

K. Wackerbauer und M. Beckmann

Untersuchungen zur Bestimmung des Flockulationsverhaltens von Brauereihefen

Die Bestimmung des Flockulationsverhaltens von Brauereihefen stellt einen wichtigen Aspekt der innerbetrieblichen Qualitätssicherung dar, da ein sich veränderndes Bruchbildungsvermögen einen unmittelbaren Einfluss auf den Gärverlauf, die Filtrierbarkeit des Bieres und die Bierqualität ausübt. Hinsichtlich ihrer Praktikabilität wurden drei Labormessmethoden zur Bestimmung der Hefeflockulation eingehend getestet. Als Vergleich dienten begleitende Gärungen in EBC-Gärrohren und Edelstahl-ZKTs. Als zweckmäßig erwiesen sich die Bestimmung der Zelloberflächenhydrophobizität nach Akiyama-Jibiki und der modifizierte Helm-Test nach D'Hautcourt und Smart. Mit beiden Methoden war es möglich, das Flockulationsverhalten schnell und sicher zu bestimmen. Weniger gut geeignet, weil mit größerer Unsicherheit behaftet, war hingegen der modifizierte Helm-Test nach Mota und Soares.

BC 41 Brauereihefe

(Deskriptoren: Brauereihefen, Flockulation, Flockulationsmessmethoden, Zelloberflächenhydrophobizität, Modifizierter Helm-Test, Hefevitalität.

Descriptors: Brewers' yeasts, flocculation, methods for Measuring flocculation, cell surface hydrophobicity, modified Helm's test, yeast vitality)

1 Einleitung und Literatur

Die Flockulation, in Brauerkreisen auch Bruchbildung genannt, beschäftigt die Wissenschaft und den Praktiker bereits seit Ende des vorletzten Jahrhunderts. Das Flockulationsverhalten beeinflusst über die Kontaktzeit der Hefe mit dem Substrat den Verlauf der Hauptgärung und die nachfolgende Reifung und damit die Qualität des erzeugten Bieres ganz wesentlich. Diesbezüglich können als Einflussfaktoren genannt werden: der innerhalb einer vorgegebenen Zeit erzielbare Vergärungsgrad, die Effizienz der Reduktion der Off-Flavour-Komponenten Diacetyl und Acetaldehyd, die Durchführung der Hefefernte, die Klärung des Bieres während der Lagerung und damit direkt zusammenhängend auch die Filterstandzeiten.

Als Einführung erfolgt zunächst ein Blick auf die Historie der Flockulationsforschung, entsprechend einer Veröffentlichung von Jansen und Mendlik aus dem Jahre 1951 (1).

Schönfeld (2) beschrieb 1910 als einer der Ersten das unterschiedliche Flockulationsverhalten unter- und obergäriger Hefen in wässriger Lösung. Erstere zeigten eine ausgeprägte Bruchbildung, letztere hingegen bildeten eine eher milchig trübe Suspension. Etwa zur selben Zeit entwickelte Lange (3) eine enzymatische Theorie. Diese besagte, dass die Menge an exkretierten proteolytischen Enzymen, welche die Proteine der Zelloberfläche

angreifen, einen Einfluss auf das Flockulationsvermögen der Hefe ausübt. Lange zufolge schieden flockulente Hefen weniger dieser Enzyme aus. Schönfeld und Krumhaar (4) postulierten 1918, dass die Flockulation durch bestimmte Würze-Proteine, welche sich an der Zelloberfläche anlagern, induziert würde. Hayduck und Schücking (5) waren die ersten, die den möglichen Einfluss von Salzen auf die Flockulation untersuchten. Ranken (6) führte Versuche mit Calcium-Salzen durch und schlussfolgerte, dass die Flockulation primär vom Kulturmedium und erst in zweiter Linie vom Hefestamm abhängig sei. Liers und Heuss (7) maßen 1931 der elektrischen Ladung der Hefezelle eine gewisse Bedeutung bei. Geys (8) führte diesbezüglich Untersuchungen mittels Mikroelektrophorese durch und fand heraus, dass eine flockulente Hefe in destilliertem Wasser ihr Flockulationsvermögen verliert. Weiter bemerkte er, dass während der Hauptgärung die negative Oberflächenladung der Hefe etwa bis zum vierten Gärtag zunimmt, ab dann jedoch immer mehr Zellen mit positiver Ladung auftreten. Silbereisen (9) konnte diesbezüglich keine Veränderungen erkennen. Stockhausen (10) war der Meinung, dass die Flockulation teilweise durch ausgefällte Proteine, welche die Hefezellen adsorbieren und zu Boden ziehen, unterstützt würde. Burns (11) erklärte 1937 das Ausbleiben der Bruchbildung während der Hauptgärung mit der Anwesenheit vergärbare Zucker.

Dieser kurze Einblick in die „Geschichte der Flockulationsforschung“ lässt erkennen, wie wichtig, aktuell und vielschichtig dieses Thema zur Zeit unserer Väter und Großväter war, und dass damals bereits wichtige Grundlagen für spätere Untersuchungen gelegt wurden. Innerhalb der letzten 65 Jahre konnten auf diesem Forschungsgebiet große Fortschritte erzielt werden, insbesondere, was das Verständnis für mögliche Flockulationsmechanismen, für die genetischen und biochemischen Grundlagen, und was die Anwendung verschiedener Messmethoden zur Beurteilung der Flockulation betrifft.

Zwei Termini müssen grundsätzlich unterschieden werden. Mit dem Begriff Flockulenz wird die Fähigkeit der Hefezellen, unter optimalen Bedingungen flockulieren zu können, beschrieben. Dies ist eine genetisch und physiologisch determinierte Stammeigenschaft (12 – 16, 24). Flockulation hingegen meint das tatsächlich auftretende reversible Phänomen, bei dem Hefezellen zunächst agglomerieren und dann im Nährmedium innerhalb kurzer Zeit sedimentieren (24).

Burns (11) war es, der als erster das Flockungsvermögen einer Hefe visuell über die Sedimentbildung zu beurteilen versuchte. Es folgten, basierend auf diesem Prinzip, in den fünfziger bis achtziger Jahren eine Reihe weiterer Modifikationen (17 – 21). Hierbei wurden Versuche unternommen, die Aussagekraft und die Reproduzierbarkeit der Flockulationstests weiter zu verbessern, indem z. B. die Bestimmung der Zelldichte photometrisch gemessen, oder, indem auch die Geschwindigkeit der Sedimentation, die Größe der Flocken und die zur Entflockung benötigte EDTA-Menge bestimmt wurden. Heutzutage werden mehr und mehr neue Aspekte, wie die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Hefezelloberfläche, berücksichtigt (22 – 26). Immer wieder betont wird die Notwendigkeit standardisierter Kulturbedingungen für die zu untersuchenden Hefen. Weiter von Bedeutung ist der Eintrag von Energie in Form von Bewegung der Zellen und die Einstellung einer möglichst gleichmäßigen Zelldichte zu Beginn der Flockulationsmessung. Die Rolle des Calciums bei der Flockulation wird kontrovers diskutiert. Vorgeschlagen wird die Möglichkeit einer Calciumsalzbrückenbindung zwischen anionischen Gruppen der Zellwand.

In dieser sogenannten Ionenhypothese (27) geht man davon aus, dass es sich bei diesen Gruppen vermutlich um die Phosphodiestergruppen des Phosphomannans oder um Carboxylgruppen der Proteine handelt (28, 29). Zusätzlich zu den Salzbrücken scheinen hierbei auch Wasserstoffbrücken zwischen den Mannoseresten an der Zelloberfläche stabilisierend zu wirken. Zweiwertige Ionen, wie Calcium, scheinen aufgrund ihres Ionenradius für die Ausbildung dieser Salzbrücken prädestiniert zu sein, wobei andere zweiwertige Ionen, wie Magnesium oder Mangan, ebenfalls, jedoch in wesentlich schwächerem Ausmaß, Flockulation auslösen können. Einen flockulationshemmenden Einfluss besitzen dagegen beispielsweise die einwertigen Natrium- und Kalium-Ionen (30). Diese Salzbrücken-Theorie wird zwar von vielen Seiten unterstützt, jedoch kann sie nicht den flockulationshemmenden Einfluss der Zucker, speziell Mannose und Glucose, erklären. Eine andere Funktion der Calcium-Ionen wird durch den heutzutage am besten erklärbaren Mechanismus der „Lektinähnlichen Adhäsion“ der Zellen beschrieben.

Diese Lektinhypothese wurde 1978 von Taylor und Orton (31) vorgeschlagen und dann von Miki et al. 1982 bestätigt (32). Sie berücksichtigt zusammen die Aspekte Calcium-Ionen, Proteinstrukturen der Zelloberfläche, Wasserstoffbrücken und Zucker. Lektine sind eine Gruppe antikörperähnlicher Proteine. Diese können sich an der Oberfläche verschiedener Zelltypen, unter anderem auch Hefen, spezifisch binden und diese dabei verklumpen. Die hierbei beteiligten Gruppen umfassen das Zuckerbindungszentrum der Lektine und die terminalen, nicht-reduzierenden Mannose-, Glucose- und Fructosereste von Mono-, Oligo- oder Polysacchariden der entsprechenden Oberflächenrezeptoren. Concanavalin A ist ein typisches Lektin und beinhaltet als essentiellen Bestandteil des Zuckerbindungszentrums Calcium-Ionen. Tatsächlich kann anhand haploider Laborstämme nachgewiesen werden, dass bestimmte Flockulationsgene Zelloberflächenproteine (Lektine oder Flockuline) kodieren, welche unmittelbar am Zustandekommen einer Zell-Zell-Bindung beteiligt sind. Interessanterweise werden in Brauereistämmen diese Komponenten erst gegen Ende der logarithmischen Phase gebildet, was das Einsetzen der Flockulation während der stationären Phase erklären kann. Calcium-Ionen können hierbei als Aktivator der Lektine dienen, und es kommt zum Aufbau von Bindungen zwischen den Zuckerbindungszentren der Oberflächenproteine und den Zuckerresten der Mannoprotein-Schicht, wobei Wasserstoffbrücken hierbei stabilisierend wirken (33). Beschrieben wurden 1991 zwei unterschiedliche Flockulationsphänotypen, welche beide dem

lektinähnlichen Adhäsionsmodell entsprechen (34). Die sogenannten FLO1-Phänotypen, zu denen die meisten Laborstämme zählen, besitzen konstitutiven Flockulationscharakter und mannosenspezifische Oberflächenproteine. Demgegenüber weisen die NewFLO-Phänotypen, wozu vermutlich der überwiegende Teil der Brauereihefen zählt, weniger spezifische Oberflächenproteine auf, die sowohl Mannose als auch Glucose binden können. Hinzu kommt ein 1992 von Masy et al. (35) beschriebener dritter Phänotyp, welcher ein mannoseunempfindliches Lektin besitzen soll. Grundsätzlich scheint jedoch der Flockulationsmechanismus in jedem Fall gleich zu sein. Insgesamt kann also das lektinähnliche Adhäsionsmodell die Flockulation bislang am besten beschreiben.

Basierend auf der Erkenntnis, dass flockulierende Hefen, bedingt durch die Bildung von lektinähnlichen Mannoproteinen im Bereich der Zellwand, eine wesentlich höhere Zelloberflächenhydrophobizität aufweisen als staubige bzw. noch nicht flockulierte Hefen (13, 33), schlugen Akiyama-Jibiki et al. (36) vor, hiermit eine Aussage über das Flockulationsverhalten einer Hefepopulation zu treffen. Ferner erwähnten sie, dass die Zelloberflächenhydrophobizität mit der Anzahl der Sprossnarben (= Zellalter) positiv korreliert sei. Auch Jin et al. (37) beschrieben bei Anwendung der Methodik von Akiyama-Jibiki et al. einen Zusammenhang ($R^2 = 0,684$) zwischen Flockulation und Zelloberflächenhydrophobizität. Soares und Mota (38) modifizierten und standardisierten den konventionellen Helm-Test, indem sie die Einstellung der Anfangszellkonzentration, die Bewegung der Probe, die Probenahme und die Bestimmung der sedimentierenden Zellen unter genau festgelegten Bedingungen durchführten. D'Hautcourt und Smart (39) entwickelten, ebenfalls basierend auf dem Helm-Test, eine Versuchsvorschrift, die auch den flockulationsbeeinflussenden Faktor Ethanol berücksichtigt.

2 Versuchsprogramm und Versuchsdurchführung

Ziel der Untersuchungen war, verschiedene leicht zu handhabende Messmethoden zur Bestimmung der Bruchbildung von Hefen auf ihre Praktikabilität hin zu untersuchen. Von besonderem Interesse war hierbei, ob und inwieweit eine zuverlässige Bestimmung bzw. Vorhersage des Flockulationsverhaltens in nachfolgenden Gärungen anhand der beschriebenen Verfahren möglich ist.

Die Beurteilung des Flockulationsverhaltens erfolgte anhand der folgenden Methoden.

1. Durchführung von Gärungen in EBC-Gärrohren bzw. in Edelstahl-ZKTs. Hierbei wurden die Gärungen isotherm bei 15 °C bei einer Anstellzellzahl von 20 Mio/mL durchgeführt. Die Hefeernte erfolgte stets aus dem Konus. Als Substrat diente im Fall der Gärungen in EBC-Gärrohren stets eine unter standardisierten Bedingungen aus Würzepulver hergestellte 11,5%ige Würze. Wurden die Gärungen im 30 Liter-Maßstab in den ZKTs durchgeführt, so kam eine aus Pilsener Malz hergestellte 11,5%ige Würze zum Einsatz. Die Kontrolle des Flockulationsverhaltens der Hefe erfolgte über die tägliche Bestimmung der Zellzahl in Schwebemittels Thoma-Kammer.
2. In-vitro-Versuche zur Bestimmung des Flockulationsverhaltens wurden entsprechend den Angaben von Soares und Mota (37) durchgeführt. Die geerntete Hefe wird zur Entfernung von Ca^{2+} zweimal mit einer 0,25 M EDTA-Lösung gewaschen. Danach erfolgt jeweils eine Waschung mit einer 0,25 M NaCl-Lösung I (pH 2) und einer 0,25 M NaCl-Lösung II (pH 4,5). Anschließend wird mit NaCl-Lösung II eine Zellkon-

zentration in der Nähe von 100 Mio/ml eingestellt. Nach Zugabe dieser Hefesuspension (48 mL) in einen Standzylinder werden als Auslöser für die Flockulation 2 ml einer 0,1 M (hier: 0,25 M) CaCl_2 -Lösung zugesetzt. Daraufhin wird der Zylinder zwecks Durchmischung und Zufuhr von kinetischer Energie manuell innerhalb von 15 s 18 mal um 180° gedreht. Von einer festgelegten Stelle wird in Intervallen von 20 Sekunden eine Probe (500 μl) gezogen und in eine Küvette mit 3 mL NaCl-Lösung I als Vorlage gegeben. Während Soares und Mota eine Messdauer von sieben Minuten vorschlagen, wird in unseren Versuchen ein Zeitraum von maximal drei Minuten betrachtet, da eigenen Erfahrungen zufolge spätestens ab diesem Zeitpunkt keine flockulationsbedingte Änderung der Extinktion mehr auftritt. Die Extinktion wird photometrisch bei 620 nm bestimmt. Für jeden Hefestamm wird zuvor eine Kalibrierkurve erstellt, anhand der dann die Flockulationsintensität der vorliegenden Population über die Zellzahl in Schwebelänge abgelesen werden kann.

3. Ebenfalls in-vitro wurde der Flockulationscharakter der Hefe mittels HICF-Test nach Akiyama-Jibiki et al. (36) bewertet. HICF bedeutet hierbei Hydrophobic Interaction Chromatography for Flocculation. Die Hefe wird zunächst zweimal mit einem 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH 4,2) gewaschen. In diesem Puffer wird eine definierte Zellkonzentration von 25 Mio/ml eingestellt, woraufhin diese Suspension (100 ml) auf eine kleine mit Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) gepackte Einweg-Hydrophobic-Kunststoffsäule (Bio-Rad Laboratories) gegeben wird. Nach Aufgabe der Hefesuspension und Nachspülen der Säule mit 3 ml eines 0,1 M Na-Acetat (+ 1 M NaCl)-Puffers wird der Eluent in einer Küvette aufgefangen und die Extinktion photometrisch bei 660 nm bestimmt. Der HICF-Wert errechnet sich über einfache Prozentrechnung wie folgt:

$$\text{HICF-Wert} [\%] = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Ausgangslösung}} - \text{Extinktion}_{\text{Eluent}}}{\text{Extinktion}_{\text{Ausgangslösung}}} * 100$$

Entsprechend der Lektin-Hypothese (13, 33) besitzen Bruchhefen einen gegenüber Staubhefen erhöhten Proteingehalt im Bereich der Zellwand (Mannoproteine = Lektine), weswegen ihre Zelloberflächenhydrophobizität erhöht ist. Solche Hefen werden von der Phenyl-Sepharose verstärkt zurückgehalten, und damit steigt der HICF-Wert. Die von der Phenyl-Sepharose zurückgehaltenen Zellen können nach der Messung mit 30%iger Isopropanol-Lösung ausgespült werden, so dass nach Equilibrierung der Packung mit dem 0,1 M Na-Acetat (+ 1 M NaCl)-Puffer die Phenyl-Sepharose erneut verwendet werden kann.

4. Der so genannte Smart-Test (39) basiert auf einer von Bendiak (40) vorgeschlagenen Methode und wurde folgendermaßen durchgeführt: 10 mL der geernteten Hefe (Zellzahl 100 Mio/ml) werden zunächst dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ in einem Kunststoffzentrifugenröhrchen A gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 9,9 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und 0,1 mL 0,5 M EDTA-Lösung resuspendiert und auf einem Vortex 15 s lang homogenisiert. 1 ml dieser Suspension wird dann mit 9 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnt, und die Extinktion wird spektralphotometrisch bei 600 nm gemessen. Röhrchen B stellt das eigentliche Reaktionsgefäß dar. Das gewaschene Hefepellet wird zunächst in 10 ml Lösung A (0,51 g/l CaSO_4) resuspendiert, 15 s lang homogenisiert und dann abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, anschließend wird in 10 mL Lösung B (0,51 g/l CaSO_4 , 6,8 g/l Natriumacetat, 4,05 g/L Eisessig und 5% vol Ethanol; pH 4,5) resuspendiert. Nach erneutem Homogenisie-

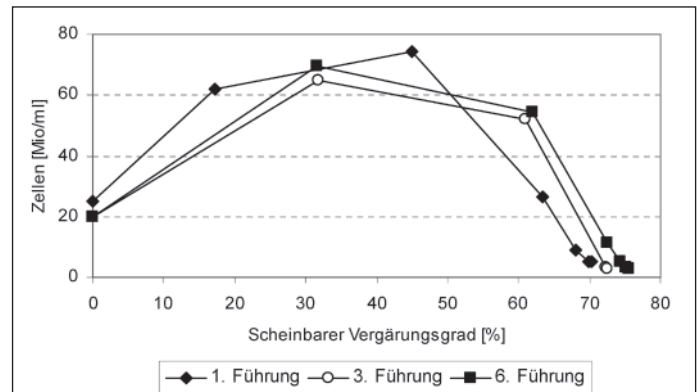


Abb. 1 Stamm Rh: Gärung in EBC-Gärrohren

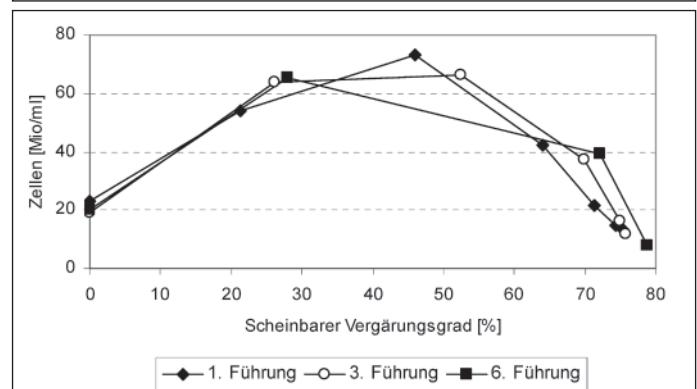


Abb. 2 Stamm 43 P: Gärung in EBC-Gärrohren

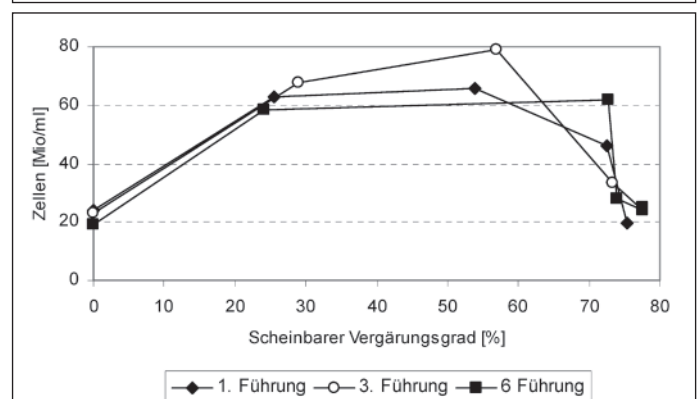


Abb. 3 Stamm Frank: Gärung in EBC-Gärrohren

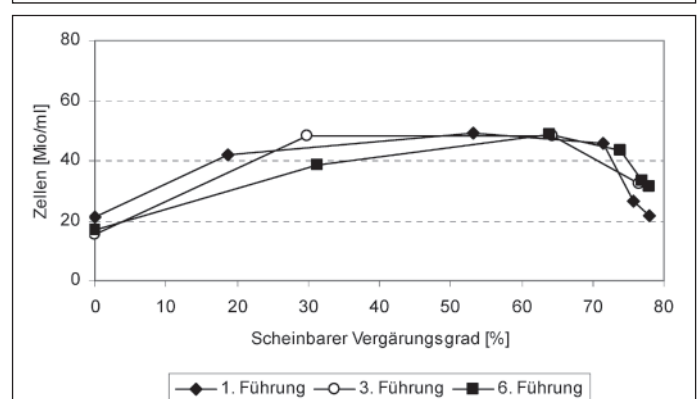


Abb. 4 Stamm 160: Gärung in EBC-Gärrohren

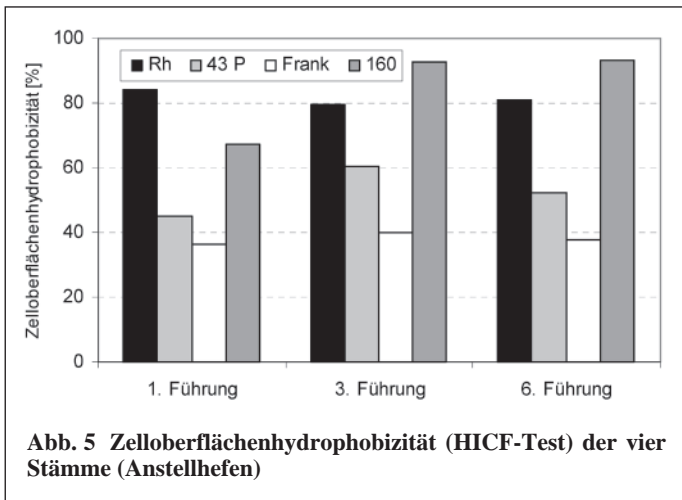


Abb. 5 Zelloberflächenhydrophobizität (HICF-Test) der vier Stämme (Anstellhefen)

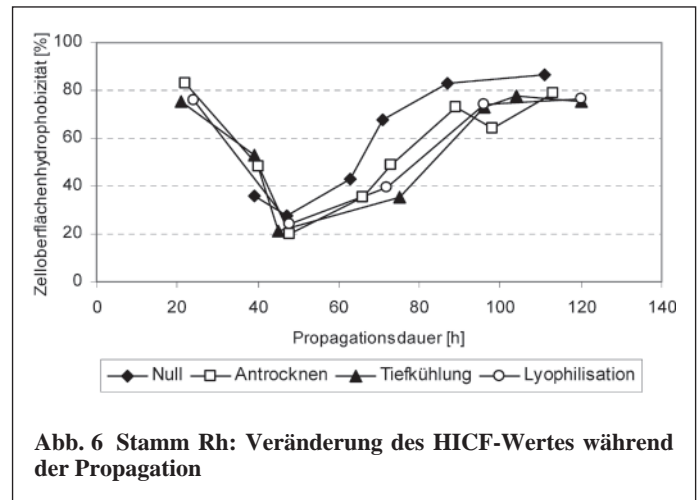


Abb. 6 Stamm Rh: Veränderung des HICF-Wertes während der Propagation

ren und fünfmaligem Drehen des Röhrchens wird dieses exakt sechs Minuten lang senkrecht stehengelassen. 1 ml aus dem oberen Teil der Suspension wird mit 9 ml H₂O_{dest.} verdünnt. Nach dem Homogenisieren wird die Extinktion gemessen. Anhand beider Extinktionswerte, die im linearen Bereich der Kalibrierkurve liegen müssen, errechnet sich der Anteil flockulierter Zellen.

Entsprechende Modifikationen dieser Methoden werden im Folgenden ausdrücklich erwähnt. Beschrieben werden zunächst ausgewählte Ergebnisse von Flockulationsversuchen unter Verwendung der Methoden 1 – 3. Zur Anwendung gelangten die untergärigen Stämme Rh, 43 P (Bruchhefen) und Frank (Staubhefe) sowie die Altbierhefe 160 (obergärig). Im Anschluss daran werden Resultate einer Versuchsreihe mit Stamm 43 P vorgestellt. Zwecks direkten Vergleichs werden parallel die zuvor beschriebenen Messmethoden 1 – 4 eingesetzt. Sämtliche Hefen entstammten der Stammsammlung des Forschungsinstituts für Technologie der Brauerei und Mälzerei (FBM). Die Stämme wurden sowohl als Schrägagarkultur als auch in konservierter Form (Lyophilisation, Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff und Antrocknen an Filterpapier) gelagert.

3 Ergebnisse

Klar zu erkennen ist, dass anhand der Höhe der Zelloberflächenhydrophobizität eine gute Stammdifferenzierung möglich ist (Abb. 5). Die Bruchhefe Rh zeigt während der Gärung in EBC-Gärrohren ein gleichmäßig gutes Absetzverhalten, was sich auch in Form hoher HICF-Werte von 80% äußert (Abb. 1). Als weniger flockulent sowohl während der Gärung als auch im HICF-Test erweist sich die zweite Bruchhefe 43 P (Abb. 2), während der Stamm Frank entsprechend seinem staubigen Charakter den mit Abstand niedrigsten HICF-Wert besitzt (Abb. 3). Die Altbierhefe 160 hingegen weist speziell nach mehrmaligem Führen die höchste Zelloberflächenhydrophobizität aller untersuchten Stämme auf (Abb. 4).

Beispielhaft beschrieben wird die Veränderung des HICF-Wertes während der Propagation (Abb. 6) und Gärung (Abb. 7) für die Bruchhefe Rh. Hier wird deutlich, dass die Zelloberflächenhydrophobizität, und dies ist besonders gut während der Propagation zu erkennen, ganz erheblich von der Kulturphase beeinflusst wird. Nach anfänglicher Abnahme kommt es während der logarithmischen Phase zu einem stetigen Anstieg des HICF-Wertes. Im Fall der beschriebenen Gärungen deutet sich zudem zum Zeitpunkt

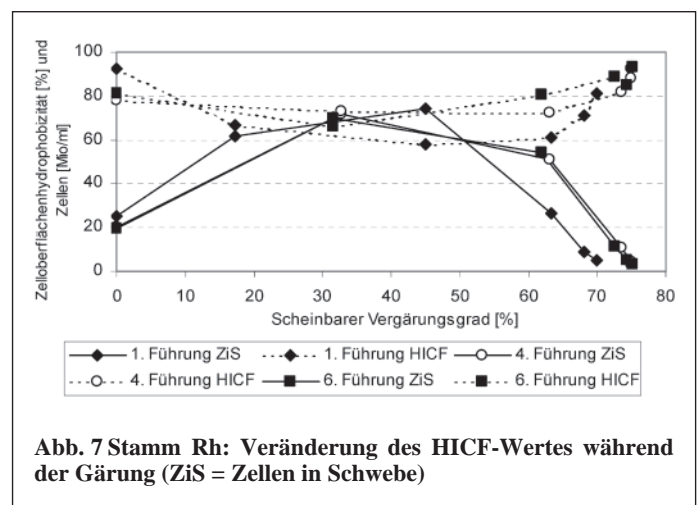


Abb. 7 Stamm Rh: Veränderung des HICF-Wertes während der Gärung (ZiS = Zellen in Schwebel)

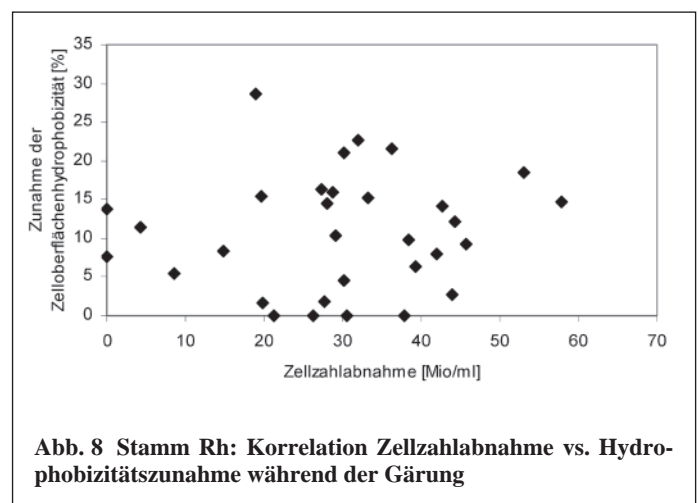


Abb. 8 Stamm Rh: Korrelation Zellzahlabnahme vs. Hydrophobizitätszunahme während der Gärung

des Einsetzens der Bruchbildung ein Anstieg des HICF-Wertes der in Schwebel befindlichen Hefen an (Abb. 7). Betont werden muss aber, dass es nicht möglich erscheint, allein aus der Höhe dieses Anstiegs auf die Flockulationsneigung zu schließen, was in Abbildung 8 zu erkennen ist. Hierfür wurden 32 Gärungen im 30 Liter-Maßstab durchgeführt. Zwar wird in jedem Ansatz ein für eine Bruchhefe typischer maximaler HICF-Wert von 70% bis 85% erreicht, jedoch besteht offensichtlich keine Beziehung zwischen der Höhe des Anstiegs der Zelloberflächenhydrophobizität

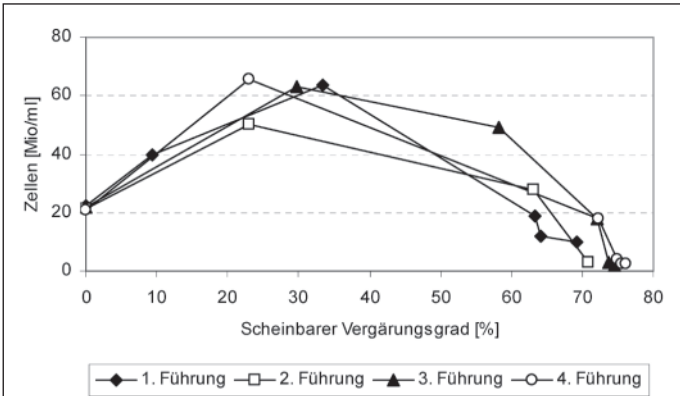


Abb. 9 Stamm Rh: Gärung in EBC-Gärrohren

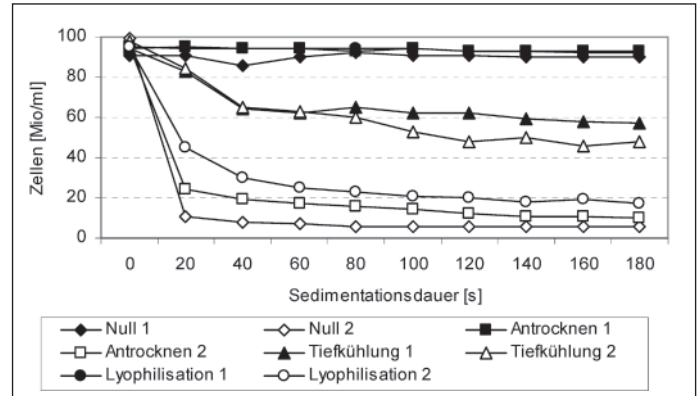


Abb. 11 Stamm Rh: Mota-Test (Erntehefe aus 1. und 2. Führung)

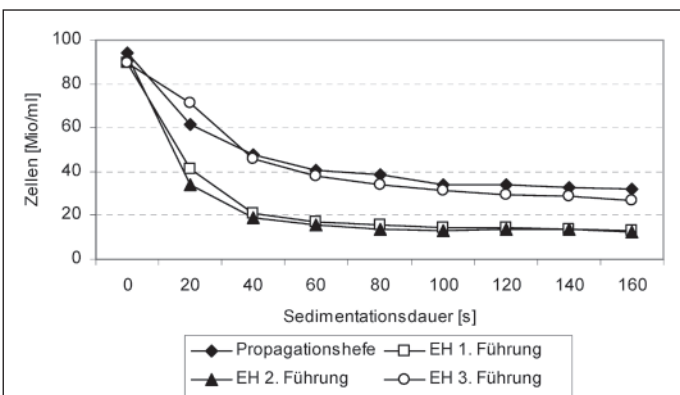


Abb. 10 Stamm Rh: modifizierter Helm-Test nach Mota und Soares (EH = Erntehefe)

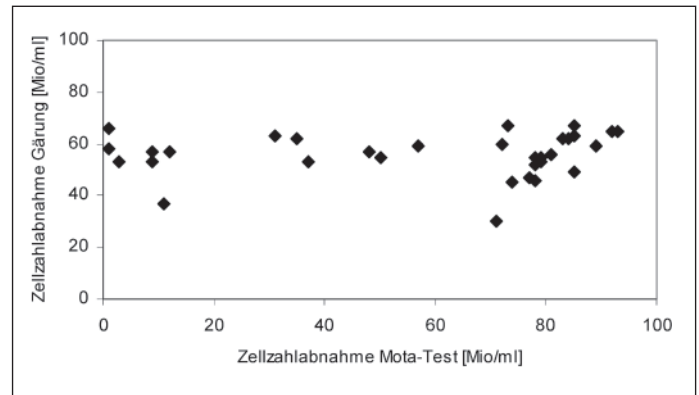


Abb. 12 Stamm Rh: Korrelation Zellzahlabnahme Mota-Test vs. Zellzahlabnahme Gärung

und der einhergehenden Zellzahlabnahme im Gärtank.

Im Folgenden wird nun der modifizierte Helm-Test nach *Mota* und *Soares*, kurz: Mota-Test genannt, betrachtet. Wie eingangs beschrieben, wird die Hefe zunächst mittels EDTA deflockuliert und dann durch Zugabe von Ca^{2+} und Eintrag von kinetischer Energie erneut zur Bruchbildung angeregt.

Die Abbildung 9 und 10 stellen Ergebnisse einer Versuchsreihe über vier Führungen mit der Bruchhefe Rh dar. Zunächst ist zu erkennen, dass die Hefe in der ersten Führung das tendenziell schlechteste Absetzverhalten im EBC-Gärrohr aufweist (Abb. 9). Betrachtet man die entsprechenden Ergebnisse des Mota-Tests (Abb. 10), so trifft dies zwar für die Propagationshefe (= Anstellhefe der ersten Führung) ebenfalls zu – allerdings weist auch die Erntehefe der dritten Führung (= Anstellhefe der vierten Führung) im Mota-Test eine schwächere Flockulation auf. Dies aber macht sich bei Betrachtung des Gärverlaufes der vierten Führung keineswegs bemerkbar.

Merkwürdig ist weiterhin folgendes wiederholt in mehreren 30-Liter-Gärungen vorliegendes Ergebnis (Abb. 11). Eine aus der logarithmischen Phase dem Propagator entnommene und dann zweimal geführte Hefe flockuliert im Fall der auf Schrägagar gelagerten und zweier konservierter Hefen laut Mota-Test nach der ersten Führung nicht, obwohl sich tatsächlich die Hefen gut im Konus des ZKTs abgesetzt haben. Erst in der zweiten Führung gehen die Ergebnisse dieses modifizierten Helm-Tests konform mit den Ergebnissen des entsprechenden Gärverlaufes. Wie der

Abbildung 12 zu entnehmen ist, besteht bei Berücksichtigung von 32 Gärversuchen kein Zusammenhang zwischen der Flockulationsintensität während der Gärung und der Stärke der Zellzahlabnahme im Mota-Test.

Es gilt weiterhin festzuhalten, dass die untersuchte Staubhefe bzw. die obergärige Hefe auch im Bereich der stationären Phase keine Bruchbildung zeigten.

Im letzten Teil dieser Untersuchungen wurden dann die Methoden Gärung in EBC-Gärrohren, HICF-Test, Mota-Test und zusätzlich auch der Smart-Test anhand der Bruchhefe 43 P direkt miteinander verglichen. Ziel dieser Versuchsreihe war, die Methoden hinsichtlich ihrer Aussagekraft abschließend zu beurteilen.

Die Abbildungen 13 und 14 beschreiben den Verlauf einer Gärung in EBC-Gärrohren mit einer auf Schrägagar (Null) gelagerten bzw. lyophilisierten Hefe (Lyo), sowie Ergebnisse der drei Labormessmethoden zur Bestimmung des Flockulationsverhaltens. In Tabelle 1 werden die verwendeten Abkürzungen näher

Tabelle 1 Erklärung der Abkürzungen

*	Propagatorhefe = Anstellhefe der ersten Führung
**	Propagatorhefe, die sieben Tage bei 10 °C gelagert wurde
***	Erntehefe der ersten Führung

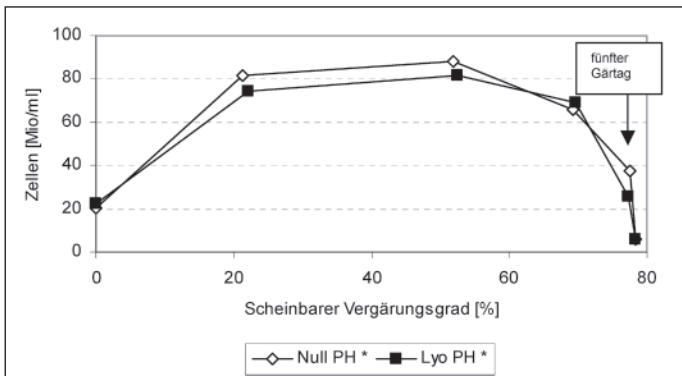


Abb. 13 Stamm 43 P: Gärung in EBC-Gärrohren

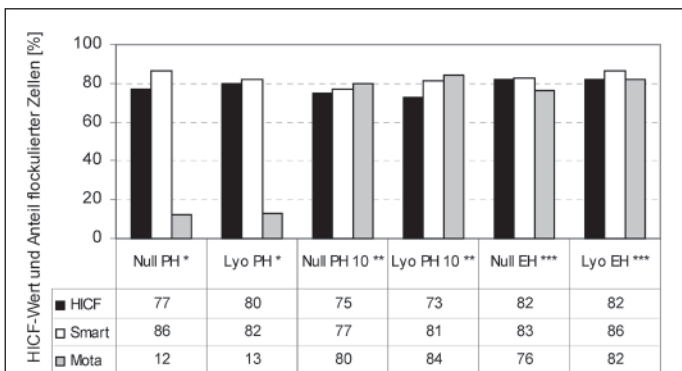


Abb. 14 Stamm 43 P: Flockulationstests

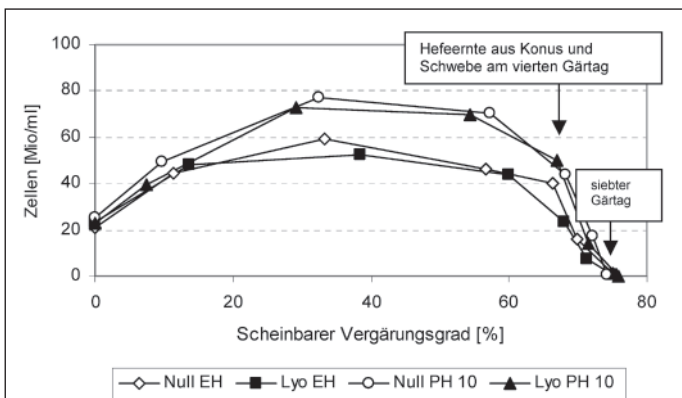


Abb. 15 Stamm 43 P: Gärung in EBC-Gärrohren

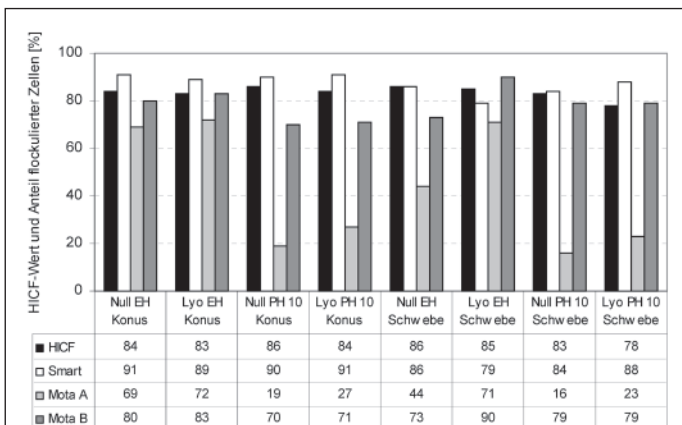


Abb. 16 Stamm 43 P: Flockulationstests

erklärt. Zunächst gilt es festzuhalten, dass in beiden Propagatoren die Hefe in der stationären Phase nach Einsetzen der Bruchbildung geerntet wurde. In der in Abbildung 13 beschriebenen anschließenden Gärung zeigen beide Hefen eine ausgeprägte Bruchbildung bei identischem Vergärungsgrad am fünften Gärtag. Betrachtet man nun das Verhalten der Hefe in den Flockulationstests, so fällt sofort das Ausbleiben der Bruchbildung im Mota-Test im Fall der Propagatorhefen Null und Lyo auf. Tatsächlich aber konnte zuvor visuell eine sehr deutliche Flockulation der Anstellhefe beobachtet werden. Sowohl der HICF- als auch der Smart-Test liefern hier eindeutig realitätsnähere Ergebnisse. Die untersuchten Erntehefen zeigen bei allen Methoden eine deutliche Bruchbildung bzw. eine hohe Zelloberflächenhydrophobizität, was konform geht mit dem guten Absetzverhalten im Gärrohr. Interessant ist, dass sich die siebentägige „warme“ Lagerung der Propagatorhefe sowohl im HICF- als auch im Smart-Test durch eine tendenzielle Abnahme der Zelloberflächenhydrophobizität bzw. des Anteils flockulierter Zellen bemerkbar macht. Dies ist durchaus verständlich, da eine warme Aufbewahrung erfahrungsgemäß mit einer physiologischen Beeinflussung der Hefe einhergeht, die sich auch in Form einer veränderten Zusammensetzung der Hefeoberfläche und, damit verbunden, einer schwächeren Neigung zur Bruchbildung äußern kann (vgl. 16, 41). Letzteres ist in diesem Fall auch visuell nachvollziehbar – beide Hefeansätze weisen ein eher suppigges Aussehen auf. Ein diesbezüglich abweichendes Ergebnis liefert hingegen erneut der Mota-Test, der eine unverändert starke Bruchbildung andeutet.

Im zweiten Versuch (Abb. 15/16) wurden die Erntehefen der zuvor beschriebenen Gärung nach siebentägiger „kalter“ Lagerung bei 0 °C bzw. die nunmehr sieben Tage „warm“ und dann sieben Tage „kalt“ gelagerten Propagatorhefen für eine Gärung eingesetzt. Die optisch in Abbildung 15 angedeuteten Unterschiede in der Zellzahlzunahme während der Gärung relativieren sich, wenn man die zwischen 21 und 25 Mio/mL betragenden Anstellzellzahlen berücksichtigt. So zeigen die Ansätze Null EH, Null PH 10 und Lyo PH 10 eine Verdreifachung der Zellzahl in Schwebelagerung, während die Hefe Lyo EH eine 2,3fache Zunahme erkennen lässt. Bis zum dritten Gärtag erweisen sich die Erntehefen, was die Gärgeschwindigkeit betrifft, am vitalsten. Nach Einsetzen der Bruchbildung erfolgte am vierten Gärtag die Hefeernte sowohl aus dem Konus als auch aus der Schwebelagerung. Hiermit wurden anschließend die Flockulationsuntersuchungen durchgeführt. In sämtlichen Ansätzen können nach sieben Tagen gleichmäßige Vergärungsgrade bei sehr niedrigen Zellzahlen in Schwebelagerung nachgewiesen werden, was in jedem Fall auf eine starke Flockulation hindeutet. Offensichtlich hat die zuvor „warme“ Lagerung der Propagatorhefen das Bruchbildungsvermögen während der Gärung in keiner Weise negativ beeinflusst – allerdings ist in jedem Ansatz eine im Vergleich zu Abbildung 13 geringere Gärleistung feststellbar. Abbildung 16 zeigt, dass zwischen den bereits im Konus abgesetzten und noch in Schwebelagerung befindlichen Zellen hinsichtlich der Zelloberflächenhydrophobizität kein Unterschied besteht. Mit Ausnahme der Hefe Lyo PH 10 liegen sämtliche Werte gleichmäßig zwischen 83% und 86%. Mit dem Smart-Test können diesbezüglich allerdings tendenzielle Unterschiede herausgearbeitet werden. In sämtlichen Ansätzen weist die Schwebelagerungshefe einen niedrigeren Anteil zur Flockulation fähiger Zellen auf. Der Mota-Test A wurde entsprechend der zuvor beschriebenen Vorschrift von Mota und Soares durchgeführt. Der Eintrag kinetischer Energie zur Auslösung der Bruchbildung erfolgt durch 18-maliges Drehen des Standzylinders. Erneut treten dabei sehr ungleichmäßige Ergebnisse auf, die dem tatsächlichen Flockulationsverhalten nicht gerecht werden. Im Mota-Test B wurden die Hefen vor dem Drehen des Standzylinders

ders zusätzlich 15 s intensiv auf dem Vortex homogenisiert. Dies führt in jedem Ansatz zu einer sehr deutlichen Verstärkung der Bruchbildung. Im Gegensatz zum Smart-Test können in diesem Fall jedoch keine Unterschiede zwischen den Konus- und Schweb-Hefen ausgemacht werden. In weiteren Versuchen konnte allerdings die Erfahrung gemacht werden, dass nicht in jedem Fall bei zunächst ausbleibender Flockulation ein Vortexen die zu erwartende Bruchbildung, und dies unabhängig von der Höhe der flockulationsinduzierenden Ca^{2+} -Konzentration, auszulösen vermag.

4 Diskussion

In den zuvor beschriebenen Untersuchungen wurden unterschiedliche Labormessmethoden zur Beurteilung des Flockulationsverhaltens von Brauereihefen hinsichtlich ihrer Praktikabilität getestet.

Betrachtet wurden die Aspekte Höhe der Zelloberflächenhydrophobizität bei unter- und obergäriger Hefe, ihre Veränderung in Abhängigkeit von der Kulturphase bzw. vom physiologischen Zustand der Zellen und schließlich der Zusammenhang zwischen Flockulation, Flockulenz, Zelloberflächenhydrophobizität sowie Hefevitalität. In einer Versuchsreihe konnte zunächst nachgewiesen werden, dass anhand der Zelloberflächenhydrophobizität eine sehr gute Differenzierung zwischen Bruch- und Staubhefen möglich ist (vgl. 13, 33, 36, 37). Letztere wiesen im Bereich der stationären Phase merklich niedrigere HICF-Werte auf. Bei einer näher untersuchten Bruchhefe war auch festzustellen, dass die Zelloberflächenhydrophobizität während der Gärung und Propagation ständigen Veränderungen unterworfen ist. Einer anfänglichen Abnahme des HICF-Wertes zu Beginn der Hefevermehrung folgte dann im Verlauf der logarithmischen Phase eine stetige Zunahme der Zelloberflächenhydrophobizität der in Schweb befindlichen Zellen, die nach Einsetzen der Bruchbildung in der stationären Phase ihr Maximum erreichte. Auch dieser Befund unterstützt die Untersuchungen von *Akiyama-Jibiki et al.* (36). Nicht bestätigt werden konnte allerdings unsere Vermutung, dass anhand der Höhe des Anstiegs des HICF-Wertes bei Einsetzen der Flockulation direkt auf die Intensität der Bruchbildung im Gärtank geschlossen werden kann. Eine „warme“ Aufbewahrung der Hefe führte zu einer tendenziellen Verringerung der Zelloberflächenhydrophobizität. Unterschiede zwischen „warm“ und „kalt“ gelagerten Hefen in nachfolgenden Gärungen hinsichtlich des HICF-Wertes und der Flockulationsintensität konnten jedoch nicht festgestellt werden. Weiterhin unterschieden sich Hefen, die dem Konus entnommen wurden und solche, die sich zu diesem Zeitpunkt noch in Schweb befanden, bezüglich ihrer Zelloberflächenhydrophobizität in keiner Weise. Dies ist insofern interessant, als dass anhand des Smart-Tests an dieser Stelle durchaus Unterschiede bezüglich des Anteils zur Flockulation fähiger Zellen nachgewiesen werden konnten. Eine von *van der Aar* (42) vermutete verstärkte Anreicherung von flockulanten Zellen mit höherer Zelloberflächenhydrophobizität im Verlauf mehrerer aufeinanderfolgender Führungen bei ausschließlicher Entnahme der Hefe aus dem Konus war nicht festzustellen. Bereits an anderer Stelle wurde beschrieben, dass zwischen der Höhe des HICF-Wertes und der Hefevitalität kein unmittelbarer Zusammenhang besteht (43). Dies konnte in diesen Untersuchungen bestätigt werden. Schließlich wies die von uns getestete obergärige Hefe zumindest ab der dritten Führung einen sehr hohen HICF-Wert von rund 90 % auf. Dies geht konform mit den Angaben von *Dengis* und *Rouxhet* (33). Somit kann der HICF-Test nach *Akiyama-Jibiki et al.* mit den zuvor beschriebenen Einschränkungen als eine durchaus praktikable Methode zur schnel-

len Bestimmung des Flockulationsverhaltens einer Hefepopulation genannt werden. Dies unterstützt ferner die Ergebnisse einer neueren Veröffentlichung von *Jin et al.* (37), die unabhängig von unseren Untersuchungen dem HICF-Test eine hohe Aussagekraft zusprechen.

Der modifizierte Helm-Test nach *Mota* und *Soares* erwies sich in mehreren Versuchen als verhältnismäßig ungenau und unsicher. Problematisch war, dass zum Teil eine Bruchbildung gänzlich ausblieb, obwohl die Hefepopulation ihrem physiologischen Zustand bzw. ihrem tatsächlichen Flockulationsverhalten entsprechend flockulieren hätte müssen. Ein alleiniges mehrmaliges, manuelles Drehen des Standzylinders zwecks Verteilung der flockulationsauslösenden Calcium-Ionen und Zufuhr von kinetischer Energie war nicht immer ausreichend, die Bruchbildung auszulösen – lediglich nach intensivem Vortexen trat, wenn auch nicht in jedem Fall, Flockulation auf. Probleme dieser Art wurden von *Mota* und *Soares* jedoch nicht erwähnt. Auch scheint unserer Erfahrung nach eine Mindestzell-dichte von 40 Mio/ml, wie von den Autoren gefordert, nicht ausreichend zu sein, um unter diesen Versuchsbedingungen die Bruchbildung sicher auszulösen.

Deutlich besser geeignet war der modifizierte Helm-Test nach *D'Hautcourt* und *Smart*. Die Bruchbildung konnte in den beschriebenen Versuchen stets sicher nachgewiesen werden. Auch konnten hiermit tendenziell Differenzierungen zwischen Hefepopulationsfraktionen bzw. zwischen Hefen mit unterschiedlichem physiologischen Zustand, die mit dem Mota-Test nicht möglich waren, durchgeführt werden. Im Unterschied zum Mota-Test verzichtet der Smart-Test auf eine anfängliche Deflockulation der Hefe mittels EDTA und verwendet einen Puffer mit geringerer Na^+ -Konzentration (0,1 M anstatt 0,25 M) – allerdings werden zusätzlich bei vergleichbarem pH-Wert Ethanol und Eisessig zur Reaktionslösung gegeben. Dies könnte sich durchaus aufgrund praxisnäherer Bedingungen (EtOH) und der niedrigeren Menge an möglicherweise antagonistisch wirkenden Natrium-Ionen positiv ausgewirkt haben. Ferner scheint auch das intensive Homogenisieren der Hefesuspension auf dem Vortex für die Auslösung der Flockulation von großer Bedeutung zu sein.

Summa summarum erweist sich sowohl der HICF-Test nach *Akiyama-Jibiki et al.* als auch der modifizierte Helm-Test nach *D'Hautcourt* und *Smart* als zweckmäßig für die Bestimmung des Flockulationsverhaltens von Brauereihefen. Völlig ausreichend ist jeweils eine Dreifach- bzw. Doppelbestimmung. Wichtig ist, dass stets Hefen aus der stationären Phase getestet werden, da nur diese in der Lage sind zu flockulieren bzw. die maximale Zelloberflächenhydrophobizität aufweisen. Weniger gut geeignet hingegen ist unserer Meinung nach der modifizierte Helm-Test nach *Mota* und *Soares*. Nach wie vor sollte aber auf begleitende Gärungen in geeigneten Gärgefäßen (z. B. EBC-Gärrohre) nicht verzichtet werden, um Veränderungen von Hefeeigenschaften, die das Flockulationsverhalten betreffen, sicher detektieren zu können.

Danksagung

Diese Arbeit enthält zum Teil Ergebnisse des Forschungsprojektes „Untersuchungen zur Konservierung von Hefestämmen und zum raschen Nachweis von Eigenschaftsveränderungen der Stämme“. Wir bedanken uns für die Förderung dieses Forschungsvorhabens durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ (AiF) aus Mitteln des Bundeswirtschaftsministeriums unter der Projektkennziffer 10704 N.

5 Summary

Wackerbauer, K., and Beckmann, M.: Investigations on the determination of the flocculation behaviour of brewers' yeast — Monatschrift für Brauwissenschaft 56, No 3/4, ?? – ??, 2003

BC 41 Brewery yeast

The determination of the flocculation behaviour of brewers' yeast represents an important part of brewery quality management, because alterations of this characteristic yeast property will directly influence the fermentation process, filterability of beer, and final beer quality. In this research work, three laboratory methods for measuring yeast flocculation were tested and evaluated. As a comparison, we simultaneously conducted fermentation trials in EBC-Fermentation Test Tubes and stainless steel CCTs. Both the determination of cell surface hydrophobicity according to Akiyama-Jibiki and the modified Helm's Test according to D'Hautcourt and Smart were practical and reliable methods, which therefore can be recommended. As a result of our findings, the modified Helm's Test according to Mota und Soares was less suitable because of its partly inaccurate results.

Wackerbauer, K., et Beckmann, M.: Examen pour la détermination du comportement de floculation des levures de brasserie — Monatschrift für Brauwissenschaft 56, No 3/4, ?? – ??, 2003

BC 41 Levure de brasserie

La détermination du comportement de floculation des levures de brasserie représente un aspect important pour l'assurance qualité à l'intérieur d'une entreprise. Un changement dans le pouvoir floculent exerce une influence directe sur le déroulement de la fermentation, de la filtrabilité de la bière et sur la qualité de la bière. On a testé trois méthodes de laboratoire de détermination de la floculation des levures pour une application pratique. Pour la comparaison on a utilisé des fermentations parallèles dans des tubes EBC et tanks cylindro-coniques en acier inoxydable. Les méthodes appropriées étaient la détermination de l'hydrophobicité de la surface cellulaire d'après Akiyama-Jibiki et le test modifié de Helm suivant d'Hautcourt et Smart. En utilisant les deux méthodes, il était possible d'évaluer rapidement et façon sûre, le comportement de floculence. Le test modifié de Helm par Mota et Soares était moins approprié car il présentait des incertitudes plus importantes.

6 Literatur

1. Jansen, H.E., Mendlik, F.: A Study On Yeast Flocculation, J. Inst. Brew. 57, 59 – 60, 1951.
2. Schönfeld, F.: Die Beeinflussung der Eigenschaften obergäriger Brauereihefen, Wochschr. Brauerei 27, 541 – 542, 1910.
3. Lange, H.: Über die Einwirkung verschiedener Reizstoffe auf die zymasebildende Tätigkeit der Hefe, Wochschr. Brauerei 24, 457 – 465, 1907.
4. Schönfeld, F., Krumhaar, H.: Die Bruch- und Staubform der Hefe – ihre Ursachen, Wochschr. Brauerei 35, 342 – 343, 1918.
5. Hayduck, F., Schücking, K.: Über die Bedeutung der Kalksalze im Brauwasser auf Hefe und Gärung, Wochschr. Brauerei 25, 241 – 244, 1908.
6. Ranken, C.: The Surface of Yeast as a Factor in Fermentation, J. Inst. Brew. 33, 76 – 84, 1927.
7. Lüers, H., Heuss, R.: Zur Kenntnis der Bruchbildung der Hefen, Z. ges. Brauw. 44, 18 – 22, 1921.
8. Geys, K.: Über die Bruchbildung der Hefe und ihre Beeinflussung

durch die Reinzucht, Z. ges. Brauw. 45, 51 – 53, 1922.

9. Silbereisen, K.: Die elektrische Ladung der Hefe und ihre Bedeutung für die Agglutination (Bruchbildung), Wochschr. Brauerei 55, 153 – 160, 1938.
10. Stockhausen, F.: Elektrische Ladung der Hefe und Wasserstoffionenkonzentration, Einfluss auf Gärfähigkeit und Flockenbildungsvermögen, Wochschr. Brauerei 44, 121 – 124, 1927.
11. Burns, J.A.: Yeast Flocculation, J. Inst. Brew. 43, 31 – 43, 1937.
12. Hinrichs, J., Stahl, U., Esser, K.: Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* and mitochondrial DNA structure, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 48 – 54, 1988.
13. Speers, R.A., Tung, M.A., Durance, T.D., Stewart, G.G.: Biochemical Aspects of Yeast Flocculation and its Measurement: A Review, J. Inst. Brew. 98, 293 – 300, 1992.
14. Wackerbauer, K., Tayama, T., Fitzner, M., Kunerth, S.: Zeitgemäßes Management der Anstellhefe Teil 1, Brauwelt 137, 80 – 87, 1997.
15. Kunerth, S.: Beeinflussung der Hefevitalität durch Gärungsparameter und ihre Charakterisierung durch ausgewählte Metaboliten, Diss. TU Berlin 1999.
16. Wackerbauer, K., Tayama, T., Kunerth S.: Neuere Erkenntnisse des Einflusses der Hefelagerung auf die Gäraktivität und Vitalität von Hefen in nachfolgenden Gärungen, Monatschrift für Brauwissenschaft 50, 132 – 137, 1997
17. Calleja, G.B., Johnson, B.F.: A comparison of quantitative methods for measuring yeast flocculation, Can. J. Microbiol. 23, 68 – 74, 1976.
18. Hough, J.S.: Characterizing the principal components of pitching yeasts, J. Inst. Brew. 63, 483 – 487, 1957.
19. Taylor, N.W., Orton, W.L.: Calcium flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Inst. Brew. 81, 53 – 57, 1975.
20. Stahl, U., Kües, U., Esser, K.: Flocculation in yeast, an assay on the inhibition of cell aggregation, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 199 – 202, 1983.
21. Stratford, M.: Yeast Flocculation: The influence of agitation, Seventh International Symposium on Yeasts, S97-S102, John Wiley & Sons Ltd. 1989.
22. Smart, K.A.: Flocculation and adhesion, Monograph 28 EBC Symposium Yeast Physiology Nutfield, UK 1999, 16 – 29.
23. Straver, M.H., van der Aar, P.C., Smit, G., Kijne, J.W.: Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort, Yeast 9, 527 – 532, 1993.
24. van der Aar, P.C., Straver, M.H., Teunissen, A.W.R.H.: Flocculation of brewer's lager yeast, Proc. EBC Congr. Oslo, 259 – 266, 1993.
25. Amory, D.E., Rouxhet, P.G., Dufour, J.P.: Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical, composition, electrostatic charge and hydrophobicity, J. Inst. Brew. 94, 79 – 84, 1988.
26. Lawrence, D.R., Bowen, W.R., Sharpe, F.R., Ventham, T.J.: Yeast zeta potential and flocculation, Proc. EBC Congr. Zürich, 505 – 512, 1989.
27. Harris, J.O.: Possible mechanism of yeast flocculation, J. Inst. Brew. 65, 5 – 6, 1959.
28. Mill, P.J.: The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Gen. Microbiol. 35, 61 – 68, 1964.
29. Lyons, T.P., Hough, J.S.: Further evidence for cross-bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast, J. Inst. Brew. 77, 300 – 305, 1971.
30. Stewart, G.G., Goring, T.E.: Effect of some monovalent and divalent metal ions on the flocculation of brewer's yeast strains, J. Inst. Brew. 82, 341 – 342, 1976.

31. Taylor, N.W., Orton, W.L.: Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Inst. Brew.* **84**, 113 – 114, 1978.
32. Miki, B.L.A., Poon, N.H., James, A.P., Seligy, V.L.: Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO 1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **150**, 878 – 889, 1982.
33. Dengis, P.B., Rouxhet, P.G.: Flocculation mechanisms of top and bottom fermenting brewing yeast, *J. Inst. Brew.* **103**, 257 – 261, 1997.
34. Stratford, M., Assinder, S.: Yeast flocculation: Flo 1 and NewFlo phenotypes and receptor structure, *Yeast* **7**, 559 – 574, 1991.
35. Masy, C.L., Henquinet, A., Mestdagh, M.M.: Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars, *Can. J. Microbiol.* **38**, 1298 – 1306, 1992.
36. Akiyama-Jibiki, M., Ishibiki, T., Yamashita, H., Eto, M.: A rapid and simple assay to measure flocculation in brewer's yeast, *MBAA Techn. Quart.* **34**, 278 – 281, 1997.
37. Jin, Y.-L., Ritcey, L.L., Speers, R.A., Dolphin, P.J.: Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymoclectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *ASBC Proceedings* **59**, 1 – 9, 2001.
38. Soares, E.V., Mota, M.: Quantification of yeast flocculation, *J. Inst. Brew.* **103**, 93 – 98, 1997.
39. D'Hautcourt, O., Smart, K.A.: Measurement of brewing yeast flocculation, *ASBC Proceedings* **57**, 123 – 128, 1999.
40. Bendiak, D.S.: Quantification of the Helm's flocculation test, *ASBC Proceedings* **52**, 120 – 122, 1994.
41. Smart, K.A., Boulton, C.A., Hinchliffe, E., Molzahn, S.: Effect of physiological stress on the surface properties of brewing yeasts, *ASBC Proceedings* **53**, 33 – 38, 1995.
42. van der Aar, P.C.: Consequences of yeast population dynamics with regard to flocculence, *Ferment* **9**, 39 – 43, 1996.
43. Wackerbauer, K., Beckmann, M.: Die Konservierung von Brauereihefen Teil 2 – Der Einfluss der Konservierung auf Hefevitalität und Bierqualität, *Brauwelt* **142**, 1099 – 1110, 2002.

(Manuskripteingang; 17. 1. 2003)

IMPRESSUM

Monatsschrift für Brauwissenschaft

ISSN 0723-1520

Herausgeber und Verlag:

Fachverlag Hans Carl GmbH, Andernacher Str. 33a, D-90411 Nürnberg, Telefon (09 11) 9 52 85-0, Telefax (09 11) 9 52 85-48, e-mail: brauwissenschaft@hanscarl.com

Internet: <http://www.hanscarl.com>

Redaktion: Dipl.-Ing. Dr. Thomas Bühler (Objektleiter, verantwortl. für redaktionellen Inhalt, 0911 / 9 52 85-37). Wissenschaftliche Beratung: Dr.-Ing. Karl-Ullrich Heyse (09 11) 9 52 85-22.

Geschäftsführung: Michael Schmitt, Wolfgang Illguth.

Erscheinungsweise: 6 x jährlich.

Jahresbezugspreis: Inland EUR 96,- + EUR 9,30 Vertriebsgebühr + MwSt. Studentenpreis Inland (halbjährlich) EUR 37,- + EUR 5,- Vertriebsgebühr + MwSt. Ausland: Binnenmarktländer-Empfänger mit Umsatzsteuer-Identifikationsnummer und Drittländer: EUR 104,- + EUR 13,40 Vertriebsgebühr. Binnenmarktländer-Empfänger ohne Umsatzsteuer-Identifikationsnummer: EUR 104,- + EUR 13,40 Vertriebsgebühr + MwSt. Preis der Einzelnummer EUR 21,- + Porto. Kündigungsfrist: 6 Wochen zum Jahresende.

Druck: Bollmann Druck GmbH, Zirndorf b. Nürnberg.

Die Zeitschrift und alle in ihr enthaltenen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt.