

C. Zufall, S. Kunerth, N. Tietje und K. Wackerbauer

# Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck

Neben der Gärtemperatur (1 – 3) und dem osmotischen Druck (4, 5) hat bekanntlich ebenfalls der physikalische Druck, d. h. der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, einen Einfluß auf das Gärverhalten der Hefe. Die erhöhte Konzentration des im Gärmedium gelösten Kohlendioxides führt zu einer starken Beeinträchtigung des Baustoffwechsels. Der Energiestoffwechsel wird dabei in wesentlich geringerem Maße gehemmt. Die praktische Anwendung dieses Zusammenhanges besteht darin, unter Druck bei vergleichsweise hohen Temperaturen zu vergären, ohne daß die für eine forcierte Hefevermehrung typischen Aromakomponenten (z. B. höhere Alkohole) verstärkt gebildet werden. Die Auswirkungen physikalischen Druckes auf die Hefevitalität sind dagegen bisher überhaupt nicht hinreichend erforscht worden. Es zeigte sich in den Untersuchungen, daß sich unterschiedliche  $\text{CO}_2$ -Partialdrücke auf den Glykogenstoffwechsel der Ernte- und Anstellhefe jeweils verschiedenartig auswirken. Unterschiedliche  $\text{CO}_2$ -Partialdrücke beeinflussen in erster Linie die Glykogenkonzentration der Erntehefe.

BC 41 Brauereihefe

(Deskriptoren: Hefephysiologie, Gärleistung, Hefevitalität, Druckgärung.

Descriptors: Physiology of yeast, fermentative power, yeast vitality, pressure fermentation).

## 1 Einleitung

Während einer Druckgärung wird der Hefestoffwechsel nicht durch den statischen Druck, sondern durch den erhöhten  $\text{CO}_2$ -Partialdruck des Mediums beeinflusst. Durch die herrschenden Bedingungen kann nur das in gelöster Form vorliegende Kohlendioxid die Gärung beeinflussen (6). Vor allem der Baustoffwechsel wird durch die erhöhte Konzentration des im Gärmedium gelösten Kohlendioxides beeinträchtigt. Der Energiestoffwechsel wird in wesentlich geringerem Maße gehemmt. Dadurch ist es möglich, bei vergleichsweise hohen Temperaturen zu gären, ohne daß Aromakomponenten wie z. B. höhere Alkohole (n-Propanol, 2-Methylbutanol (1), usw.) verstärkt gebildet werden (7).

Das bei der Gärung entstehende Kohlendioxid verändert die Membranpermeabilität und beeinflusst dadurch die Stoffwechselaktivität der Hefe. Die Permeabilität wird durch eine Hemmung der Permeasen und eine Veränderung der unpolaren Fettsäureacyl-Enden in der Membran herabgesetzt (6). Ein Indiz für den geringeren Stofftransport bei erhöhten  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken ist die verminderte Aufnahme an Gesamt-Stickstoff und freiem  $\alpha$ -Aminostickstoff (FAN) (8). Besonders die Sprossung wird durch höhere Kohlendioxidkonzentration eingeschränkt. Der Einfluß eines erhöhten  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes ist umso größer, je früher die Kohlendioxidkonzentration nach dem Anstellen ansteigt (9). Wird der Druck zu schnell nach dem Anstellen erhöht, wird die Hefevermehrung zu stark eingeschränkt. Daraus resultiert eine langsame und sogar schleppende Gärung (10).

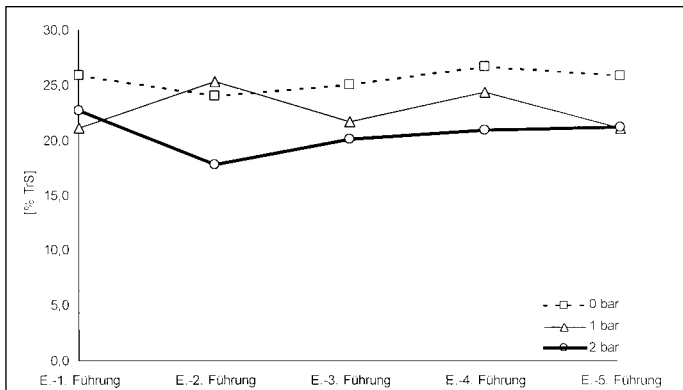
Bei mehreren aufeinanderfolgenden Druckgärungen wird vielfach eine Abnahme der Gäraktivität beobachtet. Dieses macht dann die Verwendung einer neuen Hefereinzucht erforderlich (11). Die Glykolyse wird durch eine erhöhte Kohlendioxidkonzentration dagegen nicht beeinträchtigt (8). Kohlendioxid wird aber auch direkt in den Stoffwechsel eingebunden, so daß es sich erst ab einer größeren Konzentration als toxisch erweist. Bevor diese Grenze erreicht ist, wird Kohlendioxid im Intermediärstoffwechsel der Hefe für diverse Carboxylierungsreaktionen benötigt (12).

## 2 Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurden zylindronische Tanks (ZKT's) aus Glas (50 l Volumen) eingesetzt. Die Gärtemperatur (15 °C) wurde mit einem Kryostaten konstant gehalten. Die für die Gärungen benötigten Hefereinzuchten wurden nach dem Eintank-Hefeführverfahren herangezogen. Der verwendete Hefestamm war eine untergärrige Bruchhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Stamm „Hebru“) Die angestrebte Anstellkonzentration betrug 20 Mio. Zellen/ml. Die Zellzahl wurde mit der Thoma-Kammer ausgezählt.

Der Druckaufbau durch Anschluß des Spundapparates erfolgte jeweils 24 Stunden nach dem Anstellen. Die Spundapparate waren auf Druckstufen von 0, 1 und 2 bar Überdruck eingestellt. Die Hefe wurde immer beim Erreichen der Endvergärung in eine Steilbrustflasche geerntet, die mit einer Belüftungsvorrichtung versehen war. Neben der Würze wurde auch die Ernte- und die Anstellhefe belüftet. Zur Überprüfung der Belüftungsraten der Würze diente ein Meßgerät Digox EC-401 (Fa. Dr. Thiedig, Berlin). Zwischen den Führungen wurde die Hefe zwei Tage bei einer Temperatur von 1 °C gelagert.

Nach Erreichen des Endvergärungsgrades hat man das Jungbier in Kegs geschlaucht und bei 1 °C für zwei Wochen gelagert. Für die Bieranalysen wurden die gelagerten Biere mittels Schichtenfiltration oder durch Zentrifugation (10 000 U/min bei 4 °C) geklärt. Die Bieranalysen wurden nach Mebak durchgeführt. Die Bestimmung des Glykogen- und Trehalosegehaltes basiert auf einer enzymatischen Bestimmung von Glucose (2).



**Abb. 1** Glykogengehalt der Erntehefe (E.) mit steigender Anzahl der Führungen bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken während der Gärung

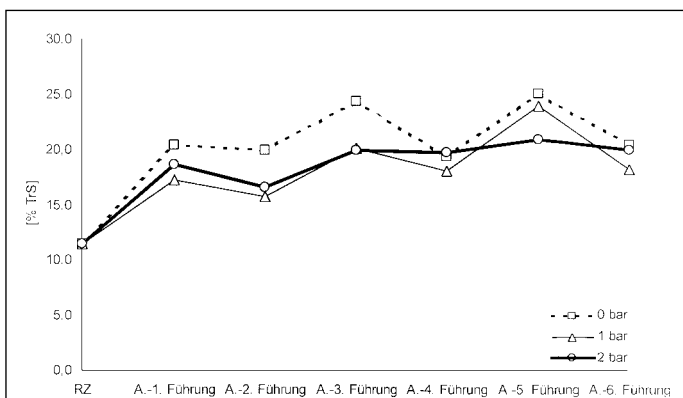
**3 Ergebnisse**

Die Glykogenkonzentrationen der Ernte- und der Anstellhefe werden durch den CO<sub>2</sub>-Partialdruck unterschiedlich stark beeinflusst. Unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Partialdrücke beeinflussen in erster Linie die Glykogenkonzentration der Erntehefe.

Mit steigendem CO<sub>2</sub>-Partialdruck verringert sich die Menge an gespeichertem Glykogen in der Erntehefe (Abb. 1). Der Unterschied zwischen 1 bar und 2 bar Überdruck ist nicht so stark ausgeprägt wie zwischen 0 bar Überdruck und den anderen Druckstufen. Ein Anstieg der Glykogenkonzentration findet nur von der Erntehefe der Reinzucht (RZ) zur Erntehefe der ersten Führung statt. In den folgenden Führungen wird kein weiterer Anstieg der Konzentration dieses Reservestoffes festgestellt. Ab der zweiten Führung bleibt auch der Unterschied zwischen den einzelnen Druckstufen konstant.

Der Glykogengehalt der Anstellhefe wird durch unterschiedliche Druckstufen nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 2). Bei steigenden CO<sub>2</sub>-Partialdrücken liegen niedrigere Glykogenkonzentrationen vor. Diese Unterschiede sind aber nicht so groß wie bei der Erntehefe. Es scheint, als ob die Hefelagerung zwischen den Führungen die vorherigen Unterschiede ausgleicht.

In der Anstellhefe steigt der Anteil der gespeicherten Glykogenreserven in der Hefezelle auch im Verlauf sukzessiver Führungen nicht an. Auffällig ist, daß bei niedrigeren CO<sub>2</sub>-Partialdrücken die



**Abb. 2** Glykogengehalt der Anstellhefe (A.) mit steigender Anzahl der Führungen bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken während der Gärung

Schwankungen in den Glykogenkonzentrationen zwischen den einzelnen Führungen stärker ausgeprägt sind als bei einer Druckstufe von 2 bar.

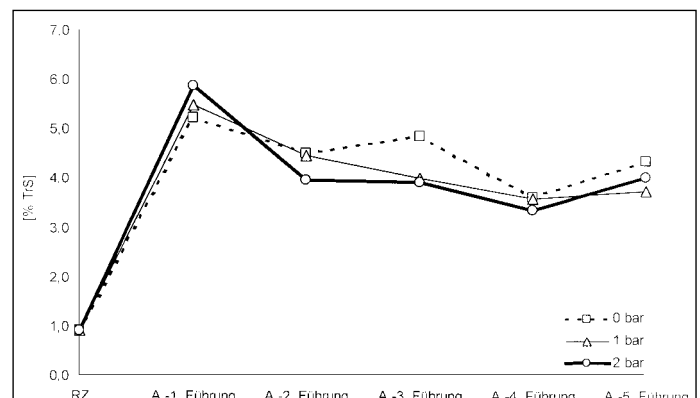
Es werden ebenfalls die Glykogenkonzentrationen der in Schwebelagerung befindlichen Hefezellen zum Zeitpunkt der Endvergärung bestimmt. Daraus resultiert ein bemerkenswertes Ergebnis: der Glykogenstoffwechsel der in Schwebelagerung befindlichen Hefezellen ist von den vorherrschenden CO<sub>2</sub>-Partialdrücken unbeeinflusst, so daß die Hefen bei unterschiedlichen Druckstufen identische Glykogengehalte aufweisen. Höhere CO<sub>2</sub>-Partialdrücke beeinflussen am stärksten die Stoffwechselung des Glykogens bei der im Konus abgesetzten Hefe. Während der Hefelagerung zwischen den Führungen findet ebenfalls eine Verwertung der Glykogenreserven statt. Der Einfluß unterschiedlicher, während der Gärung auf der Hefe lastender CO<sub>2</sub>-Partialdrücke spiegelt sich dort nicht wider. Wird die CO<sub>2</sub> durch die Belüftung der Erntehefe ausgetrieben, so kann man damit einen negativen Einfluß des Kohlendioxides verhindern. Die Erntehefen aus einer Gärung bei 2 bar Überdruck zeigen die stärkste Reduzierung des intrazellulären Glykogenpools während der Sedimentation bzw. des Verweilens im Konus. Im Vergleich zur Hefelagerung zwischen den einzelnen Führungen spielen die im Konus vorherrschenden höheren Temperaturen ebenfalls eine Rolle. Werden die Glykogenkonzentrationen der in Schwebelagerung befindlichen Hefezellen mit denen der abgesetzten Hefe verglichen, ergibt sich die in Tabelle 1 aufgezeigte durchschnittliche Veränderung.

**Tabelle 1** Durchschnittliche prozentuale Veränderung der Glykogenkonzentration der in Schwebelagerung befindlichen Hefen zu den abgesetzten Hefen

	0 bar	1 bar	2 bar
Abnahme der Glykogenkonzentration [%]	4,7	9,2	17,5

Diese vom CO<sub>2</sub>-Partialdruck abhängige Veränderung der Glykogenreserven führt zu geringeren Glykogenkonzentrationen in jener Erntehefe, die einer Gärung mit höherem CO<sub>2</sub>-Partialdruck entstammt.

In den Untersuchungen der Trehalosekonzentration sind in der Anstellhefe aus drucklosen Gärungen etwas höhere Trehalosekonzentrationen beobachtet worden als bei den Druckgärungen. Der Unterschied zwischen einer Gärung mit 1 bar und 2 bar Überdruck ist dabei gering (Abb. 3).



**Abb. 3** Trehalosegehalt der Anstellhefe (A.) mit steigender Anzahl der Führungen bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken während der Gärung

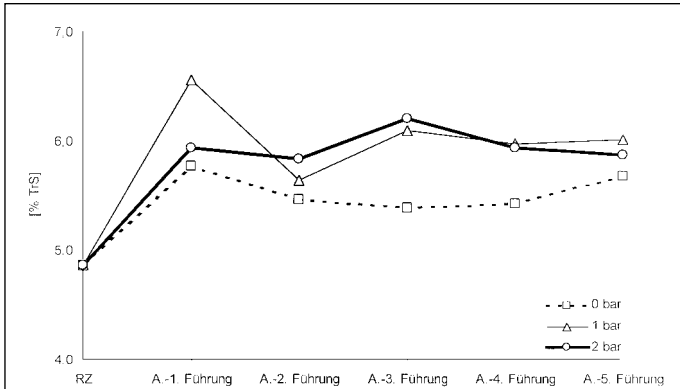


Abb. 4 Stickstoffgehalt der Anstellhefe (A.) mit steigender Anzahl der Führungen bei unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken während der Gärung

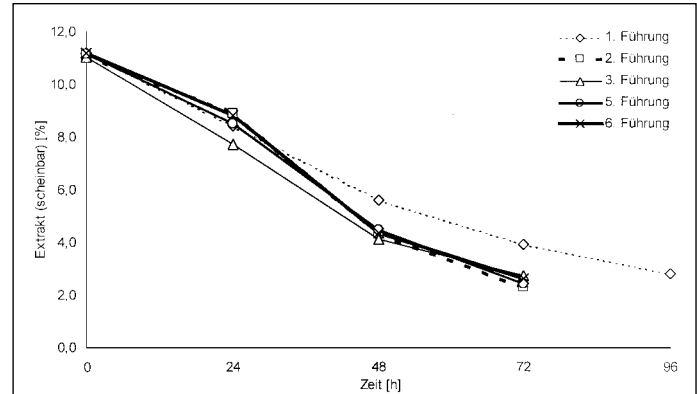


Abb. 5 Extraktabnahme mit zunehmender Anzahl der Führungen bei 2 bar Druck

Auch hier ist der starke Anstieg für alle drei Druckstufen zwischen der Reinzuchtheife und der ersten Führung zu beobachten. Es muß angemerkt werden, daß die erste Führung nach der Reinzucht für alle drei Hefen drucklos stattfindet. Bereits dabei tritt der beobachtete Anstieg der Trehalosekonzentration auf. Die Erntehefe dieser „Null-Führung“ besitzt eine Trehalosekonzentration von 5,1% in TrS. Im Verlauf der Führungen wird eine Abnahme des Trehalosegehaltes deutlich. Die für das Glykogen festgestellte unterschiedliche Beeinflussung der einzelnen Stadien (Anstellen, Ernten, Erreichen der Endvergärung) in Abhängigkeit von den jeweiligen Druckstufen zeigt sich für die Trehalose nicht. Die für die Anstellhefe dargelegten Tendenzen sind auch bei den anderen beiden Probenahmezeitpunkten in gleicher Weise vorhanden.

Im Vergleich zum Glykogen oder der Trehalose zeigt der Stickstoffgehalt der Anstellhefe eine entgegengesetzte Abhängigkeit zu den vorherrschenden CO<sub>2</sub>-Partialdrücken. Für eine drucklose Führung ergeben sich niedrigere Stickstoffkonzentrationen. Der Unterschied zwischen der Reinzuchtheife (RZ) und den folgenden Führungen ist nicht so groß wie bei den anderen untersuchten Metaboliten. Eine Stickstoffanreicherung wird bei mehreren hintereinander folgenden Führungen nicht beobachtet (Abb. 4).

Auch die Gärverläufe weisen keine wesentlichen Veränderungen durch ein mehrmaliges Führen der Hefe auf. Auch bei ungünstig erscheinenden Milieubedingungen, wie in diesem Fall einem erhöhten CO<sub>2</sub>-Partialdruck, wird keine Beeinträchtigung der Gäraktivität festgestellt. Der größte zu verzeichnende Unterschied in der Geschwindigkeit der Extraktabnahme ist zwischen der ersten und den darauffolgenden Führungen vorhanden (Abb. 5).

Die erste Führung benötigt 24 Stunden länger, um den gewünschten Vergärungsgrad zu erreichen. Die folgenden Führungen verlaufen hinsichtlich Ausmaß der Vergärung und Geschwindigkeit der Extraktabnahme sehr einheitlich. Auch die Unterschiede bezüglich der Extraktabnahme zwischen den einzelnen Druckstufen sind relativ gering. Die Differenz zwischen der ersten und der folgenden Führung tritt bei allen drei Druckstufen gleichartig auf.

Die unterschiedlichen Druckstufen beeinflussen erwartungsgemäß die Entwicklung der Gesamtzellzahl. Nach 24 Stunden kommt es bei höheren Druckstufen zu einer verminderten Bildung neuer Zellen. Dieser Unterschied verringert sich bei mehreren aufeinanderfolgenden Führungen, jedoch ist mit steigender Führungsanzahl in jeder Druckstufe eine verminderte Zellneubildung zu beobachten. Im Vergleich der ersten Führung zu den folgenden ist das schlechter werdende Sedimentationsverhalten der Hefe auf-

fällig. Dieses wird für alle drei Druckstufen gleichermaßen festgestellt. Ab der zweiten Führung wird die Sedimentation weder durch die Druckstufe noch durch die Anzahl der Führungen beeinflusst.

Die drei Druckstufen spiegeln sich in der von der Zellvermehrung abhängigen Bildung von Gärungsnebenprodukten, vor allem der höheren Alkohole und Ester wider. Die geringere Bildung höherer aliphatischer Alkohole bei höheren Konzentrationen an gelöster Kohlensäure im Gärmedium ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2 Summe der Konzentrationen gebildeter höherer Alkohole [ppm] in Abhängigkeit vom Gärungsdruck und von der Anzahl der Führungen

	0 bar	1 bar	2 bar
1. Führung	137	135	120
4. Führung	140	120	89
6. Führung	139	111	–

Bei druckloser Gärung sind in der Summe der höheren Alkohole auch über sechs Führungen gleichmäßige Konzentrationen vorhanden. Mit zunehmendem CO<sub>2</sub>-Partialdruck nimmt die Konzentration bei nacheinander folgenden Führungen ab. Bei der drucklosen Führung ist das Ausmaß der Synthese an höheren Alkoholen unbeeinflusst vom Grad des Baustoffwechsels. Es wird trotz eines im Laufe der Führungen eingeschränkten Hefewachstums die gleiche Menge an höheren Alkoholen gebildet. Die Menge der gebildeten Ester hängt ebenfalls vom vorherrschenden CO<sub>2</sub>-Partialdruck ab. Sie verringert sich mit steigendem Gärdruck und mit der Anzahl der Führungen (Tab. 3).

Tabelle 3 Summe der Konzentrationen gebildeter Ester [ppm] in Abhängigkeit vom Gärungsdruck und von der Anzahl der Führungen

	0 bar	1 bar	2 bar
1. Führung	42	33	27
4. Führung	38	32	19
6. Führung	33	31	–

#### 4 Diskussion

Um einer verstärkten Bildung höherer Alkohole bei erhöhten Gärtemperaturen entgegenzuwirken, hat sich die Anwendung erhöhter  $\text{CO}_2$ -Partialdrücke bewährt. Durch einen höheren  $\text{CO}_2$ -Partialdruck kommt es zu einem verminderten Zellwachstum. Aus dem eingeschränkten Baustoffwechsel resultiert die verminderte Bildung von Gärungsnebenprodukten, deren Bildung eng mit dem Ausmaß der Zellneubildung durch entsprechende Stoffwechselschritte (Aminosäuresynthese, Verfügbarkeit von Acetyl-Coenzym A usw.) verbunden ist. Da Kohlendioxid im Rahmen diverser Carboxylierungs- und Decarboxylierungsschritte eine bedeutende Rolle im Gesamtstoffwechsel der Hefe einnimmt, ist die Veränderung des Hefestoffwechsels erklärlich. Daß es mit zunehmender Anzahl der Führungen auch bei Druckgärungen nicht zu einer Beeinträchtigung der Gäreigenschaften kommt, ist in erster Linie auf die Belüftung der geernteten Hefe zurückzuführen. Während der Gärung findet innerhalb der Zelle eine Anreicherung mit Kohlendioxid statt. Diese intrazelluläre Anreicherung ist für einen veränderten Stoffwechsel der Hefe verantwortlich. Die Plasmamembran der Hefe, die für neutrale und hydrophobe Moleküle (z. B.  $\text{CO}_2$ ) durchlässig ist, reguliert den Austausch des Kohlendioxides zwischen Zelle und umgebendem Medium. Das Ausmaß der  $\text{CO}_2$ -Diffusion wird durch die extra- und intrazelluläre Konzentration an Kohlendioxid beeinflusst. Wird die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium durch die Belüftung bzw. Entgasung der Erntehefe vermindert, kommt es aufgrund von Gleichgewichtsreaktionen zu einem vermehrten Ausschleusen von Kohlendioxid aus der Zelle. Es konnte gezeigt werden, daß für die Lagerung der Hefe zwischen zwei Führungen keine Abhängigkeit zwischen dem in der vorangegangenen Führung herrschenden  $\text{CO}_2$ -Partialdruck und Glykogenverbrauch existiert. Eine deutliche Abhängigkeit vom  $\text{CO}_2$ -Partialdruck ist aber für die sedimentierte Hefe im Konus des zylindrokonischen Tanks zu erkennen. Enthält die die Hefe umgebende Suspension nur noch wenig vergärbare Kohlenhydrate, werden bei erhöhten  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken die Glykogenreserven stärker verstoffwechselt. Bei der Betrachtung des Einflusses erhöhter  $\text{CO}_2$ -Partialdrücke muß zwischen dem Baustoffwechsel und dem Energiestoffwechsel unterschieden werden. Während der Baustoffwechsel, wie bereits erwähnt, durch höhere  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen deutlich beeinflusst

wird und daraus geringe Zellausbeuten resultieren, wird die Umwandlung von Kohlenhydraten zu Ethanol und Kohlendioxid nicht beeinträchtigt. Der Extrakt nimmt in allen dargestellten Ansätzen (0, 1 und 2 bar) gleich schnell ab. Dieses findet statt, obwohl die hemmende Wirkung des Kohlendioxides während der Zellvermehrung auf eine eingeschränkte Permeasenaktivität und veränderte Permeabilität der Zellmembran zurückgeführt wird. Da der Stoffumsatz bei steigendem Anteil des anaeroben Stoffwechsels (Gärung) aber nicht beeinträchtigt wird, ist dieses als Indiz für die Entkopplung des aeroben und anaeroben Stoffwechsels bezüglich seiner Sensitivität gegenüber steigenden  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken anzusehen. Wie die Ergebnisse der Glykogenuntersuchungen zeigen, tritt bei der sedimentierten Hefe im Konus des zylindrokonischen Tanks der Einfluß des Kohlendioxides wieder auf. In dieser durch höhere Temperaturen und Nährstoffmangel gekennzeichneten Situation kommt es zusätzlich zu einem verminderten Gasaustausch zwischen Hefe und dem umgebendem Medium. Dieses führt zu einer verschlechterten Abfuhr des gebildeten Kohlendioxides, so daß die intrazelluläre Anreicherung mit Kohlendioxid in der Hefe (2 bar) noch weiter steigt. Wie entscheidend diese verminderte Abfuhr des gebildeten Kohlendioxides ist, wird bei Betrachtung des Reservekohlenhydrat-Stoffwechsels während der Hefelagerung nach einer Belüftung deutlich. Die Glykogenverwertung während der Hefelagerung erfolgt für alle Hefen aus den unterschiedlichen Druckgärungen gleich stark. Für die forcierte Verstoffwechslung des Glykogens unter erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck kann der in Abbildung 6 dargestellte Regulationsmechanismus herangezogen werden.

Die Beeinflussung der Phosphofruktokinase-Aktivität nimmt dabei eine entscheidende Stellung ein. Prinzipiell wird die Phosphofruktokinase durch hohe ATP- und Citrat-Konzentrationen gehemmt. Durch hohe AMP-Konzentrationen sowie einen erhöhten Fructose-2,6-bisphosphat-Spiegel wird sie aktiviert. Fructose-2,6-bisphosphat aktiviert die Phosphofruktokinase, indem sie deren Affinität zu Fructose-6-phosphat steigert und den Hemmeffekt des ATP herabsetzt. Die Inhibierung einiger Decarboxylierungen im Stoffwechsel durch erhöhte Kohlendioxidkonzentrationen muß auch berücksichtigt werden. Dabei ist vor allem die Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase zu erwähnen. Bei der durch dieses Enzym katalysierte Reaktion handelt es sich um die

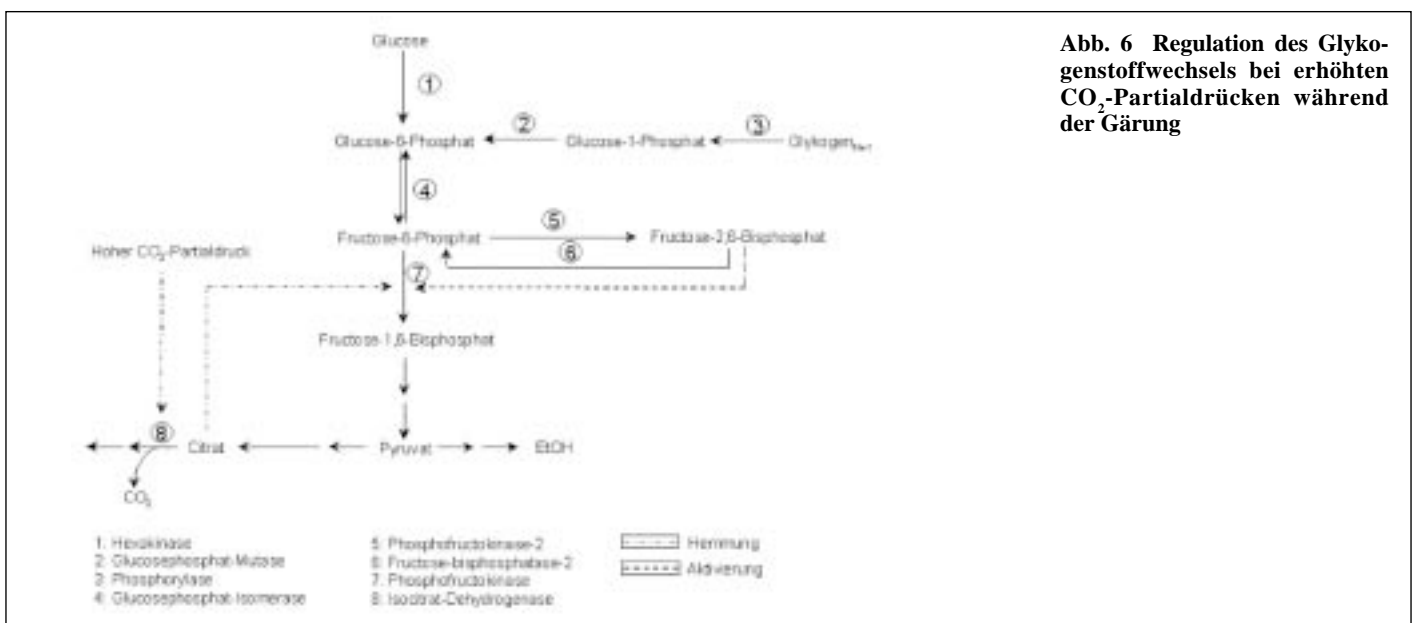


Abb. 6 Regulation des Glykogenstoffwechsels bei erhöhten  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken während der Gärung

erste oxidative Decarboxylierung im Citratzyklus. Ist diese Reaktion gehemmt, kommt es zu einer Anreicherung mit Citrat und in der Folge zur Hemmung der Phosphofruktokinase. Der Stoffumsatz der Glykolyse wird reduziert, und die Energieversorgung der Zelle ist unter den herrschenden anaeroben Bedingungen stark eingeschränkt. Es ist denkbar, daß diese Hemmung der Phosphofruktokinase durch einen erhöhten Fructose-2,6-bisphosphat-Spiegel wieder ausgeglichen wird. Um diesen zu erreichen, kann die Hefe in einem verstärkten Maße Zucker durch den Abbau von Glykogen in phosphorylierter Form freisetzen. Das gewonnene Glucose-1-phosphat wird in Glucose-6-phosphat überführt. Auch die nachfolgende Umwandlung in Fructose-6-phosphat geschieht ohne Weiteres. Durch die Inhibierung der Phosphofruktokinase kommt es nun aber zu einer Anreicherung mit Fructose-6-phosphat. Ein Überschuß an Fructose-6-phosphat führt zu einer höheren Konzentration von Fructose-2,6-bisphosphat, das andererseits die Phosphofruktokinase stimuliert. Für die Synthese von Fructose-2,6-bisphosphat wird ein Molekül ATP verbraucht. Diese Reaktion scheint unter energetischen Gesichtspunkten wenig sinnvoll zu sein. Betrachtet man sie aber unter dem Aspekt, daß durch die weitere Minimierung des ATP-Spiegels eine Stimulation der Phosphofruktokinase einsetzt und dadurch dem hemmenden Einfluß eines erhöhten Citratspiegels entgegengewirkt wird, ist dieser Mechanismus durchaus von Vorteil für die Zelle. Man muß davon ausgehen, daß die Beeinflussung der Phosphofruktokinase-Aktivität durch Citrat und ATP-Spiegel miteinander konkurrieren. Der erniedrigte ATP-Spiegel führt in dieser Phase zu einem vermehrten Glykogen-Abbau. Dadurch kann es bei zu langem Verweilen der Hefepopulation unter nährstoffarmen Bedingungen bei gleichzeitig erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck zu einem Auszehren der Kohlenhydratreserven kommen. Unter extremen Bedingungen führt dieses dann zu einem zu weitreichenden Verbrauch an Glykogen, so daß daraus Angärschwierigkeiten in der nachfolgenden Gärung resultieren. Bei einer rechtzeitigen Belüftung bzw. Austreiben des Kohlendioxides wird aber die Hemmung der Phosphofruktokinase durch einen erhöhten Citrat-Spiegel aufgehoben (siehe Hemmung der Decarboxylierung). Eine niedrigere Kohlendioxidkonzentration und damit geringerer Glykogenverbrauch ist bei der drucklosen Gärung anzutreffen. Wird die Hefe bei Druckgärungen rechtzeitig geerntet und die Erntehefe ausreichend belüftet bzw. entgast, kann ein zu weitgehender Verbrauch an Reservekohlenhydraten ausgeschlossen werden. Die Menge an Glykogen, die in Folge einer Belüftung in einem nährstoffarmen Medium verbraucht wird, ist vergleichsweise gering und führt daher nicht zu einer Beeinträchtigung der nachfolgenden Angärung durch einen eventuell zu geringen Glykogenvorrat.

Da die Trehalose nicht die Rolle eines typischen Reservekohlenhydrates erfüllt, unterliegt diese im Vergleich zum Glykogen auch nicht einer so starken Beeinflussung. So sind weder zwischen den einzelnen Druckstufen noch zwischen den einzelnen Stadien einer Gärung (Anstellhefe, Hefe in Schwebelage zum Zeitpunkt der Endvergärung, Erntehefe) Unterschiede in den Konzentrationen zu erkennen. Die Abnahme während der Hefelagerung ist damit zu erklären, daß Trehalose in diesem Abschnitt ebenfalls als Kohlenhydratreserve verstoffwechselt wird. Es zeigt sich, daß Trehalose nicht erst dann von der Hefe verstoffwechselt wird, wenn die Glykogenreserven erschöpft sind. In diesem Fall müßte bei der Druckgärung (2 bar) ein forciertes Abbau zu erkennen sein, da unter diesen Gärbedingungen, wie bereits gezeigt, die stärkste Glykogenverwertung der Hefe im Konus beobachtet wird. Der Trehalosestoffwechsel zeigt aber keine Beeinflussung durch die unterschiedlichen Druckstufen. Wertet man die vermehrte Bildung von Trehalose als Antwort der Hefezelle auf ungünstigere Milieubedingungen, muß gefolgert werden, daß ein erhöhter

$\text{CO}_2$ -Partialdruck nicht zu dieser Kategorie zu zählen ist. Trehalose wird als Streßantwort gebildet, wenn eine Stabilisierung der Zellmembran notwendig ist. Diese tritt bei Austrocknung der Zelle oder dem Einfluß von Detergentien auf. Da aber ein statischer Druck von 2 bar für die Hefe noch keine Belastung darstellt, bleibt die verstärkte Bildung von Trehalose als Schutzmechanismus aus. Auch die geschilderte mögliche Beeinträchtigung des Glykogenstoffwechsels durch einen höheren  $\text{CO}_2$ -Partialdruck wird für den Trehalosestoffwechsel nicht belegt. Dieses ist aber auch verständlich, da die Verwertung von Trehalose unter energetischen Gesichtspunkten als wenig sinnvoll erscheint, solange noch phosphorylierte Kohlenhydrate aus dem Glykogenabbau zur Verfügung stehen. Es bleibt zu klären, warum mit zunehmender Führungsanzahl die Trehalosekonzentration in der Anstellhefe abnimmt. Diese Abnahme tritt für alle drei Druckstufen in gleichem Maße auf.

Bei der Betrachtung des Stickstoffgehaltes der Hefe zeigt sich im Vergleich zum Glykogen und der Trehalose ein gegenteiliges Bild. Mit zunehmendem Druck werden höhere Stickstoffkonzentrationen in der Hefezelle beobachtet. Die Differenzen sind aber zu gering, um daraus Unterschiede zwischen den jeweiligen  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken herleiten zu können. Die niedrigeren Werte bei der drucklosen Führung werden auf die verstärkte Hefevermehrung zurückgeführt, die zu einem stärkeren Verbrauch der eigenen, zuvor angereicherten Stickstoffverbindungen führt. Ein Anstieg der Stickstoffkonzentration mit der in der Literatur beschriebenen nachlassenden Gäraktivität wird nicht festgestellt.

Die eigentlichen Gärverläufe (Extraktabnahmen) werden auch bei höheren  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken im Verlauf mehrerer nacheinander folgender Führungen nicht beeinträchtigt. Zwischen den einzelnen Druckstufen ist der markanteste Unterschied in der Zellvermehrung zu erkennen. Diese gewünschte Beeinträchtigung – um bei höheren Gärtemperaturen die Bildung höherer Alkohole zu reduzieren – ist ebenfalls auf die Inhibierung einer Decarboxylierungsreaktion zurückzuführen. Bei eingeschränkter Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase kommt es zu einer verminderten Bildung von Acetyl-CoA. Es ist eine Vorstufe für die Bildung von Fettsäuren, die für den Aufbau von Zellmaterial unerlässlich sind. Gleichzeitig ist Acetyl-CoA auch ein Ausgangspunkt für die Estersynthese. Daraus ergeben sich ebenfalls die geringeren Esterkonzentrationen bei höheren  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken. Die geringere Menge gebildeter aliphatischer Alkohole steht in direktem Zusammenhang zur Zellvermehrung. Die geringere Zellvermehrung – bedingt durch höhere Kohlendioxidkonzentrationen – und die nachlassende Zellvermehrung im Verlauf nacheinander folgender Führungen ergibt einen geringeren Bedarf an Aminosäuren. Daraus resultiert eine geringere Bildung von Gärungsnebenprodukten im Rahmen der Eigensynthese benötigter Aminosäuren. Wie auch in anderen Versuchsansätzen ist der Unterschied zwischen der ersten Führung und den folgenden markant. Der Unterschied zeigt sich deutlich in einer geringeren Glykogen- und Trehalosekonzentration, einer langsameren Extraktabnahme und in schlechteren Sedimentationseigenschaften der Hefe während der ersten Führung. Im Unterschied zu Ergebnissen, die in der Literatur zu finden sind, wird bei einem hohem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck in mehreren aufeinanderfolgenden Führungen keine Abnahme der Gäraktivität festgestellt. Die Hefebehandlung zwischen den Führungen ist dabei von großer Bedeutung. Der aufgezeigte Regulationsmechanismus (Abb. 6) liefert eine Erklärung, wie bedeutend bei hohen  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken eine Belüftung der Erntehefe ist. Die über mehrere Führungen nahezu konstanten Glykogenkonzentrationen sind ein Indiz für die Gleichmäßigkeit der Gärungen. Die abnehmende Zellneubildung bei aufeinanderfolgenden Führungen zeigt an, daß die Belüftung der Hefe, vor allem der Anstellhe-

fe, aber auch der Anstellwürze nicht ausreichend war, um gleichbleibende Vermehrungsraten zu gewährleisten. Die Auffassung, daß eine Belüftung der Hefe den Abbau der Reservestoffe forciert und daraus Gärstörungen resultieren können, konnte widerlegt werden. Gerade bei hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken ist daher eine Belüftung der Hefe zwingend erforderlich.

#### Danksagung

**Diese Arbeit ist aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft unter der Projektkennziffer AiF 11214N durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) gefördert worden.**

#### 5 Summary

**Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N., and Wackerbauer, K.: Influencing the yeast vitality by physical pressure** — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No 3/4, 44 – 49, 2000

#### BC 41 Brewery yeast

As is known the physical pressure, i. e. CO<sub>2</sub> partial pressure apart from the fermenting temperature (1-3) and the osmotic pressure (4,5), has also an influence on the fermenting behaviour of yeast. The increased concentration of the carbon dioxide dissolved in the fermenting medium leads to strong impairment of the metabolism. In this case the energy metabolism is restricted to a considerably less extent. The practical application of this interrelation is to ferment under pressure at comparably high temperatures without the aroma components (for example, high alcohols) typical for a forced yeast propagation. On the other hand the effects of physical pressure on the yeast vitality have not been researched adequately at all up to now. In the studies it was revealed that the influence of different CO<sub>2</sub> partial pressures on the glycogenous metabolism between the effect on the crop and pitching yeast is different. Primarily different CO<sub>2</sub> partial pressures influence the glycogenous concentration of the crop yeast.

**Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N., et Wackerbauer, K.: Influence de la pression physique sur la vitalité de la levure** — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No 3/4, 44 – 49, 2000

#### BC 41 Levure de brasserie

A côté de la température de fermentation (1 – 3) et de la pression osmotique (4, 5), la pression physique, c'est - à - dire la pression partielle du CO<sub>2</sub>, exerce, comme on le sait, une influence sur le comportement de la levure pendant la fermentation. L'augmentation de la concentration en anhydride carbonique soluble dans le milieu fermentaire conduit à une

forte inhibition des métabolismes. Le métabolisme énergétique est inhibé de façon réduite. L'application pratique de cette liaison conduit à fermenter sous pression à haute température répétée, sans que la multiplication forcée de la levure conduise à une augmentation des composés aromatiques typiques (p. ex. des alcools supérieurs). La répercussion de la pression physique sur la vitalité de la levure n'a pas encore été suffisamment exploré. Les essais ont montré, que l'influence des pressions partielles variables en CO<sub>2</sub> différencie l'effet du métabolisme du glycogène entre la levure de l'entonnement et de la levure à la récolte. Des pressions partielles variables en CO<sub>2</sub> influencent en première ligne la concentration en glycogène de la levure récoltée.

#### 6 Literatur

- Engan, S., und Aubert, O.: Relations between fermentation temperature and the formation of some flavour components, Proc. EBC Congr. 1977 (Amsterdam), 591 – 607.
- Wackerbauer, K., Tayama, T., Fitzner, M., und Kunerth, S.: Zeitgemäßes Management der Anstellhefe – Förderung von Vitalität und Gäraktivität der Hefe (Teil 1), Brauwelt **137**, 80 – 87, 1997.
- Wackerbauer, K., Krämer, P., und Toussaint, H. J.: Technologische Parameter der Esterbildung, Mschr. f. Brauwiss. **33**, 91 – 99, 1980.
- Panchal, C. J., und Stewart, G. G.: The effect of osmotic pressure on the production and the excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain, J. Inst. Brew. **86**, 207 – 210, 1980.
- D'Amore, T., Panchal, C. J., und Stewart, G. G.: The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort, J. Inst. Brew. **93**, 472 – 476, 1987.
- Jones, R. P., und Greenfield, P. F.: Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation, Enzyme Microb. Technol. **4**, 210 – 223, 1982.
- Renger, R. S., van Hatern, S. H., und Luyben, A. M.: The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentations – the effect of carbon dioxide pressure, J. Inst. Brew. **98**, 509 – 513, 1992.
- Knatchbull, F. B.: The effect of low CO<sub>2</sub> pressures on the absorption of amino acids and production of flavour-active volatiles by yeast, J. Inst. Brew. **93**, 420 – 424, 1987.
- Kumada, K. N., Nagami, und T. T., Nakatani, K.: Physiologische Aspekte der Druckgärung, Brauwelt **119**, 712 – 720, 1979.
- Kumada, J., Nakajima, S., Takahashi, T., und Narziß, L.: Einfluß von Druck und Temperatur bei der Gärung auf den Stoffwechsel der Hefe und Bierqualität, Proc. EBC Congr. 1975 (Nizza), 615 – 623.
- Ryder, D. S., Woods, D. R., Murray, J. P., und Masschelein, C. A.: Some practical implications of yeast growth and yeast performance, MBAA Techn. Quart. **20**, 9 – 21, 1983.
- Arcay-Ledezma, G. J., und Slaughter, J. C.: The response of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentation under carbon dioxide pressure, J. Inst. Brew. **90**, 81 – 84, 1984.

(Manuskripteingang: 10. 1. 2000)