

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Department für Lebensmittel und Ernährung

Hefepropagation mit High-Gravity Würzen

vom
Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität
angenommene

Diplomarbeit

Vorgelegt von: Martin Nagel
1. Prüfer: Dr.-Ing. F. Jacob
2. Prüfer: Univ.-Prof. Dr. E. Geiger
Vorgelegt am: 28.10.2004

Viele haben mich bei der Fertigstellung dieser Diplomarbeit unterstützt. Den zeitlichen Rahmen konnte ich nur dank Jacqueline Lorenz und Susan Illing einhalten, die einen Großteil der notwendigen Analysen für mich durchgeführt haben. Dr. Fritz Jacob und Dr. Christoph Tenge standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Die Mitarbeiter des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität und des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II, die weitere Analysen für mich durchgeführt haben und in vielfältiger sonstiger Weise ihre Zeit für mich geopfert haben, kann ich nicht alle namentlich nennen. Univ.-Prof. Dr. Eberhard Geiger danke ich für die Nutzung der Einrichtungen seines Lehrstuhls und die Mühe der Zweitkorrektur.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Grundlagen	2
2.1 High Gravity Brewing	2
2.2 Hefevermehrung in der Brauerei	2
2.3 Wirkung von Stress auf Brauereihefen	3
2.4 Der Zellzyklus der Hefe	4
2.5 Der Zuckerstoffwechsel der Hefe	5
3 Material und Methoden	7
3.1 Versuchsdurchführung	7
3.1.1 Beschreibung des Propagators	7
3.1.2 Verwendete Würze und Hefe	8
3.1.3 Durchgeführte Versuche	8
3.2 Analysen	9
3.2.1 Flusszytometrische Zellzyklusanalyse	9
3.2.2 Messung der Enzymaktivität	9
3.2.3 Bestimmung der Zuckerzusammensetzung	9
3.2.4 Ermittlung der Stammwürze, Alkoholgehalt, pH und Vergärungsgrade	9
3.2.5 Bestimmung der Gärungsnebenprodukte	9
3.2.6 Bestimmung der Hefe-Zellzahl	9
3.2.7 Messung der Schaumstabilität	10
4 Ergebnisse und Diskussion	11
4.1 Propagationsversuche	11
4.1.1 Zellzahlentwicklung, Wachstumsraten und Alkoholbildung	11
4.1.2 Enzymaktivität der Hefe	15
4.1.3 Zellzyklus	19
4.1.4 Gärungsnebenprodukte	21
4.2 Gärversuche	26
4.2.1 Gärgeschwindigkeit, Zelle in Schwebe	26
4.2.2 Enzymaktivität der Anstellhefe	29
4.2.3 Analyse der fertigen Biere	32
5 Abschlussdiskussion, Ausblick	35
6 Zusammenfassung	37
Literatur	38

A Methoden	40
A.1 DNA staining protocol for fixed Yeast cells with DAPI	40
A.2 Enzymaktivitätsmessungen	41

Abbildungsverzeichnis

1	Zellzyklus des Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Darstellung im Diagramm eines Flußzytometers [9]	4
2	Schema des Propagationssystems	7
3	Zellzahlentwicklung in reinen Malzwürzen	12
4	Zellzahlentwicklung in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit der Ausgangswürze und einer reinen Malzwürze gleicher Stammwürze	12
5	Wachstumsraten der Hefe in reinen Malzwürzen	13
6	Wachstumsraten der Hefe in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit der Ausgangswürze und einer reinen Malzwürze gleicher Stammwürze	13
7	Alkoholgehalt in Gewichtsprozent der Würzen bei einer Zellzahl von 140-150 Mio. Zellen/ml	14
8	Spezifische Maltase Aktivität der Hefe während der Propagation	16
9	Spezifische ADH Aktivität der Hefe während der Propagation	17
10	Spezifische PDC Aktivität der Hefe während der Propagation	17
11	Spezifische PDH Aktivität der Hefe während der Propagation	18
12	Massenverhältnis von Maltose zu Glucose während der Propagation	18
13	Gegenüberstellung der Zellzyklen aller Propagationsversuche bei definierter Biomasse.	20
14	Während der Propagation gebildetes Acetaldehyd, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	22
15	Während der Propagation gebildetes Ethylacetat, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	22
16	Während der Propagation gebildetes n-Propanol, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	23
17	Während der Propagation gebildetes i-Butanol, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	23
18	Während der Propagation gebildete Amylalkohole, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	24
19	Während der Propagation gebildetes Diacetyl, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	24
20	Während der Propagation gebildetes 2,3-Pentadion, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende.	25
21	Vergärungsgrade im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in reinen Malzwürzen	26
22	Vergärungsgrade im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit aus reinen Malzwürzen gewonnener Anstellhefe	27
23	Zellen in Schwebelage im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in reinen Malzwürzen	27
24	Zellen in Schwebelage im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit aus reinen Malzwürzen gewonnener Anstellhefe	28
25	Spezifische Maltase Aktivität der Anstellhefe	29
26	Spezifische ADH Aktivität der Anstellhefe	30

27	Spezifische PDC Aktivität der Anstellhefe	30
28	Spezifische PDH Aktivität der Anstellhefe	31
29	Schaumzahlen der fertigen Biere, Anstellhefe der Gärung gewonnen aus Propagationen mit verschiedenen Würzen	33
30	Gärungsnebenprodukte in den fertigen Biere, Anstellhefe der Gärung gewonnen aus Propagationen mit verschiedenen Würzen	34

Tabellenverzeichnis

1	Zusammenfassung der durchgeführten Versuche	8
2	Sensorische Bewertung der fertiggestellten Biere	33

1 Einleitung und Problemstellung

High Gravity Brewing, das Herstellen einer höherprozentigen Würze und anschließendes Verdünnen auf den gewünschten Extraktgehalt (vgl. 2.1 auf der nächsten Seite), ist vor allem bei ausländischen Brauereien eine verbreitete Methode um die Kapazität eines Sudwerks zu erhöhen und Energie zu sparen [10, 14, 18]. Bei diesem Verfahren ist die Hefe allerdings vermehrt medienbedingten Stressfaktoren (vgl. 2.3 auf Seite 3) - erhöhter Extrakt- und Ethanolgehalt der Würze - ausgesetzt [4, 13, 16]. Bei der Produktion von Bier ist Hefe ein wichtiger Rohstoff. Die Vitalität, d.h. der physiologische Zustand bzw. die Aktivität der Hefe hat großen Einfluss auf die Qualität des hergestellten Bieres [11]. Darum muss (vgl. 2.2 auf der nächsten Seite) bei Brauprozessen, die die Hefe zusätzlich belasten - wie High Gravity Brewing - der Hefeführung bzw. Propagation besondere Beachtung geschenkt werden.

In einer Brauerei die ausschließlich nach dem High Gravity Verfahren arbeitet, steht nur Würze mit einem erhöhten Stammwürzegehalt zur Verfügung. Erfolgt ihr Einsatz unverdünnt zur Hefevermehrung wird die Hefe zusätzlich zur Gärung ein weiteres mal durch medienbedingte Stressfaktoren belastet. Dieser Problematik steht eine Gefährdung der biologischen Sicherheit durch eine Würzeverdünnung schon in der Reinzucht gegenüber.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von einer Propagation mit High Gravity Würzen auf die Hefe und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das fertige Bier zu klären. Zu diesem Zweck wurden Hefepropagationen bei verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die gewonnene Hefe zur Gärung genutzt, und ein fertiges Bier hergestellt.

Der physiologische Zustand der Hefe im Rahmen der Propagationen wurde mit Hilfe der Zellzyklus Analyse und der Aktivitätsbestimmung wichtiger Enzyme des Zuckerstoffwechsels der Hefe erfasst. Desweiteren wurden die Gärungsnebenprodukte, die Zellzahlentwicklung, Wachstumsraten, Extrakt- und Alkoholgehalte bestimmt. Beim fertigen Bier lag das Augenmerk auf den Gärungsnebenprodukten, der Schaumhaltbarkeit und dem Geschmackseindruck.

2 Grundlagen

2.1 High Gravity Brewing

High Gravity Brewing bzw. das Brauen mit hoher Stammwürze bedient sich der Möglichkeit eine gegenüber dem herzustellenden Bier höherprozentige Würze herzustellen und diese vor oder nach der Gärung mit Wasser auf den benötigten Extraktgehalt zu verdünnen. Dieses vor allem im Ausland verbreitete Verfahren eignet sich dazu, die Kapazität eines bereits bestehenden Sudhauses zu erhöhen, als auch die Wirtschaftlichkeit des Brauprozesses in energetischer Hinsicht zu verbessern. Die Energieeinsparung resultiert aus dem Wegfall der Heiz- und Kühlkosten für das Verdünnungswasser, selbst bei einer geringen Erhöhung der Stammwürze auf 13 oder 14 % zeigen sich bereits deutliche Einsparungen [10, 14].

Aus technologischer Sicht wird die Höhe der Würzekonzentration in der Regel durch die Läutereinrichtung im Sudhaus begrenzt. Zu beachten ist auch ein Anstieg der Glattwasserkonzentration, die eine Wiederverwendung notwendig macht, um die verbesserte Wirtschaftlichkeit des High Gravity Brewing zu bewahren. Bei Bieren die nicht dem deutschen Reinheitsgebot unterliegen lässt sich der Extraktgehalt noch weiter durch die Verwendung von Sirup oder Zucker steigern. Probleme bei der Maischarbeit sind außer bei Rohfruchtmaischen nicht zu erwarten [10, 14].

Es kann vor oder nach der Gärung verdünnt werden, eine Verdünnung nach der Gärung bringt zwar keinen energetischen Gewinn - die abzuführende Gärungswärme bleibt gleich - aber das benötigte geringere Tankvolumen spart Geld. An das Verdünnungswasser sind die selben hohen Anforderungen zu stellen wie an das Brauwasser selbst, es muss enthärtet und biologisch einwandfrei sein. Desweiteren muss auf eine genaue kontinuierliche Dosierung geachtet werden, um eine gleichmäßige Mischung zu erhalten [10, 14].

Geschmacklich macht sich High Gravity Brewing im fertigen Bier kaum bemerkbar, solange während des Verfahrens eine Stammwürze von etwa 15 % nicht überschritten wird. Erfolgt die Verdünnung nach der Gärung werden mehr Gärungsnebenprodukte gebildet, davon gehen vor allem die Ester in den Biergeschmack ein und sorgen für eine vollmundigere, blumigere Note. Der Schaum leidet im allgemeinen abhängig vom Verdünnungsgrad, die Bierstabilität verbessert sich etwas [10, 14].

2.2 Hefevermehrung in der Brauerei

Zur Hefevermehrung im Brauprozess werden heute in der Regel geschlossene Hefereinzuchtanlagen verwendet. Die Vermehrung erfolgt in Propagatoren (Vermehrungstanks) bis hin zu der zum

Anstellen benötigten Biomasse [11]. Zusätzlich zur Herstellung der in der Brauerei benötigten Hefemenge ist das Ziel der Hefeherführung eine möglichst vitale und gärkräftige Hefe zu erhalten, d.h. die Hefe nach Möglichkeit in ihrer exponentiellen Wachstumsphase zu halten und damit hochaktive Erntehefe zur Verfügung zu haben [24]. Der Zustand der Hefe spielt eine wesentliche Rolle für den weiteren Produktionsverlauf und die Qualität des Bieres. Eine in optimaler Verfassung befindliche Bierhefe bietet viele Vorteile bei der Gärung. Die Angärung erfolgt schneller und die Gesamtgärzeit wird verringert. Diacetyl, ein unerwünschtes Gärungsnebenprodukt, wird schneller und weitgehender abgebaut. Der Gärprozess führt zu einem reineren und runderen Biergeschmack [11].

In der aktuellen Brauereipraxis werden zur Erreichung der gewünschten Ziele verschiedene Verfahren eingesetzt, von verschiedenen isothermen Verfahren über das Assimilationsverfahren bis hin zu erst in Erprobung befindlichen Verfahren zur kontinuierlichen Hefeherführung [11, 19, 24].

Als Beispiel können das Conti-Prob System und das Assimilationsverfahren angeführt werden. Beim Conti-Prob System wird sterile Würze mit Hefe im Propagator bzw. Vermehrungstank an gestellt, mit Sterilluft und Umpumpen des Tankinhalts erfolgt eine intensive Belüftung. Das Assimilationsverfahren bedient sich zweier Tanks, die Würze wird anstatt des Umpumpens kontinuierlich mit Hilfe von Sterilluft von einem Tank in den anderen gedrückt. Während des ganzen Assimilationsverfahrens wird auch ständig belüftet [11, 24].

Abgesehen vom verwendeten Verfahren nehmen vor allem die Parameter Temperatur, der Versorgungsgrad mit Sauerstoff, das Angebot an Nährstoffen und die Zuckerkonzentration Einfluss auf die Propagation. Betrieblich liegen meistens alle Parameter bis auf Temperatur und Sauerstoffversorgung fest, diese können in gewissen Rahmen variiert werden [12].

2.3 Wirkung von Stress auf Brauereihefen

Die Hefe kann während des Brauprozesses durch verschiedene Stressfaktoren belastet werden. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen, medienbedingte und verfahrenstechnische. Zu den medienbedingten gehören unter anderem ein erhöhter Extrakt- und Ethanolgehalt der Würze, wie sie beim High Gravity Brewing auftreten. Verfahrenstechnischen Einfluss auf die Stressbelastung der Hefe haben z.B. die Hefeaufbewahrung, die Hefebelüftung, das Waschen der Hefe mit Säure und die Belastung durch Scherkräfte und Druck [4, 6, 13, 16]

Die Hefe reagiert auf Stress mit einer passiven oder aktiven Antwort. Bei der passiven Stressantwort ändert sich der Stoffwechsel der Hefe durch eine Veränderung der Umgebung unspezifisch, z.B. führt eine Temperaturerhöhung zur Beschleunigung des Stoffwechsels. Bei der aktiven

Stressantwort stellen sich gezielte Änderungen im Stoffwechsel ein, die der Hefe eine Adaption an die neue Situation ermöglichen und ihr Überleben sichern. Es wird eine ganze Gruppe von Stoffen gebildet, die unter anderem die Aufgabe haben, die Struktur der Zellmembran und wichtiger Proteine zu stabilisieren [13].

Die Änderungen im Stoffwechsel haben auch einen Einfluss auf die gebildete Menge der Gärungsnebenprodukte und damit auf den Geschmack des fertigen Bieres. Erhöhte Stammwürzekonzentrationen z.B. führen zu einer überproportionalen Bildung von Estern während der Gärung [8, 21, 22, 25].

2.4 Der Zellzyklus der Hefe

Ein Parameter der auf die Physiologie der Hefe großen Einfluss hat ist der DNA-Gehalt pro Zelle, über ihn lässt sich eine Hefezelle einer Phase des Zellzyklus zuordnen. Brauereihefen zeichnen sich durch eine Besonderheit während der Vermehrung aus, es erfolgt eine asymmetrische Teilung durch Ausbildung einer zunächst kernlosen Knospe [9]. Der Zellzyklus der Brauereihefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 1).

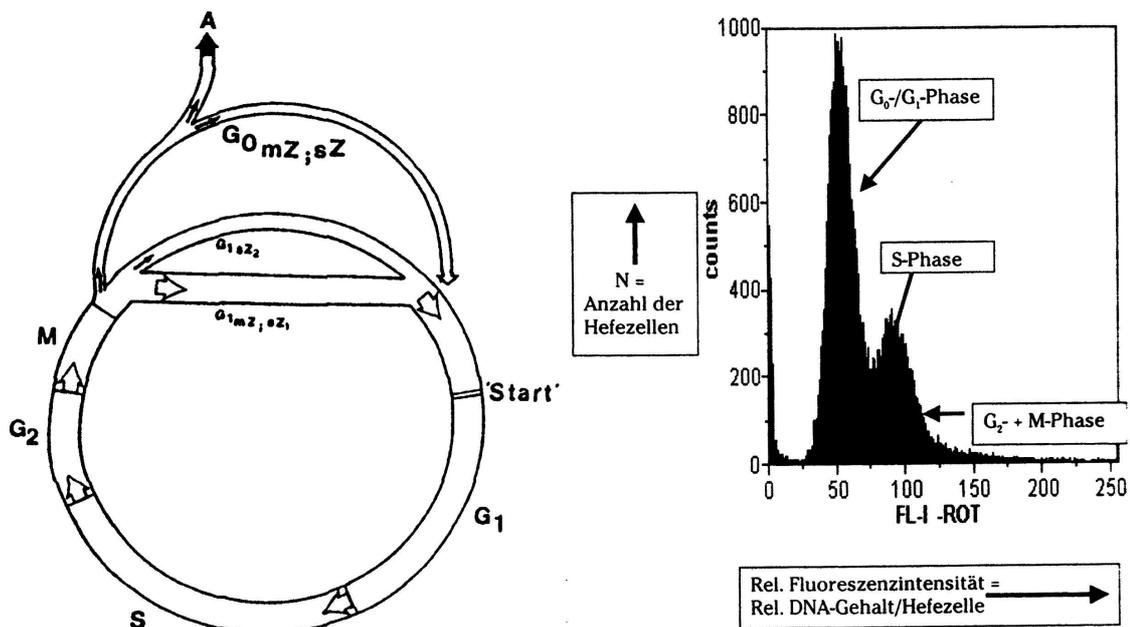


Abbildung 1: Zellzyklus des Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und Darstellung im Diagramm eines Flußzytometers. A Autolyse, M Mitose (Zellen in der Zellteilung, S Synthese (Zellen während der Replikation), G₁ gap 1 (Zellen vor der Replikation), G₂ (Zellen nach der Replikation), G₀ quieszente Zellen, G_{1mZ} G₁-Mutterzelle, G_{1sZ1} große G₁-Sprosszelle, G_{1sZ2} kleine G₁-Sprosszelle [9].

Die G₀-Phase ist die Ruhephase des Zellzyklus, die Hefezellen sind zwar vital aber nicht vermeh-

rungsfähig. Diese Zellen werden auch als schlafende, quieszente Zellen bezeichnet.

Die G_1 -Phase nimmt die längste Zeit in Anspruch, variiert aber entsprechend den Wachstumsbedingungen der Hefe im Bereich von Minuten bis Stunden. Auch die Mutter- und Sprosszellen können sich in der Dauer ihrer G_1 -Phase unterscheiden, kleine Sprosszellen müssen beispielsweise vor einem erneuten Zellzyklus ein Größenwachstum durchführen (vgl. Abb. 1 auf der vorherigen Seite G_{1sZ2}).

Bei günstigen Wachstumsbedingungen wird nach der Replikation ein neuer Zellzyklus initiiert. Ungünstige lassen die Zellen aus dem Zyklus ausscheren und zu ruhenden Zellen (vgl. Abb. 1 auf der vorherigen Seite $G_{0mZ;sZ}$) werden, bis sie entweder autolysieren oder ihnen eine Verbesserung der Umweltbedingungen den Wiedereintritt in den Zellzyklus ermöglicht. Desweiteren muss auch berücksichtigt werden, dass eine Hefezelle nur eine begrenzte Zahl von Sprosszellen setzen kann. Die zurückbleibenden Sprossnarben schädigen die Zellmembran bis hin zum Absterben der Zelle [9].

Mit Hilfe der Zellzyklusanalyse (vgl. 3.2.1 auf Seite 9 und Abb. 1 1 auf der vorherigen Seite) lässt sich der optimale Entnahmezeitpunkt der Anstellhefe für die Gärung aus der Hefeherführung ermitteln. Die Hefepopulation sollte sich in der G_2 -Phase befinden. Eine unhomogene Verteilung über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus ist zu vermeiden. Die Zellen könnten nicht zum selben Zeitpunkt mit der Gärung beginnen, d.h. zwei unterschiedliche Hefepopulationen mit verschiedenen Eigenschaften würden an der Fermentation teilnehmen [7, 9].

2.5 Der Zuckerstoffwechsel der Hefe

Die Bierhefe ist in der Lage Zucker zu Alkohol zu vergären, unter anaeroben Bedingungen ist es die einzige Möglichkeit der Energiegewinnung, unter aeroben Bedingungen wird der Zucker veratmet. Diese oxidative Energiegewinnung ist für die Hefe energetisch wesentlich günstiger, Atmung führt zu einem wesentlich schnelleren Aufbau von Biomasse. Allerdings kann der Gärungsstoffwechsel auch unter aeroben Bedingungen einsetzen, diese Erscheinung wird als Crabtree Effekt bezeichnet [15, 20].

Der Zuckerstoffwechsel verläuft bis zur Bildung des Pyruvats für Gärung und Atmung über den gleichen biochemischen Weg. Auf dieser Ebene konkurriert die Atmung mit der Gärung in Form der Enzyme des Pyruvatdehydrogenase Komplexes (PDH) und der Pyruvat Decarboxylase (PDC). Ein weiterer Schritt in der Gärung ist die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol mit dem Enzym Alkohol Dehydrogenase (ADH). Eine hohe PDC und ADH Aktivität lassen also auf eine hohe Gärungsaktivität der Hefe schließen [15].

Der Crabtree Effekt entsteht an dieser Zweigstelle durch verschiedene Einflüsse. Eine erhöhte Glucosekonzentration im Milieu der Hefezelle führt zu einer Hemmung des Atmungsstoffwechsels über mehrere Mechanismen, beispielsweise durch die Hemmung der Synthese von Coenzymen, die für den aeroben Abbau von Pyruvat benötigt werden. Bei der Bierhefe kann der Crabtree Effekt eine weitere Ursache haben, die Kapazität ihres Atmungsstoffwechsels ist beschränkt, dadurch greift die Hefe bei hohem Zuckerangebot zusätzlich auf die energetisch weniger günstige Gärung zurück, um den Überschuss an gebildeten Pyruvat abzubauen. Unter den Propagationsbedingungen in Brauereien tritt der Crabtree Effekt wegen der hohen Zuckerkonzentrationen in der Regel immer - mehr oder weniger stark ausgeprägt - auf [15, 20].

Eine Enzymaktivitätsanalyse (vgl. 3.2.2 auf Seite 9) von PDH, PDC und ADH kann nach dieser Betrachtung Aufschluss über die aktuelle Gär- und Atmungsaktivität der Hefe geben. Allerdings sind die Ergebnisse nur in einem engen Rahmen zu betrachten und nicht als Absolutwerte anzusehen. Es werden nur wenige Abschnitte eines komplexen Stoffwechselforgangs erfasst, der von vielen Parametern beeinflusst werden kann. Beispielsweise eine Anpassung der Hefe an die Umgebungsbedingungen oder Einflüsse an anderen Stellen des Zuckerstoffwechsels, angefangen beim Aufbau von Reservekohlehydraten bis zum Transport der Zucker in die Zelle [15, 17, 20].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

3.1.1 Beschreibung des Propagators

Der Propagator für alle in dieser Arbeit ausgewerteten Versuche bestand aus einem Vermehrungstank und verschiedenen Peripheriegeräten (Verteilerpaneel, Personal Computer, Thermostat und verschiedenen Regelungs- und Steuerungseinheiten). Der Aufbau der Anlage wird im folgenden Schema dargestellt (Abb. 2).

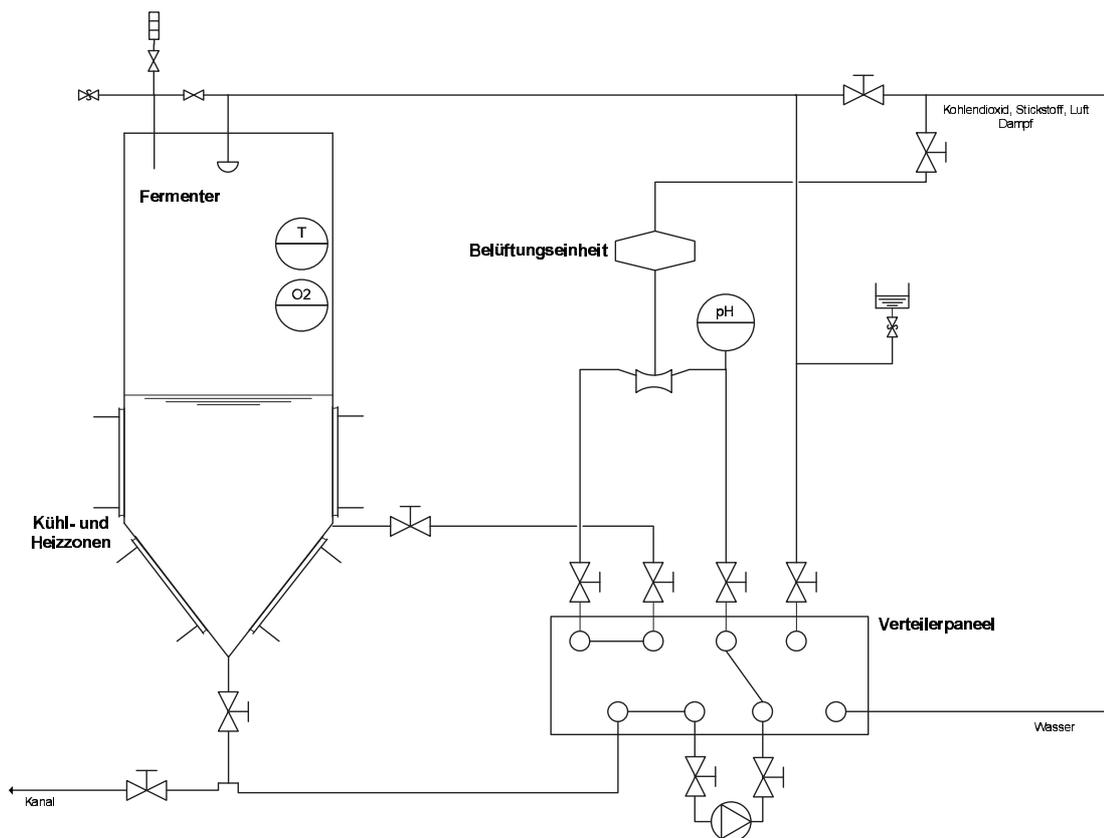


Abbildung 2: Schema des Propagationssystems. Für CIP, Umpumpen und Belüftung wird das Verteilerpaneel verwendet. Die Belüftungseinheit wird durch den im Tank eingebauten Sauerstoffsensoren gesteuert, die Luft wird sterilfiltriert. Die Temperaturregelung erfolgt über die Kühl- und Heizzonen.

Die Steuerung der gesamten Anlagen erfolgt über eine auf Siemens Simatic S5 beruhenden Visualisierung am PC, die auf ein PHOENIX Bussystem aufsetzt.

3.1.2 Verwendete Würze und Hefe

Für alle Versuche wurde untergärige Würze der Staatsbrauerei Weihenstephan verwendet. Für die höheren Stammwürzegehalte (über 12 °P) wurde Vorderwürze verdünnt und mit Hopfen (etwa 5 g α pro 40l) eine Stunde gekocht. Die Herstellung der Würzen mit Zuckersirup erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Zuckerarten zu untergäriger Ausschlagwürze.

In allen Versuchen fand der untergärige Hefestamm 34/70 der Hefebank Weihenstephan Anwendung.

3.1.3 Durchgeführte Versuche

Die durchgeführten Versuche teilten sich in zwei Versuchsreihen. In der ersten wurde nur die Propagation durchgeführt und analytisch begleitet. In der zweiten wurde unter gleichen Bedingungen bis zu einer Zellzahl von 120 Mio. Zellen pro ml propagiert. Mit der gewonnenen Hefe wurde untergärige Ausschlagwürze der Staatsbrauerei Weihenstephan in der Kleingäranlage des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei II vergoren. Die Biere lagerten eine Woche bei 4 °C und drei Wochen bei 0° C in zehn Liter Cornelius-Behältern. Die folgende Tabelle fasst die Versuche kurz zusammen.

Tabelle 1: Zusammenfassung der durchgeführten Versuche. S Extraktgehalt der Anstellwürze, Zz Hefezellzahl beim Anstellen, M Anstellmenge.

Versuchsreihe 1, Propagationen (T = 15 °C, O₂ = 2 mg/l)				
	Datum/Uhrzeit	S [G/G%]	Zz [Mio./ml]	M [l]
Versuch 0.1 12 °P	01.07.2004 05:30	11,90	7	52
Versuch 1.1 14 °P	07.07.2004 18:00	14,17	10	40
Versuch 2.1 16 °P	13.07.2004 17:00	16,13	10	35
Versuch 3.1 18 °P	21.07.2004 16:00	17,93	10	39
Versuch 4.1 16 °P (mit Glucosesirup)	28.07.2004 16:00	15,17	11	50
Versuch 5.1 16 °P (mit Maltosesirup)	02.08.2004 16:30	16,52	12	50
Versuchsreihe 2, Gärungen (T = 15 °C)				
	Datum/Uhrzeit	S [G/G%]	Zz [Mio./ml]	M [l]
Versuch 0.2 12 °P	08.09.2004 10:00	11,80	12	20
Versuch 1.2 12 °P	09.09.2004 12:00	10,80	12	20
Versuch 2.2 12 °P	07.09.2004 18:00	11,70	14	20
Versuch 3.2 12 °P	02.09.2004 14:00	11,20	14	20
Versuch 4.2 12 °P	26.08.2004 20:00	11,60	14	20
Versuch 5.2 12 °P	31.08.2004 14:00	11,40	14	20

3.2 Analysen

3.2.1 Flusszytometrische Zellzyklusanalyse

In geeigneten Zeitabständen, die der Probenübersicht im Anhang zu entnehmen sind, erfolgten Proben- und Messwertaufnahmen. Die Probe für die flusszytometrische Analyse wurde in Ethanol fixiert (jeweils 1 ml Probe in 10 ml 70 %igem Ethanol) und bis zur Durchführung der Analyse kühl gelagert.

Für die flusszytometrische Analyse wurde eine Flusszytometer PAS der Firma Partec, Münster, verwendet. Das System verwendet zur Anregung zwei Lichtquellen, eine Quecksilberlampe im UV-Bereich und einen Argon-Ionen Laser im Blaulicht-Bereich. Die DNA der Zellen wurde mit DAPI Lösung gefärbt (vgl. A.1 auf Seite 40).

3.2.2 Messung der Enzymaktivität

Zur Messung der Aktivität der Enzyme Maltase, ADH, PDC und PDH wurde eine Hefeprobe mechanisch aufgeschlossen. Im gewonnenen Heferohextrakt wurde die Aktivität der Enzyme photometrisch bestimmt (vgl. A.2 auf Seite 41).

3.2.3 Bestimmung der Zuckerzusammensetzung

Die Zuckerzusammensetzung der Würzen wurde gemäß MEBAK III 3.2.1 mittels HPLC ermittelt [1].

3.2.4 Ermittlung der Stammwürze, Alkoholgehalt, pH und Vergärungsgrade

Der Stammwürzegehalt der Würzen und Biere, sowie der Alkoholgehalt, pH und die Vergärungsgrade wurden mit einem SCABA gemäß MEBAK II 2.13.6.2 und 2.17 bestimmt [2].

3.2.5 Bestimmung der Gärungsnebenprodukte

Die Menge der Gärungsnebenprodukte wurde mittels Headspace Gaschromatographie gemäß MEBAK III 1.1.1 und 1.2.1 bestimmt [1].

3.2.6 Bestimmung der Hefe-Zellzahl

Die Hefezellzahl wurde gemäß MEBAK III 10.4.3.1 und 10.11.4.4 mit der Thoma-Zählkammer ermittelt [1].

3.2.7 Messung der Schaumstabilität

Die Schaumstabilität wurde mit dem Schaummessgerät FT002 von Steinfurth bestimmt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Propagationsversuche

4.1.1 Zellzahlentwicklung, Wachstumsraten und Alkoholbildung

Bei der Zellzahlentwicklung in den unterschiedlichen Propagationswürzen sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei den reinen Malzwürzen (vgl. Abb. 3 auf der nächsten Seite) erreicht die Würze mit einer jeweils 2° P höheren Stammwürze die gleiche Zellzahl (betrachtet in der exponentiellen Wachstumsphase) etwa zwei bis drei Stunden später. Die zeitliche Differenz setzt sich aus einer Verlängerung der stationären bzw. lag Phase und eine langsamere Vermehrung der Hefe in der exponentiellen Phase zusammen. Das verminderte Wachstum mit steigender Stammwürze ist besonders gut an den maximal erreichten Wachstumsraten (vgl. Abb. 5 auf Seite 13) zu erkennen.

Wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Hefe haben die Temperatur, die Belüftung und die Zusammensetzung der Würze [12]. In der Versuchsreihe wurde nur die Beschaffenheit der Würze - Zuckergehalt und Zusammensetzung - variiert. Hemmend auf das Hefewachstum wirken u.a. eine erhöhte Stressbelastung durch hohen Alkohol- und Zuckergehalt im Milieu [4, 13, 16]. Im während der Propagation gebildeten Alkoholgehalt zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede (vgl. Abb. 7 auf Seite 14), folglich muss für die zeitlichen Differenzen in der Zellzahlentwicklung die Zuckerkonzentration bzw. der Stammwürzegehalt von wesentlicher Bedeutung sein.

Es zeigen sich auch Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe bei gleicher Stammwürze aber veränderter Zuckerzusammensetzung durch Zugabe von Glucose- oder Maltosesirup (vgl. Abb. 4 auf der nächsten Seite und Abb. 6 auf Seite 13). Der Unterschied zwischen der reinen Malzwürze und der Würze mit Zusatz von Glucosesirup wurde wahrscheinlich durch die Unreinheit des Glucosesirups und die nicht ganz erreichte Stammwürze von 16° Plato während der Würzekonfektionierung (vgl. 3.1.2 auf Seite 8) unterdrückt. Verantwortlich für das veränderte Hefewachstum in der Versuchsreihe sind also sowohl die Zuckerkonzentration als auch die Zuckerzusammensetzung.

Zuckerkonzentration und Zusammensetzung beeinflussen die Hefe in ihrer Stoffwechselaktivität und damit ihrer Enzymausstattung und Aktivität. Der Transport von Nährstoffen durch die Zellmembran - insbesondere der Zucker - ist auch betroffen [15, 17, 20].

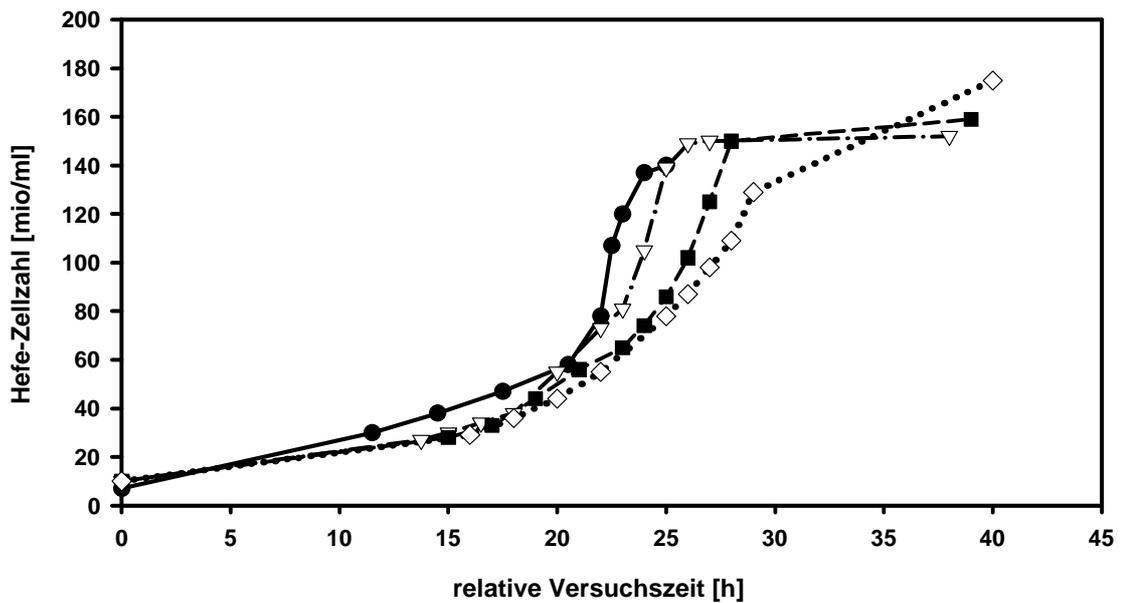


Abbildung 3: Zellzahlentwicklung in reinen Malzwürzen mit einer Stammwürze von 12 °Plato (●), 14 °Plato (▽), 16 °Plato (■) und 18 °Plato (◇).

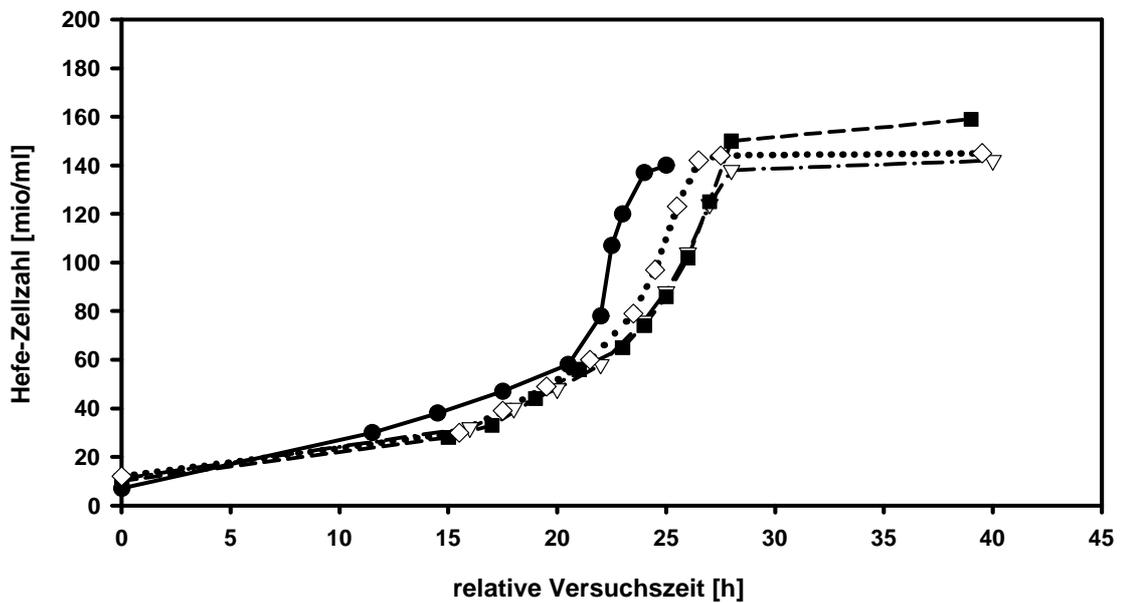


Abbildung 4: Zellzahlentwicklung in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit der Ausgangswürze und einer reinen Malzwürze gleicher Stammwürze. Ausgangswürze mit 12 °Plato (●), Reine Malzwürze 16 °Plato (■), Ausgangswürze mit Glucosesirup 16 °Plato (▽) und Ausgangswürze mit Maltosesirup 16 °Plato (◇)

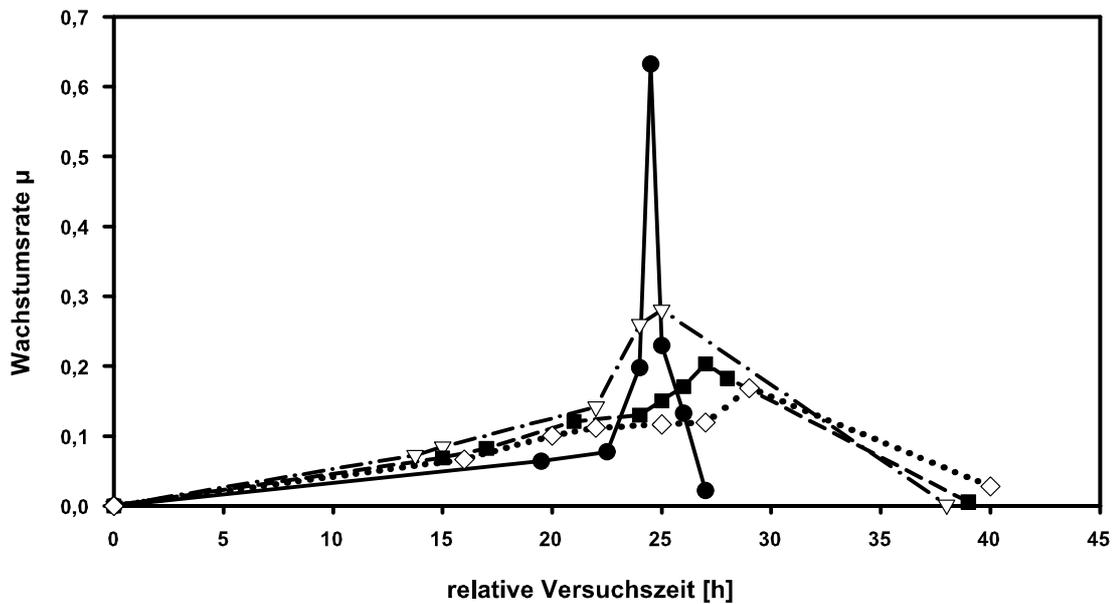


Abbildung 5: Wachstumsraten der Hefe in reinen Malzwürzen mit einer Stammwürze von 12 °Plato (●), 14 °Plato (▽), 16 °Plato (■) und 18 °Plato (◇).

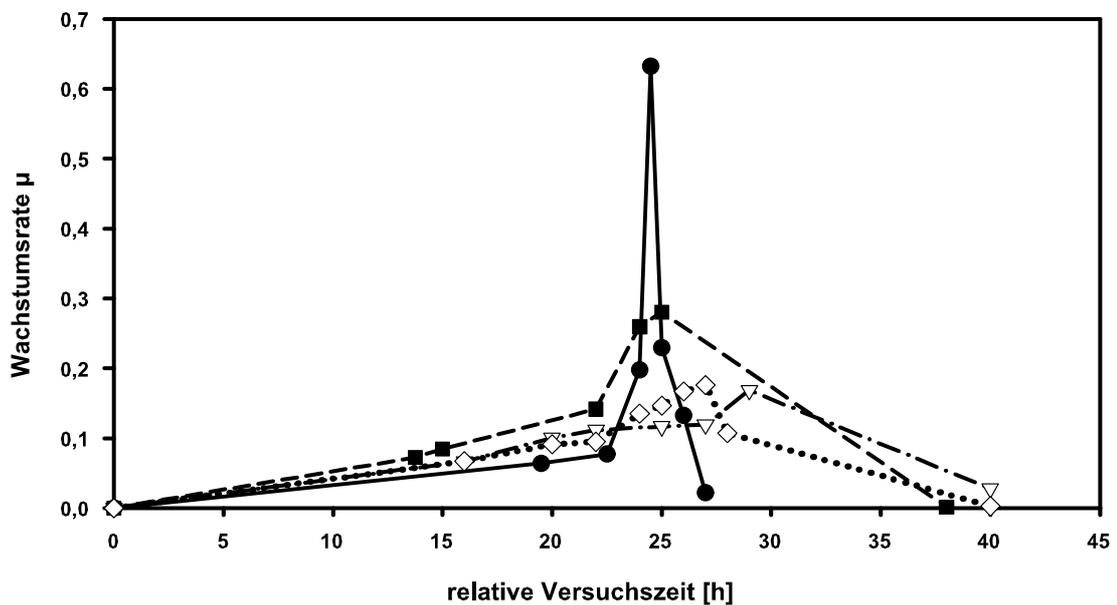


Abbildung 6: Wachstumsraten der Hefe in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit der Ausgangswürze und einer reinen Malzwürze gleicher Stammwürze. Ausgangswürze mit 12 °Plato (●), Reine Malzwürze 16 °Plato (■), Ausgangswürze mit Glucosesirup 16 °Plato (▽) und Ausgangswürze mit Maltosesirup 16 °Plato (◇)

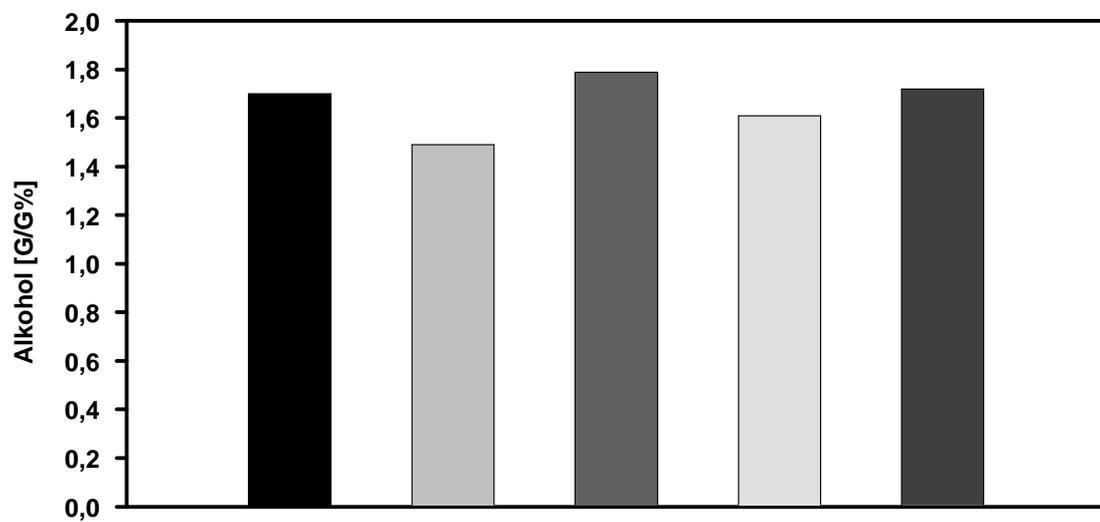


Abbildung 7: Alkoholgehalt in Gewichtsprozent der Würzen bei einer Zellzahl von 140-150 Mio. Zellen/ml. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

4.1.2 Enzymaktivität der Hefe

Der Crabtree Effekt könnte, ausgelöst bzw. verstärkt durch steigende Glucosekonzentrationen in der Würze, eine mögliche Ursache für das verlangsamte Wachstum mit sich erhöhender Stammwürze darstellen (vgl. 2.5 auf Seite 5). Um das Verhältnis zwischen Gärung und Atmung zumindestens qualitativ bzw. in Relation zwischen den einzelnen Versuchen sehen zu können, wurden die Enzymaktivitäten von ADH, PDC und PDH bestimmt (vgl. Abb. 9 auf Seite 17, 10 auf Seite 17 und 11 auf Seite 18). Die Maltase Aktivität (vgl. Abb. 8 auf der nächsten Seite) repräsentiert zu einem gewissen Grad die Aufnahmegeschwindigkeit von Maltose in die Hefezelle. Die Transfergeschwindigkeit kann zu einem limitierenden Faktor des Zuckerstoffwechsels werden. Glucose- und Maltosetransfer konkurrieren miteinander, dadurch lässt sich als zusätzlicher Faktor die Stärke der Beeinflussung der Hefe durch die Glucosekonzentration abschätzen. [17]

Die Interpretation der Ergebnisse kann sich aufgrund der hohen Komplexität der Stoffwechselvorgänge nur auf Verhältnisse oder Vergleiche zwischen den Versuchen oder mit der Anstellhefe stützen.

Betrachtet man die Werte der reinen Malzwürzen lässt sich - vor allem in der log-Phase - eine Schwächung des Atmungsstoffwechsels über die geringeren PDH Aktivitäten erkennen. Die Unterschiede sind teilweise nur sehr gering, werden aber bei der Betrachtung der beiden Eckpunkte der 12 °P und der 18° P Würze deutlich. Die PDC-Aktivität steigt hingegen analog, die Gärung wird gestärkt, der Crabtree Effekt tritt deutlicher ein. Durch die Gärungsaktivität trotz aeroben Verhältnissen nutzt die Hefe die vorhandenen Zucker weniger effizient weniger Biomasse wird in der gleichen Zeit produziert (vgl. 4.1.1 auf Seite 11).

Eine klarere Abnahme der PDH Aktivität wird möglicherweise durch die Maltosetransferrate verzerrt, eine unterschiedliche Aufnahme rate kann starken Einfluss auf den Zuckerstoffwechsel haben [17]. Betrachtet man die Maltaseaktivität, nimmt sie nicht - wegen der Hemmung des Maltosetransfers - wie erwartet mit zunehmender Glucosekonzentration ab, sondern es ergibt sich ein Minimum bei einer Stammwürze von 16° P. Ein weiteres Minimum bei diesem Extraktgehalt findet sich im Massenverhältnis von Maltose und Glucose in der log-Phase (vgl. Abb. 12 auf Seite 18). Die Massenverhältnisse und Enzymaktivitäten verhalten sich über alle Versuche hinweg ähnlich, dadurch bestätigt sich weiter, dass auch die Zuckerzusammensetzung der Würze einen wesentlichen Einfluss hat.

Die Würze mit Zusatz von Maltosesirup zeigt hohe Aktivitäten bei allen Enzymen. Möglicherweise ist bei diesen Versuchsbedingungen die maximale Atmungskapazität der Hefe erreicht und die Hefe baut überschüssiges Pyruvat (vgl. 2.5 auf Seite 5) zusätzlich über Gärung ab. Aus der

parallelen Aktivität der beiden Stoffwechselwege Atmung und Gärung würden sich die gemessenen hohen Enzymaktivitäten sowohl bei PDH als auch PDC und ADH herleiten.

Die bei der Würze mit Zusatz von Glucosesirup erwartete starke Hemmung der Atmungskette wird erst ersichtlich, wenn man die hohe PDH-Aktivität der Anstellhefe (vgl. Abb. 11 auf Seite 18) mit berücksichtigt. Der Abfall der Aktivität ist im Vergleich zu allen anderen Versuchen am höchsten und setzt sich kontinuierlich fort, die Aktivität bleibt nicht auf der selben Ebene oder erholt sich wieder wie unter den anderen Versuchsbedingungen.

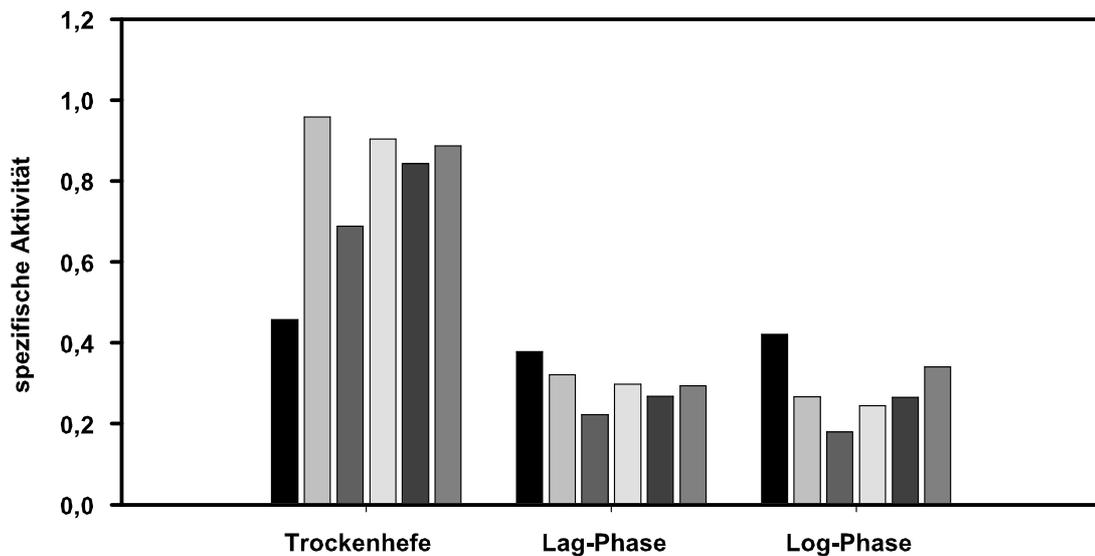


Abbildung 8: Spezifische Maltase Aktivität der Hefe während der Propagation gemessen in der Anstellhefe (Trockenhefe), während der lag-Phase und zu Beginn der log-Phase des Zellwachstums. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

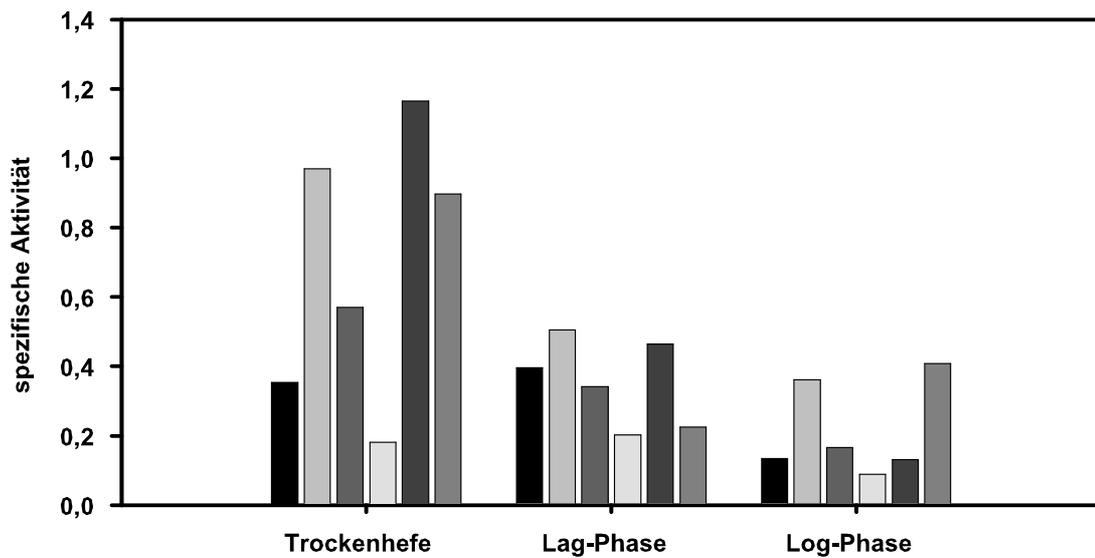


Abbildung 9: Spezifische ADH Aktivität der Hefe während der Propagation gemessen in der Anstellhefe (Trockenhefe), während der lag-Phase und zu Beginn der log-Phase des Zellwachstums. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

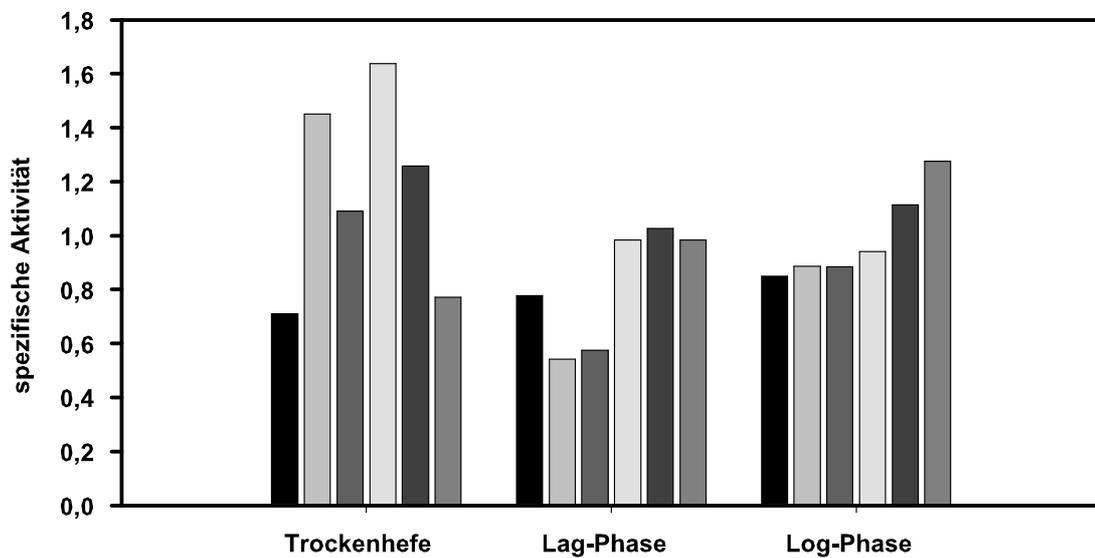


Abbildung 10: Spezifische PDC Aktivität der Hefe während der Propagation gemessen in der Anstellhefe (Trockenhefe), während der lag-Phase und zu Beginn der log-Phase des Zellwachstums. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

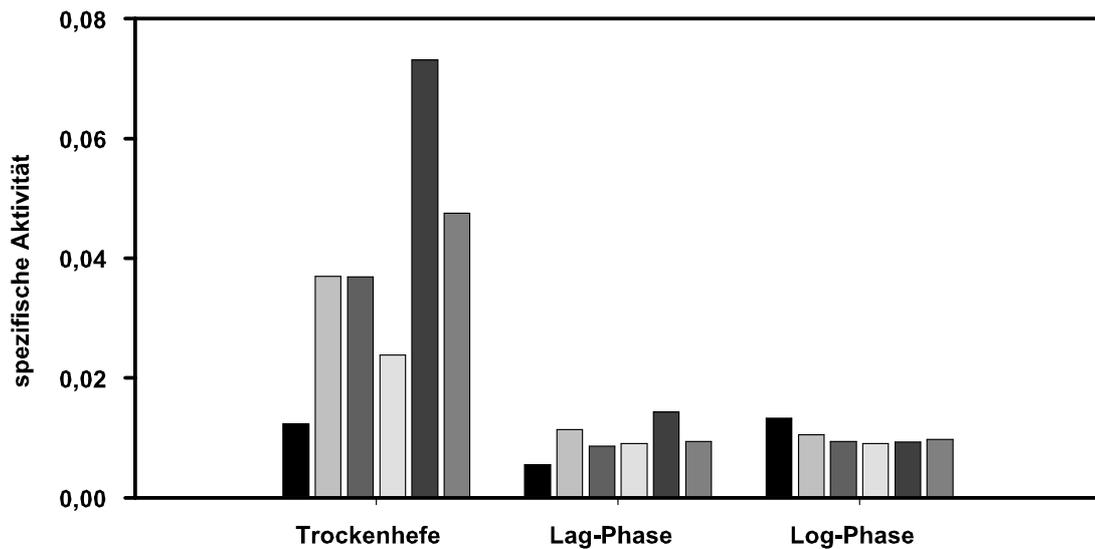


Abbildung 11: Spezifische PDH Aktivität der Hefe während der Propagation gemessen in der Anstellhefe (Trockenhefe), während der lag-Phase und zu Beginn der log-Phase des Zellwachstums. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

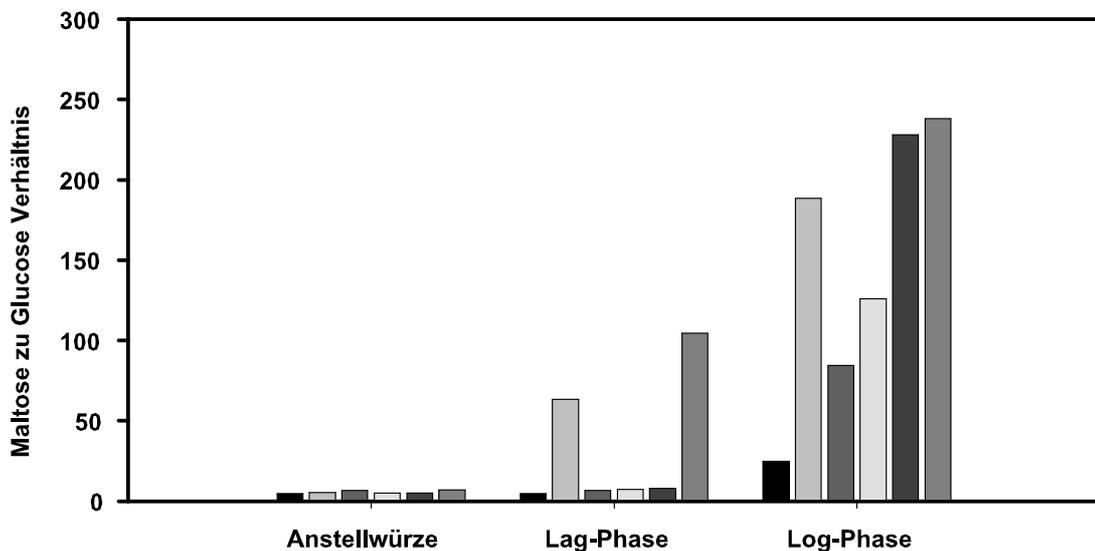


Abbildung 12: Massenverhältnis von Maltose zu Glucose während der Propagation gemessen in der Anstellwürze, während der lag-Phase und zu Beginn der log-Phase des Zellwachstums. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

4.1.3 Zellzyklus

Bei der Propagation mit High-Gravity Würzen ist die Hefe hauptsächlich zwei potentiellen Stressfaktoren ausgesetzt, dem hohen Stammwürzegehalt und oxidativer Belastung durch die Belüftung (vgl. 2.3 auf Seite 3). Sauerstoff stellt für die Hefe, trotz seiner Notwendigkeit für die Atmung, eine Belastung durch Bildung toxischer Zwischenprodukte dar [13]. Die Zellzyklusanalyse gibt Auskunft über den physiologischen Zustand der Hefe und damit auch zumindestens indirekt über die Belastung durch Stressfaktoren. Stress beeinflusst den Membrantransport, den Stoffaustausch und damit die Physiologie und den Zellzyklus der Hefe [9, 13].

Bei den durchgeführten Versuchen befinden sich alle Hefepopulationen zum größeren Prozentsatz in der G_2 -Phase (vgl. Abb. 13 auf der nächsten Seite), sie vermehren sich aktiv (vgl. 2.4 auf Seite 4). Bei den höheren Stammwürzegehalten über 14° P befinden sich fast alle Zellen in der G_2 -Phase, das Milieu bietet anscheinend optimale Vermehrungsbedingungen für die Hefe. Die erhöhte Menge an freien Aminostickstoffen in den reinen Malzwürzen und das Zuckerangebot wirken sich günstig aus.

Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe (vgl. 4.1.1 auf Seite 11) gibt keinen Aufschluss über den physiologischen Zustand der Hefe. Eine hohe Wachstumsrate kann für die Hefe - beispielsweise durch einen schnellen Verbrauch von Reservekohlehydraten und der Bildung von Sprossnarben auf der Zellmembran - belastend sein [9, 13]. Ein schnelleres Wachstum bei 12 °P ist mit einem höheren Anteil von Hefezellen in der G_2 -Phase vereinbar.

Die Hefe wird in ihrer Vitalität durch die höheren Stammwürzen und die Belüftung nicht negativ beeinflusst, der physiologische Zustand der Hefe ist bei gleicher Biomasse gleich oder besser als bei einer Vollbierwürze.

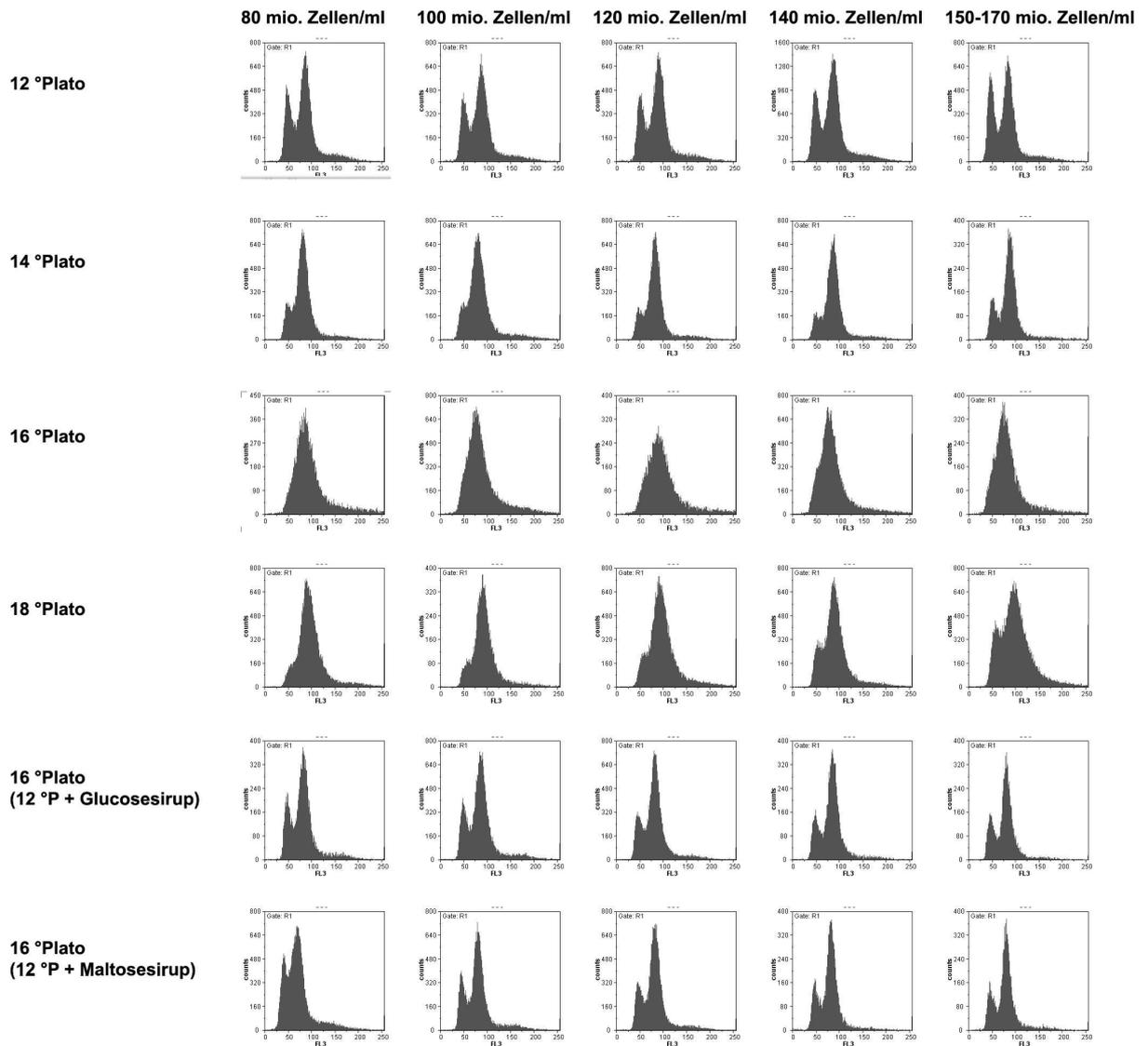


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Zellzyklen aller Propagationsversuche bei jeweils annähernd gleicher Biomasse

4.1.4 Gärungsnebenprodukte

Beim Anstellen einer Gärung gelangt ein größerer Prozentsatz des Substrats der Propagation mit der Hefe in den Gärtank. Die verschleppten Gärungsnebenprodukte könnten eine Auswirkung auf den Geschmack des fertigen Bieres haben. Desweiteren wird die Bildung von Acetaldehyd, Estern und - zu einem kleineren Maß - höheren Alkoholen von der Stammwürzekonzentration des Mediums und der Atmungsaktivität der Hefe beeinflusst [21, 22, 25].

Acetaldehyd ist ein Zwischenprodukt der Gärung, bei Atmungsaktivität der Hefe wird der weitere Abbau gehemmt, die Konzentration von Acetaldehyd in der Würze steigt. Die in der Versuchsreihe wie erwartet eingetretenen hohen Konzentrationen sind in Abbildung 14 auf der nächsten Seite dargestellt.

Die Esterbildung wird von der Zusammensetzung der Würze, der Zuckerkonzentration und der Atmungsaktivität der Hefe beeinflusst. Die biochemische Atmungskette konkurriert mit der Ester-synthese um benötigte Coenzyme, d.h. aerobe Bedingungen führen zu einer geringeren Bildung von Estern. Eine höhere Stammwürze hingegen fördert die Synthese von Estern [21, 22]. Unter den Bedingungen der Versuchsreihe ist also eine Zunahme der Esterkonzentration mit steigendem Extraktgehalt und abnehmender Atmungsaktivität (vgl. 4.1.2 auf Seite 15) zu erwarten. Diese Zunahme zeigt sich auch bei den reinen Malzwürzen am Beispiel des Ethylacetats (vgl. Abb. 15 auf der nächsten Seite). Die Werte bei den Würzen mit Zuckersirup entsprechen nicht der Erwartung. Die Literatur beschreibt eine verringerte Synthese von Gärungsnebenprodukten in Würzen mit hohen Maltosekonzentrationen, der Zusatz von Glucose fördert im Gegensatz dazu die Bildung von Gärungsnebenprodukten [25]. Die Versuchsergebnisse spiegeln ein genau umgekehrtes Verhältnis wieder. Eine mögliche Ursache könnte in einer Veränderung des intrazellulären pHs durch Maltose- bzw. Glucosetransfer liegen [22].

Die höheren Alkohole folgen zum Teil auch dem Trend zu höheren Werten bei höheren Stammwürzen (vgl. Abb. 16 auf Seite 23, Abb. 17 auf Seite 23 und Abb. 18 auf Seite 24) [25]. Zu den Vicinalen Diketonen Diacetyl und 2,3 - Pentadion (vgl. Abb. 18 auf Seite 24 und Abb. 19 auf Seite 24) lassen sich keine Aussagen treffen, die Bildung ist stark vom pH der verwendeten Würze abhängig [3], aufgrund der Würzeaufbereitung war dieser starken Schwankungen unterlegen.

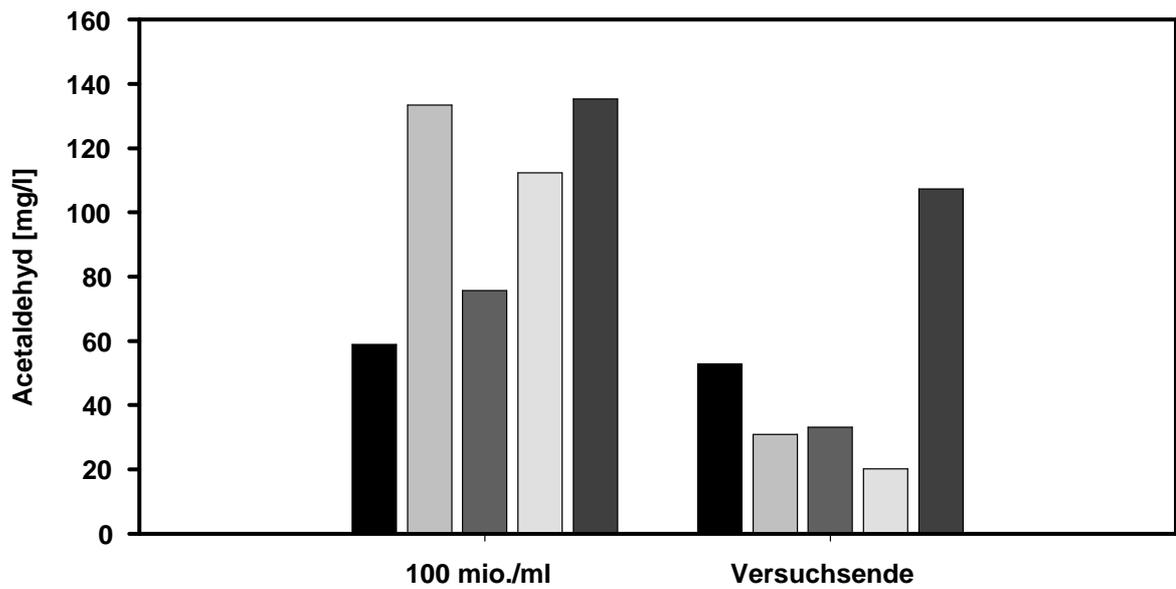


Abbildung 14: Während der Propagation gebildetes Acetaldehyd, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■) und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

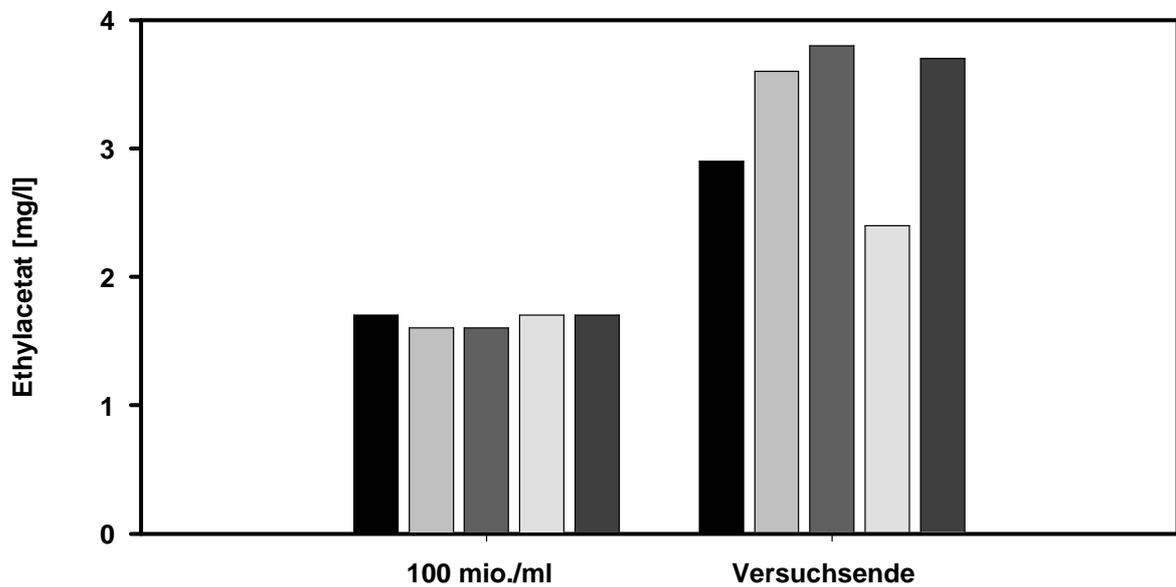


Abbildung 15: Während der Propagation gebildetes Ethylacetat, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■) und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

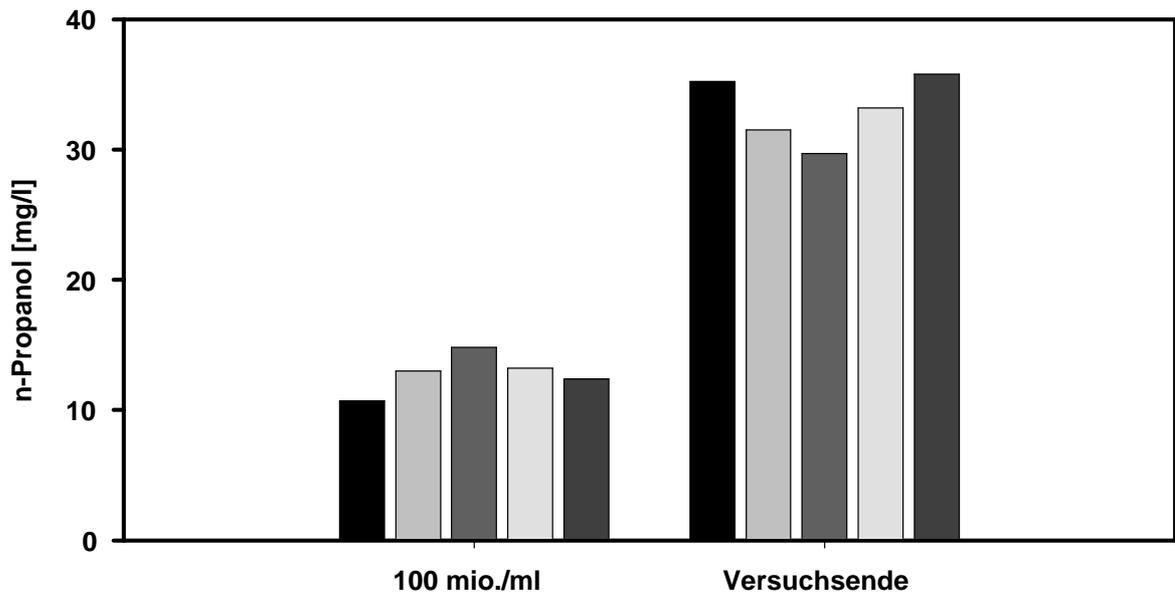


Abbildung 16: Während der Propagation gebildetes n-Propanol, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

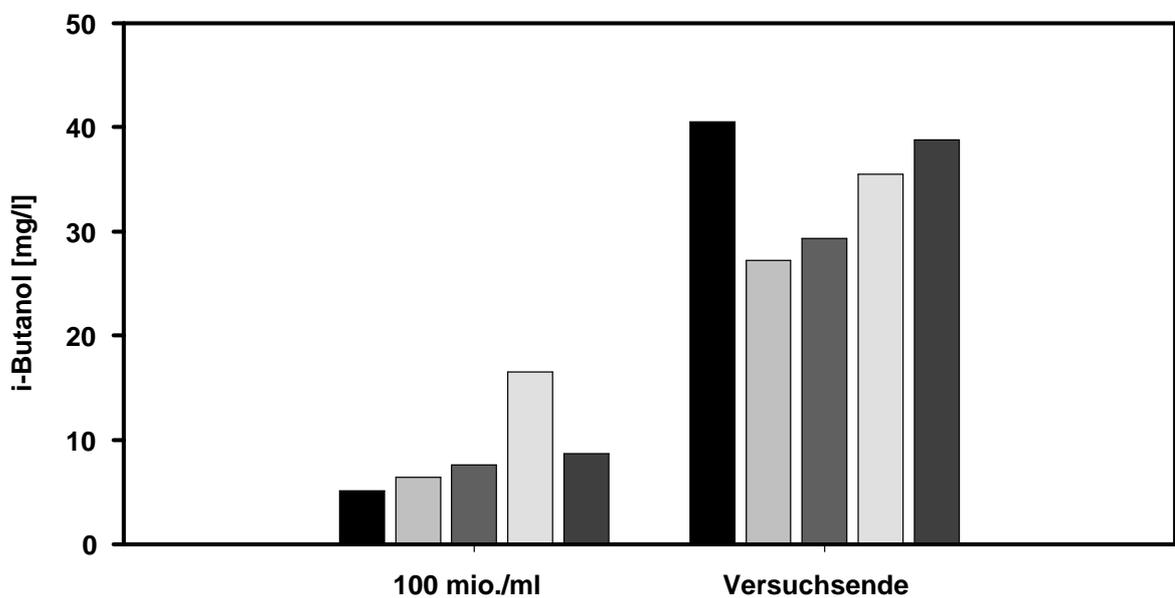


Abbildung 17: Während der Propagation gebildetes i-Butanol, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

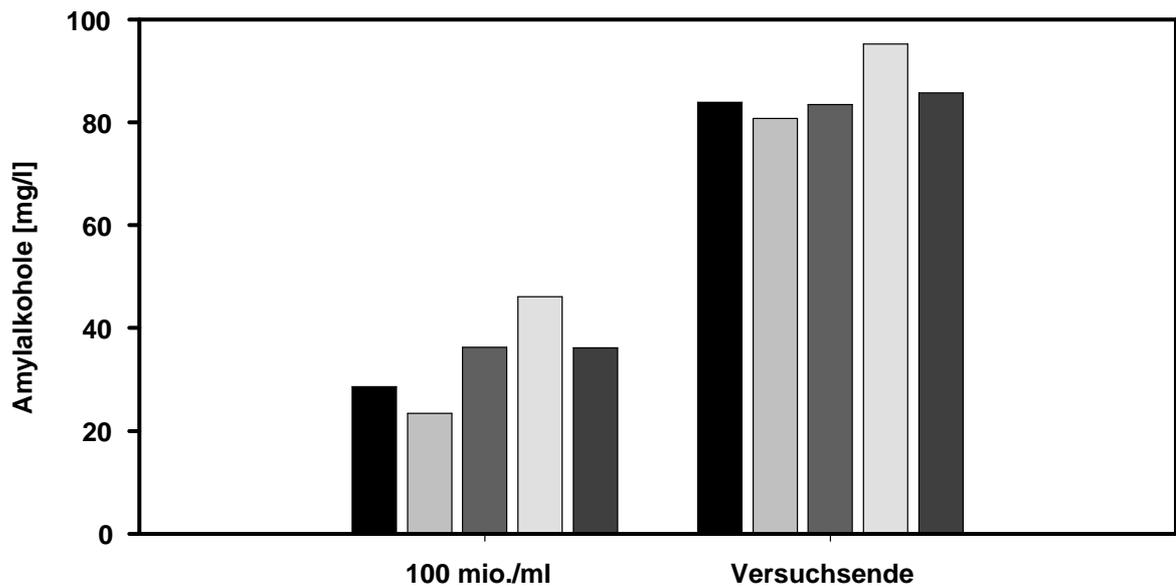


Abbildung 18: Während der Propagation gebildete Amylalkohole, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

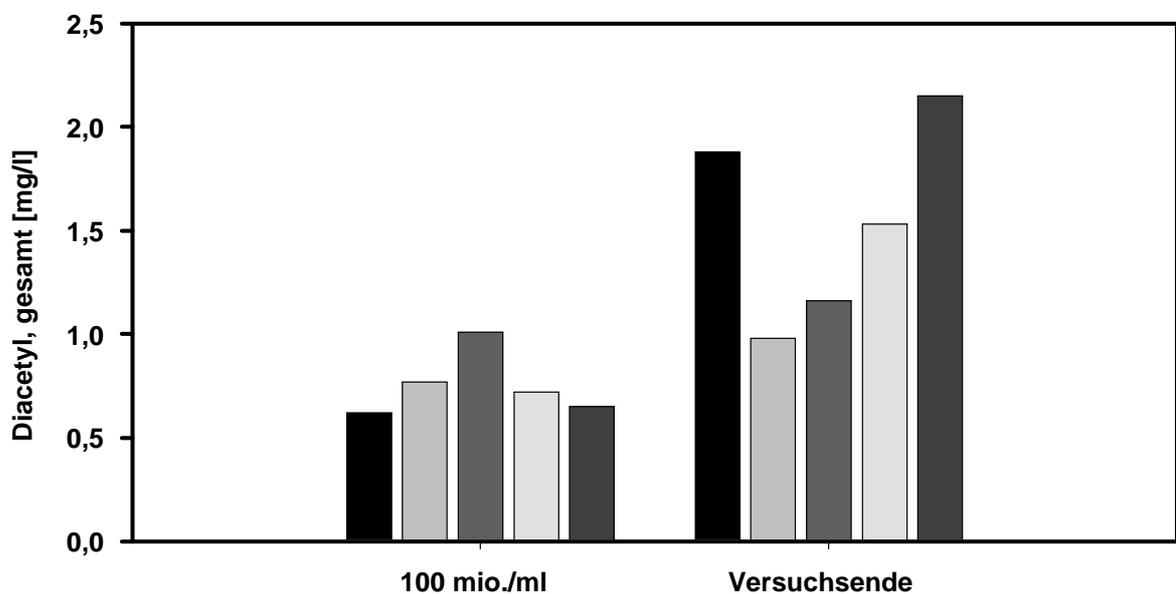


Abbildung 19: Während der Propagation gebildetes Diacetyl, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

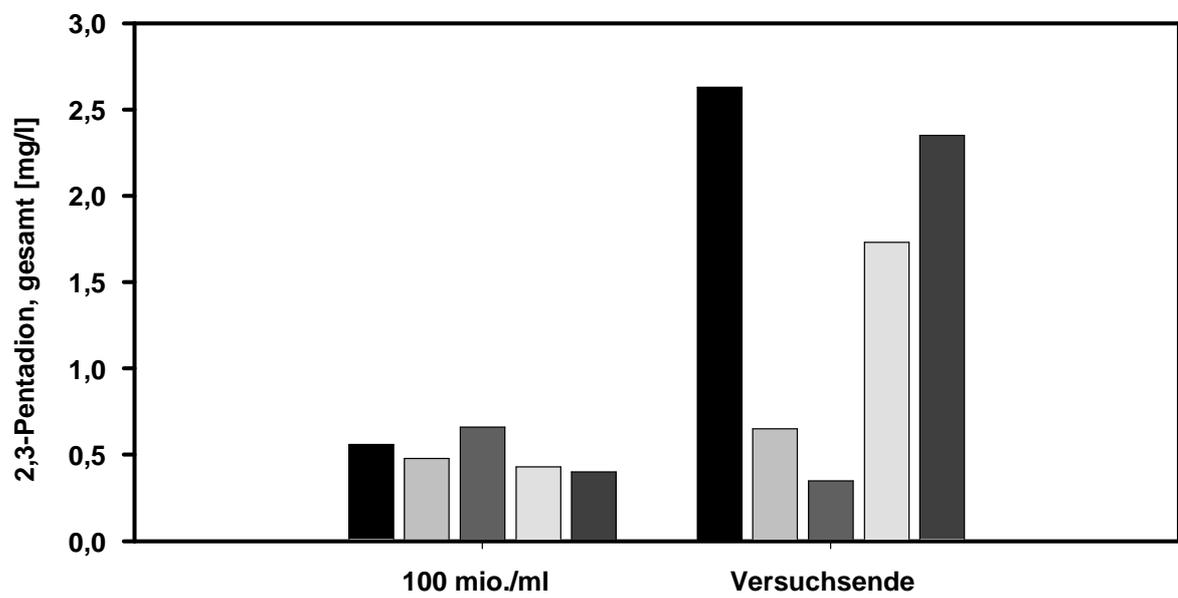


Abbildung 20: Während der Propagation gebildetes 2,3-Pentadion, gemessen bei 100 Mio. Zellen/ml und am Versuchsende. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 14 °P(■), 16 °P(■)und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

4.2 Gärversuche

4.2.1 Gärgeschwindigkeit, Zelle in Schwebelager

Für die zweite Versuchsreihe wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Absatz 4.1 propagiert. Die Ernte der Hefe für die Gärversuche erfolgte bei einer Hefezellzahl von ca. 120 Mio. Zellen/ml. Angestellt wurde in Vollbierwürze mit einer Zellzahl von ca. 14 Mio. Zellen/ml.

Zur übersichtlicheren Darstellung der Gärgeschwindigkeit ist der scheinbare Vergärungsgrad über der Zeit aufgetragen (vgl. Abb. 21 und Abb. 22 auf der nächsten Seite). Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der Gärgeschwindigkeit, allerdings erreichen alle Hefen den innerhalb geringer Abweichungen gleichen Endvergärungsgrad. Unter der Voraussetzung der gleichen Bedingungen für alle Gärungen müssen diese Differenzen durch einen unterschiedlichen Zustand der Hefen verursacht werden. Daraus und aus der gleichen Endvergärung lässt sich ableiten, dass sich die zeitlichen Differenzen höchstwahrscheinlich aus einer Verlängerung bzw. Verkürzung der Adaptionszeit der Hefe an das neue Milieu ergeben [13]. Auffällig sind die langsame Gärgeschwindigkeit der aus reiner Malzwürze mit 16°P gewonnenen Anstellhefe und der Hefe aus der Propagation mit Zusatz von Glucosesirup.

Das Absetzverhalten der Hefe verschlechtert sich mit dem Anstieg des Extraktgehalts der Propagationswürze (vgl. Abb. 23 auf der nächsten Seite und Abb. 24 auf Seite 28), diese Ergebnisse fügen sich in die Literatur ein [23].

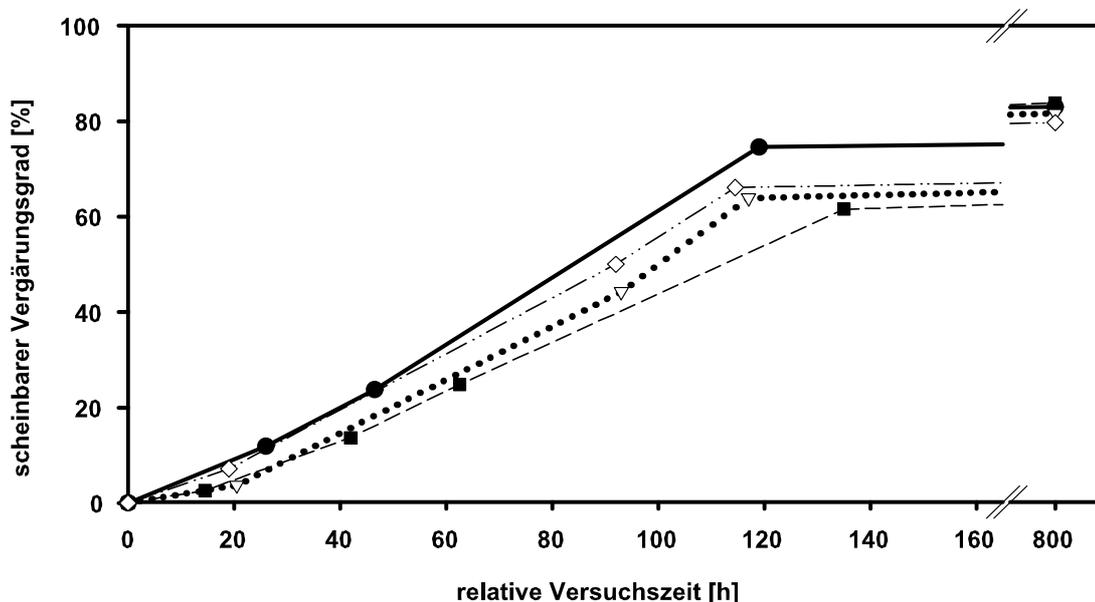


Abbildung 21: Vergärungsgrade im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in reinen Malzwürzen von 12° Plato (●), 14° Plato (▽), 16° Plato (■) und 18° Plato (◇).

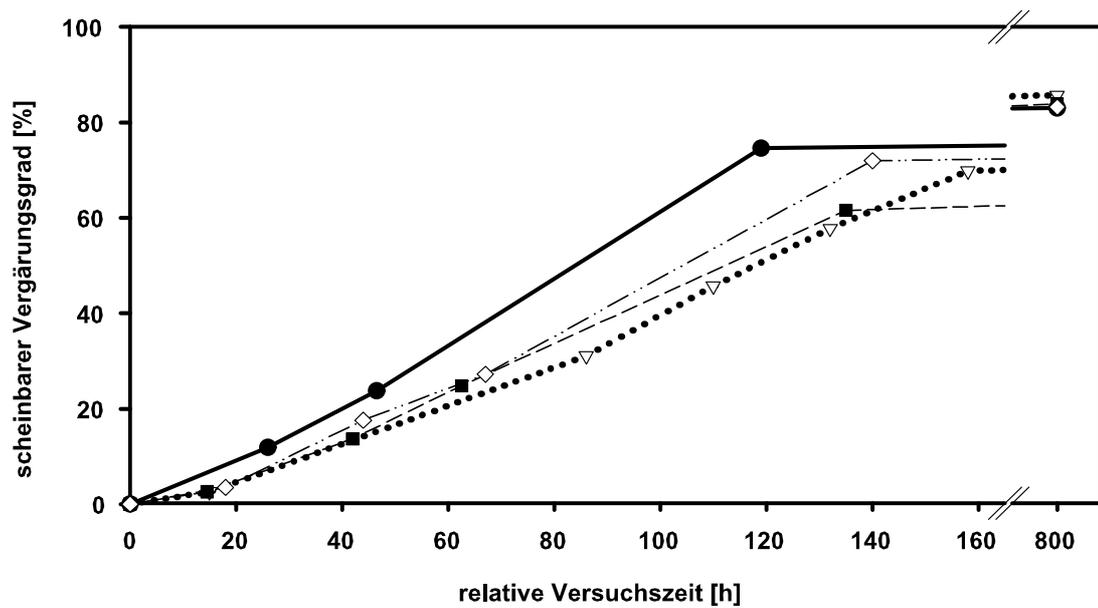


Abbildung 22: Vergärungsgrade im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit aus reinen Malzwürzen gewonnener Anstellhefe. Ausgangswürze mit 12 °Plato (●), Reine Malzwürze 16 °Plato (■), Ausgangswürze mit Glucosesirup 16 °Plato(▽) und Ausgangswürze mit Maltosesirup 16 °Plato (◇)

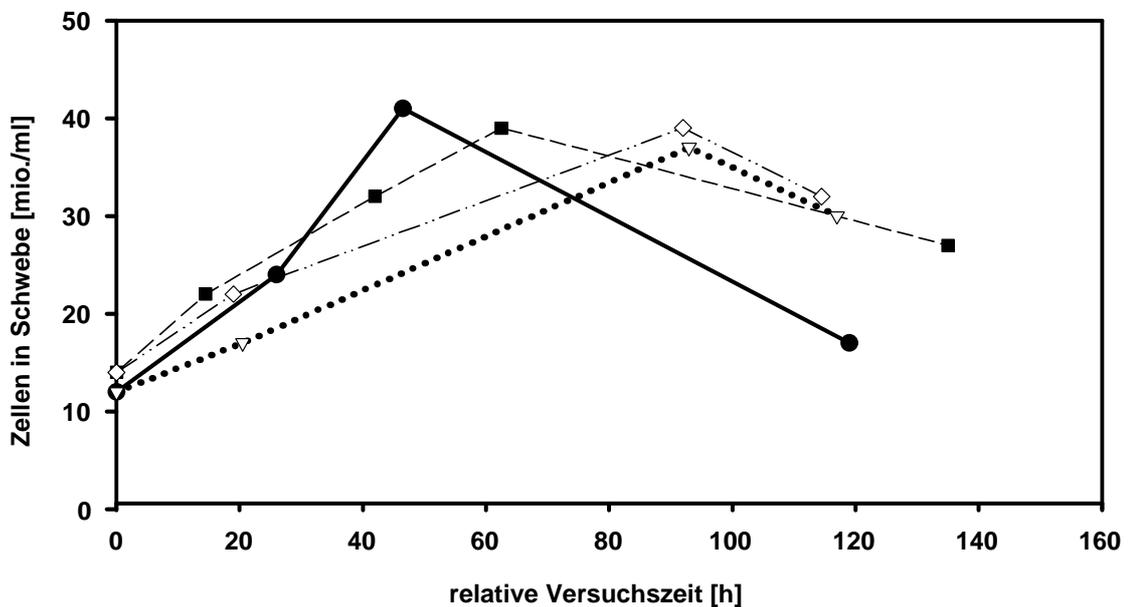


Abbildung 23: Zellen in Schwebelösung im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in reinen Malzwürzen von 12 °Plato (●), 14 °Plato(▽), 16 °Plato (■) und 18 °Plato (◇).

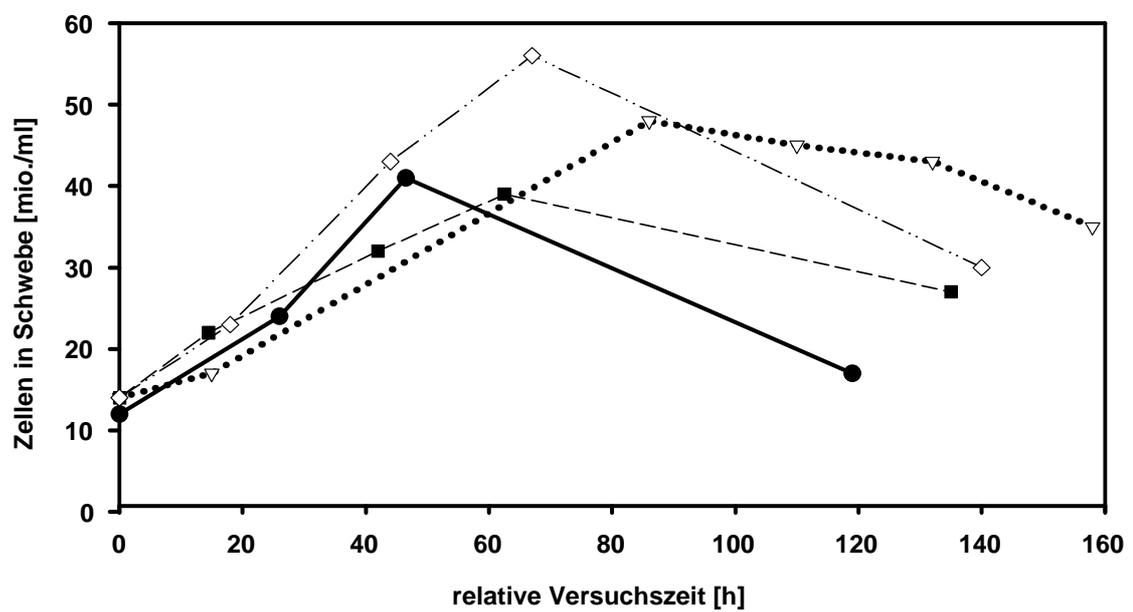


Abbildung 24: Zellen in Schwebelose im zeitlichen Verlauf, Anstellhefe gewonnen durch Propagation in Würzen mit Zuckerzusatz im Vergleich mit aus reinen Malzwürzen gewonnener Anstellhefe. Ausgangswürze mit 12 °Plato (●), Reine Malzwürze 16 °Plato (■), Ausgangswürze mit Glucosesirup 16 °Plato (▽) und Ausgangswürze mit Maltosesirup 16 °Plato (◇)

4.2.2 Enzymaktivität der Anstellhefe

Auffällig bei der Enzymaktivitätsmessung der Anstellhefen sind die extrem niedrigen Werte bei der aus reiner Malzwürze mit 16°P gewonnenen Anstellhefe und der Hefe aus der Propagation mit Zusatz von Glucosesirup (vgl. Abb. 25 - 28 auf den nächsten Seiten), besonders die Aktivitäten der Enzyme ADH und Maltase. Die gleichen Hefen zeigen die langsamste Gärgeschwindigkeit (vgl. 4.2.1 auf Seite 26).

Hefen mit einer hohen PDC und ADH Aktivität der Anstellhefe zeigen schnelle Gärgeschwindigkeiten. Die Hefen sind enzymatisch auf einen anaeroben Stoffwechsel eingestellt, die Adaptionszeit an die Gärungsbedingungen verkürzt sich. Die aus der Propagation von Würze mit Maltosesirup gewonnene Hefe folgt dieser Annahme jedoch nicht. Sie besitzt mit die höchsten Enzymaktivitäten in der Anstellhefe, vergärt aber nur mit moderater bis langsamer Geschwindigkeit. Diese Beobachtung zeigt, dass noch ein anderer Einflussfaktor vorhanden sein muss. In Würzen mit veränderter Stammwürze bzw. Zusatz von Zuckersirup verändert sich das Verhältnis der Stickstoffverbindungen zu den Kohlehydraten, dadurch kann sich beispielsweise Einfluss auf den Aminosäurestoffwechsel ergeben. Die daran beteiligten Enzyme wurden nicht mit ihrer Aktivität bestimmt, sie könnten den weiteren Einflussfaktor darstellen.

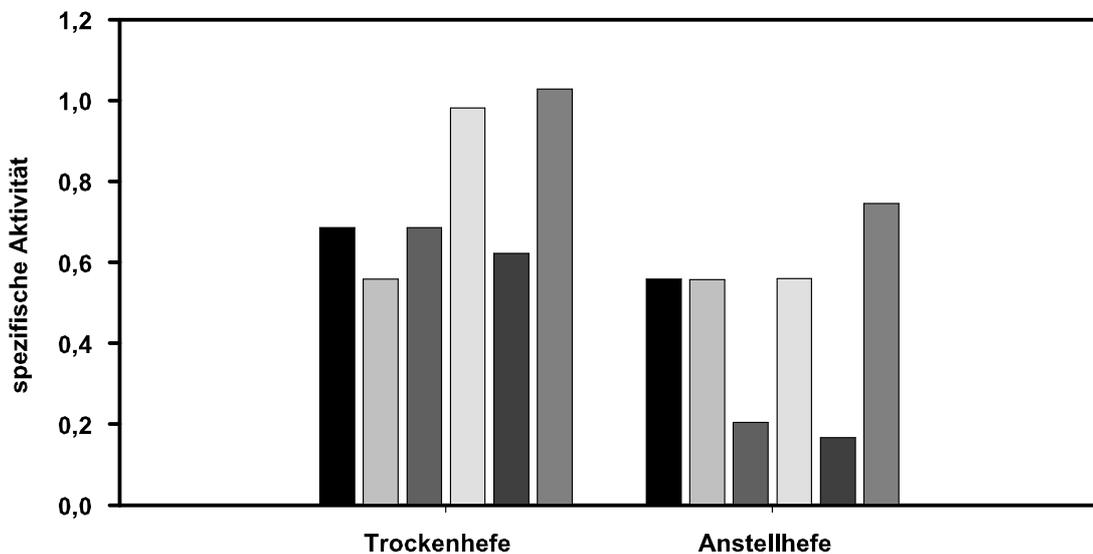


Abbildung 25: Spezifische Maltase Aktivität der Anstellhefe gemessen im Vergleich zur für die Propagation verwendeten Trockenhefe. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P(■), 14 °P(■), 16 °P(■) und 18 °P(■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup(■).

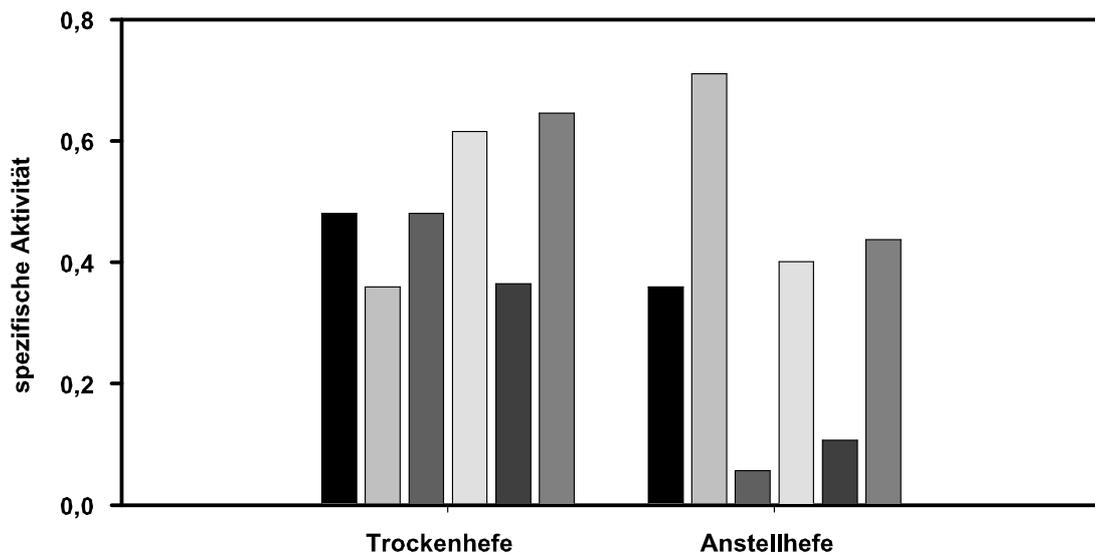


Abbildung 26: Spezifische ADH Aktivität der Anstellhefe gemessen im Vergleich zur für die Propagation verwendeten Trockenhefe. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (□).

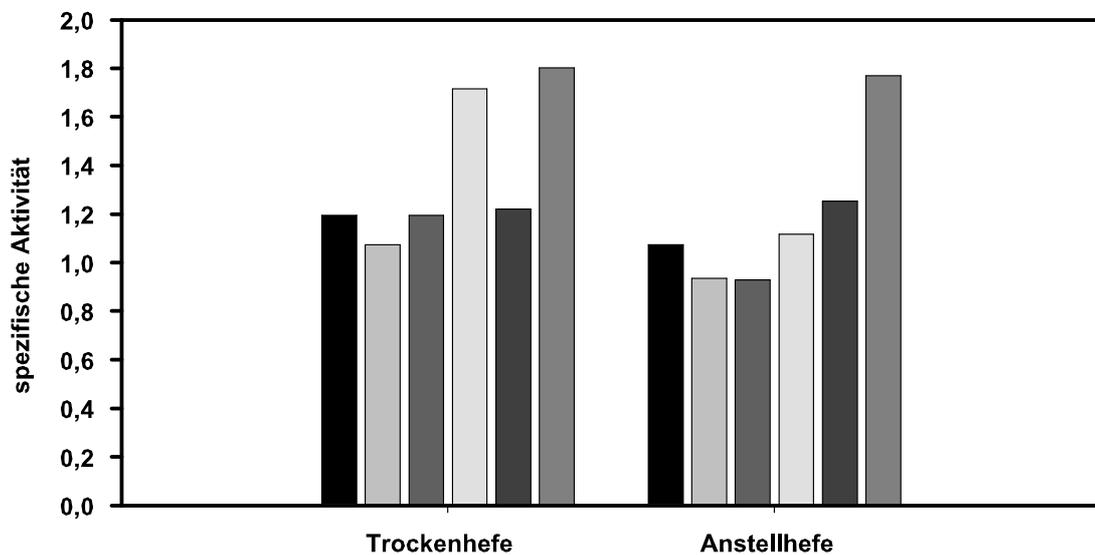


Abbildung 27: Spezifische PDC Aktivität der Anstellhefe gemessen im Vergleich zur für die Propagation verwendeten Trockenhefe. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (□).

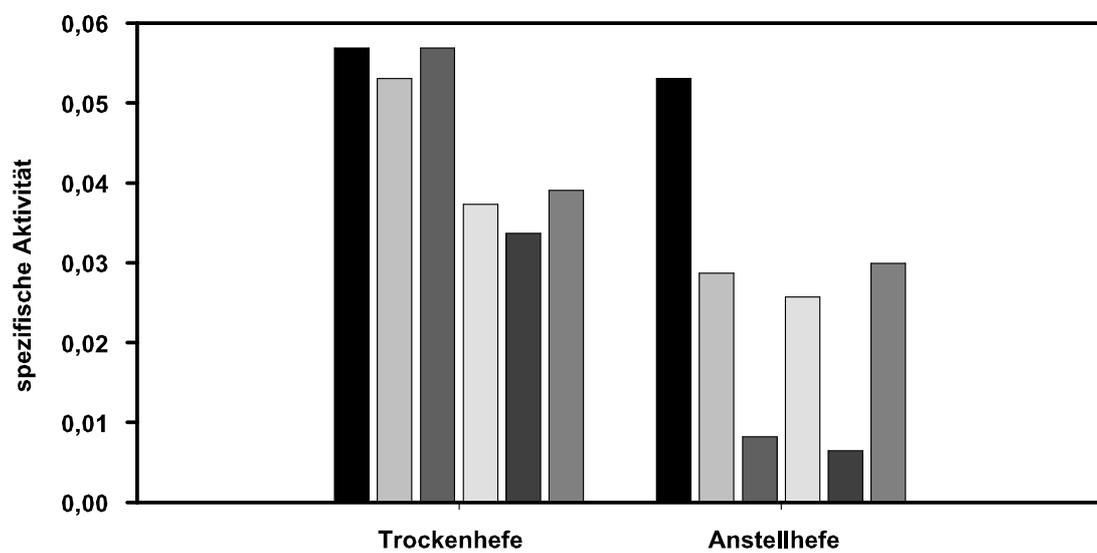


Abbildung 28: Spezifische PDH Aktivität der Anstellhefe gemessen im Vergleich zur für die Propagation verwendeten Trockenhefe. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

4.2.3 Analyse der fertigen Biere

Zur Klärung der Auswirkungen der unterschiedlichen Gärgeschwindigkeiten und verschiedenen Enzymaktivitäten wurden die fertigen Biere sensorisch analysiert (vgl. Tab. 2 auf der nächsten Seite). Desweiteren wurden die Gärungsnebenprodukte (vgl. Abb. 30 auf Seite 34) und Schaumzahl bzw. Schaumhaltbarkeit gemessen (vgl. Abb. 29 auf der nächsten Seite).

Weder in der Schaumzahl noch in den gemessenen Gärungsnebenprodukten zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Bieren. Alle Arbeiten während der Gärung und Lagerung wurden händisch durchgeführt, eine absolut gleichmäßige Behandlung der Biere ist nicht ausreichend garantiert. Die vorhandenen geringen Schwankungen können nicht ausschließlich auf die verwendete Hefe bezogen werden, sondern ihre Ursache auch in den Lager- und Gärungsbedingungen haben. Ausgehend von dieser Betrachtung und unter Einbezug des Fehlerbereichs der durchgeführten Analysen sind die Biere bezüglich der Schaumzahl und der Gärungsnebenprodukte als gleich anzusehen. Alle Ergebnisse der Analysen bewegen sich im Bereich qualitativ einwandfreier Biere.

Bei der sensorischen Analyse der Biere wurde eine beschreibende Verkostung durchgeführt werden. Unterschiede in der Hopfung und der Stammwürze durch die eingebrachte Propagationen sowie die Behandlung während der Gärung und Lagerung (siehe oben) schlossen eine vergleichende Verkostung aus. Die Hefe gewonnen aus Propagationen reiner Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P, 14 °P und 18 °P lieferte sensorisch einwandfreie Biere. Auffallend sind die Biere vergoren aus Hefe propagiert in Würze mit Zusatz von Glucosesirup, Würze von 16° P und Würze mit Maltosesirup, es handelt sich dabei um die am langsamsten vergorenen Biere (vgl. 4.2.1 auf Seite 26). Die Fehler der beiden letztgenannten Biere sind mit großer Wahrscheinlichkeit während der Lagerung entstanden und nicht mit Sicherheit auf die Propagationsbedingungen zurückzuführen.

Es lässt sich die Aussage treffen, dass alle Biere aus Sicht der technischen Analysen qualitativ in Ordnung sind. In der sensorischen Analyse zeigen sich die langsamer vergärenden Biere schwächer. Allerdings sind diese Tendenzen hinsichtlich des Einflusses der Lagerung nicht überzubewerten.

Tabelle 2: Sensorische Bewertung der fertiggestellten Biere. Anstellhefe der Gärung gewonnen aus Propagationen mit verschiedenen Würzen (Angabe in Klammern)

	Geruch	Geschmack	Trunk, Abtrunk
Versuch 0.2 (12 °P)	rein, sauber, leicht fruchtig	rein, sauber, leicht fruchtig	schlank, Abtrunk harmonisch
Versuch 1.2 (14 °P)	rein, sauber, leicht fruchtig, frische Hefenote	rein, sauber, leicht fruchtig, frische Hefenote	schlank, Abtrunk harmonisch
Versuch 2.2 (16 °P)	rein, sauber, leicht fruchtig, leichte Diacetylnote	rein, sauber, leicht fruchtig, leichte Diacetylnote	schlank, Abtrunk harmonisch
Versuch 3.2 (18 °P)	rein, sauber, leicht fruchtig	rein, sauber, leicht fruchtig	schlank, Abtrunk harmonisch
Versuch 4.2 (Glucosesirup)	rein	rein	wenig vollmundig, Bittere leicht nachhängend
Versuch 5.2 (Maltosesirup)	unangenehm hefig	unangenehm hefig	vollmundig, Abtrunk normal

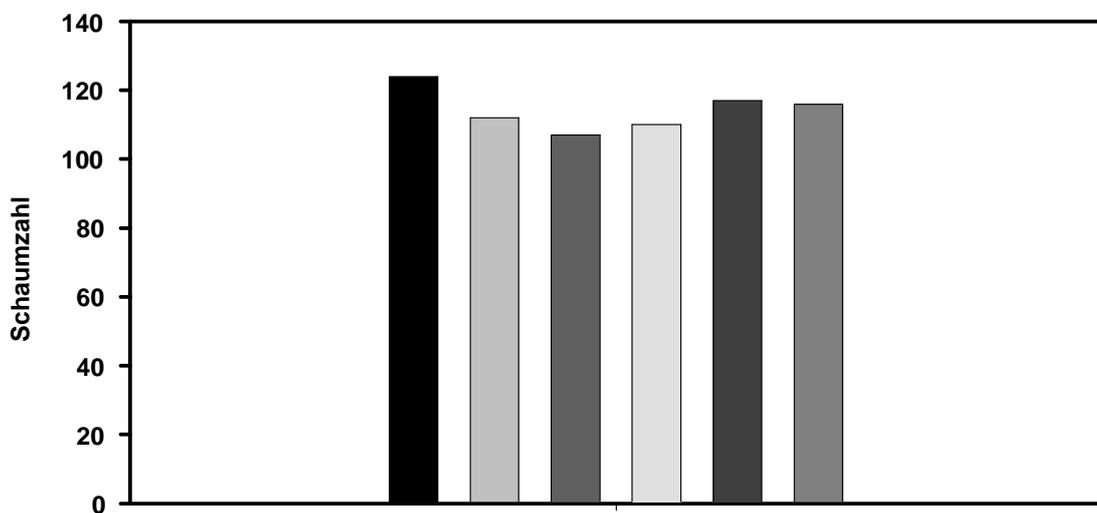


Abbildung 29: Schaumzahlen der fertigen Biere, Anstellhefe der Gärung gewonnen aus Propagationen mit verschiedenen Würzen. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (■), 16 °P (■) und 18 °P (■), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucosesirup (■) und Maltosesirup (■).

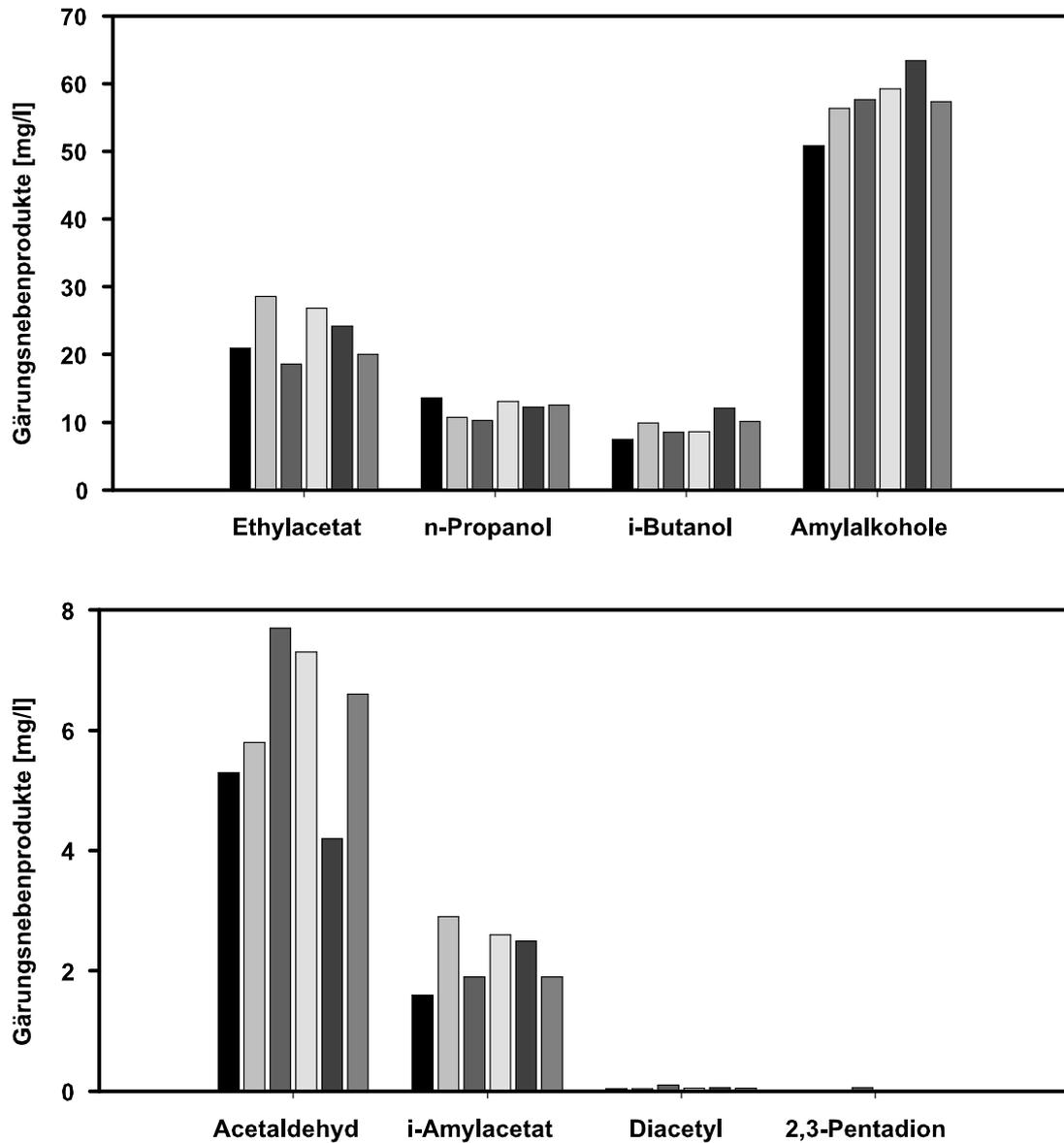


Abbildung 30: Gärungsnebenprodukte in den fertigen Biere, Anstellhefe der Gärung gewonnen aus Propagationen mit verschiedenen Würzen. Reine Malzwürzen mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P (■), 14 °P (□), 16 °P (■) und 18 °P (□), desweiteren Würze mit Zusatz von Glucose-sirup (■) und Maltosesirup (■).

5 Abschlussdiskussion, Ausblick

Bei der Hefepropagation in High-Gravity Würzen verlangsamt sich mit zunehmender Stammwürzekonzentration die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe. Bei gleicher Stammwürzekonzentration führt ein höherer Glucoseanteil in der Würze zu einer Verzögerung des Hefewachstums. Für unterschiedliche Wachstumsraten ist zum Großteil der Crabtree-Effekt verantwortlich, mit zunehmender Glucosekonzentration im Milieu werden die Enzyme der Atmungskette unterdrückt und die Hefe muss den vorhandenen Zucker energetisch weniger günstig vergären. Die biochemischen Pfade der Hefe sind auf verschiedene Weise miteinander verknüpft, dadurch lassen sich die Auswirkungen des Crabtree Effekts beispielsweise auch in der Estersynthese beobachten.

Im Rahmen der durchgeführten Versuche zeigte sich die Hefe weder durch die hohen Stammwürzekonzentrationen, noch den Alkoholgehalt belastet. Die Hefen waren bezüglich der Zellzyklusanalyse in physiologisch einwandfreiem Zustand. Eine wie in der Literatur im Labormaßstab beobachtete Schädigung der Hefe durch Propagation in High-Gravity Würzen [5] konnte hier in der der Großtechnik nachempfundenen Anlage nicht festgestellt werden.

Die aus den verschiedenen Propagationen gewonnenen Hefen erreichten zwar den gleichen scheinbaren Endvergärungsgrad, allerdings zeigten sich Unterschiede in der Gärgeschwindigkeit. Hefen die bezüglich der Enzyme des Zuckerstoffwechsels auf anaerobe Verhältnisse eingestellt sind vergären schneller. Die in Würze mit Maltosesirup propagierte Hefe passt sich in dieses Bild nicht ein und lässt auf weitere Einflussfaktoren, beispielsweise die Aktivität der am Aminosäurestoffwechsel beteiligten Enzyme schließen.

Die Stammwürzekonzentration und Zuckerzusammensetzung der Propagationwürze haben in den hier durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf die Konzentration der Gärungsnebenprodukte in den fertigen Bieren. Eine Auswirkung auf die Schaumhaltbarkeit konnte auch nicht festgestellt werden. Bei der sensorischen Analyse zeigten sich in einigen Bieren Fehler im Geruch und Geschmack. Bezieht man die Lagerbedingungen in die Betrachtung mit ein, kann ein Teil der Fehler darauf bezogen werden. Damit bleibt das Bier aus Versuch 4.2 (Anstellhefe propagiert in Würze mit Glucosesirup) im Bereich der Bittere und der Vollmundigkeit sensorisch leicht auffällig.

Bei der Qualität der eingebrauten Biere sind nach diesen Ergebnissen - vor allem bei der Verwendung reiner Malzwürze - keine Einbußen zu erwarten, wenn eine Brauerei, die Bier nach dem High-Gravity Verfahren herstellt, ihre Betriebswürze zur Hefeherführung einsetzt. Davon ausgenommen ist der massive Einsatz von Zuckersirupen. Glucosesirup in der Propagationwürze führ-

te zur langsamsten Gärgeschwindigkeit, das fertige Bier war in der sensorischen Qualität leicht beeinträchtigt. Der Verwendung von Maltosesirup oder das Brauen mit reinen Malzwürzen hebt aber möglicherweise die Kostenvorteile auf, die besonders bei der Verarbeitung von Very-High-Gravity Würzen entstehen, die mit günstigen Zuckersirupen auf die hohe Stammwürze gebracht werden. Ob die Hefe in weiteren Führungen ihre Eigenschaften behält, sowie das Gärverhalten bei Einsatz eines Gemisches aus Reinzucht- und Erntehefe zum Anstellen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ein geschicktes Hefemanagement könnte mögliche Probleme beim Einsatz von Glucosesirup umgehen.

Die vorliegende Diplomarbeit konzentriert sich hauptsächlich auf die Hefeherführung und Reinzucht. Weitere Arbeiten könnten sich den Einfluss der Gärung mit High-Gravity Würzen auf die Hefe erschließen. Auch im Bereich der Propagation könnten noch viele weitere Versuche durchgeführt werden, beispielsweise mit noch höheren Stammwürzen, der Analyse der Proteaseaktivität oder enzymatischen Untersuchungen weiterer Stoffwechselwege. Die Zusammenführung der gewonnenen Ergebnisse würde die Erstellung eines modernen Hefemanagementkonzepts für High-Gravity-Brewing ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Die Vitalität, d.h. der physiologische Zustand bzw. die Aktivität der Hefe hat großen Einfluss auf die Qualität des hergestellten Bieres. Darum muss bei Brauprozessen, die die Hefe zusätzlich belasten - wie High Gravity Brewing - der Hefeherführung bzw. Propagation besondere Beachtung geschenkt werden. In einer Brauerei, die nach dem High-Gravity Verfahren braut, steht nur Würze mit hohem Extraktgehalt zur Verfügung, sie kann zur Hefereinzucht verdünnt oder unverdünnt eingesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Propagation mit High Gravity Würzen auf die Hefe und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das fertige Bier zu klären. Zu diesem Zweck wurden Hefepropagationen bei verschiedenen Bedingungen durchgeführt, die gewonnene Hefe zur Gärung genutzt und ein fertiges Bier hergestellt.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe verringert sich mit zunehmendem Extraktgehalt der Propagationwürze. Bei gleicher Stammwürze führt eine Erhöhung des Glucosegehalts zu einem langsameren Wachstum. Die Hauptursache für die Veränderungen der Wachstumsrate ist, nach den Ergebnissen der Enzymaktivitätsanalyse, der Crabtree-Effekt. Die Hefen werden durch die hohen Stammwürzegehalte während der Propagation nicht geschädigt, sie waren bezüglich der Zellzyklusanalyse in physiologisch einwandfreiem Zustand.

Die gewonnenen Hefen zeigen Unterschiede in der Gärgeschwindigkeit aber nicht bezüglich des Endvergärungsgrades. Die Hefen die bezüglich der Enzyme des Zuckerstoffwechsels auf anaerobe Verhältnisse eingestellt sind vergären schneller (Hefen propagiert in Würze mit einem Stammwürzegehalt von 12 °P, 14 °P und 18° P). Am langsamsten vergärt die durch Propagation in Würze mit Glucosesirup gewonnene Hefe.

Die Konzentrationen der Gärungsnebenprodukte und die Schaumzahl der fertigen Biere bewegen sich innerhalb normaler Werte. Die in Würze mit Glucosesirup propagierte Hefe erzeugt ein im Bereich der Bittere und der Vollmundigkeit sensorisch leicht auffälliges Bier.

Eine Brauerei, die das High-Gravity Verfahren im Brauprozess einsetzt, kann ohne Probleme ihre Betriebswürze unverdünnt zur Hefeherführung verwenden. Der Einsatz von Glucosesirup zur Erhöhung der Stammwürze kann allerdings zu langsameren Gärgeschwindigkeiten und einer etwas schlechteren sensorischen Qualität der Biere führen.

Literatur

- [1] Methodensammlung der Mitteleuropäischen Analysenkommission, Band III. Selbstverlag der MEBAK, 1996
- [2] Methodensammlung der Mitteleuropäischen Analysenkommission, Band II. Selbstverlag der MEBAK, 2002
- [3] ALMEIDA, R.; E SILVA, J. A.; LIMA, U.; ASSIS, A. UND SILVA, D.: Evaluation of factors involved in the concentration of vivinal dicetones in beer produced by high gravity. In: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology, Volume 30 Issue 3, 2004, Seiten 147 – 153
- [4] BENEY, L.; DE MARANÓN, I. M.; MARECHAL, P.-A. UND GERVAIS, P.: Influence of thermal and osmotic stresses on viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: International Journal of Food Microbiology, Nr. 55, 2000, Seiten 275 – 279
- [5] CAHILL, G.; MURRAY, D.; WALSH, P. UND DONELLY, D.: Effect of the Concentration of Propagation Wort on Yeast Cell Volume and Fermentation Performance. In: Journal of the American Society of Brewing Chemists, 58(1), 2000, Seiten 14 – 20
- [6] CUNNINGHAM, S. UND STEWART, G.: Effects of High-Gravity Brewing and Acid Washing on Brewers' Yeast. In: Journal of the American Society of Brewing Chemists, 56(1), 1998, Seiten 12 – 18
- [7] HARMS, D.; MIRBACH, S.; NITZSCHE, F. UND HUTTER, K.: Novel Ways of Yeast Management – A New Analytical Approach to Optimise Yeast Handling. Online im Internet: <http://www.koenig.de/brauerei/unternehmen/forschung-pdfs/EBC2003-1.pdf> [Stand: 18.08.2004], 2003
- [8] HERRMANN, M.; BACK, W.; SACHER, B. UND KROTTENTHALER, M.: Möglichkeiten zur technologischen Beeinflussung der Bieraromastoffe. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 5/6, 2003, Seiten 99 – 103
- [9] HUTTER, K.-J.: Flusszytometrische Prozesskontrolle untergäriger Bierhefen. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 1/2, 2001, Seiten 13 – 27
- [10] KUNZE, W.: Technologie Brauer und Mälzer, Kapitel 4.8.1. 8. Auflage. VLB Berlin, 1998, Seiten 473 – 476
- [11] KUNZE, W.: Technologie Brauer und Mälzer, Kapitel 4.2. 8. Auflage. VLB Berlin, 1998, Seiten 363 – 371
- [12] MANGER, H.-J. UND ANNEMÜLLER, G.: Die Geschwindigkeit der Hefevermehrung in der Brauerei. In: Brauwelt, Nr. 13/14, 2000, Seiten 520 – 525
- [13] MÖNCH, D.; KRÜGER, E. UND STAHL, U.: Wirkung von Streß auf Brauereihefen. In: Monatsschrift für Brauwissenschaft, Heft 9/10, 1995, Seiten 288 – 299
- [14] NARZISS, L.: Die Technologie der Würzebereitung, Kapitel 9. 7. Auflage. Stuttgart: Enke, 1992, Seiten 352 – 354

- [15] POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, A. UND VAN DIJKEN, J.: Enzymatic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Applied and Environmental Microbiology, 55, Nr. 2, 1989, Seiten 468 – 477
- [16] PRATT, P.; BRYCE, J. UND STEWART, G.: The Effects of Osmotic Pressure and Ethanol on Yeast Viability and Morphology. In: Journal of the Institute of Brewing, 109(3), 2003, Seiten 218 – 228
- [17] RAUTIO, J. UND LANDESBOROUGH, J.: Maltose Transport by Brewer's Yeast in Brewer's Wort. In: Journal of the Institute of Brewing, 109(3), 2003, Seiten 251 – 261
- [18] RINGHOLT, M.: Weltweit akzeptiert, High-Gravity-Brewing/High-Gravity-Blending. In: Brauwelt, Nr. 30/31, 2000, Seiten 1232 – 1246
- [19] SCHMIDT, H.-J.: Beschleunigte Herführung von Reinzuchthefen. In: Brauwelt, Nr. 44/45, 1993, Seiten 2254 – 2274
- [20] VAN URK, H.; VOLL, L.; SCHEFFERS, A. UND VAN DIJKEN, J.: Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. In: Applied and Environmental Microbiology, 56, Nr. 1, 1990, Seiten 281 – 287
- [21] VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G. UND DELVAUX, F. R.: Esters in beer - part 1: The fermentation process: more than ethanol formation. In: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology, Volume 29 Issue 3, 2003, Seiten 41 – 48
- [22] VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G. UND DELVAUX, F. R.: Esters in beer - part 2: Controlling ester levels during beer formation: a biochemical approach. In: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology, Volume 29 Issue 4, 2003, Seiten 22 – 29
- [23] WACKERBAUER, K.; CHEONG, C. UND BECKMANN, M.: Die Propagation der Hefe unter besonderer Berücksichtigung des Flockulationsverhaltens in der ersten Führung. In: Brauwelt, Nr. 23/24, 2002, Seiten 785 – 797
- [24] WESTNER, H. UND KUPLANT, F.: Die Hefevermehrung in der Brauerei - Eine Übersicht. In: Brauwelt, Nr. 35, 1999, Seiten 1563 – 1566
- [25] YOUNIS, O. UND STEWART, G.: Effect of Malt Wort, Very-High-Gravity Malt Wort, and Very-High-Gravity Adjunct Wort on Volatile Production in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57(2), 1999, Seiten 39 – 45

A Methoden

A.1 DNA staining protocol for fixed Yeast cells with DAPI

1. Dilute one volume of Partec DAPI solution with 2 volumes of Tris buffer or PBS (pH 7.5)
2. Wash your fixed yeast sample (fixed in 70 % Ethanol with PBS: spin the suspension and resuspend 10^7 cells in 2 ml PBS buffer
3. Add 10 μ l of the diluted DAPI solution
4. Incubate for 14-20 min
5. Analyse with the PA, CCA, PAS or PAS-III

A.2 Enzymaktivitätsmessungen

A: Vorbereitung der Probe:

Die aus dem Fermenter entnommene Probe wird wie folgt bearbeitet:

1. Zentrifugation I (Hefe aus der Würze/Jungbier gewinnen):

Einstellungen: Temperatur = +4°C (bis 20°C); RPM = 16.000; t= 10 min Rotor SS - 34 CODE 05 Anzahl Zentrifugenbecher abhängig von der Zellkonzentration (max. 4 Zentrifugenbecher)

2. Abdekantieren I:

Nach der 1. Zentrifugation kann der Überstand zum Spindeln bzw. zur Extraktmessung herangezogen werden oder wird verworfen

3. Zugabe von HA - Puffer I: (Hefe wird gewaschen)

Die Pufferlösung ist im Kühlraum aufbewahrt. Durch Umrühren mittels Rührspatel erfolgt eine Resuspendierung der Hefe im Puffer. Dazu wird zunächst in den ersten Becher der Puffer eingefüllt, resuspendiert und in den nächsten umgefüllt und wieder mittels Rührspatel resuspendiert.. Der dritte Becher wird ebenso behandelt usw.. Zum Schluss hat man die gesamte Hefe in einem Zentrifugenbecher.

4. Zentrifugation II:

Der verbleibende Becher wird nach den obigen Bedingungen erneut zentrifugiert.

In dieser Zwischenzeit empfiehlt es sich im Grosslabor die Substanzen zur enzymatischen Bestimmung aufzutauen.

5. Abdekantieren II:

Der Überstand wird verworfen. Der Rückstand mittels HA- Puffer erneut resuspendiert und unter Rühren wird 400µl PMSF Lösung dazu zugegeben. PMSF ist ein Proteasen Inhibitor.

6. Aufschluss der Hefezellen mittels FP:

Im Keller des Gebäudes befindet sich die French-Press zur Gewinnung des Zellsaftes. Der Aufschluss der Probe wird 1 mal durchgeführt. Die Probe ist stets gekühlt aufzubewahren.

7. Zentrifugation III:

Die Parameter sind gegenüber den anderen nur in der Zeit verändert; t = 15 min Es ist zu beachten, dass nach der dieser Zentrifugation der Überstand den Heferohextrakt (Enzyme) enthält und für die Aktivitätsmessungen benötigt wird. Der Überstand wird in einen 100ml Erlenmeyerkolben überführt, der wiederum auf Eis kühl gehalten wird.

B: Bestimmung der Gesamtproteine:

1. 4 x 1,5 Safe - Lock - Tubes bereitstellen (Winzlinge)
2. Mit unverdünntem Substrat wie folgt befüllen
 1. 100 μl Substrat und mit bidest. H₂O auf 1 ml auffüllen
 2. 200 μl Substrat und mit bidest. H₂O auf 1 ml auffüllen
 3. 300 μl Substrat und mit bidest. H₂O auf 1 ml auffüllen

Bemerkung: die Substratmenge richtet sich nach der aufgeschlossenen Hefemenge (wird viel Hefe aufgeschlossen empfiehlt sich 50, 100 und 200 μl)

3. Zugabe von 0,2 ml Tri- Chlor- Essigsäure (TCA) in jede Probe und vortexen
4. Zentrifugieren bei 13.000 Umdrehungen / min: 15min
5. Überstand vorsichtig verwerfen und auf Papier abtropfen lassen 6. Zugabe von je 200 μl bidest. H₂O und mittels Rührspates umrühren (+ Blindwert)
7. Zugabe von je 1 ml Biuret - Lsg. (+ Blindwert)
8. Nach +/- 30 min: Spektralphotometrische Auswertung

C: Verdünnung der Probe für die Enzymaktivitätsmessungen:

In einen kleinen Erlenmeyerkolben wird eine Verdünnung 1:20 oder 1:10 erstellt (abhängig von der Enzymmenge). Dazu werden 0,5ml Heferohextrakt mit 9,5ml BSA (= 1:20) oder 1,0ml Heferohextrakt mit 9,0ml BSA (= 1:10) verdünnt.

D: Enzymbestimmung:

Vor jeder Messung das entsprechende Programm im Computer aufrufen

1 Maltase Bestimmung (4 Küvetten):

Einstellungen am Photometer: Programm unter 11-20; MALTASE 1; Mittels MODE: t - 300s; Intervalle = 10; X = 405nm; Anzahl der Proben 3; System über RUN startbereit

Testansatz MAL:

200 μl Puffer; Reagenzglas mit M

(600-x) μl Wasser; bidest.

X = 75 μl / 100 μl Heferohextrakt

Start: 200 μl PNPG; Winzling M

Mittels Paraffin abdecken, homogenisieren und messen Nach der Messung Anpassen der Steigung und Überprüfung der Ergebnisse

2. ADH Bestimmung (4 Küvetten):

Einstellungen am Photometer: Programm unter 11-20; MALTASE (Ist noch Angewählt); Mittels MODE t = 340s; Intervalle = 10; X = 340nm; Anzahl der Proben 4; System über RUN startbereit

Testansatz ADH:

908 μ l Ansatz 1; Reagenzglas ohne Beschriftung

40 μ l Glutathion

X = 75 μ l/100 μ l Heferohextrakt

START: 67 μ l NAD⁺

(Keine Zugabe von Wasser) Homogenisieren und messen; Auswerten wie gehabt

3. PDC Bestimmung (4 Küvetten):

Einstellungen am Photometer: Programm unter 11-20; MALTASE (Ist noch Angewählt) Mittels
MODE: t = 360s; Intervalle = 10; x = 34nm; Anzahl der Proben 4; System über RUN startbereit

Testansatz PDC:

120 μ l Ansatz 3; PDC

20 μ l ADH

X = 50 μ l/75 μ l/100 μ l Heferohextrakt

(781 - X) μ l Wasser

START: 79 μ l Na - Pyruvat; P

Homogenisieren und messen; Auswerten wie gehabt

4. PDH Bestimmung (4 Küvetten):

Einstellungen am Photometer: Programm unter 11-20; MALTASE (Ist noch Angewählt) Mittels
MODE: t = 360s; Intervalle = 10; x = 34nm; Anzahl der Proben 4; System über RUN startbereit

Testansatz PDH:

210 μ l Ansatz 1

250 μ l Ansatz 2

X=100 μ l/200 μ l unverdünnter Heferohextrakt

(480 - X) μ l Wasser

START: 20 μ l CoA-SH

Homogenisieren und messen; Auswerten wie gehabt