekannt sein und in der Prozessführung berücksichtigt werden. Die dazu in der Literatur herangezogenen Werte für die O<sub>2</sub>-Aufnahme der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen wurden meist aus verwandten Applikation, wie z.B. der Verarbeitung von Melasse übertragen oder geben eine enorme Bandbreite an, ohne einen direkten Zusammenhang mit den Einflussgrößen Hefephysiologie und Technologie aufzuzeigen (vgl. Kapitel 2.5.3).

Der erste Schritt, bei dem sowohl die oxidative Belastung der Würze als auch die Menge des für den Hefestoffwechsel zu Verfügung stehenden Sauerstoffs ermittelt wurde, war die O<sub>2</sub>-Abnahme in unterschiedlich stark belüfteten Würzen parallel mit und ohne Zugabe von Hefe zu untersuchen (vgl. Kapitel 4.1). Die Differenz aus der Konzentrationsabnahme in Würzen ohne Hefezugabe und der Konzentrationsabnahme in mit Hefe angestellten Würzen ergab folglich die tatsächlich von der Hefe aufgenommene O<sub>2</sub>-Menge und den an einer oxidativen Schädigung beteiligten Anteil des Sauerstoffs. Dabei wurde deutlich, dass die absolute Konzentration an Sauerstoff in der Würze keinen direkten Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe hat und somit der Anteil an Sauerstoff, der an Reaktionen mit Würzeinhaltsstoffen beteiligt ist, nur über die Kontaktzeit beeinflusst wird. Anhand dieser Ergebnisse konnte der an oxidativen Reaktionen mit Würzebestandteilen beteiligte Anteil des eingebrachten Sauerstoffs mit 15 bis 20% beziffert werden. Dies entspricht bei einer für die Bierbereitung durchschnittlichen Gärtemperatur von 10 °C einer effektiven Menge von 5,5 bis 5,7 µg O<sub>2</sub>/l\*min bzw. 0,336 bis 0,343 mg O<sub>2</sub>/l\*h.

Die Dauer der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit in den verschiedenen im konventionellen Batch-Verfahren durchgeführten Versuchsreihen erstreckte sich in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration an Sauerstoff in der Würze und der O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefen auf einen Zeitraum von 40 bis 240 min. Dies entspricht einem Oxidationspotential von 0,22 bis 1,37 mg/l. Unter Berücksichtigung einer für die chemisch-physikalische und geschmackliche Stabilität bereits kritischen Menge für die O<sub>2</sub>-Aufnahme des Bieres während des Abfüllvorgangs von 0,10 bis 0,30 mg O<sub>2</sub>/l wird die enorme Bedeutung der Würzebelüftung und der eingebrachten O<sub>2</sub>-Menge während des Anstellens deutlich. Inwieweit jedoch eine exakt auf den Hefemetabolismus abgestimmte Belüftung zu einer Minimierung dieses Potentials beiträgt,

und die Bierqualität und -stabilität verbessert, muss in weiterführenden Forschungsarbeiten aufgezeigt werden.

Generell muss der an Reaktionen mit Würzebestandteilen beteiligte Anteil des Sauerstoffs vom Gesamtsauerstoff subtrahiert werden, um die effektive Menge des für die Hefe zu Verfügung stehenden und im Metabolismus umgesetzten Anteils zu ermitteln. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass der unter Praxisbedingungen übliche Gegendruck von 0,5 bar beim Füllen eines Gärtanks während des Anstellens keinen signifikanten Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe hat. Die unter Gleichdruckbedingungen, Überdruck und Verwendung von Inertgas im Kopfraum eines Gärtanks durchgeführten Versuche ergaben keinen Hinweis auf mögliche Veränderungen im Aufnahmeverhalten der Hefe. Somit spielt eine Diffusion aus oder in den Kopfraum keine Rolle bei dem in der Würze gelösten und von der Hefe aufgenommenen Sauerstoff.

Vielmehr konnte gezeigt werden, dass der physiologische Zustand der Hefe stark mit der O<sub>2</sub>-Zehrung in Verbindung steht und die aus der Literatur bekannte und in den vorliegenden Versuchen bestätigte enorme Bandbreite in den Aufnahmeraten erklärt. Aus einem Vergleich verschiedener Versuchsreihen wurde deutlich, dass sogar die Bedeutung physikalischer Prozessgrößen in einem gewissen Rahmen durch den physiologischen Zustand der Hefe überlagert werden kann. So ergab die Auswertung von O<sub>2</sub>-Abnahmen während der Angärung, dass eine Temperaturdifferenz von bis zu 1 °C eine geringere Auswirkung auf die O<sub>2</sub>-Zehrung der Hefe haben kann als der physiologische Ausgangszustand der Stellhefe. Wird die in den Brauereien vorhandene technische Ausstattung zu einer präzisen Steuerung der Würzetemperatur beim Kühlvorgang berücksichtigt, lässt sich daraus die große Bedeutung eines reproduzierbaren physiologischen Zustands der Hefe für eine konstante Prozessführung und Minimierung der oxidativen Belastung der Würze ableiten.

Um die O<sub>2</sub>-Versorgung besser auf die Hefe abstimmen zu können, wurde der O<sub>2</sub>-Bedarf in Abhängigkeit der Hefephysiologie ermittelt. Ein Vergleich von Erntehefen mit einer aus der identischen Population erneut propagierten Hefe zeigte dabei eine deutliche Zunahme in der O<sub>2</sub>-Zehrung während des Anstellvorgangs bei den propagierten Hefen. Zusammen mit den ebenfalls in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über eine nachlassende O<sub>2</sub>-Aufnahmerate der Hefe mit zunehmender Lagerzeit kann ein deutlicher Zusammenhang zwischen der O<sub>2</sub>-Zehrung und dem physiologischen Zustand der Hefe hergestellt werden. Eine im ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Zustand befindliche Hefe weist somit eine schnellere Umsetzung des Sauerstoffs auf, als eine im Ruhestadium oder in einem gärungsphysiologischen Zustand befindliche Hefe. Die daraus abzuleitenden Unterschiede in der Dauer der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit lagen in einem Bereich von 15 bis 20 %. Allein dies kann zu Veränderungen im Oxidationspotential während der Angärung von 0,03 bis 0,27 mg/l führen.

In Zusammenhang mit der O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit muss jedoch ebenfalls berücksichtigt werden, dass sich eine längere Kontaktzeit der Hefe mit Sauerstoff eventuell positiv auf den

Hefemetabolismus auswirken könnte, da die sauerstoffabhängigen Schritte der Lipidbiosynthese so über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden können. Andererseits steht die gleiche - unter Berücksichtigung der geringeren Würzeoxidation rechnerisch größeren - Menge an Sauerstoff für eine Hefe mit höherer Aufnahmerate zu Verfügung. Aufgrund des verbesserten vermehrungsphysiologischen Charakters einer solchen Hefe sollte der Sauerstoff effizienter im Rahmen der Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen genutzt werden. Ist jedoch nur eine gewisse zeitliche Versorgung der Hefe mit Sauerstoff nötig, könnte die präzise Anpassung zu einer Schonung des antioxidativen Potentials der Würze beitragen und somit zu einer besseren Stabilität des resultierenden Bieres führen.

Auch die Betrachtung der  $O_2$ -Konzentrationen im Gärtank über den Verlauf eines Drauflassverfahrens hat eine besondere Bedeutung für die optimale Adaption der Belüftungsstrategie an den Hefemetabolismus. Da in den Brauereien nicht zuletzt aufgrund der technischen Ausstattung meist nur die maximale Sättigung der Würze von 8 bis 10 mg/l als Option zur  $O_2$ -Versorgung der Hefe in Betracht kommt, müssen ab dem 2. Sud aufgrund der Vermischung der Würzevolumina die geringeren absoluten  $O_2$ -Gehalte berücksichtigt werden und die damit verbundenen Auswirkungen auf die  $O_2$ -Zehrung der Hefe bekannt sein. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Reduzierung in der  $O_2$ -Konzentration zwar bei den ersten beiden Suden eines Drauflassverfahrens zunächst keine signifikanten Auswirkungen auf die Aufnahmerate hatten, aber im weiteren Verlauf trotz einer noch vorhandenen Konzentration von ca. 2,0 bis 3,3 mg  $O_2$ /l Unterschiede in der  $O_2$ -Zehrung zu beobachten waren. So sanken die  $O_2$ -Aufnahmeraten der Hefe von durchschnittlich 0,0037 und 0,0032  $\mu\text{g } O_2/\text{Mio. } Z^*\text{min}$  bei den ersten beiden Suden auf 0,0014 und 0,0016  $\mu\text{g } O_2/\text{Mio. } Z^*\text{min}$  bei den darauffolgenden Suden. Dieses Verhalten der Hefe könnte auf eine veränderte Reaktion des Hefestoffwechsels auf die geringeren  $O_2$ -Mengen und auf eine aufgrund der anaeroben Bedingungen bereits eingetretene Umstellung im Hefemetabolismus zurückzuführen sein. Diese Annahme deckt sich allerdings nicht mit den Ergebnissen, die bei niedrigeren  $O_2$ -Konzentrationen im Batch-Verfahren erzielt wurden.

Dass die Hefe allerdings nicht generell eine nachlassende  $O_2$ -Aufnahme über den Verlauf eines Drauflassverfahrens zeigt, beweisen die Versuche, bei denen eine Würzebelüftung mit einer resultierenden  $O_2$ -Konzentration von 8 mg/l im Gärtank simuliert wurde, was durch die Nutzung von reinem Sauerstoff anstatt von Sterilluft auch in der Praxis möglich wäre. Bei diesen Versuchen wurde deutlich, dass die  $O_2$ -Zehrung über den gesamten Anstellvorgang trotz der anaeroben Phasen zwischen den Drauflasszeitpunkten in einem deutlich höheren Bereich von 0,0041 und 0,0048  $\mu\text{g } O_2/\text{Mio. } Z^*\text{min}$  lag. Dies könnte unter Berücksichtigung einer möglichen zusätzlichen oxidativen Belastung der Würze Anlass geben, die Belüftung der Hefe von der Würzedosage zu entkoppeln und direkt an die  $O_2$ -Konzentration im Gärtank zu orientieren. Dies würde zwar eine zusätzliche Steuerung der Belüftungseinrichtung und eine weiterreichende Untersuchung zum Einfluss dieses

Vorgehens auf die resultierende Bierqualität nötig machen, jedoch könnte eine für den Hefemetabolismus bessere O<sub>2</sub>-Versorgung erreicht werden.

## 5.2 Die Bedeutung des Knotenpunkts Acetaldehyd für den Hefemetabolismus und die Erfassung des PDH-Bypasses mittels Enzymaktivitätsmessung

Eine zielgerichtete Erfassung der Hefephysiologie und das Verständnis über Reaktionen im Hefestoffwechsel unter brautechnologischen Bedingungen stellen die Grundlage zur Optimierung des Gärungsprozesses dar. Diese Erfassung kann entweder über eine direkte Methode zur Messung von Stoffwechselaktivitäten oder über eine Analyse der für den Hefemetabolismus bedeutenden Stoffwechselprodukte erfolgen. Damit stellt eine Verknüpfung von Enzymaktivitätsmessungen als eine direkte Analysemethode von Stoffwechselreaktionen und die Durchflusszytometrie mit der Möglichkeit, verschiedene Intermediärprodukte des Hefemetabolismus zu bestimmen eine effektive Kombination zur Beurteilung des physiologischen Zustands der Hefe dar und zeigen den Einfluss der Prozessparameter bei Propagation und Gärung (vgl. Kapitel 2.3, 2.6, 3.2.1 und 3.2.2). Allgemeinere Methoden zur Beurteilung der Hefephysiologie, wie z.B. die Messung des ICPs, können zwar ebenfalls zu einer Optimierung des bestehenden Hefemanagements beitragen, aber geben nur unzureichend Aufschluss über die verantwortlichen Mechanismen im Hefestoffwechsel.

Die für eine zügige und weitreichende Vergärung der Würze maßgeblichen Eigenschaften der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen setzen sich aus einer intensiven Hefevermehrung während der ersten Gärtage und einer anschließend schnellen Umstellung auf hohe GL zusammen. Diese vermehrungs- und gärungsphysiologischen Eigenschaften der Hefe sind am Knotenpunkt Acetaldehyd miteinander verknüpft. An dieser Schlüsselposition im Stoffwechsel ist die Hefe in der Lage, sowohl Acetyl-CoA als Grundlage für die Lipidbiosynthese über den PDH-Bypass zu generieren und damit die unter brautechnologischen Bedingungen einzigen sauerstoffabhängigen Schritte bei der Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen zu versorgen, als auch über das Enzym ADH den Acetaldehyd zu Ethanol zu reduzieren. Mit dieser abschließenden Stoffwechselreaktion der Alkoholischen Gärung gewährleistet die Hefe die zur Aufrechterhaltung des Energiegewinns notwendige Regeneration von  $\text{NAD}^+$  (vgl. Kapitel 2.4.3 und 2.4.5).

Um diesen Teilbereich im Hefestoffwechsel unter den verschiedenen Bedingungen der Propagation und Gärung vollständig zu betrachten, mussten für die vorliegende Forschungsarbeit die bereits aus vorangegangenen Forschungsvorhaben vorhandenen Enzymaktivitätsmessungen der PDH, PDC und ADH um die Aktivitätsmessung der Enzyme des PDH-Bypasses erweitert werden. Die dazu notwendigen Reaktionsansätze zur Bestimmung der ALDH- und ACS-Aktivität konnten erfolgreich in die Routineanalytik integriert werden. Die dabei teilweise als gekoppelte Enzymreaktionen aufgebauten Reaktionsansätze basieren auf der Extinktionsdifferenz der Cofaktoren  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , deren Umsetzung spektralphotometrisch bestimmt werden kann und damit einen Aufschluss über die jeweilige Ausprägung der Stoffwechselaktivitäten gibt (vgl. Kapitel 3.2.1 und 4.2).

Die ersten Untersuchungen zum Expressionsverhalten der ACS im Hefestoffwechsel unter Gärungsbedingungen zeigten deutlich, dass einerseits die ACS-Aktivität eine weitaus größere Gewichtung gegenüber der für eine direkte oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlichen PDH im Stoffwechsel der Hefe hat und andererseits eine Korrelation zwischen der Aktivitätszunahme der ACS und einer auf der Synthese von ungesättigten Fettsäuren und Sterolen basierenden Hefevermehrung existiert. Unter Berücksichtigung einer zeitlichen Verzögerung, die auf die Umsetzung von Acetyl-CoA zu neuem Zellmaterial zurückzuführen ist, zeigte die ACS eine Aktivitätszunahme von ca. 60% während zeitgleich eine Hefevermehrung von 15 auf 50 Mio. Z/ml zu beobachten war. Dennoch scheint nicht die absolute Enzymaktivität der ACS ausschlaggebend zu sein, sondern vielmehr die Entwicklung der Stoffwechselaktivität des PDH-Bypasses.

Die Grundlage für die durch die ACS katalysierte Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat stellt die Umsetzung von Acetaldehyd durch die ALDH dar. Dabei zeigte die Aktivitätsmessung der ALDH bei einer konventionell hergeführten Hefe keine mit der Steigerung der ACS parallele Expression während der Gärung. Die im Vergleich zu den Gärungsenzymen generell deutlich geringere Stoffumsetzung der ALDH erfährt während der Angärphase eine starke Repression. Dies kann auf die Regulationsmechanismen der Enzymkinetik und die Gesamtheit der vor- und nachgeschalteten Stoffwechselwege zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur ADH besitzt die ALDH einen deutlich niedrigen  $k_m$ -Wert. Ein während der Angärung auftretender höherer Acetaldehydgehalt, dessen Bildung durch die PDC katalysiert wird, hemmt somit die ALDH. Erst mit abnehmender Konzentration an Acetaldehyd durch eine gesteigerte ADH-Aktivität in der zweiten Hälfte der Gärung findet auch eine erneute Expressionszunahme der ALDH statt.

Somit scheint die Hefevermehrung sowohl von der  $O_2$ -Verfügbarkeit als auch von der Limitierung des Intermediärproduktes Acetat aufgrund der Repression der ALDH-Aktivität während der Angärphase abhängig zu sein. Dennoch kann die Entwicklung der ACS-Aktivität als Indikator für einen ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Zustand der Hefe herangezogen werden, aber ermöglicht keine direkte Voraussage der Hefezellzahlentwicklung.

### **5.3 Die Propagation als Schlüssel zur Ausrichtung der Hefephysiologie und die Aminosäureverwertung unter aeroben Wachstumsbedingungen**

Die Zielsetzung der Hefepropagation wurde in der Vergangenheit vorwiegend auf das Erreichen einer anstelltauglichen Hefezellzahl begrenzt. Erst in den letzten Jahren konnten anhand von Vitalitätsmessungen der Hefe zusätzliche Erkenntnisse zum optimalen Entnahmezeitpunkt erarbeitet und der Propagationsverlauf besser auf die Anstelltechnologie und die Gärungsbedingungen abgestimmt werden. Mittels der flusszytometrischen Betrachtung der DNA-Verteilung und der Messung des ICP der Hefe wurden diese Fortschritte im Bereich des Hefemanagements unter brautechnologischen Bedingungen erreicht. Dennoch basieren die gewonnenen Kenntnisse meist auf empirischen Erfahrungswerten aus den nachfolgenden Gäreigenschaften. Die Hintergründe im Hefestoffwechsel wurden unterdessen nur unzureichend betrachtet, was dazu führte, dass zwar auch anlagentechnische Verbesserungen erreicht wurden, aber der Einfluss des grundlegenden Prozessparameters Sauerstoff auf die Hefephysiologie nur ungenügend untersucht wurde. Nur mit dem Verständnis der Reaktionen im Hefemetabolismus auf den vorhandenen Sauerstoff kann eine optimale Ausrichtung des Propagationsprozesses auf die nachfolgenden Gärungsbedingungen erfolgen. Dies kann dazu beitragen, die vorhandenen Kapazitäten bestmöglich auszulasten und eine gleichbleibend hohe Qualität des resultierenden Bieres zu erzeugen.

Um den Einfluss des Sauerstoffs auf den physiologischen Zustand der Hefe während der Propagation zu erfassen, wurden die Auswirkungen verschiedener Belüftungsvariationen auf den Hefemetabolismus untersucht. Dazu erfolgten neben den klassischen brautechnologischen Analysen (Extraktabbau, ZIS, pH) die Aktivitätsmessung der in der Alkoholischen Gärung zusammengefassten Enzyme PDC und ADH und die der im PDH-Bypass lokalisierten Enzyme ALDH und ACS. Weiterhin wurde eine flusszytometrische Bestimmung relevanter Stoffwechselmetaboliten der Hefe durchgeführt. Neben den Analysen des Glykogen-, Trehalose- und Neutrallipidgehalts war die Erfassung der DNA-Verteilung und somit des Zellzyklus zentraler Bestandteil zur Beurteilung der Hefephysiologie.

Da es sich bei der herkömmlichen Propagation um einen kontinuierlich belüfteten Prozess handelt, wurden zu Beginn dieser Forschungsarbeit ebenfalls Versuchsreihen mit einem kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Gehalt von 2 und 8 mg/l durchgeführt, um den grundlegenden Einfluss der O<sub>2</sub>-Konzentration auf den physiologischen Zustand der Hefe zu bestimmen. In diesen Versuchen konnte eine geringfügige Steigerung der in der G<sub>2</sub>/M-Phase befindlichen Hefen und leicht höhere Aktivität aller untersuchten Enzyme durch eine niedrigere O<sub>2</sub>-Konzentration beobachtet werden. Die absoluten Aktivitäten waren allerdings stark mit dem physiologischen Ausgangszustand der eingesetzten Hefe verknüpft. Dieser kann zumindest bei einer kontinuierlich belüfteten Propagation den Einfluss des Prozessparameters Sauerstoff überlagern.

Die Messungen des als Stressindikators geltenden Reservekohlenhydrates Trehalose hingegen zeigten keine signifikante Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Konzentration während der Propagation, so dass der absolute O<sub>2</sub>-Gehalt keinen Einfluss auf die Stresssituation der Hefe zu haben scheint. Zwar zeigten die Hefen Unterschiede in der Neutrallipidkonzentration zum Ende der Propagation, jedoch deuten die über den Propagationsverlauf gewonnenen Ergebnisse auf einen stetigen Auf- und Abbau der Lipidspeicher hin. Somit kann eine Analyse des Trehalose- und Neutrallipidgehalts als Steuerung des Propagationsprozesses nur bedingt herangezogen werden. Insgesamt jedoch wurde deutlich, dass mit einer niedrigeren O<sub>2</sub>-Konzentration geringfügig auf den Hefemetabolismus zugunsten einer Steigerung des gärungsphysiologischen Charakters Einfluss genommen werden kann. Die resultierenden Gäreigenschaften zeigten aber nur eine bedingt verbesserte Adaption der Hefe durch die unterschiedliche Belüftungsstrategie (vgl. Kapitel 5.4).

Vielmehr konnte anhand der Enzymaktivitätsmessungen festgestellt werden, dass sich die Stoffwechsellausprägungen der Hefe während der Propagation deutlich von denen unter Gärungsbedingungen unterscheiden. Die in Kapitel 4.2 zur Implementierung der Aktivitätsmessung der Enzyme des PDH-Bypasses durchgeführten Gärversuche zeigten eine deutliche Expression der ACS während der Vermehrungsphase der Hefe. Zudem kam es während der Angärung zu einer leicht reprimierten und über den Gärverlauf gesteigerten Aktivität der ALDH. Zusätzlich fand eine Zunahme der PDC- und ADH-Aktivitäten über den gesamten Gärverlauf statt. Unter Propagationsbedingungen mit kontinuierlicher Belüftung hingegen wurden alle Enzyme über den gesamten Prozess stark reprimiert, was auf die unterschiedlich Steuerungsmechanismen der jeweiligen Isoenzyme zurückzuführen ist. Allgemein sind bei der Beurteilung der Enzymaktivitäten die Kenntnisse der vorhandenen Isoenzyme und deren differente Steuerung im Hefemetabolismus von großer Bedeutung. So liegen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zwei Isoenzyme der an der Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligten ACS vor. Dabei wird das Isoenzym ACS1 als aerobes, welches durch hohe Zuckerkonzentrationen allerdings reprimiert wird, und das Isoenzym ACS2 als anaerobes beschrieben, das bei Abwesenheit von Sauerstoff durch Glucose und Ethanol exprimiert wird. Aufgrund dessen kommt es während der aeroben Propagation in einer Vollbierwürze - mit einem Gehalt an vergärbaren Zuckern von ca. 75 g/l - zu einer vollständigen Repression der ACS-Aktivität. Zudem steigt die Acetaldehydkonzentration während eines Propagationsprozesses deutlich über die bei einer Gärung erreichte Konzentration, was zu einer stärkeren Repression der ALDH führt und somit zusätzlich eine Verarmung an Acetat als Substrat der ACS forciert. Diese Unterschiede im Stoffwechsel bei Propagation und Gärung tragen allerdings nur bedingt zu einer übergeordneten Beschreibung eines vermehrungsphysiologischen oder gärungsphysiologischen Zustands der Hefe bei, da das Verhältnis der Gärungsenzyme und der des PDH-Bypasses während der Vermehrungsphase in der Gärung stark davon abweicht.

Parallel wurde eine Versuchsreihe zum Einfluss von Belüftungswechsel auf eine Hefepopulation unternommen. Die DNA-Verteilung der Hefen zeigte dabei, dass ein Wechsel

der Habitatbedingungen sowohl von aerob auf anaerob als auch von anaerob auf aerob eine Synchronisation der Population bewirkt und sich 30 min nach einer solchen Umstellung ein weitaus größerer Anteil der Hefepopulation in der G<sub>2</sub>-/M-Phase befindet als dies unter normalen Propagations- oder Gärungsbedingungen der Fall ist.

Diese Erkenntnisse gaben Anlass, den Propagationsprozess zu überdenken und mittels Intervallbelüftung sowohl die sauerstoffabhängigen Schritte im Hefemetabolismus zu ermöglichen und die Population zu synchronisieren, aber gleichzeitig die Enzymausstattung der Hefe hinsichtlich der nachfolgenden Gärungsbedingungen zu stimulieren. Diese Versuche mit unterschiedlich aufgebauten Intervallbelüftungen machten deutlich, dass eine effektive Beeinflussung der Enzymaktivitäten und damit der Hefephysiologie nur mit einer 8stündigen Belüftungspause erreicht werden kann (vgl. Kapitel 4.3.2). Während dieser anaeroben Phase steigerte die Hefe ihre ACS-Aktivität von 0,020 U/mg bis auf ein sonst nur unter Gärungsbedingungen beobachtetes Niveau von 0,067 U/mg. Im Vergleich zu einer kontinuierlich belüfteten Propagation kann so eine erhöhte Expression der ACS von bis zu 300% erreicht werden. Gleichzeitig exprimierte die Hefe auch die ALDH stärker, was zu einer konstanten und nicht wie bei der klassischen Propagation fallenden Aktivität führt.

Zwar kam es während der anaeroben Phase erwartungsgemäß zu einer Verzögerung in der Hefevermehrung, aber dieser Unterschied nivellierte sich mit Einsetzen der erneuten O<sub>2</sub>-Versorgung durch eine deutlich stärkere Hefevermehrung, als dies in einer kontinuierlich belüfteten Propagation zu beobachten wäre. Dies ist einerseits auf die durch den Belüftungswechsel erreichte Synchronität der Population und andererseits auf einen erhöhten Pool an anaeroben Vorstufen für die sauerstoffabhängigen Schritte der Lipidbiosynthese aufgrund der gesteigerten ACS-Aktivität zurückzuführen. Insgesamt wird so eine vergleichbare HZZ in dem für den Propagationsprozess angestrebten Zeitraum erreicht.

Die gesteigerten Enzymaktivitäten sanken zwar während der aeroben Phase im zweiten Teil der Propagation wieder leicht ab, blieben jedoch deutlich über den Aktivitäten einer kontinuierlich belüfteten Propagation. Dies spiegelte sich in einer besseren Adaption an die nachfolgenden Gärungsbedingungen wider und führte zu einem zügigeren Gärverlauf (vgl. Kapitel 4.5.1 und 5.4). Gleichzeitig zeigten die Versuche, dass der Zeitpunkt für die anaerobe Phase trotz zu erwartender Vorteile für die nachfolgende Gärung nicht beliebig gegen Ende des Propagationsprozesses verschoben werden kann, sondern in einem Zeitraum von 8 bis 16 h nach Start der Propagation einzuhalten ist.

Für eine weitreichende Vermehrung der Hefe während der Propagation und Gärung ist zusätzlich eine ausreichende Versorgung mit assimilierbarem Stickstoff ausschlaggebend. Dieser wird als FAN in der Würze zusammengefasst und summiert die vorliegenden Aminosäuren zu einem wichtigen Qualitätskriterium der Würze. Gleichzeitig existiert eine Gruppierung der verschiedenen Aminosäuren anhand ihrer Wertigkeit für den Hefemetabolismus (vgl. Kapitel 2.2 und 2.4.4). Diese am Beispiel einer o.g. Ale-Hefe unter Gärungsbedingungen aufgestellte Gruppierung wurde in der vorliegenden Arbeit auf ihre

Gültigkeit unter Propagationsbedingungen überprüft. Auf die Bestimmung von Cystein musste aufgrund der für diese Aminosäure nicht eindeutige Signifikanz der verwendeten Analyseverfahren mittels HPLC allerdings verzichtet werden.

Die Analyse der einzelnen Aminosäuren zeigte teilweise deutliche Abweichungen im Aufnahmeverhalten der Hefe unter Propagationsbedingungen gegenüber der unter Gärungsbedingungen postulierten Aufnahme. Mit den gewonnenen Ergebnissen erfolgte eine Einteilung der einzelnen Aminosäuren in sechs verschiedene Gruppen mit jeweils für mehrere Aminosäuren charakteristischen Konzentrationsverläufen.

Dabei wurden die Aminosäuren Asparagin, Histidin, Lysin, Methionin, Serin und Threonin kontinuierlich von Beginn an von der Hefe assimiliert. Während jedoch Asparagin, Lysin, Methionin und Serin vollständig von der Hefe aufgenommen wurden, fand die Aufnahme der Aminosäuren Histidin und Threonin nur bis zu einer Restkonzentration von ca. 1 mg/100 ml statt, und die Assimilation wurde im weiteren Verlauf der Propagation eingeschränkt. Bei den Aminosäuren Arginin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Tryptophan zeigte sich eine zu Beginn geringere, aber über den Verlauf zunehmende Verwertung durch die Hefe, wobei gegen Ende der Propagation noch geringe Konzentrationen dieser Aminosäuren im Propagationsmedium verblieben. Bei den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure kam es hingegen in der Anfangsphase der Propagation zu einer ausgeprägten Repression bei der Aufnahme. Im Weiteren wurden beide Aminosäuren allerdings innerhalb kurzer Zeit vollständig von der Hefe verwertet. Diese 13 Aminosäuren sind damit bei Anwesenheit hoher Zuckerkonzentrationen und unter aeroben Wachstumsbedingungen von größter Bedeutung für den Hefemetabolismus (vgl. Kapitel 4.3.3).

Die in der Bierwürze nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Aminosäuren Glutamin und Glycin zeigten zwar ähnliche Konzentrationsverläufe wie die Asparaginsäure und Glutaminsäure, aber die Aufnahme durch die Hefe fiel nach der Repressionsphase deutlich geringer aus, obwohl Glutamin als universeller Stickstofflieferant für die Hefe angesehen werden kann. So könnte eine Anreicherung dieser Aminosäure durch eine veränderte Sortenauswahl oder die Verwendung anderer Rohmaterialien zu einer besseren Versorgung der Hefe beitragen (vgl. Kapitel 2.2, 2.4.4 und 4.3.3). Die übrigen Aminosäuren Alanin, Valin, Tyrosin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure wurden nur bei fast vollständiger Limitierung der übrigen Aminosäuren vom Hefemetabolismus verwertet. Dies lässt darauf schließen, dass diese vier Aminosäuren eine untergeordnete Bedeutung für den Hefemetabolismus haben. Allerdings liegen diese Aminosäuren jeweils in einem Konzentrationsbereich von 8 bis 12 mg/l100 ml in der Würze vor und machen somit einen großen Anteil des für die Hefe kalkulierten Stickstoffpools aus. Selbst unter Propagationsbedingungen, bei dem der FAN nahezu vollständig aufgezehrt wird, liegt noch eine Gesamtkonzentration dieser vier Aminosäuren von ca. 20 mg/100 ml vor, was annähernd 10% des Ausgangs-FANs entspricht. Zusammen mit den in der Tabelle 49 dargestellten Abweichungen im Aufnahmeverhalten zu der allgemein gültigen Gruppierung ergibt dies einen Anlass zur Neubewertung der

Stickstoffausstattung der Würze, um dieses Qualitätskriterium besser an die für den Hefemetabolismus bedeutsamen Aminosäuren zu orientieren.

**Tabelle 49: Unterschiede im Aufnahmeverhalten der Hefe unter Propagationsbedingungen gegenüber der klassischen Gruppierung der Aminosäuren**

| Aminosäure(n) | Klassische Gruppierung                                                                | Aufnahme der Hefe unter Propagationsbedingungen                                     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Asn, Lys, Ser | Gruppe 1:<br>Sofortige und vollständige Aufnahme                                      | Sofortige und vollständige Aufnahme                                                 |
| Thr           |                                                                                       | Sofortige aber nicht vollständige Aufnahme                                          |
| Asp, Glu      |                                                                                       | Nicht sofortige aber vollständige Aufnahme                                          |
| Gln           |                                                                                       | Schwache Repressionsphase und geringe Assimilation aufgrund niedriger Konzentration |
| Arg           |                                                                                       | Weder sofortige noch vollständige Aufnahme                                          |
| Ile, Leu      | Gruppe 2:<br>Langsame aber kontinuierliche Aufnahme über die Gärung                   | Langsame aber kontinuierliche Aufnahme                                              |
| Met           |                                                                                       | Sofortige und vollständige Aufnahme                                                 |
| His           |                                                                                       | Sofortige aber nicht vollständige Aufnahme                                          |
| Val           |                                                                                       | Ausgeprägte Repressionsphase und geringe Aufnahme                                   |
| Ala, Tyr, Gly | Gruppe 3:<br>Aufnahme erfolgt erst nachdem die Gruppe 1 vollständig assimiliert wurde | Ausgeprägte Repressionsphase und geringe Aufnahme                                   |
| Phe, Trp      |                                                                                       | Schwache Repressionsphase und weitreichende Aufnahme                                |

Die grün markierten Aminosäuren zeigen, dass es nur bei acht Aminosäuren zu einer vollständigen Übereinstimmung zwischen dem in der Literatur beschriebenen Aufnahmeverhalten und den hier unter Propagationsbedingungen gewonnen Ergebnissen kam. Diese Abweichungen können dabei sowohl durch die aeroben Prozessbedingungen der Propagation als auch durch den physiologischen Zustand der Hefe und die Verwendung eines anderen Hefestammes begründet sein.

Diese neue und detaillierte Einteilung der Aminosäuren macht jedoch eine praktische Umsetzung einer neuen Berechnungsgrundlage des FAN als Teil der Qualitätsbestimmung der Würze nur schwer möglich. Dafür wurden die Aminosäuren, wie aus der Tabelle 50 ersichtlich, in Abhängigkeit des Aufnahmeverhaltens der Hefe nochmals zu vier Gruppen mit charakteristischen Eigenschaften zusammengefasst. Die dabei doppelt auftretenden Aminosäuren wurden sowohl von Beginn an als auch vollständig assimiliert und sollten daher mit einer höheren Gewichtung in die Berechnung des FAN einfließen.

**Tabelle 50: Einteilung der Aminosäuren in Abhängigkeit der Aufnahme durch die Hefe unter Propagationsbedingungen**

| Zügige Assimilation zu Beginn der Propagation | Vollständige Assimilation während der Propagation | Weitreichende Assimilation während der Propagation | Geringe Assimilation während der Propagation                            |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>Asn, His, Lys, Met, Ser, Thr</b>           | <b>Asn, Asp, Glu, Lys, Met, Ser</b>               | <b>Arg, His, Ile, Leu, Phe, Trp, Thr</b>           | <b>Ala, Gln, Gly, Tyr, Val<br/><math>\gamma</math>-Aminobuttersäure</b> |

Die Aminosäuren Alanin, Glutamin, Glycin, Tyrosin, Valin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure hingegen sind entweder aufgrund der geringen Assimilation durch die Hefe oder der niedrigen Konzentrationen zumindest unter Propagationsbedingungen nur bedingt mit in die Berechnung des FAN einzubeziehen. Insgesamt veranlassten diese abweichenden Erkenntnisse über das Aufnahmeverhalten der Hefe die Assimilation des FAN auch unter Gärungsbedingungen und in Abhängigkeit der Hefephysiologie zu überprüfen. Die aus den Versuchsgärungen erzielten Ergebnisse werden in Kapitel 5.5 diskutiert.

## 5.4 Der physiologische Zustand der Hefe unter Gärungsbedingungen in Abhängigkeit der Würzebelüftung

Um den Einfluss des physiologischen Zustandes der Hefe auf die Gäreigenschaften und die Bierqualität besser bewerten zu können, war es von großer Bedeutung, vorab mögliche Unterschiede zwischen einzelnen Hefestämmen aufzuzeigen. Zudem kann dies zur Beantwortung der in vielen Forschungsarbeiten diskutierten Fragestellung beitragen, ob der Einsatz eines anderen Hefestammes eine höhere Bedeutung für die Stabilität des Bieres besitzt, als die technologische Beeinflussung der Hefephysiologie. Dazu wurden unter identischen Prozessbedingungen sechs u.g. Hefestämme parallel hergeführt und auf ihre Gäreigenschaften untersucht sowie die resultierende Bierqualität analysiert. Zusätzlich wurden bei drei dieser Hefestämme die Enzymaktivitäten der PDC, ADH, ALDH und ACS während der Gärung gemessen, um die genetisch bedingte Variation in den Stoffwechselausprägungen zwischen den Hefestämmen zu erfassen.

Dabei zeigte sich, dass vier der sechs Hefestämme eine weitgehend vergleichbare Zellzahlentwicklung unter Gärungsbedingungen aufwiesen. Ausgehend von einer Anstellzellzahl von ca. 15 Mio. Z/ml erreichten diese nach etwa 72 h mit ca. 40 Mio. Z/ml ihr Zellzahlmaximum. Nur bei dem Stamm W 34/78 konnte mit einem Maximum von ca. 60 Mio. Z/ml ein höheres Hefewachstum in den ersten beiden Gärtagen und bei dem als Staubhefe charakterisiertem Stamm W 66/70 ein weitreichenderes Hefewachstum bis zum dritten Gärtag auf eine HZZ von ca. 50 Mio. Z/ml beobachtet werden. Das Absetzverhalten der Hefen zum Ende der Gärung wies allerdings keine signifikanten Unterschiede auf.

Auch beim Extraktabbau kam es zu Abweichungen zwischen den Gärungen der einzelnen Stämme. So erreichten die Gärungen mit den Stämmen W 34/78 und W 66/70 den angestrebten GVG bereits nach 144 bzw. 168 h und zeigten damit einen deutlich schnelleren Extraktabbau als die übrigen Stämmen. Bei einer Hauptgärtemperatur von 10 °C konnten die Stämme W 194 und der mit dem Stamm W 34/78 eng verwandte W 34/70 den vergärbaren Extrakt erst in der anschließenden Reifungsphase weitgehend umsetzen. Dieser große Unterschied zwischen zwei eng verwandten Stämmen lässt trotz der parallelen Versuchsdurchführung bereits auf die große Bedeutung feiner Unterschiede in der Hefephysiologie für eine Optimierung des zentralen Prozesses der Gärung schließen.

Die berechneten GL zeigten, dass die Hefen aller Stämme zu Beginn der Gärungen und somit während der jeweiligen Vermehrungsphase die höchste Extraktmenge pro Zelle umsetzten. Der Grund dafür liegt neben der Zuckerverwertung vor allem in der Aufnahme der in der Würze vorliegenden Wachstoffsstoffe, wie u.a. den Aminosäuren und den Lipide. Dass es während dieser Zeit allerdings nur zu einem geringen absoluten Extraktabbau kommt, hängt mit der in diesem Stadium noch geringen Menge an Hefezellen zusammen. Wie am Beispiel der Hefen vom Stamm W 34/78 erkennbar, könnte eine zu Beginn der Gärung hohe GL auch ein Anhaltspunkt für einen ausgeprägten vermehrungsphysiologischen Charakter der Hefen

sein. Diese Hefen wiesen am 1. Gärtag mit  $0,059 \Delta\text{Gew.}\%/\text{Mio. Z}^*h$  die höchste GL auf und zeigten im weiteren Verlauf die schnellste und weitreichendste Hefevermehrung.

Anhand der GL ließ sich zudem beobachten, dass es zum Ende der Vermehrungsphase zu einer Umstellung im Stoffwechsel der Hefe kommt. Da der Extraktabbau pro Hefezelle nach dem 2. Gärtag deutlich absinkt, und erst über die Hauptgärung wieder zunimmt, ist daran eine nährstoffbedingte Umstellung von einem ausgeprägten vermehrungsphysiologischen zu einem gärungsphysiologischen Zustand zu erkennen.

Zwar lagen die absoluten GL aller Hefen in den ersten beiden Gärtagen am höchsten, aber für eine zügige Vergärung sollten neben einer hohen Zellzahl vor allem die GL am 3. bis 5. Gärtag entscheidend sein. So zeigten auch hier die Hefen vom Stamm W 34/78 mit  $0,045 \Delta\text{Gew.}\%/\text{Mio. Z}^*h$  zeitweise den größten Stoffumsatz. Aber auch die GL der Hefen vom Stamm W 69 wiesen während der Hauptgärung ein mit dem Stamm W 34/78 vergleichbares Niveau auf. Aufgrund dessen erreichten die Hefen dieses Stammes bei einer durchschnittlichen Zellzahlentwicklung den zügigsten Gärverlauf. Damit sind sowohl eine weitreichende Vermehrung zu Beginn und eine hohe GL während der Hauptgärphase ausschlaggebend für einen zügigen Gärverlauf.

Die Aktivitätsmessungen der untersuchten Schlüsselenzyme konnten zeigen, dass generell keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen über den Gärverlauf auftreten und somit eine über die Prozessparameter erreichte Beeinflussung der Hefephysiologie auch auf andere Hefestämme übertragbar ist. Nur die Hefen vom Stamm W 69 zeigten eine gegenüber den anderen getesteten Stämmen höhere Aktivität der ADH während der Hauptgärphase. So erreichte die ADH-Aktivität am 3. bis 5. Gärtag mit ca.  $0,60 \text{ U/mg}$  eine um ca.  $0,20 \text{ U/mg}$  höhere Aktivität, was allerdings deutlich unter den im Folgenden beschriebenen Variationen der Enzymexpressionen in Abhängigkeit der angewandten Technologie liegt. Dennoch konnte die erhöhte Aktivität mit der ebenfalls am 4. und 5. Gärtag beobachteten höheren GL dieser Hefen in Verbindung gebracht werden und gibt einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer hohen Aktivität der Gärungsenzyme und der GL einer Hefe.

Um den physiologischen Zustand der Hefen weitgehend beschreiben zu können, wurden ebenfalls Veränderungen in den Enzymexpressionen über die Anzahl der Führungen und der damit verbundenen Adaption an die Gärungsbedingungen und die Alterung der Hefepopulation untersucht. Dabei wurden signifikante Entwicklungen in den Enzymaktivitäten beobachtet. So zeigt die PDC-Aktivität einer frisch hergeführten Hefe eine ausgeprägte Repression während der Angärphase, was auf den vorhandenen Sauerstoff beim Anstellen und die Adaption an die veränderten Nährstoffbedingungen insbesondere der Zucker zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf findet eine stetige Expressionszunahme dieses Enzyms statt. Diese Regulationseigenschaften der PDC scheinen jedoch über die Führungen stetig nachzulassen, bzw. sich den Habitatbedingungen anzupassen, so dass sowohl die Repressionsphase während der Angärung, als auch die Expressionssteigerung im

Anschluss schwächer ausfällt. Dabei kann die geringere Repression während der Vermehrungsphase auch mit den jeweiligen Ausgangsaktivitäten der PDC zum Zeitpunkt des Anstellens in Verbindung gebracht werden. So konnte bei niedrigeren Ausgangsaktivitäten eine schwächere Repression festgestellt werden als bei höheren Aktivitäten der Stellhefe. Die in einer nachfolgenden Führung geringere Expression der PDC im 2. Teil der Gärung kann bis zu einer abnehmenden PDC-Aktivität zum Ende der Gärung und somit zu einer erneut niedrigeren Ausgangsaktivität der Hefen in der darauf anschließenden Führung führen. Somit stellt sich über eine längere Adaption an die brautechnologischen Bedingungen ein nahezu konstantes und gleichbleibendes Niveau der PDC-Aktivität ein. Dies kann somit zu einer Charakterisierung eines ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustands herangezogen werden.

Die unter Herführungsbedingungen stark reprimierte ADH-Aktivität der Hefe erfährt in der 1. Führung unter Gärungsbedingungen eine stetige Zunahme über den gesamten Gärverlauf. Zwar kann die ADH-Aktivität von der Hefe nicht vollständig über die Lagerphase zwischen den Führungen konserviert werden, dennoch kommt es auch in der anschließenden Gärung zu einer weiteren Zunahme bis auf ein temporäres Aktivitätsmaximum. In den darauffolgenden Führungen zeigt die ADH, vermutlich ebenfalls aufgrund der höheren Ausgangsaktivitäten der Stellhefe und einer Adaption an die jeweils neuen Nährstoffbedingungen, beim Anstellen eine Repressionsphase während der Vermehrungsphase. Erst im 2. Abschnitt der Gärung steigert die Hefe ihre ADH-Aktivität wieder. Damit besitzt eine Hefe mit ausgeprägtem gärungsphysiologischem Charakter einerseits eine höhere Ausgangsaktivität der ADH, aber gleichzeitig unterliegt sie größeren Schwankungen über den Gärverlauf.

Die ALDH weist vor allem in der 1. Führung eine auf die Acetaldehydkonzentration und den niedrigen  $k_m$ -Wert dieses Enzymes zurückzuführende Repression während der ersten beiden Gärtage auf, bevor es wieder zu einer kontinuierlichen Expressionszunahme kommt. Dieses Verhalten kann durch eine Korrelation mit den ADH-Aktivitäten erklärt werden. Die ebenfalls in der zweiten Hälfte der Gärung ansteigende ADH-Aktivität verringert bei einer in diesem Zeitraum konstanten PDC-Aktivität die Konzentration an Acetaldehyd und trägt so mit zu einer Aktivitätszunahme der ALDH bei. Die nachfolgende Steigerung der ALDH-Aktivität bis zum Ende der Gärung, die auch an der Reduktion des Acetaldehyds während der Reifungsphase unter den Geschmacksschwellenwert beteiligt ist, führt zu einer höheren Ausgangsaktivität in der darauffolgenden Führung. Aufgrund der höheren ADH-Aktivitäten der Erntehefen und einer nahezu konstanten PDC-Aktivität findet in den darauffolgenden Führungen eine geringere Repression der ALDH über die Angärphase statt. Zwar kommt es während der Hefevermehrung zu Schwankungen in der ALDH-Aktivität, aber in der Hauptgärung ist ein den übrigen Enzymen ähnliches und konstantes Aktivitätsniveau zu beobachten. Somit scheint auch die Steuerung der ALDH-Aktivität mit zunehmendem gärungsphysiologischem Charakter der Hefe zu einer konstanteren, auf höherem Niveau befindliche Aktivität zu führen.

Die ACS-Aktivität zeigt mit zunehmender Adaption an die Gärungsbedingungen und der Alterung der Hefepopulation ebenfalls eine stetige Entwicklung in ihrem Verlauf. Während das Expressionsmaximum nach der Herführung am 2. bis 3. Gärtag erreicht wird, verschiebt sich diese Zunahme im Gärverlauf zeitlich nach vorne, so dass die maximale ACS-Aktivität einer bereits geführten Hefe schon am 1. Gärtag auftritt. Mit weiterer Adaption findet die deutlichste Expressionssteigerung bereits in den ersten 12 h der Gärung statt und es kommt zu Unterschieden in der Ausprägung des Aktivitätsmaximums. Während die Hefen in einem vermehrungsphysiologischen Zustand diese hohe Aktivität für ca. 24 h aufwiesen, führt ein ausgeprägter gärungsphysiologischer Charakter der Hefe zu einer längeren Phase mit maximaler ACS-Aktivität, die erst gegen Ende der Gärung wieder abfällt. Dies führt insgesamt zu einer sowohl zu Beginn als auch gegen Ende der Gärung vergleichbaren ACS-Aktivität der Hefen unabhängig von der Anzahl der durchlaufenen Führungen.

Neben der Anzahl der Führungen, die einen deutlichen Einfluss auf die Entwicklung der einzelnen Enzyme haben, kommt dem jeweilig verwendeten Anstellverfahren eine ebenfalls große Bedeutung in der Steuerung des Hefemetabolismus zu. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gärungsenzyme PDC und ADH als auch die Enzyme des PDH-Bypasses mit zunehmendem Sudrhythmus während eines Drauflassverfahrens, d.h. längeren Pausen zwischen den nachfolgenden Suden bei Füllen eines Gärtanks, eine verstärkte Expression erfuhren. So konnte durch die Verwendung eines derartigen Anstellverfahrens bei der PDC eine Steigerung der Aktivität um bis zu 60% und bei der ADH bis zu 100% zum Ende der Gärung festgestellt werden. Die ACS-Aktivitäten zeigten ebenfalls einen weitreichenden Einfluss des Sudrhythmus. So kam es mit längeren Pausen zwischen den Suden zu einer deutlich gesteigerten Aktivität der ACS. Diese um ca. 60% gesteigerte Expression ist vermutlich auf das anaerobe Isoenzym der ACS zurückzuführen. Dabei sind sowohl die Abwesenheit von Sauerstoff als auch die frischen Wuchsstoffe der Würze und eine bereits geringere Konzentration an Ethanol positiv für die zusätzliche Expression der ACS zu bewerten. Zwar wurde auch die ALDH mit längeren Pausen zwischen den Suden und zunehmender Gärdauer stärker exprimiert, allerdings fielen die Unterschiede hierbei deutlich geringer aus.

Die Hefeherführung hat, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, einen bedeutenden Einfluss auf die Ausrichtung des Hefestoffwechsels und kann als Instrument für eine bessere Adaption an nachfolgenden Gärungsbedingungen genutzt werden. Zusätzlich steht mit der Würzebelüftung eine Möglichkeit zu Verfügung, die als Steuerung der Hefephysiologie eingesetzt werden kann. Allerdings muss die Menge und der Zeitpunkt der O<sub>2</sub>-Versorgung auf den physiologischen Ausgangszustand der Hefe abgestimmt werden.

Die in Kapitel 4.5.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bei einer frisch hergeführten Hefe unter Beachtung der grundlegenden Prozessführung einer Propagation vollständig auf eine zusätzliche Versorgung mit Sauerstoff während des Anstellvorganges durch die Würzebelüftung verzichtet werden kann und dennoch eine zügigere Vergärung erreicht wird. Zwar kommt es bei einem Verzicht auf die Würzebelüftung zu einem bis zu

30 Mio. Z/ml geringeren Hefewachstum während der Gärung, aber wie anhand der GL der Hefen in diesen Versuchen ersichtlich, findet eine schnellere und weitreichendere Umstellung von einem vermehrungsphysiologischen zu einem gärungsphysiologischen Zustand statt. In der Folge treten die zwar in niedrigeren Konzentrationen vorliegenden Hefen in einer unbelüfteten Gärung einerseits wesentlich früher in die Hauptgärphase ein und setzen andererseits deutlich mehr Extrakt pro Zelle um als dies bei zusätzlich belüfteten Hefen der Fall war. Mit einem so optimierten Verfahren kann der angestrebte VG bis zu 20 h früher erreicht werden und somit zu einer Kapazitätserhöhung des Gärkellers ohne zusätzliche Investitionskosten von über 10% beitragen.

Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der an die Propagationsversuche PI0 und PI8 gekoppelten Gärungen, dass mit Hilfe einer Intervallpropagation - mit 8stündiger Belüftungspause in einem Zeitraum von 8 bis 16 h nach Propagationsstart - der physiologische Zustand der Hefe zusätzlich auf die nachfolgenden Gärungsbedingungen ausgerichtet werden kann. Es kann zwar auch hier auf eine Belüftung der Hefe zugunsten einer schnelleren und weitreichenderen Umstellung im Hefemetabolismus verzichtet werden, aber der Unterschied im Extraktabbau zwischen den belüfteten und unbelüfteten Gärungen fällt wesentlich geringer aus. Die insgesamt verbesserte Adaption und die hohe Synchronität zum Zeitpunkt des Anstellens einer mittels Intervallbelüftung hergeführten Hefe bewirkt ein schnelleres Hefewachstum. Ein solches Propagationsverfahren trägt somit einerseits generell zu einer konstanteren und reproduzierbareren Prozessführung bei und andererseits kann im Falle einer betrieblich bedingten geringen Hefeernte die Würzebelüftung als Instrument genutzt werden, ohne weitreichende Folgen für die Gärdauer die Hefeernte zu erhöhen.

In einer weiteren Versuchsreihe mit dem Ziel, den Propagationsprozess in Kombination mit der Würzebelüftung auf eine bessere Adaption der Hefe an die Gärungsbedingungen abzustimmen, wurden Hefen aus zwei kontinuierlich belüfteten Propagationen mit einem unterschiedlichen  $O_2$ -Gehalt von 2 und 8 mg/l, sowie aus einer intervallbelüfteten Propagation mit einer 8stündigen Belüftungspause über vier Führungen hinweg getestet. Die zuvor aus Propagationsversuchen gewonnenen Ergebnisse führten zu einer Verschiebung der Belüftungspause in das letzte Drittel des Propagationsprozesses. Die bereits in Kapitel 5.3 diskutierten Ergebnisse dieser Propagationen zeigten jedoch, dass der positive Effekt der nach hinten verschobenen Belüftungspause schwächer ausfiel als dies bei einer früheren Unterbrechung der  $O_2$ -Versorgung zu beobachten war. Um die Bedeutung der Würzebelüftung zu untersuchen, wurden aus jeder Propagation eine belüftete und eine unbelüftete Gärung angestellt.

In dieser Versuchsreihe konnte jedoch in keiner Gärung der 1. Führung der zuvor beobachtete positive Effekt einer zusätzlichen  $O_2$ -Versorgung auf das Wachstum der Hefe nachgewiesen werden. Weder die Bestimmung der HZZ noch die Analyse der DNA-Verteilungen gaben einen Hinweis auf eine signifikant höhere Vermehrung der belüfteten Hefen. Vielmehr wiesen die Hefen in den unbelüfteten Gärungen sowohl bei den ACS-Aktivitäten als auch bei den in der  $G_2$ -/M-Phase befindlichen Zellen teilweise leicht höhere

Werte auf. Bei einem Vergleich der Gär- und Vermehrungseigenschaften der Hefen aus den jeweiligen Propagationen muss grundsätzlich der unterschiedliche physiologische Ausgangszustand vor der Propagation mit berücksichtigt werden.

Im Falle der kontinuierlich belüfteten Propagationen zeigten die zu Gärbeginn zusätzlich belüfteten Hefen dennoch einen geringfügig schnelleren Extraktabbau. Gleichzeitig wiesen die GL allerdings unabhängig von der Belüftung annähernd die gleichen Werte auf. Im Vergleich der beiden kontinuierlich belüfteten Propagationen erreichten die Hefen aus der mit 8 mg O<sub>2</sub>/l durchgeführten Propagation den angestrebten GVG etwas früher. Die dafür mitverantwortlichen schwachen GL der Hefen aus der mit einem kontinuierlichen O<sub>2</sub>-Gehalt von 2 mg/l belüfteten Propagationen korrelierten mit einer geringen Zunahme in der Expression der Gärungsenzyme.

Nur bei der intervallpropagierten Hefe konnte trotz der weniger starken Beeinflussung der Hefephysiologie durch die verschobene Belüftungspause deutlich bessere Gäreigenschaften der unbelüfteten Hefe sowohl gegenüber der belüfteten als auch gegenüber den Gäreigenschaften der aus den kontinuierlichen Propagationen stammenden Hefen nachgewiesen werden. Dies war in einer deutlich höheren Aktivität der Gärungsenzyme PDC und ADH begründet, die über den gesamten Gärverlauf fast 0,20 U/mg und damit 200% im Falle der PDC und ca. 0,50 U/mg und damit bis zu 100% im Falle der ADH über den Aktivitäten der belüfteten Hefen lagen.

Zur besseren Darstellung des physiologischen Gesamtzustands der Hefen wurden die Verhältnisse aus den Gärungsenzymen PDC und ADH und den für die Hefevermehrung bedeutsamen Enzymen ALDH und ACS über den Gärverlauf gebildet. Dabei wurde deutlich, dass die mit der niedrigeren O<sub>2</sub>-Versorgung hergeführten Hefen ein vergleichsweise geringes und zudem konstantes Verhältnis zwischen den Stoffwechselwegen aufwiesen. Daraus lässt sich eine nicht konsequente Umstellung im Hefemetabolismus zugunsten eines hohen Zuckerumsatzes ableiten. Bei den Hefen aus der mit 8 mg/l propagierten Hefe hingegen fand eine stetige Zunahme im Verhältnis statt. Somit kam es zu einer kontinuierlichen Steigerung des gärungsphysiologischen Charakters dieser Hefen. Bei den intervallpropagierten Hefen konnte zwar ebenfalls eine kontinuierliche Ausrichtung im Stoffwechsel über die gesamte Hauptgärphase festgestellt werden, allerdings fand vor allem bei den unbelüfteten Hefen die Umstellung im Stoffwechsel zugunsten der Gärungsenzyme bereits zu Beginn statt, so dass diese Hefe bereits ab dem 2. Gärtag einen ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand aufwiesen.

Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Gärungen, die ebenfalls mit einer aus einer intervallbelüfteten Propagation stammenden Hefe angestellt wurden, bestätigt sich somit die mittels Belüftungspausen erreichte bessere Adaption der Propagationshefe an die nachfolgenden Gärungsbedingungen. Bei einer Abstimmung der Würzebelüftung auf die Hefephysiologie kann zudem eine deutliche Verbesserung der

Gäreigenschaften erreicht werden. Zusätzlich kann über diese Anpassungen ein kontinuierlicher und reproduzierbarer Prozess geschaffen werden.

Auch in der 4. Führung konnte kein signifikanter Einfluss der zusätzlichen Würzebelüftung auf das Hefewachstum festgestellt werden. Zwar zeigten die belüfteten Hefen nach 12 h teilweise eine leicht höhere ACS-Aktivität und einen höheren Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>-/M-Phase, dennoch blieben die HZZ über die Gärverläufe sowohl zwischen den unbelüfteten und belüfteten, als auch zwischen den aus verschiedenen Propagationen stammenden Hefen vergleichbar.

Insgesamt konnte eine vergleichbare Entwicklung in den Enzymaktivitäten wie bereits bei den Untersuchungen zum Einfluss mehrmaligen Führens beobachtet werden. So zeigten die ACS-Aktivitäten, wenn überhaupt, nur zu Beginn der Gärung eine Expressionszunahme und blieben danach auf einem konstanten Niveau. Auch die Schlüsselenzyme ADH und ALDH wiesen die bereits zuvor beschriebene Entwicklung auf und erreichten in allen Gärungen ein vergleichbares Aktivitätsniveau. Während allerdings die PDC-Aktivitäten bei den Hefen aus den kontinuierlich belüfteten Propagationen über den Gärverlauf stiegen und gegen Ende wieder abfielen, blieb die Aktivität der intervallbelüfteten Hefen konstant auf einem durchschnittlichen Niveau, was auf einen ausgeprägteren gärungsphysiologischen Zustand dieser Hefen hindeutet. Beim Extraktabbau sowie bei dem Verhältnis der Gärungsenzyme zu denen des PDH-Bypasses wiesen die Hefen aus den kontinuierlich belüfteten Propagationen keine Unterschiede zwischen den zusätzlich belüfteten und unbelüfteten Hefen auf und auch die Gäreigenschaften und GL waren nahezu identisch. Die Hefen erreichten am 7. Gärtag einen scheinbaren Restextrakt von ca. 4,0 Gew.-%, was noch leicht oberhalb des angestrebten GVG lag. Im gleichen Zeitraum setzten die aus der intervallbelüfteten Propagation ca. 0,5 Gew.-% mehr Extrakt um und erreichten den angestrebten GVG. Zudem wurde bei den Hefen aus der intervallbelüfteten Propagation zu Beginn der 4. Führung ein besonders hoher Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>-/M-Phase von 76,2% gemessen, der sonst nicht beobachtet werden konnte.

Dass sich eine zusätzliche Würzebelüftung nicht immer positiv auf die Hefevitalität auswirkt und einen schlechten physiologischen Zustand nicht zwangsläufig verbessert, zeigten auch die Gärungen mit intensiv propagierten Hefen, die über eine optimale Nährstoffversorgung hinaus bis zu Zellzahlen von 200 Mio. Z/ml vermehrt wurden. Auch hier konnte die Belüftung aller Sude in einem Drauflassverfahren keine signifikante Verbesserung der Gäreigenschaften gegenüber den unbelüfteten Hefen bringen. Dementsprechend ist die gesamte Abstimmung des Hefemanagements von der Herführung bis hin zur Erntehefebehandlung der Schlüssel für eine Optimierung des zentralen Prozessschrittes der Gärung.

## **5.5 Die Aminosäureverwertung unter anaeroben Wachstumsbedingungen in Abhängigkeit der Hefephysiologie**

Die in den Kapiteln 4.3.2 und 5.3 beschriebene Aminosäureaufnahme der Hefe unter Propagationsbedingungen wich stark von dem allgemein postulierten Aufnahmeverhalten ab, so dass dies zum Anlass genommen wurde, die Gültigkeit der Gruppierung auch unter Gärungsbedingungen zu überprüfen. Die Gärungen im Anschluss an die unter Kapitel 4.3.1 durchgeführten Propagationen wurden genutzt, um die Konzentrationsabnahme und damit das Assimilationsverhalten der Hefe zu analysieren. Gleichzeitig konnte so überprüft werden, ob eine Übertragung der Aminosäureverwertung von der Propagation auf die Gärung möglich ist.

Um den Einfluss der Hefephysiologie mit in die Analyse einfließen zu lassen, wurde zudem das Aufnahmeverhalten in unterschiedlich belüfteten Drauflassverfahren untersucht, und gleichzeitig fand in der 3. Führung dieser Versuchsreihe eine Prüfung möglicher Veränderungen in der Assimilation mit zunehmendem gärungsphysiologischen Zustand der Hefe statt. Zusätzlich wurde das Aufnahmeverhalten einer intensiv propagierten Hefe untersucht. Diese über die vollständige Limitierung des FAN hinaus durchgeführte Vermehrung der Hefen diente dazu, einen im Vorfeld aufgetretenen Mangel an Stickstoffsubstanzen zu simulieren und die Reaktionen auf die erneute Versorgung mit Aminosäuren zu erfassen.

Wie unter Kapitel 5.3 für die Bedingungen des Propagationsprozesses beschrieben, musste auch unter Gärungsbedingungen eine Neugruppierung der Aminosäuren vorgenommen werden. Obwohl es bei einigen Aminosäuren zu Übereinstimmungen mit der in der Literatur vorgenommenen Einteilung kam, wich, wie aus der Tabelle 51 ersichtlich, bei einem Großteil der Aminosäuren das Assimilationsverhalten der untersuchten Hefen ab. Auch das Aufnahmeverhalten der Hefe unter Propagationsbedingungen war nur teilweise auf die Aufnahme der Hefe in der Gärung übertragbar. So kam es bei allen Aminosäuren innerhalb der ersten 24 h zu einer Abnahme in der Konzentration. Jedoch konnte bei den Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure, Serin und Threonin eine sehr zügige und über den Gärverlauf vollständige Verwertung durch die Hefe beobachtet werden. Zwar wurden auch die Aminosäuren Glutaminsäure, Leucin, Lysin, Methionin und Phenylalanin in großem Umfang von Beginn an von der Hefe aufgenommen, aber nach 24 h, also noch vor Ende der Vermehrungsphase, sank die Aufnahme stark ab. Allerdings korreliert die zeitliche Umstellung in der Assimilation dieser Aminosäuren mit dem für die ACS beobachteten Aktivitätsmaximum. So scheint auch die Aminosäureverwertung der Hefe an die Voraussetzungen der Lipidbiosynthese gekoppelt zu sein.

Tabelle 51: Unterschiede im Aufnahmeverhalten der Hefe unter Gärungsbedingungen gegenüber der klassischen Gruppierung der Aminosäuren

| Aminosäure(n)      | Klassische Gruppierung                                                                | Aufnahme der Hefe unter Gärungsbedingungen                        |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Asn, Asp, Ser, Thr | Gruppe 1:<br>Sofortige und vollständige Aufnahme                                      | Sofortige und vollständige Aufnahme                               |
| Glu, Lys, Gln, Arg |                                                                                       | Sofortige aber nicht vollständige Aufnahme                        |
| Ile                | Gruppe 2:<br>Langsame aber kontinuierliche Aufnahme über die Gärung                   | Langsame aber kontinuierliche Aufnahme über die Gärung            |
| Leu, Met           |                                                                                       | Sofortige aber nachlassende Aufnahme über die Gärung              |
| Val                |                                                                                       | Sofortige aber geringer und nachlassende Aufnahme über die Gärung |
| Ala                | Gruppe 3:<br>Aufnahme erfolgt erst nachdem die Gruppe 1 vollständig assimiliert wurde | Langsame aber kontinuierliche Aufnahme über die Gärung            |
| Phe                |                                                                                       | Sofortige aber nachlassende Aufnahme über die Gärung              |
| Gly, Trp, Tyr      |                                                                                       | Sofortige aber geringer und nachlassende Aufnahme über die Gärung |

Die Aminosäuren Alanin und Isoleucin wurden kontinuierlich bis zum Ende der Gärung aufgenommen und werden somit unter Gärungsbedingungen auch außerhalb der Hauptvermehrungsphase von der Hefe für Stoffwechselreaktionen benötigt. Bei den Aminosäuren Arginin, Glutamin, Glycin, Tryptophan, Tyrosin, Valin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure konnte hingegen nur eine geringe Aufnahme während der ersten 24 h festgestellt werden. Die im weiteren Verlauf der Gärung nahezu konstante Konzentration lässt auf eine für den Hefemetabolismus untergeordnete Bedeutung schließen. Dennoch machen diese Aminosäuren einen großen Anteil des im Bier verbleibenden FAN aus. Wie unter Propagationsbedingungen ergibt sich daraus die Notwendigkeit, die klassische Berechnung und Bewertung des FAN zu überarbeiten und eine neue Grundlage für die Qualitätsbeurteilung der Würze zu schaffen (vgl. Kapitel 5.3).

Allerdings ist eine derartig detaillierte Betrachtung der Aminosäuren für eine praktische Beurteilung der Würze wiederum nicht empfehlenswert. Um einen Ansatzpunkt zur Neubewertung des FAN der Würze zu schaffen, wurden die Aminosäuren erneut in vier Gruppen mit charakteristischen Eigenschaften in Zusammenhang mit dem Assimilationsverhalten der Hefen eingeteilt (vgl. Tabelle 52). Auch unter Gärungsbedingungen kommt es dabei zu doppelt genannten Aminosäuren, die daher wiederum mit einer höheren Gewichtung in die Berechnung des FAN einfließen sollten.

**Tabelle 52: Einteilung der Aminosäuren in Abhängigkeit der Aufnahme durch die Hefe unter Gärungsbedingungen**

| Zügige Assimilation zu Beginn der Gärung                               | Vollständige Assimilation während der Gärung | Weitreichende Assimilation während der Gärung | Geringe Assimilation während der Gärung                    |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr</b> | <b>Asn, Asp, Ser, Thr</b>                    | <b>Ala, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Phe</b>      | <b>Arg, Gln, Gly, Trp, Tyr, Val<br/>γ-Aminobuttersäure</b> |

Jedoch kommt es, wie in der Tabelle 53 dargestellt, zu Veränderungen im Aufnahmeverhalten einzelner Aminosäuren in Abhängigkeit des physiologischen Zustands der Hefe. So können bereits Unterschiede zwischen dem Aufnahmeverhalten der Hefe unter Propagations- und Gärungsbedingungen festgestellt werden. Während die Hefe bei der aeroben Herführung im Vergleich zur Gärung verstärkt Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Lysin und Tryptophan aufnahmen, kam es bei Alanin zu einer wesentlich geringeren Assimilation.

**Tabelle 53: Veränderungen im Aufnahmeverhalten von Aminosäuren der Hefe in Abhängigkeit des physiologischen Zustands**

| Unterschiedliche Assimilation bei Propagation und Gärung | Veränderte Assimilation bei vorheriger Limitierung | Nachlassende Assimilation mit abnehmendem vermehrungsphysiologischen Charakter der Hefe | Aminosäuren mit untergeordneter Bedeutung für den Hefemetabolismus |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Ala, Arg, Glu, His, Lys, Trp</b>                      | <b>Ala, Arg, Gln, Gly, His, Ile, Thr</b>           | <b>Ala, Arg, Asp, Glu, Val</b>                                                          | <b>Gln, Gly, Tyr, Val<br/>γ-Aminobuttersäure</b>                   |

Auch die intensiv propagierten Hefen, bei denen ein Mangel an Stickstoffsubstanzen während der Herführung bestand, zeigten eine veränderte Aufnahme einzelner Aminosäuren. So wurden hier Alanin, Threonin und Isoleucin in geringeren Konzentrationen von der Hefe aufgenommen, als dies von Hefen mit höherer Vitalität der Fall war. Dafür war der Bedarf dieser Hefen an Arginin, Glutamin, Glycin und Histidin höher.

Die Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten von Hefen in einem ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand zeigten eine nachlassende Aufnahme der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutamin und Valin. Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht die Belüftung in einem Drauflassverfahren ausschlaggebend für eine Veränderung im Aufnahmeverhalten zu sein scheint, sondern der in der Herführung erzeugte physiologische Ausgangszustand. So zeigten die mit einer hohen O<sub>2</sub>-Konzentration propagierten Hefe eine geringere Assimilation der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Valin, als dies in der 1. Führung der Fall gewesen war, während die mit niedrigerer O<sub>2</sub>-Konzentration propagierten Hefen ein mit der 1. Führung vergleichbares Aufnahmeverhalten aufwiesen.

Insgesamt wird deutlich, dass sich das Aufnahmeverhalten einer Hefe in schlechterem physiologischen Zustand dem in der Literatur beschriebenen Aufnahmeverhalten annähert. Dies lässt den Schluss zu, dass zwar der Hefestamm einen Einfluss auf die Verwertung der Stickstoffsubstanzen hat, aber die Hefephysiologie entscheidend für den Umfang der Assimilation einzelner Aminosäuren ist.

Anhand der in dieser Forschungsarbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Assimilationsverhalten der Hefe unter Propagations- und Gärungsbedingungen, sowie unter Berücksichtigung der Hefephysiologie, kann abschließend zusammengefasst werden, dass den Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin und Threonin eine weitaus größere Bedeutung für den Hefestoffwechsel unter brautechnologischen Bedingungen zukommt, als den Aminosäuren Glutamin, Glycin, Tyrosin, Valin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Daraus abgeleitet soll auch im Hinblick auf eine Verwendung anderer Rohstoffe, wie Malzen aus Weizen und Sorghum und der Verwendung von Gerste, Mais oder Reis ein Vorschlag zur Neubewertung des Würze-FAN erfolgen. Dazu könnte ein zusätzlicher Faktor die nötigen Informationen über die Assimilationsfähigkeit der vorliegenden Stickstoffsubstanzen geben. Dieser wird im Folgenden als  $FAN_{\text{Assimilationsfaktor}}$  **NA** bezeichnet. Dabei muss, wie in der Formel 12 dargestellt, den Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure, Serin, Threonin, Lysin, Leucin, Methionin und Phenylalanin aufgrund einer zügigen und weitreichenden oder sogar vollständigen Aufnahme eine zusätzliche Gewichtung gegeben werden.

**Formel 12: Berechnung des  $FAN_{\text{Assimilationsfaktors}}$  (NA) zur Bewertung der Stickstoffausstattung einer Würze in Abhängigkeit des Aminosäurebedarfs der Hefe**

$$FAN_{\text{Assimilationsfaktor}}(\text{NA}) = \frac{\sum \text{Ala, Arg, Glu, His, Ile} + 2 * \sum \text{Asn, Asp, Ser, Thr, Lys, Leu, Met, Phe}}{FAN_{\text{Gesamt}}}$$

Ein steigendes Verhältnis aus den für den Hefestoffwechsel bedeutsamen Aminosäuren zum Gesamt-FAN würde somit eine höhere Qualität der Würze hinsichtlich der Hefeernährung anzeigen. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass ein empfohlener Bereich neu definiert werden muss, um eine optimale FAN-Ausstattung zu beschreiben.

## 5.6 Einfluss der Hefephysiologie und der Prozessbedingungen auf die resultierende Bierqualität und Bierstabilität

Der Geschmack und die Qualität des fertigen Bieres werden maßgeblich über die Stoffwechselaktivitäten der Hefe im zentralen Prozessschritt der Gärung bestimmt. Auch wenn die Würzebereitung bereits wichtige Aromakomponenten einbringt und die Rahmenbedingungen für eine gute Vergärbarkeit aufgrund des Zuckerspektrums, der Stickstoffausstattung und weiterer Wachstumsstoffe schafft, ist doch die Qualität der Hefe maßgebend. Deren Bildung von Ethanol und CO<sub>2</sub>, die Zusammensetzung der GNP sowie der weitgehender Abbau der Zucker sind entscheidend für die Beurteilung des resultierenden Bieres.

Die Bewertung der Qualität und geschmacklichen Stabilität des Bieres ist jedoch aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren nur schwer direkt mit dem physiologischen Zustand der Hefe während der Gärung und Reifung in Verbindung zu bringen. Eine nicht vollständig reproduzierbare Würzezusammensetzung aufgrund rohstoffbedingter Schwankungen und die vor allem im Pilotmaßstab unvermeidbaren Abweichungen bei den Parametern Temperatur, Anstellzellzahl, Belüftung und Sudrhythmus als Teil der Anstelltechnologie führen zu einer schwer kalkulierbaren Basis bei der Bewertung des Einflusses der Hefephysiologie auf die Qualität und Stabilität der hergestellten Biere.

Neben den durch die Hefephysiologie begründeten Unterschieden in den Gäreigenschaften und der Bildung von Aromasubstanzen spielt der eingesetzte Hefestamm eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des fertigen Produktes. Das Wissen über die Bedeutung des Hefestammes für die Variationsbreite der Qualitätsmerkmale gibt zugleich eine Bewertungsgrundlage zum Einfluss der angewandten Technologie. Um diese Voraussetzungen zu schaffen, wurden dazu in dieser Arbeit sechs Hefestämme unter identischen Prozessbedingungen getestet und die Unterschiede in den Gäreigenschaften, in der Bildung der GNP und in der resultierenden Bierqualität analysiert (vgl. Kapitel 4.4.1 und 4.7.1).

Die Konzentration an höheren Alkoholen im fertigen Bier, welche mengenmäßig den größten Anteil der GNP ausmachen, lag in Abhängigkeit der untersuchten Hefestämme in einem Bereich von 57,1 bis 72,4 mg/l. Auch die Esterverbindungen zeigten mit Werten von 11,6 bis 16,8 mg/l eine unterschiedlich starke Synthese durch die einzelnen Stämme. Allerdings machten die Analysen der GNP zugleich deutlich, dass meist nicht die gesamte Gruppe der GNP eine Veränderung aufwies, sondern vermehrt Einzelkomponenten für einen Großteil der Abweichungen verantwortlich waren. Dennoch bildete z.B. der Stamm W 128 generell eine höhere Konzentration an GNP als der Stamm W 66/70. Die unterschiedliche Ausstattung an GNP in den hergestellten Bieren trug dementsprechend zu unterschiedlichen Ausprägungen im Geruchs- und Geschmacksspektrum der einzelnen Biere bei.

Die chemisch-technischen Analysen machten ebenfalls Unterschiede in den Qualitätskriterien Alkoholgehalt, Restextrakt, AVG und pH-Wert der fertigen Biere durch den

Einsatz der verschiedenen Hefestämme deutlich. So variierte der AVG in einem Bereich von 74 bis 81%, was zu einem Unterschied im Alkoholgehalt von bis zu 0,4 Vol.-% führen kann. Steht bei einem Produkt weniger ein bestimmtes Geschmacksprofil eines Hefestammes im Vordergrund, kann durch einen eventuellen Wechsel des Stammes ein höherer Ausstoß bei gleichem Rohstoffeinsatz erzielt werden und damit zu einer besseren Kostenstruktur beitragen.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Hefestämme auf die Geschmacksstabilität zeigten, dass die absolute Konzentration an Alterungskomponenten in den gealterten Bieren in einem vergleichbaren Rahmen lag und nicht außerordentlich vom Hefestamm abhängig ist. Dennoch scheinen einige Stämme, wie der W 34/70 und der W 34/78, tendenziell bessere Alterungsvoraussetzungen zu schaffen, indem entweder die Bildung einzelner Alterungsindikatoren unterdrückt wird oder es zu einer Umsetzung relevanter Substanzen im Stoffwechsel kommt. Der Hauptunterschied in den Alterungskomponenten war dabei allerdings auf die Wärmeindikatoren zurückzuführen. Trotz gleicher Prozessbedingungen und der Verwendung identischer Ausschlagwürze kam es bei Furfural zu einem Unterschied von bis zu 34 µg/l. Dies entspricht ca. 30% der in diesen Bieren gemessenen Konzentration. Aufgrund der identischen Voraussetzungen kann der Unterschied nur auf die Gäreigenschaften bzw. den Metabolismus der Hefe zurückzuführen sein. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist allgemein durchaus in der Lage, z.B. Furfural zu Furfurylalkohol zu reduzieren (Palmqvist, 1999; Taherzadeh, 2000; Liu, 2008). Damit könnte der Hefe eine zusätzliche Bedeutung bei der Alterungsentwicklung des Bieres zukommen. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, scheint dieses Reduktionsvermögen jedoch zwischen einzelnen Stämmen zu variieren. Um eine detaillierte Aussage dieses Potentials unter brautechnologischen Bedingungen treffen zu können, müssten weitreichende Untersuchungen zu diesem Thema erfolgen. Die ebenfalls durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Hefen auf die resultierenden Konzentrationen an Fettsäuren und Fettsäureester im Bier ließen hingegen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Bei den Verkostungen erreichten alle Biere sehr gute Ergebnisse und es zeigte sich das Potential aller getesteten Hefestämme, ein qualitativ sehr hochwertiges Produkt zu erzeugen. Dass die ermittelten Unterschiede in den frischen oder den forciert gealterten Bieren nicht allein auf das GNP-Spektrum oder die Summe der Alterungsindikatoren zurückzuführen ist, war anhand der mit den Stämmen W 128 und W 69 und W 66/70 hergestellten Biere ersichtlich. So wiesen die Biere aus den Gärungen mit den Stämmen W 128 und W 66/70 zwar die größte Differenz in den GNP auf, erreichten aber annähernd die gleiche sensorische Beurteilung sowohl im frischen als auch forciert gealterten Zustand. Bei dem Bier mit den weitreichendsten Alterungserscheinungen, das mit dem Stamm W 69 produziert wurde, konnte hingegen nur ein durchschnittlicher Gehalt an Alterungskomponenten gemessen werden.

Eine vergleichbare, teilweise sogar größere Bedeutung für die Qualität und Stabilität des Bieres kommt den Propagations- und Gärungsbedingungen durch die Beeinflussung der

Hefephysiologie zu. Anhand der erzielten Resultate konnte zudem geprüft werden, wieweit sich ein vermehrungs- oder gärungsphysiologischer Zustand der Hefe auf die Qualität des fertigen Produktes überträgt. Die Propagation bestimmt jedoch nicht nur über die hergeführte Hefe u.a. das GNP-Spektrum des Bieres, auch die während des Vermehrungsprozesses wesentlich höheren Konzentrationen an gebildeten GNP werden bei einer Dosage von ca. 10% des Propagatorinhalts mit in die Gärung eingebracht (vgl. Kapitel 4.3.3).

Dass auch der physiologische Zustand der Hefe für das GNP-Spektrum in den fertigen Biere von großer Bedeutung ist, beweisen die Veränderungen im Verhältnis der gebildeten höheren Alkohole zu den Ester mit zunehmendem gärungsphysiologischem Charakter der Hefe. Während in der 1. Führung nach einer Propagation teilweise über fünfmal mehr höhere Alkohole als Ester im Bier vorhanden waren, nahm dieses Verhältnis bis auf unter 3 zu 1 in den darauffolgenden Führungen ab. Auch in diesem Zusammenhang zeigte sich die durch eine Intervallbelüftung bei der Propagation erfolgreiche Stimulation des Gärungsstoffwechsels der Hefe. Die mit einer 8stündigen Belüftungspause propagierten Hefen bildeten mehr Ethylacetat und i-Amylacetat als die Hefen aus der kontinuierlich belüfteten Vergleichspropagation bei einer jeweils vergleichbaren Synthese an höheren Alkoholen. Eine derartige Stimulation der Physiologie einer o.g. Hefe könnte zu einer weiterreichenden Aromabildung bei der Herstellung von Weizenbier beitragen. Eine in das letzte Drittel der Propagation verschobene Belüftungspause, die auch geringere Auswirkungen auf den Hefemetabolismus zur Folge hatte, beeinflusst das GNP-Spektrum hingegen nicht signifikant.

Die geringen Unterschiede im Bereich der chemisch-technischen Analysen in den hergestellten Bieren lassen auf eine untergeordnete Bedeutung des Propagationsprozesses und der Hefephysiologie in diesem Zusammenhang schließen. So kam es bei den Versuchsbieren nur zu geringen Abweichungen im AVG, Restextrakt- und Alkoholgehalt sowie pH-Wert. Zwar konnten die intervallpropagierten Hefen einen im Vergleich zu den kontinuierlich belüfteten Hefen leicht höheren AVG erreichen, der allerdings in der Regel durch die Maischarbeit im Sudhaus weit höheren Schwankungen unterliegt.

Dass die Hefephysiologie und speziell eine Stimulation des Gärungsstoffwechsels auch einen Einfluss auf die endgültige Konzentration an Furfural im Bier zu haben scheint, zeigt ein Vergleich der Biere, die wiederum mit den Hefen aus einer kontinuierlich belüfteten und aus einer intervallbelüfteten Propagation hergestellt wurden. Da der Gehalt an  $\gamma$ -Nonalacton, das ebenfalls als Wärmeindikator gilt, in dem mit der intervallpropagierten Hefe hergestellten Bier leicht höher lag, kann auch unter Berücksichtigung der Verwendung unterschiedlicher Würzechargen die niedrigere Konzentration an Furfural in diesem Bier als Folge des physiologischen Charakters der Anstellhefe erklärt werden. Die ebenfalls niedrigere Konzentration an Sauerstoffindikatoren beschreibt zusätzlich den positiven Einfluss des erreichten gärungsphysiologischen Charakters und gibt einen Hinweis auf eine

---

verbesserte Alterungsstabilität dieser Biere. Hinzu kommt, dass die unbelüfteten Gärungen nochmals ca. 30 µg/l und damit ca. 20% weniger Alterungsindikatoren aufwiesen.

Allerdings kam es nur zu geringfügigen Unterschieden in der sensorischen Beurteilung der mit den verschiedenen propagierten Hefen hergestellten Biere. Bei den im frischen Zustand verkosteten Bieren wurden dabei die mit einer kontinuierlich belüfteten Hefe hergestellten leicht bevorzugt und im gealterten die mit der intervallbelüfteten Hefe, was mit den Ergebnissen aus den Analysen der Alterungsindikatoren korreliert.

Auch in der im Anschluss an die verschiedenen Propagationen durchgeführten 4. Führung ließen zwar die chemisch-technischen Analysedaten keinen nennenswerten Einfluss der Propagation auf die Eigenschaften der Biere mehr erkennen, allerdings zeigten die Analysen der Alterungsindikatoren hier eine jeweils niedrigere Konzentration an Furfural im fertigen Bier aus den unbelüfteten Gärungen. Insgesamt deutet dies wiederum auf eine Umsetzung geringer aber eventuell entscheidender Mengen durch den Hefemetabolismus hin. Somit scheint sowohl der physiologische Zustand als auch die genetische Ausstattung der Hefe einen Einfluss in diesem Bereich zu nehmen und gibt Anlass das Furfural nicht alleine als Wärmeindikator zu betrachten.

## 6 Zusammenfassung

Im zentralen Prozessschritt der Gärung ist der physiologische Zustand der Hefe entscheidend für eine schnelle und weitreichende Umsetzung der Würzeinhaltsstoffe. Gleichzeitig bestimmt die Hefe über ihre Stoffwechselprodukte maßgeblich die chemisch-physikalischen und sensorischen Eigenschaften des Bieres. Dass in den Prozessschritten der Propagation und Gärung allerdings durch eine nicht optimal integrierte Belüftung eine Schädigung des antioxidativen Potenzials der Würze riskiert wird, ohne optimale Gäreigenschaften der Hefe garantieren zu können, war Anlass, diese Prozessschritte im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit detailliert zu untersuchen.

Um Ansätze für eine Optimierung des Hefemanagements zu erarbeiten, wurden sowohl der physiologische Zustand der Hefe unter brautechnologischen Bedingungen als auch dessen Beeinflussung durch die einzelnen Prozessparameter erfasst. Die notwendige Charakterisierung des physiologischen Zustands der Hefe basierte dabei einerseits auf der für die Hefevermehrung entscheidenden Lipidbiosynthese und andererseits auf dem Reaktionsweg der Alkoholischen Gärung. Die Implementierung der Aktivitätsmessung der identifizierten Schlüsselenzyme in die Routineanalytik machte es möglich, eine starke Korrelation zwischen der Expressionszunahme der Acetyl-CoA Synthase (ACS) und dem Zellwachstum der Hefe aufzuzeigen. Gleichzeitig konnten in Abhängigkeit der Prozessführung Veränderungen in den Enzymexpressionen der Hefe festgestellt werden. Zusammengefasst ermöglichte dies eine detaillierte Beschreibung des vermehrungs- und gärungsphysiologischen Zustands der Hefe in den einzelnen Prozessschritten der Bierbereitung. Anhand der Enzymaktivitäten der Pyruvatdecarboxylase, der Alkoholdehydrogenase, der Acetaldehyddehydrogenase und der ACS verschiedener Hefestämme konnte zudem deutlich gemacht werden, dass die technologische Beeinflussung größer ist, als eventuell genetisch basierte Unterschiede in den Stoffwechselausprägungen.

Um eine effektive Anpassung der Würzebelüftung an den Hefemetabolismus vornehmen zu können, erfolgte die Bestimmung des Sauerstoffbedarfs und der Sauerstoffzehrung der Hefe in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes der Hefe. Diese Ergebnisse machten zudem eine Bestimmung des Oxidationspotenzials des eingebrachten Sauerstoffs während des Anstellvorgangs möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Hefen mit steigendem vermehrungsphysiologischem Charakter eine wachsende Sauerstoffzehrung aufweisen, im Gegensatz zu Hefen im Ruhestadium oder in einem ausgeprägten gärungsphysiologischen Zustand, bei dem die Aufnahmerate über die Lagerzeit absinkt. Dass es deshalb während des Anstellvorgangs zu erheblichen Unterschieden im Oxidationspotenzial von bis zu 20% kommt, verdeutlichte die Notwendigkeit, die Sauerstoffversorgung bei der Bierbereitung besser auf den Hefemetabolismus abzustimmen. Zudem ist der physiologische Zustand in einem gewissen Rahmen von größerer Bedeutung für eine optimale Vergärung der Würze als die technisch präzise Steuerung der Prozessbedingungen. Denn es konnte gezeigt werden,

dass Variationen einzelner physikalischer Parameter durch Unterschiede in der Hefephysiologie überlagert werden können.

Die Enzymaktivitätsmessungen zeigten zudem eine grundlegend verschiedene Ausprägung in den Stoffwechselwegen der Hefe während der Propagation und Gärung. Zusammen mit Erkenntnissen aus den Zellzyklusanalysen bei wechselnden aeroben und anaeroben Habitatbedingungen wurde eine erweiterte Zielsetzung im Propagationsprozess entwickelt. Neben einer optimalen Hefevermehrung sollte die Prozesssteuerung auf eine Stimulation der gärungstechnologisch relevanten Stoffwechselwege ausgerichtet werden.

Die daraufhin erfolgten Untersuchungen zum Einfluss von Intervallbelüftungen auf die Hefephysiologie zeigten, dass eine effektive Beeinflussung des Hefemetabolismus und eine damit verbundene bessere Adaption der Hefe an die nachfolgenden Gärungsbedingungen nur über eine 8stündige Belüftungspause in einem Zeitraum von 8 bis 16 h nach Propagationsbeginn möglich ist. In dieser Zeit konnten vor allem die Enzyme des Pyruvatdehydrogenase-Bypasses maßgeblich stimuliert werden und wiesen ein sonst nur unter Gärungsbedingungen beobachtetes Niveau auf.

In den angeschlossenen Gärversuchen, bei denen zusätzlich verschiedene Belüftungsstrategien untersucht wurden, konnte festgestellt werden, dass eine optimal propagierte Hefe zumindest in der 1. Führung vollständig auf eine zusätzliche Würzebelüftung verzichten kann und gleichzeitig bessere Gäreigenschaften erreicht werden können. Grund dafür war die angestrebte schnellere und weiterreichende Umstellung im Hefestoffwechsel zugunsten höherer Gärleistungen. Zusätzlich trugen die mit dem in dieser Arbeit entwickelten Propagationsverfahren mit Belüftungspause hergeführten Hefen zu einer reproduzierbareren Vergärung bei. Zusammengenommen können diese Maßnahmen zu einer effektiven Verbesserung des Gärungsprozesses und einer Verkürzung der Prozesszeit von bis zu 20 h führen. Ein so optimierter Prozess würde eine 10%ige Steigerung der Gärkellerkapazität bedeuten.

Allerdings zeigten die Untersuchungen bei einem mehrmaligen Einsatz dieser Hefen, dass sich die Stimulierung des Gärungsstoffwechsels über die Führungen nivellieren. Generell bleibt jedoch die Möglichkeit, bei Hefen in gutem physiologischem Zustand auf eine zusätzliche Würzebelüftung zu verzichten und somit Voraussetzungen für eine verbesserte Geschmacksstabilität zu schaffen.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde zudem die in der Literatur anhand eines Ale-Hefestammes postulierte Gruppierung der Aminosäuren hinsichtlich ihrer Assimilation auf ihre Gültigkeit unter Propagations- und Gärungsbedingungen bei der Verwendung einer untergärigen Hefe überprüft. Die Ergebnisse zeigten eindeutige Abweichungen im Aufnahmeverhalten dieser Hefen in beiden Prozessschritten und es konnte ein entscheidender Einfluss der Hefephysiologie auf die Assimilation bestimmter Aminosäuren aufgezeigt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, die Aminosäuren der Würze in Abhängigkeit der Assimilationspräferenz der Hefe neu zu gruppieren. Entsprechend dieser Erkenntnisse wurde ein Vorschlag zur Neubewertung des FAN erarbeitet. Besonders unter Berücksichtigung alternativer Rohstoffe und im Hinblick auf optimale Gäreigenschaften kommt einer an der Hefe orientierten Bewertung der Stickstoffausstattung der Bierwürze eine besondere Bedeutung zu.

Die aus den einzelnen Versuchsreihen resultierten Biere wurden abschließend sensorisch und analytisch auf einen möglichen Einfluss der Propagations- und Gärungsbedingungen auf die GNP-Spektren, sowie die geschmackliche Stabilität getestet. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine leicht verbesserte Stabilität der Biere, die mit einer bei der Propagation intervallbelüfteten Hefe und ohne Würzebelüftung hergestellt wurden. Dies könnte sowohl auf eine Schonung der antioxidativen Kapazität der Würze als auch auf den zügigeren Gärverlauf zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse müssen allerdings im großtechnischen Maßstab auf ihre Signifikanz und Relevanz überprüft werden.

## Literaturverzeichnis

[Online] Beckman Coulter. [Zitat vom: 27. 10 2009.] <http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/BR-10115B.pdf>.

[Online] KEGG - Table of Contents. [Zitat vom: 27. 5 2009.] [http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?C00024](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C00024).

[Online] BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System. [Zitat vom: 11. 5 2007.] [http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=6.2.1.1](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=6.2.1.1).

**Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C. 1994.** Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*. 1994, 124, S. 17-22.

**Anderson, R. et al. 2000.** *Fermentation & Maturation*. [Hrsg.] European Brewery Convention. s.l. : Hans Carl Fachverlag, 2000. ISBN 3-418-00775-9.

**Annemüller, G., Manger, H-J., Lietz, P. 2008.** *Die Hefe in der Brauerei*. Berlin : VLB, 2008. ISBN 978-3-921690-57-4.

**Back, W. 2005.** *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Nürnberg : Fachverlag Hans Carl GmbH, 2005. ISBN 3-418-00802-X.

**Bakker, B. M., et al. 2001.** Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001, 25, S. 15-37.

**Bamforth, C. W., Parsons, R. 1985.** New procedures to improve the flavour stability of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1985, 43, S. 197–202.

**Barford, J. P., Hall, R. J. 1979.** An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the Role of Respiratory Adaptation. *Journal of General Microbiology*. 1979, Bd. 114, S. 267-275.

—. 1979. An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the Role of Respiratory Adaptation. *Journal of General Microbiology*. 1979, 114, S. 267-275.

**Barnett, J. A. 2000.** A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850 - 1880. *Yeast*. 2000, 16, S. 755-771.

**Barnett, J. A., Robinow, C. F. 2002.** A history of research on yeasts 4: cytology part II, 1950–1990. *Yeast*. 2002, 19, S. 745-772.

**Barnett, J.A. 1998.** A History of Research on Yeasts 1: Work by Chemists and Biologists 1789–1850. *Yeast*. 1998, 14, S. 1439-1451.

- Barnett, J.A., Lichtenthal, F.W. 2001.** A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880±1900. *Yeast*. 2001, 18, S. 363-388.
- Barnett, J.A., Robinow, C.F. 2002.** A history of research on yeasts 4: cytology part I, 1890–1950. *Yeast*. 2002, 19, S. 151-182.
- Batistote, M., da Cruz, S. H., Ernandes, J. R. 2006.** Altered Patterns of Maltose and Glucose Fermentation by Brewing and Wine Yeasts Influenced by the Complexity of Nitrogen Source. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006, 112, S. 84–91.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. 2001.** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag, 2001. ISBN 3-540-41096-1.
- Bisswanger, H. 2000.** *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. s.l. : Wiley-VCH, 2000.
- Boiteux, A., Hess, B. 1970.** Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Letters*. 1970, Bd. 9, S. 293-296.
- Boles, E., Zimmermann, F. K. 1993.** Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the concentrations of three-carbon glycolytic metabolites. *Archives of Microbiology*. 1993, 160, S. 324-328.
- Boulton, C., Quain, D. 2001.** *Brewing Yeast and Fermentation*. Oxford : Blackwell science Ltd., 2001. ISBN 0-632-05475-1.
- Brefeld, O. 1872.** *Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie*. Leipzig : Verlag von Arthur Felix, 1872.
- Briggs, D.E., et al. 2004.** *Brewing, science and practice*. Cambridge : WP limited, 2004. S. 429.
- Brockhaus. 2003.** *Der Brockhaus - Naturwissenschaft und Technik*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2003.
- Buchner, E. 1907.** *Cell-free fermentation*. s.l. : Nobel Lectures Chemistry, 1907.
- Bulloch, W. 1938.** The History of Bacteriology. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1938, Bd. 196, 6, S. 868.
- Bunn, H. F., Poyton, R. O. 1996.** Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological Reviews*. 1996, 76, S. 839–885.
- Buxbaum, E. 2007.** *Fundamentals of Protein Structure and Function*. s.l. : Springer Verlag, 2007. ISBN 978-0-387-26352-6.
- Cabib, E., Bowers, B. 1971.** Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *Journal of Biological Chemistry*. 1971, Bd. 246, S. 152-159.
- Campbell, N. A. 2000.** *Biologie*. s.l. : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2000.

- Chang, Y., et al. 1989.** Identification and characterization of the maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. *Journal of Bacteriology*. 1989, Bd. 171, 11, S. 6148-6154.
- Chen, E. C. H. 1978.** The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1978, 36, S. 39-43.
- Chow, T., Sollitti, P., Marmur, J. 1989.** Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*. 1989, Bd. 122, S. 60-69.
- Ciriacy, M. 1997.** Alcohol dehydrogenase. [Buchverf.] F. K., Entian, K. D. Zimmermann. *Yeast Sugar Metabolism*. Lancaster : Technomic Publishing Company, 1997.
- Cohen, J. D., Goldenthal, M. J., Buchferer, B., Marmur, J. 1984.** Mutational analysis of MAL1 locus of *Saccharomyces*: identification and functional characterization of three genes. *Molecular Genetics and Genomics*. 1984, Bd. 196, 2, S. 208-216.
- da Cruz, S. H., Batistote, M., Ernandes, J. R. 2003.** Effect of Sugar Catabolite Repression in Correlation with the Structural Complexity of the Nitrogen Source on Yeast Growth and Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, 109, S. 349-355.
- Darnell, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R. 1994.** Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994, Bd. 264, S. 1415-1421.
- De Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H., De Keukeleire, D. 2000.** Alterations of the profiles of iso-alpha-acids during beer ageing, marked instability of trans-iso-alpha-acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso-alpha-acids. *Journal of the Institute of Brewing*. 2000, 106, S. 169-178.
- De Deken, R. H. 1966.** The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*. 1966, Bd. 44, S. 149-156.
- Deckwert, W. D., Pühler, A., Schmid, R. D. 1999.** *Römpp Lexikon: Biotechnologie und Gentechnik*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1999. S. 250-252.
- Depraetere, S. A., et al. 2008.** The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling processes. *Food Chemistry*. 2008, 107, S. 242-249.
- Depraetere, S. A., Winderickx, J., Delvaux, F. R. 2003.** Evaluation of the oxygen requirement of lager and ale yeast strains by preoxygenation. *MBAA Technical Quarterly*. 2003, 40, S. 283-289.
- Dillmann, A. 2008.** Enzyme. *Basiswissen Biochemie*. 7. komplett überarbeitete Auflage. s.l. : Springer Berlin Heidelberg, 2008.

- Dubin, R. A., Needleman, R. B. Gossett, D., Michels, C. A. 1985.** Identification of the structural gene encoding maltase within MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of Bacteriology*. 1985, Bd. 164, 2, S. 605-610.
- Eklund, H., Brändén, C.L. 1987.** Alcohol dehydrogenase. [Buchverf.] F. A., McPherson, A. *Jurnak. Biological Macromolecules and Assemblies: Active Site of Enzyme*. New York : Wiley, 1987, Bd. 3, S. 73-142.
- Enari, T.-M. 1974.** *Amino acids, peptides and proteins of wort*. EBC Symposium : European Brewery Convention Monograph I, 1974. S. 73-89.
- Entian, K. D., Schüller, H. J. 1997.** Carbon catabolite repression in yeast. [Buchverf.] F. J., Entian, K. D. Zimmermann. *Yeast Sugar Metabolism*. Lancaster : Technomic Publishing company, 1997, S. 410-434.
- Fernie, A. R., Carrari, F., Sweetlove, L. J. 2004.** Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004, 7, S. 254–261.
- Filkweert, M.T., et al. 1996.** Pyruvat Decarboxylase: An Indispensable Enzyme for Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Glucose. *Yeast*. 1996, Bd. 12, S. 247-257.
- Forsburg, S. L., Nurse, P. 1991.** Cell Cycle Regulation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1991, 7, S. 227-256.
- Forster, C., Schwieger, J., Narziß, L., Back, W., Uchida, M., Ono, M., Yanagi, K. 1999.** Untersuchungen zur Geschmacksstabilität von Bier mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie freier Radikale. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 1999, 5/6, S. 86-93.
- Fرتون, S. J. 2002.** A History Of Pepsin And Related Enzymes. *The Quarterly Review of Biology*. 2002, Bd. 77, 2.
- Gachotte, D., Barbuch, R., Gaylor, J., Nickel, E., Bard, M. 1998.** Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998.
- Gastl, M. I. 2006.** Technologische Einflussnahme auf den Lipidabbau im Sinne einer Verbesserung der Geschmacksstabilität des Bieres. *Dissertation*. s.l. : TU München, 2006.
- Hartwell, L. 1974.** *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev*. 1974, Bd. 38, S. 164-198.

- Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R. J., Pilkington, M., Sobezak, J., Russel, I. 2000.** Measurement of brewing yeast viability and vitality : A review of methods. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas*. 2000, 37, S. 409-430.
- Hengst, L. 2003.** Regulation der Zellproliferation. *Jahrbuch 2003*. Martinsried : Max-Planck-Institut für Biochemie, 2003.
- Higgins, V J., Beckhouse, A. G., Oliver, A. D., Rogers, P. J., Dawes, I. W. 2003.** Yeast Genome-Wide Expression Analysis Identifies a Strong Ergosterol and Oxidative Stress Response during the Initial Stages of an Industrial Lager Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69, S. 4777-4787.
- Hilz, H., Kittler, M., Knape, G. 1959.** Die Reduktion von Sulphat in der Hefe. *Biochemische Zeitschrift*. 1959, Bd. 332.
- Hohmann, S. 1991.** Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1991, Bd. 173, 24, S. 7963-7969.
- Hohmann, S., Mager, W. H. 2003.** *Yeast Stress Responses*. Berlin Heidelberg : Springer Verlag , 2003.
- Holzer, H., Goede, W. H. 1957.** Zwei Wege vom Pyruvat zum Acetyl-Coenzym A in Hefe. *Journal of Biochemistry*. 1957, Bd. 329, S. 175-191.
- Hong, H., Marmur, J. 1986.** Primary structure of the maltase gene of the MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*. 1986, Bd. 21, 1, S. 75-84.
- Horák, J. 1997.** Yeast nutrient transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, Bd. 1331, S. 41-79.
- Hutter, K.-J. 1993.** Flußzytometrische Analysen zur Gärfähigkeit verschiedener Hefen. *Brauwelt*. 1993, Bd. 44/45, S. 2247-2253.
- **2001.** Flusszytometrische Prozesskontrolle untergäriger Bierhefen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2001, Bd. 1/2, S. 13-27.
- **1993.** Zellkinetische Analysen an Hefen und Bakterien mit Hilfe der Flusszytometrie. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 1993, Bd. 12, S. 444-450.
- Hutter, K.-J., Remor, M., Müller, S. 2000.** Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren VII. Mitteilung: Untersuchungen zur flußzytometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes der Betriebshefe. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2000, Bd. 5/6, S. 68-76.

**Huvaere, K., Andersen, M. L., Olsen, K., Skibsted, L. H., Heyerick, A., De Keukeleire, D. 2003.** Radicaloid-type oxidative decomposition of beer bittering agents revealed. *Chemistry – A European Journal*. 2003, 9, S. 4693–4699.

*Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of Saccharomyces cerevisiae in batch culture.* **Palmqvist, E., Almeida, J. S., Hahn-Hägerdal, B. 1999.** 4, s.l. : Biotechnology and Bioengineering, 1999, Bd. 62, S. 447 - 454.

**Jones, M., Pierce, J. S. 1969.** Absorption of amino acids by yeast from a semi-defined medium simulating wort. *The Journal of the The Institute of Brewing&Distilling*. 1969.

**Kaltner, Dietmar. 2000.** Untersuchungen zur Ausbildung des Hopfenaromas und technologische Maßnahmen zur Erzeugung hopfenaromatischer Biere. *Dissertation*. s.l. : TU München, 2000.

**Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., Kamada, K. 1989.** The role of free radicals in beer oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1989, 47, S. 49–53.

**Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. 1994.** *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart : Thieme, 1994.

**Kellermann, E., Seeboth, P. G., Hollenberg, C. P. 1986.** Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 1986, Bd. 14, 22, S. 8963–8977.

**Klein, P., Falke, D., Hahn, H. 2009.** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. s.l. : Springer Berlin Heidelberg, 2009. S. 8-10. ISBN 978-3-540-26529-0.

**Kodama, Y., Kielland-Brandt, M- C., Hansen, J. 2006.** Lager brewing yeast. *Comparative Genomics - Using Fungi as Models*. Berlin / Heidelberg : Springer, 2006.

**Kratzer, S., Schüller, H-J. 1997.** Transcriptional control of the yeast acetyl-coA synthetase gene, ACS1, by the positive regulators CAT8 and ADR1 and the pleiotropic repressor UME6. *Molecular Microbiology*. 1997, Bd. 26, 4, S. 631-641.

**Kresze, G. B., Ronft, H. 1981.** Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. Properties and some kinetic and regulatory properties. *European Journal of Biochemistry*. 1981, Bd. 119, S. 573-579.

**Kunz, T., Stephan, A., Methner, F. J., Kappl, R., Hüttermann, J. 2002.** Grundlegendes zur Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) und Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen oxidativer Bierstabilität und dem SO<sub>2</sub>-Gehalt. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2002, 7/8, S. 140-153.

**Kunze, W. 2007.** *TECHNOLOGIE Brauer & Mälzer*. s.l. : VLB Berlin, 2007. ISBN 978-3-921690-56-7.

- Kwast, K. E., Burke, P. V., Poyton, R. O. 1998.** Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *The Journal of Experimental Biology*. 1998, 201, S. 1177–1195.
- Lagunas, R. 1993.** Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 104, S. 229-242.
- Lentini, A. 1993.** A review of the various methods available for monitoring the physiological status of yeast: yeast viability and vitality. *Fermentation*. 1993, 6, S. 321-327.
- Leskovac, V., Trivic, S., Latkoskova, M. 1976.** State and accessibility of zinc in alcohol dehydrogenase. *Journal of Biochemistry*. 1976, Bd. 155, S. 155-161.
- Leskovac, V., Trivic, S., Pericin, D. 2002.** The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2002, Bd. 2, S. 481-494.
- Lichtenthaler, F. W. 1994.** 100 Years "Schlüssel-Schloss-Prinzip": what made Emil Fischer use this analogy? *Angewandte Chemie*. 1994, Bd. 106, S. 2456-2467.
- . **1992.** Emil Fischer's proof of the configuration of sugars: a centennial tribute. *Angewandte Chemie*. 1992, Bd. 104, S. 1577-1593.
- Liu, Z. L., Moon, J., Andersh, B. J., Slininger, P. J., Weber, S. 2008.** Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyd reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, Bd. 81, 4, S. 743-753.
- Loureiro-Dias, M., Peinado, J. 1984.** Transport of maltose in *saccharomyces cerevisiae*, effect of pH and potassium ions. *Jouranal of Biochemnistry*. 1984, 222, S. 293-298.
- Lustig, S. 1994.** Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Lagerung von Flaschenbier und deren technologische Beeinflussung beim Brauprozess. *Dissertation*. s.l. : TU München, 1994.
- MacWilliam, I. C. 1968.** Wort composition - a review. *Journal of the Institude od Brewing*. 1968, Bd. 74, S. 38-54.
- Mandl, B. 1974.** Mineral matter, trace elements, organic and inorganic acids in hopped worts. *Proceedings of the European Brewery Convention Symposium Monograph I*. 233-8, 1974.
- Manginota, C., Roustana, J. L., Sablayrolles, J. M. 1998.** Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of The Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, 23, S. 511-517.
- Meilgaard, M. C. 1975.** Flavor chemistry of beer; Part I: flavor interaction between principal volatiles. *MBAA Technical Quarterly*. 1975, 12, S. 107-117.

- Mendes-Ferreira, A., et al. 2007.** Saccharomyces cerevisiae Signature Genes for Predicting Nitrogen Deficiency during Alcoholic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73, S. 5363-5369.
- Meussdoerffer, F. G. 2009.** *Handbook of Brewing*. Weinheim : Wiley-VCH, 2009. ISBN 978-3-527-31674-8 - Wiley-VCH, Weinheim.
- Meyen, F. 1838.** *Jahresbericht über die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik von dem Jahre 1837. 4(2)*. s.l. : Archiv für Naturgeschichte, 1838. S. 1–186.
- Mönch, D. 1995.** Wirkung von Stress auf Brauereihefen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 1995, Bd. 9/10, S. 288-297.
- Müller, S., Hutter, K. J., Bley, T., Petzold, L., Babel, W. 1997.** Dynamics of yeast cell sates during proliferation and non proliferation periods in a brewing reactor monitored by multidimensional flow cytometry. *Bioprocess Engineering*. 1997, 17, S. 287-293.
- Müller, S., Hutter, K.-J. 1999.** Prozeßoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren mittels Flußzytometrie in sächsischen Brauereien. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 1999, Bd. 3/4, S. 40-48.
- Narziß, L. 1995.** *Abriss der Bierbrauerei*. Stuttgart : Ferdinand Enke Verlag, 1995. ISBN 3-432-84136-1.
- . **1992.** *Die Technologie der Würzebereitung*. Stuttgart^ : Ferdinand Enke Verlag, 1992. ISBN 3-432-85007-7.
- Narziss, L., Back, W., Miedaner, H., Lustig, S. 1999.** Untersuchungen zur Beeinflussung der Geschmacksstabilität durch Variation technologischer Parameter bei der Bierherstellung. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 1999, 52, S. 192–206.
- Northcote, D. H., Horne, R. W. 1952.** The chemical composition and structure of the yeast cell wall. *Biochemical Journal*. 1952, Bd. 51, 2, S. 232–236.
- P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman. 1994.** *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1994. 3-13-357814-6.
- Palmqvist, E., Almeida, J. S., Hahn-Hägerdal, B. 1999.** Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of Saccaromyces cerevisiae in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, Bd. 62, 4, S. 447-454.
- Park, H., Bakalinsky, A.T. 2000.** SSU1 mediates sulfi te effl ux in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*. 2000, Bd. 16.
- Peddie, H. A. B. 1990.** Ester formation in brewery fermentations. *Jouranal of the Institute of Brewing*. 1990, 96, S. 327-331.

- Pierce, J. S. 1987.** The role of nitrogen in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 1987, 93, S. 378-381.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A. 2006.** How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*. 2006, 22, S. 183-186.
- Postma, E., et al. 1989.** Enzymatic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, Bd. 55, 2, S. 468-477.
- Postma, E., Kuiper, A., Tomasouw, W. F., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. 1989.** Competition for Glucose between the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55, S. 3214-3220.
- Pronk, J.T., et al. 1996.** Pyruvate Metabolism in *S. cerevisiae*. *Yeast*. 1996, Bd. 12, S. 1607-1633.
- Quain, D. E., Tubb, R. S. 1982.** The importance of glycogen in brewing yeasts. *Technical Quarterly of the MBAA*. 1982, 19, S. 29-33.
- Ratledge, C., Evans, C. T. 1989.** Lipids and their metabolism. [Buchverf.] A. H., Harrison, J. S. Rose. *The yeasts: metabolism and physiology of yeasts*. San Diego : Academic Press, 1989.
- Remize, F., et al. 2000.** Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg<sup>2+</sup> and Mitochondrial K<sup>+</sup> Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, Bd. 66, 8, S. 3151-3159.
- Renger, R. S., van Hateren, S. H., Luyben, K. Ch. A. M. 1992.** The Formation of Esters and Higher Alcohols during brewery Fermentation; The Effect of Carbon Dioxide Pressure. *Journal of the Institute of Brewing*. 1992, 98, S. 509-513.
- Rieger, M., Käppeli, O., Fiechter, A. 1983.** The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. 1983, Bd. 129, S. 653-661.
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., Salmon, J.-M. 2003.** Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69, S. 113-121.
- Schierbeek, A. 1953.** The collected letters of Antoni van Leeuwenhoek. *Antoni van Leeuwenhoek*. 1953, Bd. 19, 1.
- Schlegel, H.-G. 1992.** *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1992. ISBN 978-3134446081.

- Serrano, R. 1977.** Energy requirement for maltose transport in yeast. *European Journal of Biochemistry*. 1977, 80, S. 97-102.
- Swain, P. A. 2008.** Brewing research, enzymes and the history of the pH scale. *School Science Review*. 2008, 89, S. 75-81.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G. 2000.** Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000, Bd. 53, 6, S. 701-708.
- Tenge, C. 2006.** *Hefe und Hefeherführung*. Nürnberg : Fachverlag Hans Carl GmbH, 2006. S. 20.
- Tenge, C., Geiger, E., Wallerius, D. 2004.** Auswirkungen von Belüftungsvarianten bei der Anstelltechnologie. *Brauwelt*. 2004, 12, S. 336-338.
- Thiele, F., Back, W. 2005.** Die Assimilationstechnik als Basis für ein optimales Hefemanagement. *Brauwelt*. 2005, 50, S. 1594-1598.
- Thiele, F., Hartwig, A., Back, W. 2008.** Yeast Quality Distribution in the Cone of Cylindro Conical Tanks. *BrewingScience*. 2008, 7/8, S. 148-161.
- Thomas, D. S., Hossack, J. A., Rose, A. H. 1978.** Plasma-Membrane Lipid Composition and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*. 1978, 117, S. 239-245.
- Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y. 1997.** Metabolism of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, Bd. 61, 4.
- Van den Berg, M. A., Steensma, H. Y. 1995.** *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase essential for growth on glucose. *European Journal of Biochemistry*. 1995, Bd. 231, S. 704-713.
- Van den Berg, M.A., et al. 1996.** The Two Acetyl-coenzyme A Synthetasen of *Saccharomyces cerevisiae* with Respect to Kinetic Properties and Transcriptional Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996, Bd. 271, 46, S. 28953-28959.
- Van Urk, H., Leopold Voll, W. S., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. 1990.** Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, Bd. 56, 1, S. 281-287.
- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A., Van Dijken, J. P. 1989.** Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Journal of General Microbiology*. 1989, Bd. 135, S. 2399-2406.
- van Waesberghe, J. W. M. 2001.** Geschmacksstabilität beginnt beim Malz und der Sudhausarbeit. *Brauwelt*. 2001, 42, S. 1810-1815.

- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. 1990.** The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*. 1990, 95, S. 357-381.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. 1990.** Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures. *Journal of General Microbiology*. 1990, Bd. 136, S. 395-403.
- Verstrepen, K. J., et al. 2003.** Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, Bd. 96, 2, S. 110-118.
- Voet, D., Voet, J. G. 1994.** *Biochemie*. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994. 3-527-29249-7.
- Wackerbauer, K., Meyna, S., Marre, S. 2003.** Hydroxy Fatty Acids as indicators for ageing and the influence of oxygen in the brewhouse on the flavour stability of beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2003, 9/10, S. 174-178.
- Wang, X., et al. 1998.** Molecular Cloning, Characterization and Potential Roles of Cytosolic and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase in Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1998, Bd. 140, 4, S. 822-830.
- Wellhoener, U. 2006.** Beurteilung des physiologischen Zustandes von Bierhefe mittels Aktivitätsmessung von Schlüsselenzymen bei Propagation und Gärung. *Dissertation*. s.l. : TU-München, 2006.
- Wening, H., Pötzl, E. 2007.** Modernes Hefemanagement in der Praxis. *Brauwelt*. 2007, 46-47, S. 1366-1369.
- Wenzel, T. J., Luttik, M. A. H., van den Berg, J. A., Steensma, H. Y. 1993.** Regulation of the PDH1 gene encoding the E1a subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 1993, Bd. 10, S. 297-308.
- Weusthuis, R. A., Visser, W., Pronk, J. T., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. 1994.** Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiology*. 1994, 140, S. 703-715.
- Wills, C. 1990.** Regulation of Sugar and Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology*. 1990, 25, S. 245-280.
- Wilson, R. J. H. 1978.** The influence of oxygen on fermentation and storage. *European brewery convention monograph*. 1978, S. 17-27.
- Wurzbacher, M., Franz, O., Back, W. 2005.** Control of sulphite formation of lager yeast. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 2005, 11/12, S. 10-17.
- Yoshioka, K., Hashimoto N. 1984.** Ester Formation by Brewers' Yeast during Sugar Fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1984, 48, S. 333-340.

**Young, E. T., Pilgrim, D. 1985.** Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1985, Bd. 5, 11, S. 3024-3034.

**Zitomer, R. S., Lorry, C. V. 1992.** Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 1992, Bd. 56, S. 1–11.