

K. Wackerbauer, A. Ludwig und J. Möhle

Verbesserung der Langzeitstabilität in Hauptgärungen mit immobilisierter Hefe

II. Versuche im MPI-Reaktor und Bewertung der Hefevitalität im immobilisierten System

Aufbauend auf den im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit definierter Belüftung und Variation des Trägermaterials im Festbettreaktor wurde hier im Hauptversuch ein Schleifenreaktor mit Siliciumcarbid-Modulen als Immobilisierungsmatrix, ein sogenannter MPI-Reaktor, für die Immo-Hauptgärung eingesetzt. Zunächst wurden wieder die aus früheren Versuchen bekannten Effekte pH-Anstieg, verringerte Synthese höherer Alkohole und verringerte FAN-Konsumption gefunden. Diese Entwicklungen waren im MPI-Reaktor gegenüber dem Festbettreaktor etwas verlangsamt. Nach 25 Versuchstagen wurde die Belüftungsrate angehoben, um den geschilderten Veränderungen der Bierqualität entgegenzuwirken. Insgesamt gelang es daraufhin über die Reaktorlaufzeit von 92 Tagen Biere recht konstanter Qualität herzustellen, was sowohl durch chemisch-technische Analysen als auch Verkostungsergebnisse belegt werden konnte. Eine zweiwöchige Stillstandsphase des Reaktors führte erwartungsgemäß zu einer deutlich veränderten Qualität des während dieser Zeit im Reaktor verbliebenen Bieres. Nach dem Wiederanfahren des Reaktors konnte aber innerhalb weniger Tage wieder Bier der ursprünglichen Qualität hergestellt werden. Durch Vorversuche, bei denen die Hefe künstlich einer Mangelsituation ausgesetzt wurde, sollten Aussagekraft und Durchführung von Methoden zur Bewertung der Hefevitalität untersucht werden. Der Gehalt an säurelöslichem Glykogen erwies sich hierbei als aussagekräftiges Kriterium. Der intrazelluläre pH-Wert erschien ebenfalls interessant, konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aber noch nicht abschließend bewertet werden. Der Acidification-Power-Wert gibt zwar korrekte Tendenzen an, leidet aber an seiner recht schwachen Reproduzierbarkeit. Durch keine der erwähnten Methoden, die auch im Hauptversuch Anwendung fanden, konnte eine nachhaltige und kontinuierliche Abschwächung der Hefevitalität während des Langzeitversuches im MPI-Reaktor nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung der Hefeviabilität der am Reaktorauslauf beprobten Zellen stützt dieses Ergebnis.

BC 23 Gärung

(Descriptor: Langzeitstabilität, Geschmacksstoffe, Aromakomponenten, immobilisierte Hauptgärung, Reaktortypen).

Descriptors: Long term stability, flavor substances, aroma compounds, immobilized main fermentation, reactor types).

1 Einleitung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden bereits die speziellen Vorteile von Hauptgärungen mit immobilisierter Hefe dargestellt. Es wurden jedoch auch Gründe herausgearbeitet, weshalb sich die kontinuierliche Hauptgärung mit immobilisierter Hefe bislang nicht in der industriellen Praxis durchsetzen konnte. Ein entscheidendes Kriterium hierfür ist, dass die Langzeitstabilität derartiger Systeme nicht in ausreichender Weise gewährleistet ist. Dies bedeutet, dass die Qualität der Biere über die Laufzeit des Reaktorbetriebes nicht konstant ist, sondern insbesondere durch eine Veränderung der Mengen an den verschiedenen Gärnebenpro-

dukten gekennzeichnet ist. Die hierfür verantwortliche Veränderung des physiologischen Zustandes der Hefe kann vor allem durch eine sich verringerende Vermehrung aber auch durch eine Begrenzung des Nährstofftransportes aus dem Medium zur Zelle bedingt sein. Um Strategien zu entwickeln, die der genannten Entwicklung begegnen, wurden in der genannten Arbeit der Einfluss einer definierten Sauerstoffversorgung sowie verschiedener Trägermaterialien auf die Qualität der in Festbettreaktoren hergestellten Biere untersucht. Es konnte im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere eine definierte Versorgung der Zellen mit Sauerstoff eine erhebliche Stabilisierung der Situation bewirkt. Die Tatsache, dass eine definierte Sauerstoffversorgung gegeben war oder nicht, beeinflusste die Langzeitstabilität im Reaktor erheblich mehr als die Variation des Trägermaterials im Festbettreaktor (1).

1.1 Bedeutung des Reaktortyps

Als wichtige Grundformen von Reaktortypen, die für die Immobilisierung von Mikroorganismen einsetzbar sind, lassen sich Festbettreaktoren, Festbett-Schleifenreaktoren, Wirbelschichtreaktoren und Gasliftreaktoren unterscheiden (2). Daneben existieren jedoch auch Sonder- oder Mischtypen wie etwa der von der Firma Meura-Delta entwickelte MPI-Reaktor (3). In der Literatur wird dem Einfluss des eingesetzten Reaktortyps auf den Stoff-

transfer aus dem Medium zur immobilisierten Zelle besondere Bedeutung beigemessen. Dieser häufig auch als „externer Massentransfer“ bezeichnete Stofftransport besitzt Relevanz hinsichtlich der Versorgung der Hefezellen mit von ihr benötigten Komponenten, etwa Aminosäuren, und ist somit für die Langzeitstabilität von Bedeutung (4, 5). Übereinstimmend ist bei verschiedenen Autoren von einer verbesserten Aufnahme von Aminosäuren in Reaktortypen die Rede, welche mit einer forcierten Anströmung des Trägermaterials arbeiten, beispielsweise Wirbelschichtreaktoren. *Ryder* und *Masschelein* führten einen Vergleich zwischen Fest- und Wirbelschichtreaktor durch. Im Festbettreaktor wurden Limitationen der Gärkraft, der Aufnahme von Aminosäuren und der Bildung höherer Alkohole und Ester festgestellt (6). In einer weiteren Arbeit von *Masschelein* et al. ist ebenfalls von dieser Entwicklung in Festbettreaktoren die Rede. Festbettreaktoren werden sogar als gänzlich ungeeignet für die Herstellung akzeptabler Biere bezeichnet. Ferner wird in dieser Arbeit die ausreichende Sauerstoffversorgung der in Calcium-Alginat-Gel inkorporierten Hefe als kritisches Kriterium für die Fermentation angeführt, da diese ebenfalls einem limitierten Massentransfer unterworfen ist (7). *Cop* et al. führten Versuche mit in Gelkugeln immobilisierter Hefe durch. Es wurden verschiedene Anströmgeschwindigkeiten im verwendeten Festbettreaktor eingestellt. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Aufnahme von freien α -Aminosäuren (FAN) aus der Würze und der Vergrößerung der Strömungsgeschwindigkeit wurde festgestellt (8).

Als wesentliche Vorteile des Festbettreaktors werden insbesondere sein einfacher Aufbau und der relativ geringe Energiebedarf genannt. Dem stehen die bereits erwähnte verringerte Durchmischung des Reaktors, Ansammlung von Gasaschen sowie weitere Nachteile gegenüber. Nachteile des Wirbelschichtreaktors sind ein höherer Energieeinsatz, mitunter Scherkräfteintrag und Neigung zum Schäumen sowie ein komplizierteres „scale-up“ als beim Festbettreaktor. Die Vorteile des Systems liegen vor allem in einer guten Durchmischung des Reaktorinhalts und damit guter Wärme- und Stoffaustauschwerte (2, 4, 5, 9).

Der bereits eingangs erwähnte MPI-Reaktor, welcher nach 1990 in Belgien entwickelt wurde, sollte die Vorteile von Wirbelschichtreaktoren, insbesondere die gute Durchmischung mit dem simplen Aufbau von Festbettreaktoren verbinden, jedoch nicht ihre jeweiligen Nachteile Scherkräftbelastung bzw. Verblockung (9). Im Reaktorgehäuse sind Module aus porösem Siliciumcarbid eingebaut, in denen sich – vergleichbar mit Keramikmodulen für die Crossflowfiltration – in Längsrichtung Kanäle befinden. Die Hefe wird in den Poren innerhalb der Module immobilisiert, ein granuläres oder partikuläres Trägermaterial existiert bei diesem System nicht. Das Substrat wird mittels einer Pumpe umgewälzt und strömt damit sowohl auf der Außenseite der Module als auch durch die inneren Kanäle an den immobilisierten Zellen entlang (3, 10). Die grundsätzliche Eignung des Systems für die Hauptgärung wurde bereits in früheren Arbeiten festgestellt (11).

Die industrielle Weiterentwicklung des MPI-Reaktors wurde aus kommerziellen Gründen vor einigen Jahren eingestellt. Dennoch ist das System unseres Erachtens nach wie vor als Modell interessant, da in ihm eine Reihe von Forderungen erfüllt sind, die nichts an Aktualität eingebüßt haben. Es wurde daher ein Langzeitversuch mit diesem Reaktortyp etabliert. Mit den Erfahrungen der in Teil 1 dieser Arbeit dargestellten Versuche im Festbettreaktor sollte wiederum mit einer definierten Begasung des Reaktors gearbeitet werden. Der mögliche Einfluss des durch die Zwangsströmung im MPI-Reaktor bedingten verbesserten Stofftransfers auf die Langzeitstabilität des Reaktors hinsichtlich der Qualität des produzierten Bieres sollte Hauptgegenstand dieser Untersuchung sein.

1.2 Bewertung der Hefephysiologie

Die Verknüpfung des physiologischen Zustandes der eingesetzten Hefe mit der Qualität des produzierten Bieres ist unbestritten. Dies gilt sowohl für die konventionelle Gärung als auch für kontinuierliche Verfahren. Somit kommt der direkten Bewertung der Hefephysiologie eine besondere Bedeutung zu. Unterschieden werden muss in diesem Zusammenhang die „Viabilität“ (= viability) von der Vitalität der Zellen. „Viabilität“ ist nur ungenügend mit „Lebensfähigkeit“ zu übersetzen, da es sich um nichts anderes als den Anteil aktiver Zellen einer Population handelt. Die Vitalität stellt hingegen den physiologischen Zustand der lebenden Zellen einer Population dar. Zur Bestimmung des Lebend-/ Totzellenanteils dienen zumeist Färbemethoden in Verbindung mit einer Zählung. Beispiele sind Anfärbungen mit gepufferter Methylenblau-Lösung, Mg-ANS oder Fluoresceindiacetat (12). Schwieriger gestaltet sich die Anwendung von Methoden für die Vitalitätsbestimmung. Es stehen hier verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine einfach durchzuführende Methode ist der von *Opekarova* et al. beschriebene Acidification-Power-Test (AP-Test). Betrachtet wird mittels pH-Wert-Messung das Säurebildungsvermögen der Zellen nach Inokulation in destilliertem Wasser ohne und nach einem Zusatz von Glukose. Je stärker das als AP-Wert berechnete Säurebildungsvermögen ausgeprägt ist, umso vitaler sollen die untersuchten Zellen sein (13). Mit mehr apparativem Aufwand ist die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) nach *Imai* et al. verbunden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer spektralphotometrisch gemessenen Fluoreszenz und dem pH-Wert. Auf diese Weise kann durch entsprechende Vorbereitung der Zellen der intrazelluläre pH-Wert bestimmt werden, welcher in direktem Zusammenhang zum transmembranen Protonengradienten steht. Dieser ist Triebkraft für den Nährstofftransport in die Zelle (Protonenpumpe). Der ICP beeinflusst offenbar auch die Regulation wichtiger Enzyme der Glykolyse und Gluconeogenese. Je weniger ausgeprägt die Extrusion von Protonen aus der Zelle ist, umso geringer ist der ICP-Wert und umso weniger vital wird die untersuchte Hefe beurteilt (14). Auch der Gehalt an intrazellulären Kohlenhydraten kann bedingt als Maß für die Bewertung der Hefevitalität dienen. Hier spielt insbesondere das Reservekohlenhydrat Glykogen eine Rolle. In Chargengärungen zeigt es typische Verläufe: Ein Absinken der Gehalte zu Beginn der Hauptgärung und der damit verbundenen Sterolsynthese sowie eine Zunahme der Glykogenkonzentration gegen Ende der exponentiellen bzw. in der stationären Phase und ein Rückgang während der Hefelagerung (15, 16). Trehalose ist ein Reservekohlenhydrat der Hefe, wird aber häufig auch als Stress-Schutzstoff beschrieben, der bei besonderen Umweltbedingungen – wie etwa Einwirkung von Hitze – vermehrt angereichert wird (16, 17).

Die beschriebenen Methoden fanden vor allem in Arbeiten Anwendung, die der Beurteilung der Hefevitalität in Chargengärungen bzw. der Hefelagerung und Hefebehandlung dienen, so beispielsweise in den Arbeiten von *Quain* et al. (15), *Kara* et al. (18), *Slaughter* et al. (19), *Kunerth* (20), *Back* et al. (21), *van Zandycke* et al. (22) oder *Beckmann* (23).

Neuere Arbeiten, in denen anhand der oben beschriebenen Parameter gezielt und systematisch der physiologische Zustand der Hefe im immobilisierten System betrachtet wird, sind nicht häufig zu finden. Auch fällt ein Vergleich derartiger Arbeiten schwer, da die gewählten Versuchsbedingungen stark voneinander abweichen. Einzelne Autoren widmen sich diesem Thema jedoch. *Smart* schreibt immobilisierten Zellen erhöhte Gehalte an Glykogen, struktureller Polysaccharide und DNA zu (24). *Fitzner* fand in aus einem Festbettreaktor mit DEAE-Cellulose ausgespülten

Zellen eines Brauerei-Hefestammes zunächst einen langsamen Rückgang des Gehaltes an Glykogen. Nach etwa 30 Tagen Reaktorbetrieb stellte sich dann eine relativ stabile Glykogenkonzentration auf ausreichend hohem Niveau ein. Ein weiterer Versuch im Festbettreaktor wurde vom selben Autor mit dem Trägermaterial Bioceramics und einem Laborhefestamm durchgeführt. Die Glykogenkonzentration bewegte sich auf einem – im Vergleich zur Brauereihefe – sehr niedrigen Niveau und sank über die Versuchsdauer weiter. Gegen Ende des Versuches nach nur 47 Tagen zeigte die Hefe starke Autolyseerscheinungen. Es war hier offenbar ein Zusammenhang zwischen abnehmender Vitalität und sinkender Glykogenkonzentration gegeben. Jedoch existiert ebenfalls eine starke Abhängigkeit des Glykogengehaltes vom eingesetzten Hefestamm (2).

Ziel unserer Untersuchungen war zunächst, zur Verfügung stehende Methoden für die Bewertung der Hefevitalität hinsichtlich ihrer Durchführung und Aussagekraft zu vergleichen. Des Weiteren sollten die Methoden für die Bewertung der Hefe aus einem Immoreaktor im Langzeitbetrieb genutzt werden, um so den Kenntnisstand über die Entwicklung der Hefevitalität im immobilisierten System zu erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Hungerkultur (Vorversuche zur Beurteilung der Hefevitalität)

Eine Vorzucht des Stammes „Hebru“ aus der Stammsammlung des FBM der VLB wurde in 11,5%iger Würze bei 20 °C hergeführt. Die Hefe wurde durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen und in ein Gefäß mit sterilem, destilliertem Wasser überführt. Die Hefesuspension stand bei 20 °C und wurde permanent und langsam gerührt, um die Hefe gerade in Schwebelage zu halten. In regelmäßigen Abständen wurde diese Hungerkultur beprobt und verschiedene Parameter der Hefevitalität wurden untersucht und verglichen. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Versuche von Opekarova und Sigler (13).

2.2 Reaktorsystem

Das für den Hauptversuch verwendete MPI-Reaktorsystem ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Würze und das produzierte Jungbier wurden in einem gekühlten Raum bei 1 °C aufbewahrt. Der MPI-Reaktor selbst befand sich in einem bei

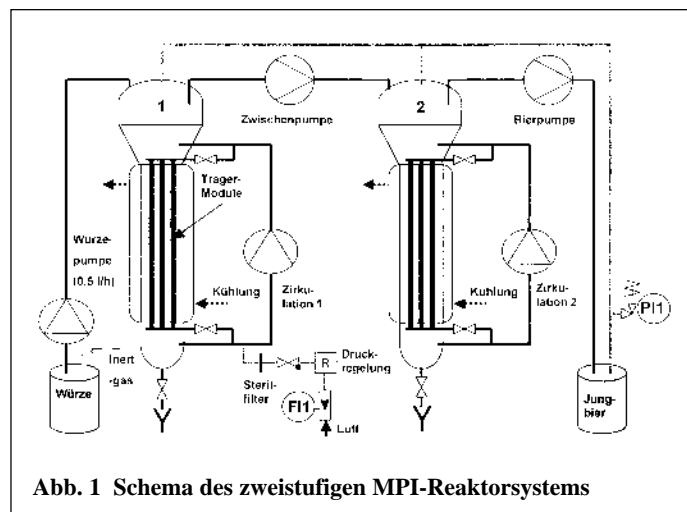


Abb. 1 Schema des zweistufigen MPI-Reaktorsystems

15 °C temperierten Raum. Dies geschah, um die Temperatur im Kopfraum der Reaktorsäulen konstant zu halten, die über keine Mantelkühlung verfügten.

Der zentrale Bereich der Säulen, in dem sich auch die Siliciumcarbid-Module befinden, ist mit einer Mantelkühlung ausgestattet. Die Gärtemperatur betrug 15 °C. Der Durchsatz an Würze wurde auf 0,5 kg/h eingestellt. Mittels eines Nadelventils konnte der Gasstrom exakt eingestellt und an einem Durchflussmesser abgelesen werden. Ferner war ein Druckregler installiert, der den Durchsatz unabhängig vom Hinterdruck konstant hielt. Die Belüftung wurde zunächst auf 5 ml/min eingestellt, nach 25 Versuchstagen dann aber auf 20 ml/min angehoben.

2.3 Analysen und Verkostungen

Nasschemische und gaschromatographische Analysen erfolgten gemäß den Analysenvorschriften der MEBAK. Verkostungen wurden auf der Grundlage des Verkostungsschemas der VLB vorgenommen.

Der Acidification-Power-Test (AP-Test) wurde in Anlehnung an die Methode von Kara et al. (18) durchgeführt. Für die Bestimmung der intrazellulären Kohlenhydrate Glykogen und Trehalose wurde die von Kunerth modifizierte Methode von Quain verwendet (20, 25). Die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) entsprach der von Imai et al. beschriebenen Methode (14). Die Differenzierung der Lebend-/Totzellzahl (Viabilität) erfolgte mittels einer gepufferten Methylenblaulösung (20), die Auszählung wurde mikroskopisch in der Thomakammer durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bewertung der Bierqualität

Der FAN-Gehalt im Bier (im Vergleich zur Würze) und der Bier-pH hatten sich in früheren Versuchen als brauchbare indirekte Indikatoren für Veränderungen des physiologischen Zustandes der Hefe im immobilisierten System herausgestellt. Der Vorteil des pH-Wertes liegt dabei in seiner schnellen Verfügbarkeit. Die Ergebnisse für Würze und Jungbier hinsichtlich dieser Parameter sind in der Abbildung 2 dargestellt. Nach Beginn des Versuches kam es zu einem nahezu konstanten Anstieg sowohl des FAN-Gehaltes als auch des pH-Wertes im Jungbier. Da mit der Belüftung eine Einflussmöglichkeit zur Verfügung stand, wurde die Belüftungsrate nach der am 25. Versuchstag gewonnenen Probe von 5 auf 20 ml/min angehoben. Der Effekt der veränderten Belüftung ist gut zu erkennen. Sowohl pH-Wert als auch FAN-Gehalt sanken in der Folge deutlich ab. Dennoch ist ein erneuter Anstieg bis zum Abfahren des Reaktors am 50. Tag erkennbar. Während der nachfolgenden zweiwöchigen Stillstandsphase wurde im Reaktor eine Temperatur von 1 °C eingestellt und die Hefe stand unter Bier im Reaktor. Außerordentlich hoch waren die FAN-Gehalte, aber auch der pH-Wert unmittelbar nach dem Wiederanfahren des Reaktors. Das hier beprobte Bier stand für 14 Tage über der Hefe. Die Abgabe von Aminosäuren bzw. Autolyse sind hierfür wahrscheinlich die Ursache. Insgesamt war die Hefevitalität offenbar jedoch nicht so beeinträchtigt, dass es nicht gelang innerhalb weniger Tage wieder Normalwerte zu erreichen.

Die Gesamtgehalte der wichtigsten Gärnebenprodukte sind in der Abbildung 3 dargestellt. Zu Beginn des Reaktorbetriebes ergab sich ein recht hoher Gehalt an höheren aliphatischen Alkoholen, was in der Anfahrphase jedoch nicht ungewöhnlich ist. Nach etwa zehn Tagen sank die HAA-Konzentration wieder. Die erhöhte

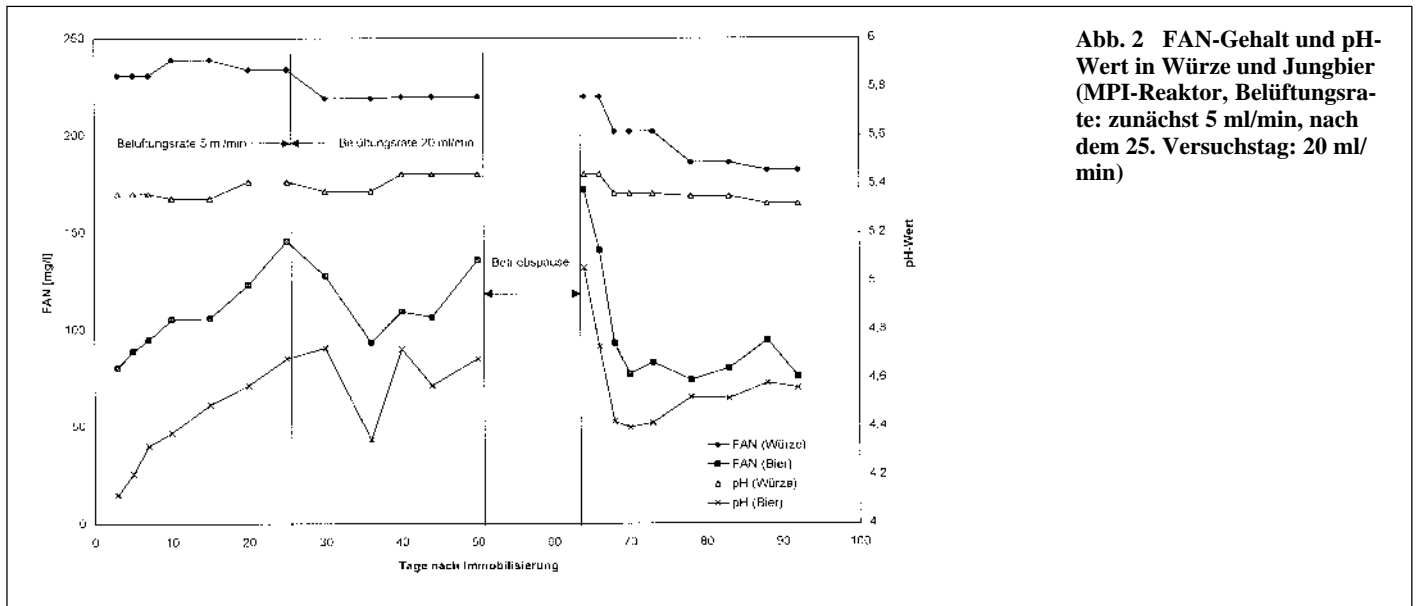


Abb. 2 FAN-Gehalt und pH-Wert in Würze und Jungbier (MPI-Reaktor, Belüftungsrate: zunächst 5 ml/min, nach dem 25. Versuchstag: 20 ml/min)

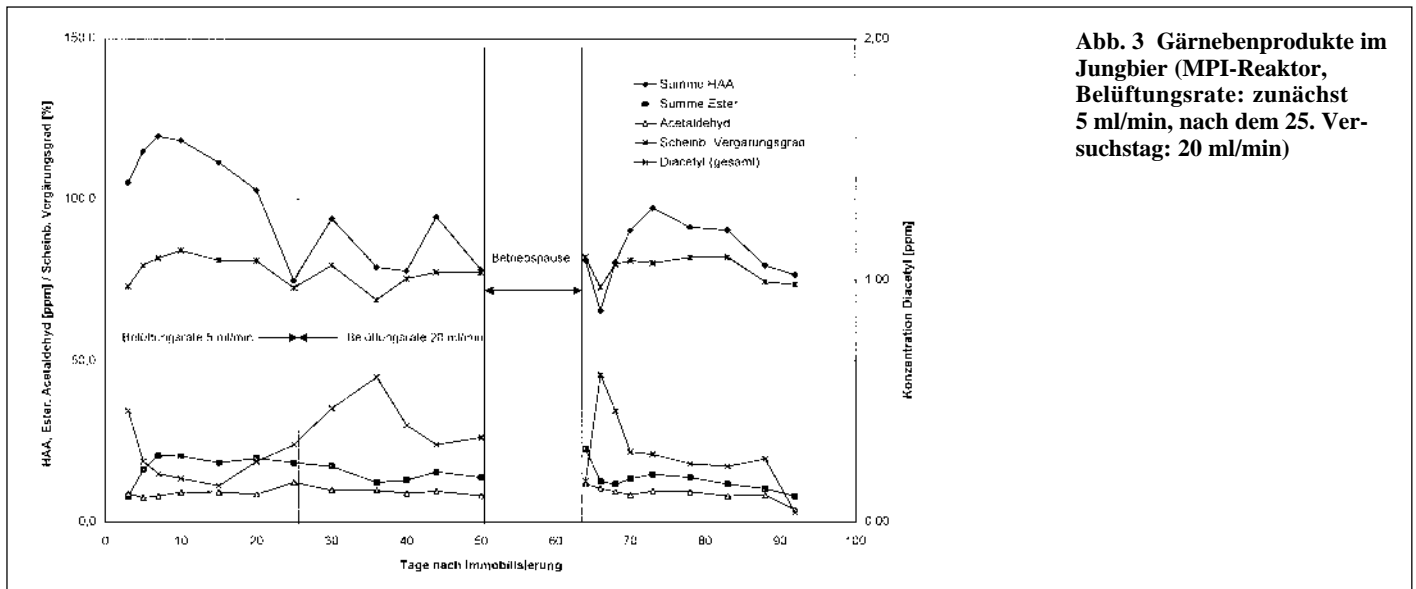


Abb. 3 Gärnebenprodukte im Jungbier (MPI-Reaktor, Belüftungsrate: zunächst 5 ml/min, nach dem 25. Versuchstag: 20 ml/min)

Belüftungsrate ab dem 30. Versuchstag führte auch zu einer Erhöhung der HAA-Gehalte. Im Laufe des weiteren Reaktorbetriebes schwankten die Werte im Bereich von 80 bis 90 ppm. Eine zweite Anfahrphase stellte die Wiederaufnahme des Betriebes nach der Betriebspause dar. Auch hier war zunächst ein deutlicher Anstieg der HAA-Gehalte zu verzeichnen.

Die Gehalte an Estern bewegten sich auf niedrigem Niveau und nahmen über die Dauer des Versuches tendenziell weiter ab. Eine Ausnahme stellte lediglich wieder der Probenahmetag nach dem Wiederanfahren des Reaktors dar.

Der Gehalt an Gesamt-Diacetyl im gesammelten Jungbier verblieb bei den gewählten Versuchseinstellungen über dem Geschmacksschwellenwert, aber deutlich unter den Werten, die früher in einstufigen Reaktorkonfigurationen gefunden wurden. Für Verkostungsbiere wurde eine Warmphase angeschlossen, in der es stets gelang, den Diacetylgehalt unter 0,1 ppm zu bringen. Der Gehalt an Acetaldehyd befand sich im produzierten Jungbier bereits auf niedrigem Niveau.

Wichtig ist auch der Vergleich der verschiedenen bislang von uns

eingesetzten Versuchskonfigurationen. In Abbildung 4 sind die Gehalte höherer aliphatischer Alkohole und der FAN-Konsumption (DELTA FAN, Differenz des FAN der Würze und des Bieres) während der ersten 25 Versuchstage wiedergegeben.

Besonders auffällig sind die Unterschiede zwischen den belüfteten Versuchen (Festbett und MPI) und dem unbelüfteten Versuch (Festbett) hinsichtlich FAN-Aufnahme und der Bildung höherer aliphatischer Alkohole. Eine deutliche und zügige Verringerung beider Parameter war beim unbelüfteten Ansatz feststellbar. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden belüfteten Versuche (Festbett und MPI) innerhalb der ersten 25 Versuchstage, also bis zur Veränderung der Belüftungsrate im MPI-Reaktor, so ergibt sich für beide Fälle eine konstante bzw. leicht abnehmende Tendenz. Allerdings lagen die gefundenen Werte im Falle des MPI-Reaktors zumeist geringfügig über den entsprechenden Werten des Festbettreaktors. Im Falle des MPI-Reaktors führte die Erhöhung der Belüftungsrate im Reaktor von 5 auf 20 ml/min ab dem 25. Versuchstag zu einer Verstärkung der FAN-Aufnahme im weiteren Verlauf des Versuches (wie bereits aus Abb. 2 zu entnehmen war).

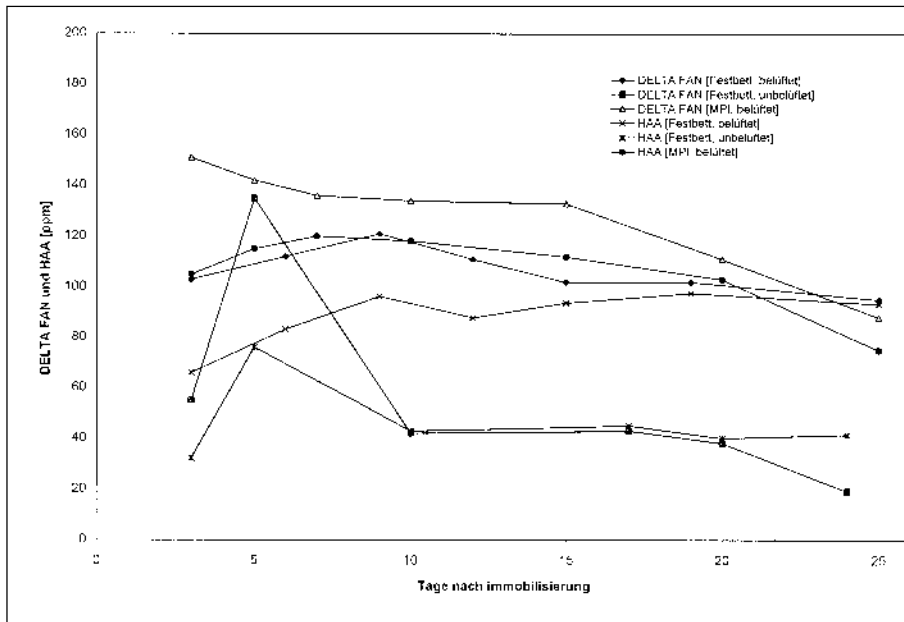


Abb. 4 Vergleich verschiedener Versuchskonfigurationen hinsichtlich FAN-Konsumption und den höheren aliphatischen Alkoholen in den ersten 25 Tagen des Versuches

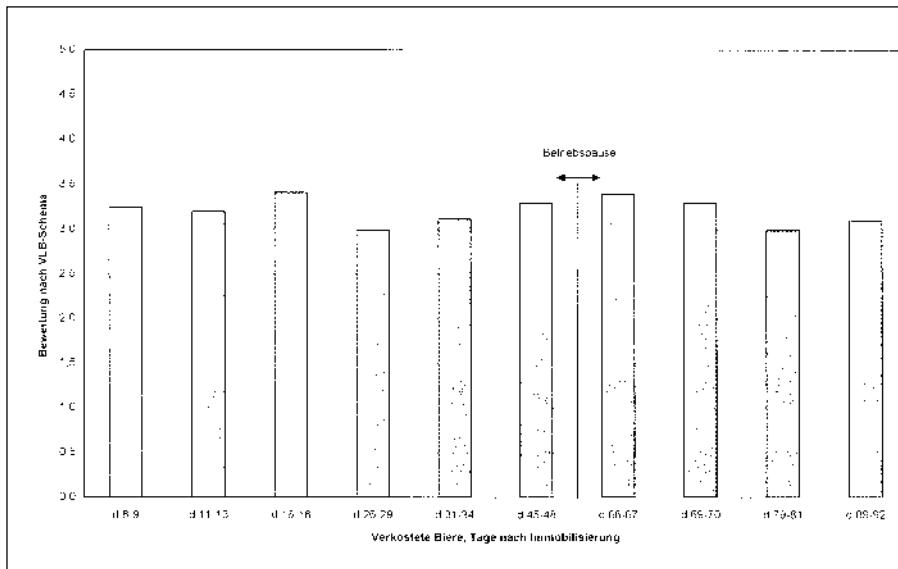


Abb. 5 Verkostungsergebnisse verschiedener Probiere aus dem Versuchslauf

Die Bildung höherer Alkohole wurde durch die Erhöhung der Belüftungsrate zunächst ebenfalls forciert, nahm dann aber, wie bereits besprochen, einen recht konstanten Verlauf über die weitere Versuchszeit.

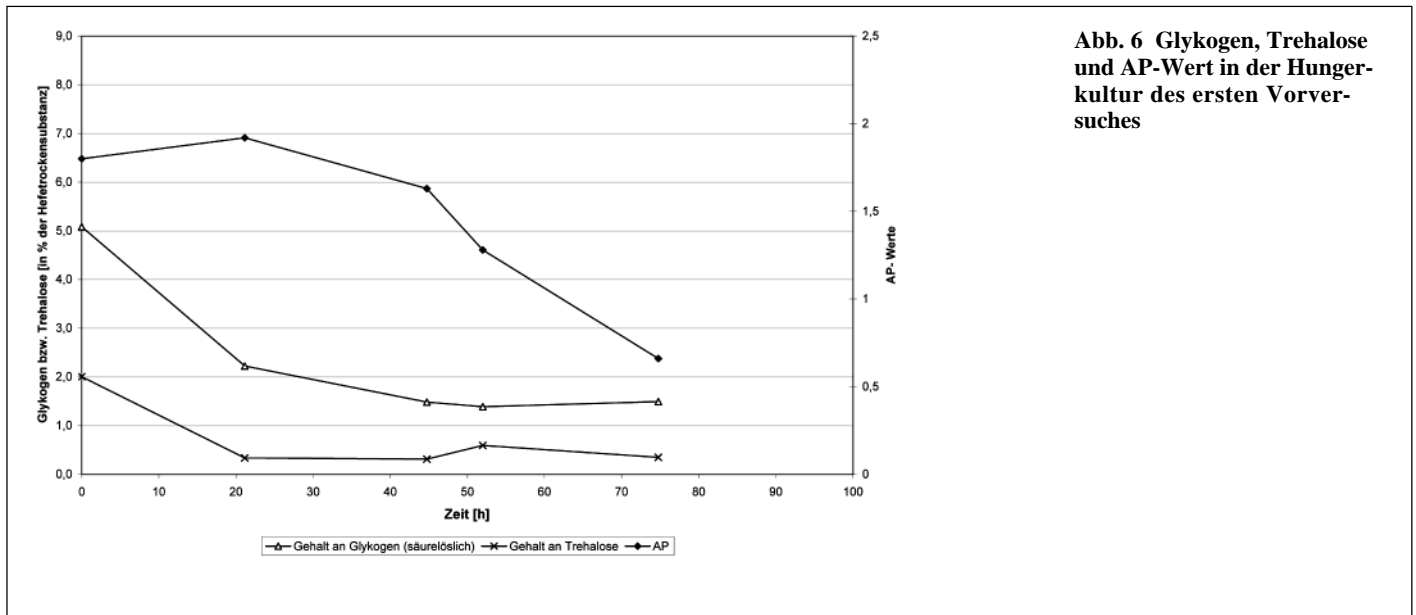
In der Abbildung 5 sind die Ergebnisse der durchgeführten Verkostungen beispielhaft für das Kriterium „Allgemeine Qualität“ des VLB-Verkostungsschemas dargestellt. Dieses Kriterium gibt die Bewertung des allgemeinen Eindrucks des bewerteten Bieres wieder. Die bewerteten Qualitätskriterien „Reinheit des Geruchs“, „Reinheit des Geschmacks“ und „Qualität der Bittere“ fließen in die „Allgemeine Qualität“ ein. Mögliche Fehler, die durch die drei genannten Einzelkriterien nicht ausreichend beschrieben werden, können in der „Allgemeinen Qualität“ zu einer weiteren Abwertung führen. Bei den im MPI-Reaktor hergestellten Bieren, die sensorisch geprüft wurden, handelte es sich um Proben, die in der Zeit zwischen den einzelnen chemisch-technischen Probenahmetagen gesammelt wurden. Alle Bewertungen liegen zwischen den Noten 3,0 und 3,4, was für im Pilotmaßstab hergestellte Biere völlig akzeptabel ist. Eine Abhängigkeit des Verkostungsergebnisses von der Reaktorlaufzeit, etwa eine kon-

tinuierliche Verschlechterung der Bierqualität, konnte nicht nachgewiesen werden.

Abschließend sei erwähnt, dass mit dem MPI-Reaktor ein verlässlicher Dauerbetrieb gut möglich war. Verblockungsprobleme gab es praktisch nicht. Lediglich einmal hat sich ein kompakter Hefeklumpen im Reaktor festgesetzt, was die Umwälzung behinderte. Der Reaktor konnte jedoch mittels intensivierten Umwälzens zügig freigespült werden und lief danach wieder problemlos. Eine technische Schwierigkeit bestand in der begrenzten Lebensdauer der für die Umwälzung eingesetzten Peristaltik-Schläuche. Vereinzelt rissen diese, so dass die Reaktorsäule auslief. Die aufgetretenen Schwierigkeiten konnten aber stets schnell behoben werden und wären durch den Einsatz anderer Pumpen auch recht einfach lösbar.

3.1 Bewertung der Hefephysiologie

In mehreren Vorversuchen wurde die Aussagekraft einzelner Methoden, die für die Bewertung der Hefevitalität vorgeschlagen wurden, untersucht. Die Hefe wurde hierbei gezielt einer Hunger-

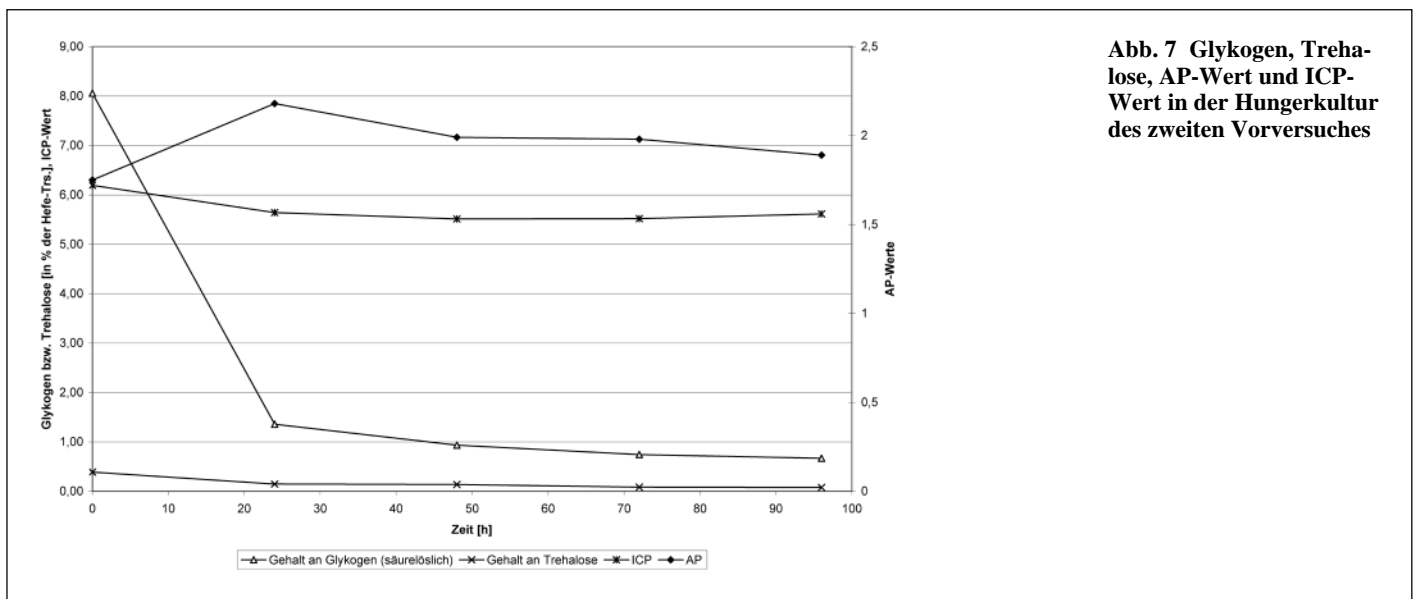


situation unterworfen, indem sie in destilliertem Wasser inokuliert und durch Rühren in Schwebelage gehalten wurde. In regelmäßigen Abständen wurde die Hefe beprobt und analysiert. Die Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse für die Kohlenhydrate Glykogen und Trehalose sowie den Acidification Power-Test.

Eindeutig und erwartungsgemäß war die Entwicklung für säurelösliches Glykogen und Trehalose. Beide Kohlenhydrate erfuhren in der Mangelsituation eine deutliche Abnahme. Die Werte des alkalilöslichen Glykogens sind nicht dargestellt, da sein Anteil vernachlässigbar klein war. Überraschend war der höhere AP-Wert nach 24 Stunden der Hungerkultur gegenüber dem Anfangswert. Zu erwarten gewesen wäre hier eine Verringerung der Säuerungskraft wie sie aber erst bei den später genommenen Proben auch klar erkennbar war.

In einer Versuchswiederholung unter den gleichen Bedingungen, deren Ergebnisse in der Abbildung 7 dargestellt sind, wurde für den Gehalt an säurelöslichem Glykogen eine vergleichbare Entwicklung wie im ersten Versuch gefunden.

Der Gehalt an Trehalose hatte in diesem Versuch bereits zu Beginn ein geringes Niveau und verblieb auch auf diesem. Bei der Säuerungskraft wurde ebenfalls ein Unterschied zum ersten Vorversuch festgestellt. Zwar war innerhalb der ersten 24 Stunden wieder ein geringfügiger Anstieg zu verzeichnen. Im weiteren Versuchsverlauf war die Abnahme des AP-Wertes dann aber überraschend gering ausgeprägt. Insgesamt ist zu konstatieren, dass der AP-Test deutliche Schwächen in der Reproduzierbarkeit aufwies. So zeigten Hefeprouben, die für nur 15 Minuten nach der Probenahme aufbewahrt wurden zum Teil deutlich andere AP-Werte als Hefe aus unmittelbar verarbeiteten Proben. Der intrazelluläre pH-Wert zeigt dem gegenüber eine Entwicklung, die tendenziell der des Glykogengehaltes zu folgen scheint. In den ersten 24 Stunden nahm der ICP-Wert ab, nämlich um den Wert 0,56, was eine ganz erhebliche Verringerung darstellte. Das heißt, die Extrusion von Protonen war verringert und die Vitalität der Hefe somit verschlechtert. Danach lag der ICP-Wert bis zum Ende des Versuches in etwa auf dem gleichen Niveau, was auch auf den Glykogengehalt zutraf.



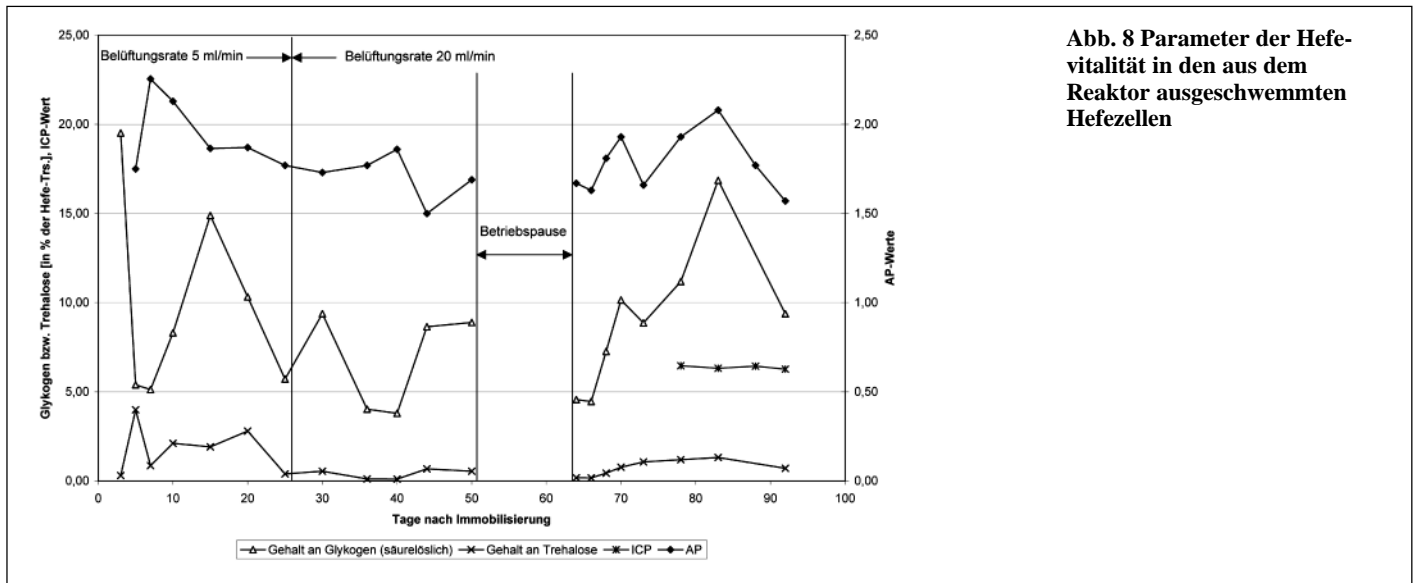


Abb. 8 Parameter der Hefevitalität in den aus dem Reaktor ausgeschwemmten Hefezellen

Mit Hilfe der dargestellten Methoden sollte nun versucht werden, Rückschlüsse auf die Vitalität der Hefezellen im Reaktor zu erhalten. Problematisch war dabei, dass es keine praktikable Methode gab, Proben der immobilisierten Zellen direkt und steril aus dem Reaktor zu entnehmen. Statt dessen wurde die aus dem Reaktor ausgeschwemmte Hefe, die sich im Probegefäß mit dem Jungbier befand, beprobt. Die Hefe wurde durch Zentrifugation vom Bier abgetrennt und dann untersucht. Es wurde darauf geachtet, dass stets am Vorabend der Probenahme ein neues Probegefäß angeschlossen wurde und am folgenden Morgen sofort die Probe hieraus genommen wurde. Das Probegefäß stand in einem gekühlten Raum bei 1 °C um Veränderungen während des nächtlichen Sammelns der Probe zu minimieren.

Die Abbildung 8 zeigt die Gehalte an säurelöslichem Glykogen, Trehalose und den AP-Wert. Die Analytik für den intrazellulären pH-Wert wurde parallel zum Versuch eingeführt und geprüft und stand erst gegen Ende des Langzeitversuches zur Verfügung.

Der Gehalt an säurelöslichem Glykogen war von recht starken Schwankungen gekennzeichnet. Die gefundenen Konzentrationen lagen aber stets deutlich über denen der „hungernden“ Zellen aus den Vorversuchen. In den ersten 25 Tagen nach Versuchsbeginn schienen die Spitzenwerte auf einem höherem Niveau zu liegen als nach Veränderung der Belüftung ab dem 25. Tag bis zur Betriebspause. Nach Wiederaufnahme des Betriebes wurden dann wieder steigende Glykogengehalte gefunden. Insgesamt ist aus den gefundenen Gehalten an Glykogen über die Reaktorlaufzeit keine Auszehrung der Kohlenhydratreserven feststellbar. Eine kontinuierliche Verschlechterung der Hefevitalität ist aus diesen Daten daher nicht abzuleiten. Dies gilt selbst für die Werte, die kurz nach Wiederaufnahme des Betriebes gefunden wurden. Hier waren die Glykogengehalte zwar auf niedrigem aber nicht auf niedrigstem Niveau.

Für die Säuerungskraft – ausgedrückt als AP-Wert – wurden zu Versuchsbeginn höhere Werte gefunden, im Laufe der Zeit war eine gewisse Abschwächung zu verzeichnen. Nach Wiederaufnahme des Betriebes im Nachgang der Betriebspause wurden dann eher wieder höhere AP-Werte festgestellt. Auch aufgrund der AP-Werte lässt sich somit keine kontinuierliche Abschwächung der Hefevitalität über die Laufzeit des Reaktors feststellen. Einschränkend ist hier allerdings zu bemerken, dass diese Methode, wie bereits erwähnt, gewisse Mängel in ihrer Reproduzierbarkeit aufweist und ihre Aussagekraft daher eingeschränkt ist.

Der Gehalt an Trehalose nahm nach anfänglich recht hohen Werten ab und verblieb auf einem Niveau zwischen 0,5 und 1% bezogen auf die Trockensubstanz der Hefe. Möglicherweise spielten hier Adaptationsvorgänge an die Verhältnisse im Reaktor zu Beginn des Versuches eine Rolle. In jedem Fall ist aus den gefundenen Daten keine Verstärkung der Stress-Antwort der Hefe über die Versuchszeit zu entnehmen.

Der ICP-Wert, der nur in der Endphase des Versuches ermittelt werden konnte, zeigte an den betrachteten Versuchstagen große Konstanz. Das Niveau lag deutlich über dem der hungernden Zellen aus den Vorversuchen. Die Methode erwies sich als gut reproduzierbar und praktikabel. Für weitergehende Aussagen muß der Datenbestand in Zukunft jedoch noch deutlich vergrößert werden.

Die Abbildung 9 zeigt die Entwicklung der Zellzahlen bzw. der Viabilität am Auslauf des Reaktorsystems. Die gefundenen Zellzahlen unterlagen während der Reaktorlaufzeit starken Schwankungen und es ist nicht möglich, Ursachen hierfür zu benennen. Die prozentualen Anteile als inaktiv identifizierter Zellen schwankten stets im Bereich von etwa 2 bis 5%. Eine Ausnahme, die jedoch zu erwarten war, war die Wiederanfahrphase nach zweiwöchigem Reaktorstillstand. Hier wurden kurzfristig Totzellenanteile von etwa 10% gefunden. Die Viabilität der Zellen verschlechterte sich aber nicht nachhaltig. Dies bestätigt im Prinzip die Aussagen, die auch für die Vitalitätskriterien der Hefe gefunden wurden.

4 Diskussion

In den hier dargestellten Versuchen mit dem MPI-Reaktor ergaben sich gerade zu Beginn des Versuches typische analytische Veränderungen des Bieres, wie sie auch in früheren Versuchen bereits gefunden wurden. Diese lassen sich durch ansteigende pH-Werte, verringerte FAN-Aufnahmen sowie sinkende Konzentrationen höherer Alkohole beschreiben (Abbildungen 2 und 3). Durch die Anpassung der Belüftung konnten diese Veränderungen jedoch aufgehalten werden und es wurde bis zum Versuchsende - mit Ausnahme der Stillstandsphase – eine recht konstante Zusammensetzung des Bieres aus dem Immo-Reaktor erreicht. Im direkten Vergleich der ersten 25 Versuchstage, also der Tage, die hinsichtlich der Betriebsbedingungen vergleichbar sind, ergaben sich tendenziell etwas höhere FAN-Konsumptionen und Bildung höherer Alkohole beim MPI-Reaktor gegenüber dem

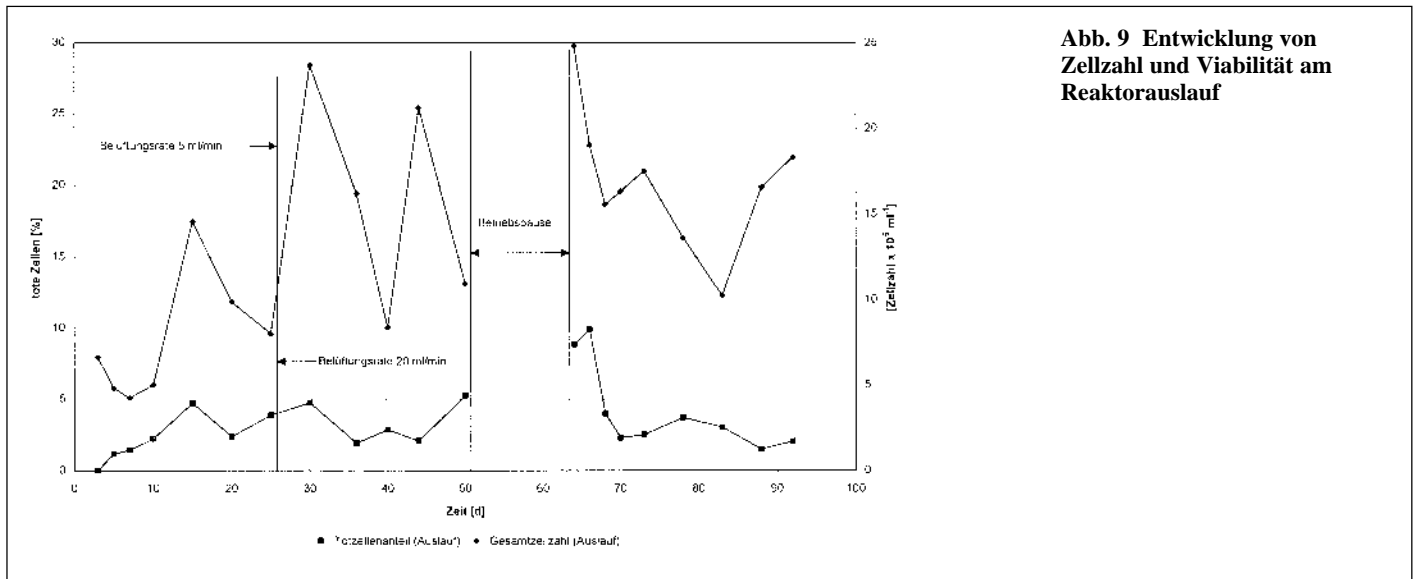


Abb. 9 Entwicklung von Zellzahl und Viabilität am Reaktorauslauf

belüfteten Festbettreaktor (Abbildung 4). Diese fielen zwar geringer aus als im Vorfeld erwartet wurde, bestätigten aber grundsätzlich die Aussagen in der Literatur über verbesserte externe Massentransfers in Systemen mit Zwangsströmung. Hinsichtlich der Verkostungsergebnisse war das Ergebnis recht befriedigend. Es gab zwar nach wie vor Schwankungen in der Bewertung der produzierten Biere, es konnte aber keine kontinuierlich abnehmende Tendenz in der Bewertung der Immo-Biere nachgewiesen werden. Die Qualität der Biere war stets akzeptabel. Hierbei ist anzumerken, dass die Biere im Pilotmaßstab hergestellt wurden, was zum einen eine größere Fehleranfälligkeit mit sich bringt. Zum anderen wurden die für die Versorgung der Reaktoren bereitgestellten Würzen heiß abgefüllt, um Kontaminationen während der Lagerung der Würzen zu vermeiden. Die Würzen kühlten dann nur langsam ab, was der Qualität der Biere insgesamt sicher nicht förderlich, aber aus versuchstechnischen Gründen nicht zu vermeiden war.

Bei den von uns betrachteten Methoden zur Bewertung der Hefevitalität scheint, was die Vorversuche in der Hungerkultur anbetrifft, der Gehalt an säurelöslichem Glykogen die verlässlichsten Ergebnisse zu liefern. Der ICP-Wert erwies sich als vielversprechend. Die Methode ist gut reproduzierbar und es könnte nach den ersten Ergebnissen ein Zusammenhang zum Glykogenegehalt zu existieren. Um eine abschließende Bewertung vornehmen zu können, sind aber in Zukunft noch weitere Untersuchungen notwendig. Die Durchführung des AP-Tests ist zwar sehr einfach, offenbar aber auch anfällig für sehr kleine Veränderungen. Wie bereits erwähnt, führte eine nur um wenige Minuten versetzte Doppelbestimmung des AP-Wertes der selben Hefeprobe mitunter bereits zu verschiedenen Ergebnissen. Dies gilt sowohl für die Vorversuche als auch die Proben aus dem MPI-Reaktor. Auch ist die Entwicklung der AP-Werte, die in den gleich durchgeführten Vorversuchen gefunden wurde, recht unterschiedlich. Die Methode ist möglicherweise dazu geeignet, Tendenzen aufzuzeigen. Es verbleibt jedoch fraglich, ob sich mit ihrer Hilfe die Hefevitalität verlässlich bewerten lässt. Korrelationen mit anderen Vitalitätsparametern, etwa zwischen dem AP nach 10 Minuten (AP 10-Wert) und dem Gehalt an Glykogen, wie sie von *van Zandycke et al.*(22) mitgeteilt wurde, konnte weder in den Vorversuchen noch im Immo-Hauptversuch bestätigt werden.

Die Ergebnisse für die Parameter der Hefevitalität und auch Viabilität der aus dem Reaktor ausgeschwemmten Hefe geben

keinerlei Hinweis auf eine nachhaltige Verschlechterung des physiologischen Zustandes der Hefe mit der Reaktorlaufzeit und bestätigen damit die Ergebnisse der chemisch-technischen Bieranalyse und der Verkostung. Wie bereits erwähnt, ist eine gewisse Schwäche dieser Untersuchung in dem Umstand zu sehen, dass ausgeschwemmte Zellen und nicht immobilisierte Zellen analysiert werden. Allerdings ist es schwer vorstellbar, dass eine Veränderung des physiologischen Zustandes der immobilisierten Hefezellen sich in irgendeiner Form nicht auch bei den ausgeschwemmten Zellen bemerkbar macht und somit tendenzielle, wenn auch keine absoluten Aussagen möglich sind. Des Weiteren würde sich bei einer Beprobung der immobilisierten Hefe aus dem Reaktor, wenn diese praktikabel wäre, die Frage stellen, ob der Probenahmeort überhaupt repräsentativ für alle immobilisierten Zellen ist. In diesem Punkt bedeutet die Untersuchung der ausgeschwemmten Zellen sogar einen Vorteil, kann man doch davon ausgehen, dass auf jeden Fall ein repräsentativer Querschnitt der nicht-immobilisierten Zellen erfasst wird.

Ein weiterer, durchaus praxisrelevanter Aspekt unserer Untersuchung ist die zweiwöchige Betriebspause. In dieser Zeit befand sich die Hefe ohne Belüftung, gekühlt, aber bei Spundungsdruck (ca. 0,8 bar) im Reaktorsystem. Die Qualität des Bieres, das zwei Wochen über der Hefe gestanden hat, ist erwartungsgemäß deutlich verändert, auch werden erheblich erhöhte Anteile inaktiver Zellen im Reaktorauslauf gefunden. Dennoch kommt es zu einer sehr schnellen Normalisierung der Situation und es werden binnen kurzer Frist wieder akzeptable Biere hergestellt. Kürzere Stillstandphasen dürften sich entsprechend weniger auf den Reaktorbetrieb auswirken.

Der Einfluss der Belüftung auf die Qualität der hergestellten Biere wurde bereits mehrfach hervorgehoben. Auch wurde die Tatsache erwähnt, dass mit dem pH-Wert ein zeitnah verfügbarer Parame-

ter zur Verfügung steht, mit dem gewisse Aussagen über die Qualität des Produktes möglich sind. Ein Aspekt, der bei unseren bisherigen Arbeiten über die Langzeitstabilität in Immo-Reaktoren nicht betrachtet wurde, ist die Regelung derartiger Systeme. In diesem Versuch wurde nach 25 Versuchstagen beispielsweise die Belüftungsrate manuell verändert und dann konstant so belassen. Effekte auf die Bierqualität stellten sich sehr kurzfristig ein. Denkbar und für großtechnische Systeme wünschenswert wären Regelungen, mit denen die Belüftungsrate als Stellgröße beeinflusst wird. Als Regelgröße wäre der Bier-pH denkbar. Neben der Weiterverfolgung des „externen Massentransfers“, der Fortsetzung des Erkenntnisgewinns über die Hefevitalität im immobilisierten System ist in der Zukunft vorgesehen, die regelungstechnische Dynamisierung der Fermentation in unsere Untersuchungen einzubeziehen.

Danksagung

Wir bedanken uns für die Förderung dieses Forschungsvorhabens (AiF-FV-Nr. 13338) aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft (BMW) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF).

5 Summary

Wackerbauer, K., Ludwig, A., and Möhle, J.: Improvement of long term stability in main fermentations with immobilized yeast, II. Trials in MPI-reactor and evaluation of yeast vitality in the immobilized system — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 9/10, 172 – 181, 2002

BC 23 Fermentation

Based on the trials applied in the first part of this paper working with defined aeration and variation of carrier material in a fixed bed reactor, further tests were developed. Here in the main trial a loop reactor with silicon-carbide modules as an immobilization matrix, the so called MPI-reactor, was used for immo-main fermentation. In the first time effects which were known from former trials like pH-increase, reduced synthesis of higher alcohols and minimized FAN-consumption were found. These developments were slightly retarded in the MPI-reactor in comparison to fixed bed reactor. After 25 days the aeration rate was increased in order to counteract against the described changes of beer quality. After this in general it was possible to produce beers of a relatively constant quality over the reactor operation period of 92 days which could be proved by results of chemical-technical as well as sensory analysis. As expected a two-week interruption of reactor operation lead to a noticeably changed quality of the beer that remained in the reactor during this time. But after restarting the reactor it was possible to produce beer of the original quality within a few days. In preliminary tests the yeast was exposed to forced starvation. By this means expressiveness and practical feasibility of methods for the evaluation of yeast vitality were to be determined. The concentration of acid-soluble glycogen proved to be an expressive criterion. Also the intracellular pH-value appeared to be interesting, but it was not possible to give a final evaluation with the available results. The Acidification-Power-value shows correct tendencies but it suffers from its weak reproducibility. By none of the mentioned methods, which were applied in the main trial, too, a lasting and continuous decline of yeast vitality could be shown during the long-term trial in the MPI-reactor. Also the determination of yeast viability from cell samples taken at the reactor outlet support these results.

Wackerbauer, K., Ludwig, A., et Möhle, J.: Amélioration de la stabilité à longue durée de la fermentation principale avec de la levure immobilisée, II. Essais avec le réacteur MPI et évaluation de la vitalité de la levure dans le système immobilisé — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No. 9/10, 172 – 181, 2002

BC 23 Fermentation

Dans la première partie de ce travail des essais ont été effectués avec une aération définie et une variation du matériel de support du réacteur à lit fixe. Dans cet essai décisif, pour la fermentation principale immobilisée, on a utilisé un réacteur MPI, un réacteur à boucle avec des modules de carbure de silicium comme matrice d'immobilisation. Dans un premier temps on a retrouvé, comme pour les essais précédents, les effets connus tels que l'augmentation du pH, une synthèse réduite des alcools supérieurs et une consommation réduite en AAL (azote aminé libre). Ces évolutions étaient un peu diminuées dans le réacteur MPI par rapport au réacteur à lit fixe. Après 25 jours d'essais, on a suspendu le taux d'aération afin de contrecarrer les changements cités dans la qualité de la bière. Dans l'ensemble on a réussi sur une durée de la conduite du réacteur de 92 jours à fabriquer des bières d'une qualité constante ce qui a été confirmé par l'analyse technico-chimique et par l'analyse sensorielle. Une phase d'arrêt du réacteur de deux semaines a conduit, comme on s'y attendait, à un changement important de la qualité. La bière est restée dans le réacteur pendant cette période. Après la remise en route du réacteur, on produisait à nouveau en quelques jour une bière de qualité identique. A partir de pré-essais, où on a exposé la levure artificiellement dans une situation de carence, on a prévu d'examiner par des plans d'expériences et des essais, la vitalité de la levure. La teneur en glycogène soluble à l'acide était un marqueur reconnu. La valeur du pH intracellulaire semble également intéressante mais compte tenu des résultats obtenus on ne pouvait pas l'évaluer. La valeur du test du pouvoir d'acidification donne des tendances correctes mais souffre de la faible répétabilité. Dans aucune des méthodes citées ci-dessus, qui étaient appliquées pendant l'essai décisif, on ne pouvait constater un affaiblissement constant de la vitalité de la levure pendant l'essai à long terme dans le réacteur MPI. Les examens de la vitalité de la levure sortie réacteur confirment également ces résultats.

6 Literatur

1. Wackerbauer, K., Ludwig, A., Legrand, J.: Verbesserung der Langzeitstabilität in Hauptgärungen mit immobilisierter Hefe, II. Versuche in Festbettreaktoren und Einfluss definierter Belüftung, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **55**, 128 – 137, 2002.
2. Fitzner, M.: Der Einsatz immobilisierter Hefen in der Brauerei unter besonderer Berücksichtigung der Angärphase und ausgewählter Reaktortypen und Trägermaterialien, Dissertation, Technische Universität Berlin, D 83, FB 15 Nr. 124, 1998.
3. Van de Winkel, L., van Beveren, P.C., Borremans, E., Goossens, E., Masschelein, C.A.: High performance immobilized yeast reactor design for continuous beer fermentation, *Proceeding 24th EBC-Congress*, Oslo, 307 – 314, 1993.
4. Norton, S., D'Amore, T.: Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing, *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 365 – 375, 1994.
5. Pilkington, P.H.; Margaritis, A.; Mensour, N.A.; Russel, I.: Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review, *J. Inst. Brew.* **104**, 19 – 31, 1998.
6. Ryder, D.S., Masschelein, C.A.: The Growth Process of Brewing Yeast and the Biotechnological Challenge, *J. ASBC* **43**, 66 – 75, 1985.
7. Masschelein, C.A., Carlier, A., Ramos-Jeunehomme, C., Abe, I.: The effect of immobilization on yeast physiology and beer quality in continuous and discontinuous systems, *Proceeding 20th EBC-Congress*, Helsinki, 339 – 346, 1985.
8. Cop, J., Dyon, D., Iserentant, D., Masschelein, C.A.: Reactor design optimization with a view to the improvement of amino acid utilization and flavour development in calcium alginate entrapped brewing yeast fermentations, *Proceeding 22th EBC-Congress*, Zürich, 315 – 322, 1989.
9. Masschelein, C.A., Andries, M.: The Meura-Delta Immobilised Yeast Fermenter for the continuous production of beer, *Cerevisia* **21**, 28 – 31, 1996.

10. Andries, M., van Beveren, P.C., Goffin, O., Masschelein, C.A.: Design of a Multi Purpose Immobilized Yeast Bioreactor System for application in the brewing process, EBC Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 134 – 143, 1995.
11. Wackerbauer, K., Fitzner, M., Lopsien, M.: Untersuchungen mit dem neuen MPI-Bioreaktor-System, Brauwelt **136**, 2250 – 2256, 1996.
12. Lentini, A.: A review of the Various Methods Available for Monitoring the Physiological Status of Yeast: Yeast Viability and Vitality, Ferment **6**, 321 – 327, 1993.
13. Opekarova, M., Sigler, K.: Acidification Power: Indicator of Metabolic Activity and Autolytic Changes in *Saccharomyces cerevisiae*, Folia Microbiol., **27**, 395-403, 1982.
14. Imai, T., Nakajima, I., Ohno, T.: Development of a New Method for Evaluation of Yeast Vitality by Measuring Intracellular pH, J. ASBC **52**, 5 – 8, 1994.
15. Quain, D.E., Thurston, P.A., Tubb, R.S.: The structural and storage carbohydrates of *Saccharomyces cerevisiae*: Changes during fermentation of wort and a role for glycogen catabolism in lipid biosynthesis, J. Inst. Brew. **87**, 108 – 111, 1981.
16. Ryder, D.S., Masschelein, C.A.: The importance of being glycogen, Proceeding 24th EBC-Congress, Oslo, 241 – 250, 1993.
17. De Virgilio, C., Simmen, U., Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A.: Heat shock induced enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in presence of cycloheximide, FEBS **273**, 107 – 110, 1990.
18. Kara, B.V., Simpson, W.J., Hammond, R.M.: Prediction of the Fermentation Performance of Brewing Yeast with the Acidification Power Test, J. Inst. Brew. **94**, 153 – 158, 1988.
19. Slaughter, J.C., Nomura, T.: Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability, Enzyme Microb. Technol. **14**, 64 – 67, 1992.
20. Kunerth, S.: Beeinflussung der Hefevitalität durch Gärungsparameter und ihre Charakterisierung durch ausgewählte Metaboliten, Dissertation, Technische Universität Berlin, D 83, FB 15 Nr. 141, 1999.
21. Back, W., Imai, T., Forster, C., Narziß, L.: Hefevitalität und Bierqualität, Monatsschrift für Brauwissenschaft **51**, 189 – 195, 1998.
22. Van Zandycke, S.M., Siddique, R., Smart, K.A.: Yeast Membrane Potential and Carbohydrate Utilisation, Proceeding 28th EBC-Congress, Budapest, 2001.
23. Beckmann, M.: Der Einfluss unterschiedlicher Konservierungsverfahren für Brauereihefen auf die physiologischen und brautechnischen Eigenschaften der Stämme, Dissertation, Technische Universität Berlin, D 83, Fakultät III, 2002.
24. Smart, K.A.: Nutritional Requirements and Performance of Yeast: EBC Monograph XXIV, EBC-Symposium Immobilized Yeast Applications in the Brewing Industry, Espoo, 146 – 155, 1995.
25. Quain, D.E.: The determination of glycogen in yeasts, J. Inst. Brew. **87**, 289 – 291, 1981.

(Manuskripteingang: 21. 6. 2002)