

K. Wackerbauer und M. Beckmann

Verschiedene Konservierungsmethoden für Hefen auf dem Prüfstand

Verhalten der Hefestämme bei nachfolgenden Gärungen

Neben den Aspekten der Hefepropagation und der Behandlung der Hefe zwischen den Führungen stellt die Art und Weise der Aufbewahrung der Hefestämme im mikrobiologischen Betriebslaboratorium bzw. in Stammsammlungen einen weiteren Teil des Hefemanagements dar. Die bislang am häufigsten verwendete Stammhaltungsmethode für Hefen ist die Lagerung auf Schrägagar. Als nachteilig hierbei ist jedoch einerseits die Kontaminationsgefahr während der Weiterführung von Nährboden zu Nährboden, andererseits das mögliche Auftreten von Eigenschaftsveränderungen zu nennen. Diese betreffen insbesondere das Flockulationsverhalten und die unterschiedliche Bildung von aromaintensiven Gärungsnebenprodukten. Als Alternative zur Aufbewahrung der Hefen bieten sich die Konservierungsmethoden Lyophilisation, Tiefkühlen in flüssigem Stickstoff und Antrocknen an Filterpapier an, deren Eignung im Rahmen eines Forschungsvorhabens eingehend untersucht wurde.

BC 41 Brauereihefe/ 44 Hefereinzucht/Hefeführung

(Descriptor: Hefestämme, Konservierungsmethoden, Lyophilisation, Tiefkühlung, Trocknung, Viabilität, Vitalität, Flockulation).

Descriptors: Yeast strains, preservation methods, lyophilization, freezing, drying, viability, vitality, flocculation).

1 Einleitung und Literatur

Die Entwicklung der Hefereinzucht durch Emil Christian Hansen, das heißt, die Etablierung reiner Hefestämme in der Brauindustrie, kann als ein bedeutender Meilenstein in Richtung einer modernen Brauereitechnologie angesehen werden. So begannen gegen Ende des letzten Jahrhunderts viele Brauer ausschließlich Reinkulturen einzusetzen, wodurch eine stetige Verbesserung sowohl der Qualität als auch der Gleichmäßigkeit des Produktes Bier angestrebt und zum überwiegenden Teil auch erzielt werden konnte. Über die Aspekte der Isolation, Selektion und Propagation der Hefen wurde seitdem vielfach und ausführlich berichtet.

Im folgenden soll nun ein weiterer Gesichtspunkt betrachtet werden, der im direkten Zusammenhang zur Kultivierung reiner Hefen steht. Es ist dies die Stammhaltung bzw. die Stammpflege der selektierten Hefestämme selbst. Neben der Auswahl technologisch relevanter Hefestämme ist deren Erhaltung eine wesentliche Grundvoraussetzung für den späteren industriellen Einsatz. Hierbei werden solche Stämme in Stammsammlungen der wissenschaftlichen Spezialinstitute, aber auch in manchen Betrieben der Brauindustrie in unterschiedlicher Form geführt.

An die Aufbewahrung der Hefen müssen prinzipiell folgende Anforderungen gestellt werden:

- Gewährleistung einer ausreichend hohen Viabilität und Vitalität der Hefen nach erneutem Überführen in günstige Wachstumsbedingungen und dies auch über einen längeren Zeitraum von mehreren Monaten bis einigen Jahren. Unter dem Begriff Viabilität versteht man den Anteil lebender bzw. zum Anwachsen fähiger Hefezellen in einer Hefesuspension. Der Begriff Vitalität ist hingegen wesentlich weiter gefaßt und beschreibt sowohl die Gärleistung der Hefe, die metabolische Aktivität, das Sauerstoffaufnahme- und Säurebildungsvermögen, die Reduktionskraft und den Gehalt an Zellinhaltsstoffen, wie z. B. Glykogen und Trehalose (18).
- Erhaltung der technologischen Eigenschaften der Hefestämme, weil nur hierdurch über viele Jahre eine konstante Bierqualität erzielt werden kann.
- Garantie der Kontaminationsfreiheit der Kulturen.

Zunächst sollen an dieser Stelle einige gebräuchliche Methoden zur Aufbewahrung von Hefen vorgestellt werden. Als die wohl älteste und bis vor wenigen Jahrzehnten noch meistbenutzte Methode ist die Lagerung der Hefen auf Schrägagar bei Temperaturen um 4 – 6 °C zu nennen. Hierbei erfolgt in der Regel im Abstand von acht bis zwölf Wochen eine Überführung der Hefe auf neuen, frischen Schrägagar. Als nachteilig ist neben dem bei einer umfangreichen Stammsammlung anfallenden hohen Arbeitsaufwand beim regelmäßigen Weiterführen von Schrägagar zu Schrägagar die damit verbundene Kontaminationsgefahr zu nennen. Weiterhin zu beachten ist hierbei auch das mögliche Auftreten von Eigenschaftsveränderungen. Speziell bei Bruchhefen kann sich dies verstärkt in einer Änderung des Flockulationsverhaltens bemerkbar machen. Erfahrungen diesbezüglich zeigen, daß manche solcher flockulanten Hefestämme bei mehrjähriger Lagerung auf Schrägagar mit häufigem Weiterführen ihr Bruchbildungsvermögen mehr und mehr verlieren können. *Thorne* (1) beschrieb 1963 ein solches Phänomen und begründete dies

Autoren: Prof. Dr.-Ing. Karl Wackerbauer und Dipl.-Ing. Martin Beckmann, Forschungsinstitut für Technologie der Brauerei und Mälzerei der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB), Seestraße 13, 13353 Berlin — erweiterte Fassung des gleichnamigen Vortrages, gehalten von Dipl.-Ing. Martin Beckmann anlässlich der 86. Brau- und Maschinentechnischen Arbeitstagung der VLB am 9. März 1999 in Salzburg

damit, daß der in dem seinerzeit näher untersuchten Bruchhefestamm stets vorhandene Anteil an Staubhefen durch eine spontan auftretende Mutation flockulenter in Richtung nicht flockulenter Zellen nachhaltig erhöht wurde. Parallel dazu trat möglicherweise auch eine ebenfalls mutationsbedingte Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit bei den „staubigen“ Hefen auf, so daß vermutlich auf diesem Weg über die Zeitspanne von zweieinhalb Jahren aus dem flockulenten ein gänzlich nicht flockulenter Hefestamm entstand. Die Lagerung der Hefen auf Schrägagar, vor allem bei sehr häufigem Weiterführen in kurzen Abständen, muß demnach als alleinige Methode zur langjährigen Aufbewahrung der Hefen zunächst mit Vorsicht betrachtet werden.

Aus eben diesen Gründen wurden während der letzten Jahrzehnte zahlreiche neue Methoden für die Stammhaltung entwickelt. So zählt zu den einfacheren Methoden die Lagerung der Hefen in Schrägagarröhrchen, die mit sterilem, flüssigem Paraffin überschichtet sind. Ziel dieser Methode ist, das Austrocknen des Agars zu verhindern und zugleich das Wachstum der Hefen zu drosseln. Wie *Rehberg* (2) beschrieb, kann jedoch Sauerstoff nach wie vor in bestimmtem Umfang in die Röhrchen diffundieren, so daß auch weiterhin ein, wenngleich geringes Wachstum der Hefen festzustellen ist. Dies ist gekoppelt mit einer Anreicherung des Agars mit verschiedenen Stoffwechselprodukten der Hefe, beispielsweise Ethanol, höheren Alkoholen und Estern, was auf Dauer der Viabilität und Vitalität der Hefen abträglich sein kann. Wachstum sollte aber, im Sinne einer echten Konservierung, auf jeden Fall vollständig unterdrückt werden, weil nur dadurch das Auftreten von Mutationen bzw. die Selektion und Anreicherung von Hefen mit gänzlich anderen Charakteristika vermieden werden können.

Als echte Konservierungsmethoden im Sinne einer vollständigen Hemmung sämtlicher Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten gelten allgemein die Trocknungs- und Tiefkühlverfahren. Hierzu zählen so gebräuchliche Methoden wie die Gefriertrocknung (= Lyophilisation) und die Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff (2-13). Weniger häufig beschrieben, insbesondere hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf die technologischen Eigenschaften, wurde bislang die Methode „Antrocknen der Hefen an Filterpapierstreifen“ (14, 15). Auf diese drei Konservierungsmethoden soll an dieser Stelle nun näher eingegangen werden.

Das typische Kennzeichen der Gefriertrocknung ist die Entfernung des Wassers aus den zuvor eingefrorenen Zellen. An die Stelle des bei normaler Trocknung stattfindenden Phasenübergangs flüssig-gasförmig tritt hier die Sublimation des Wassers mit den Phasenübergängen flüssig-fest-gasförmig. Demgegenüber findet bei der Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff ein Einfrieren der Mikroorganismen bei Temperaturen von -196 °C statt (3). Werden diese beiden Verfahren unter Voraussetzung gleich guter Konservierungsergebnisse beurteilt, dann weist die Gefriertrocknung insbesondere einen großen Vorteil gegenüber der Tiefkühlung auf. Gefriergetrocknete und unter Vakuum verschlossene Kulturen können nämlich auch bei Raumtemperatur ohne Aufwand für Klimatisierung und Pflege auf engstem Raum gelagert und bei Bedarf jederzeit problemlos transportiert und in die entferntesten Winkel der Welt verschickt werden.

Als eine reine Trocknungsmethode kann das Antrocknen der Hefen – nach vorheriger Suspendierung in einem Schutzmittel, wie z. B. Kondensmilch – an Filterpapierstreifen bezeichnet werden. Der große Vorteil, gleichfalls unter Voraussetzung eines ebenbürtigen Konservierungserfolges, sind primär die wesentlich geringeren Kosten gegenüber der Gefriertrocknung und der Tiefkühlung. Es sind weder Gefriertrocknungs- noch Tiefkühlvorrichtungen erforderlich, empfohlen wird lediglich das Aufbewahren der Hefen bei Kühlschranktemperaturen zwischen 4 und 6 °C ,

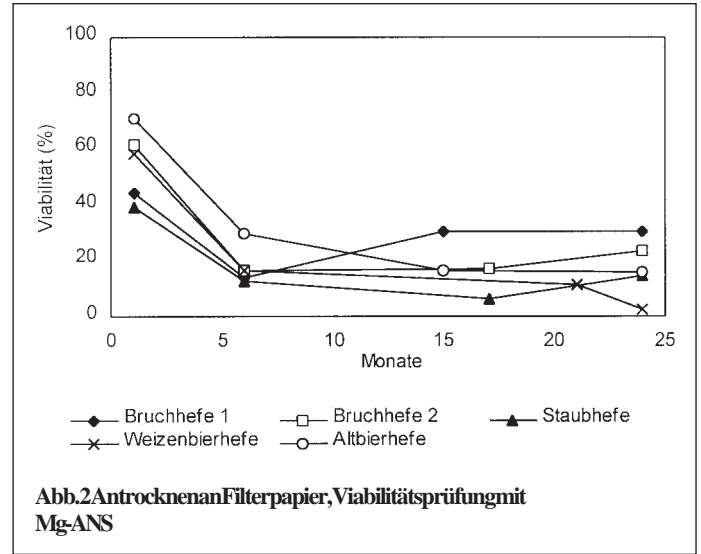
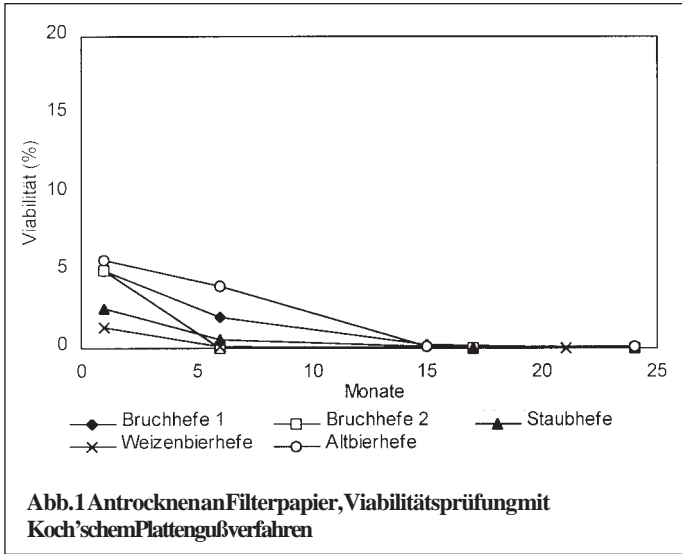
nach Möglichkeit in einem Exsikkator bzw. in gut verschließbaren Behältern in Anwesenheit eines geeigneten Trockenmittels (14, 15). Folglich kann der erforderliche Materialaufwand für diese Methode als eher gering bezeichnet werden.

Die aus der Literatur auf diesem Gebiet der Konservierung von Hefen verfügbaren Forschungsergebnisse deuten an, daß wohl keine universell für alle Hefegattungen, -arten und -stämme gleich gut geeignete Methode existiert, der man bedenkenlos den Vorzug geben könnte. Berücksichtigt werden muß hierbei jedoch, daß die Konservierungsparameter Vorzucht der Hefen, Alter, Ernte und Vorbereitung des Zellmaterials, Durchführung der Konservierung, Wahl der Schutzmittel bzw. der Vorzuchtmedien, Aufbewahrung der Dauerkulturen und Reaktivierung der Hefen teilweise sehr unterschiedlich gewählt werden, so daß hier nach wie vor keine eindeutige Klarheit über die Eignung der Methoden existiert. Die Methoden zur Bestimmung der Viabilität können größtenteils als zu ungenau charakterisiert werden. Es wird einerseits nur festgestellt, ob sich die Hefen überhaupt reaktivieren lassen, das heißt, man verzichtet auf eine möglichst exakte Bestimmung der Überlebensraten, andererseits kommt zur lebend-tot-Bestimmung lediglich Methylenblau zur Anwendung, was als alleinige Methode aus heutiger Sicht unzureichend ist (17). Der Schwerpunkt der technologischen Untersuchungen liegt überwiegend im Bereich reiner Laborgärungen, wobei zumeist auf einige wenige Analyseergebnisse für höhere Alkohole und Ester, die erzielten Vergärungsgrade und das Flockulationsverhalten nach einer einzigen beschriebenen Gärung eingegangen wird. An dieser Stelle setzten nun die folgenden Untersuchungen an, deren Ziel es war, verschiedene Konservierungsmethoden auf den Prüfstand zu stellen und die Auswirkungen auf den Konservierungserfolg und speziell die technologischen Eigenschaften der Hefen zu beleuchten.

2 Versuchsprogramm und Versuchsdurchführung

Das Versuchsprogramm A umfaßte fünf Hefestämme, die eine repräsentative Auswahl gängiger Brauereihefen darstellen. Es handelte sich hierbei im einzelnen um zwei weitverbreitete untergärige Bruchhefen 1 und 2, eine Staubhefe, sowie eine Altbier- und eine Weizenbierhefe. Diese Hefen wurden mittels der Methoden Lyophilisation, Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff und Antrocknen an Filterpapierstreifen konserviert und dann über einen Zeitraum von zwei Jahren gelagert. Für die Konservierung wurden jeweils Zellen aus der stationären Phase verwendet. Als Schutzmittel kamen für das Antrocknen an Filterpapierstreifen Kondensmilch, für die Tiefkühlung Glycerin und für die Lyophilisation Magermilch zum Einsatz. In regelmäßigen Abständen erfolgte die Reaktivierung der Hefen, die Bestimmung der Viabilität und die Durchführung von sechs sukzessiven Gärungen im 5-Liter-Maßstab in Steilbrust-Glasflaschen. Hierfür wurden zwecks Standardisierung des Substrates 11,5% ige Würzen aus Würzepulver bereitet und bei Temperaturen von 12 °C zur Gärung gebracht. Das Würzepulver selbst wurde hierfür aus gehopfter Ausschlagwürze eines Sudes, stammend aus einer Großbrauerei, hergestellt. Als Vergleich dienten jeweils die nicht konservierten Stämme, die auf Schrägagar lagerten und alle sechs Monate neu überimpft wurden. Angestellt wurde jeweils mit 20 Mio Zellen/ml. Von Interesse waren einerseits die erzielten Vergärungsgrade, andererseits das Spektrum der gebildeten Gärungsnebenprodukte.

Das Versuchsprogramm B beinhaltete primär eine Betrachtung der Stabilität des Flockulationsverhaltens der Bruchhefen nach 15 bis 24 Monaten Lagerzeit über mehrere sukzessive Gärungen, die bei 15 °C in EBC-Gärrohren durchgeführt wurden.



Im Versuchsabschnitt C wurden mit der Bruchhefe 1 Propagationsversuche durchgeführt, woran sich zwei Führungen bei 15 °C im 30-Liter-Maßstab anschlossen. Die 12 % igen Würzen wurden für diesen Versuch aus Pilsener Malz in der Studienbrauerei des Forschungsinstitutes für Technologie der Brauerei und Mälzerei der VLB hergestellt. Es kamen konservierte Hefen zum Einsatz, die zuvor 15 Monate gelagert wurden.

Zur Überprüfung der Viabilität kamen durchgängig die Fluoreszenzfärbung der Hefen mittels Mg-ANS (Magnesiumsalz der 1-Anilino-8-Naphthalen-Sulfonsäure) sowie insbesondere das Koch'sche Plattengußverfahren zur Anwendung. Speziell für die Überprüfung des Konservierungserfolges sind die Plattenmethoden den Färbemethoden vorzuziehen, da nur hierdurch eine sichere Beurteilung möglich ist, wieviele Zellen tatsächlich in der Lage sind, nach der Reaktivierung erneut anzuwachsen (16 – 18).

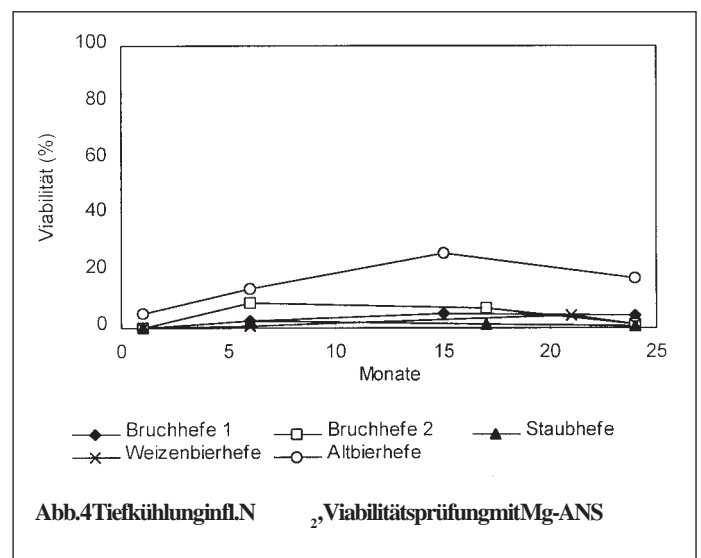
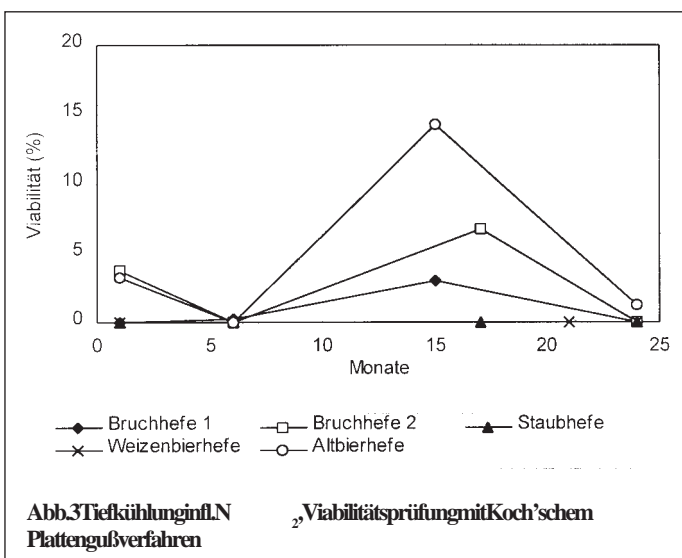
3 Ergebnisse und Diskussion

In den Abb. 1 und 2 werden zunächst die Ergebnisse der Reaktivierung der an Filterpapierstreifen getrockneten Hefen über den Untersuchungszeitraum dargestellt.

Es ist hier auffällig, daß über den untersuchten Zeitraum eine von Stamm zu Stamm unterschiedlich stark ausgeprägte Abnahme der Viabilität stattfand, wobei dies insbesondere bei Betrachtung der mittels Koch'schem Plattengußverfahren erzielten Resultate deutlich wird. Vor allem die Weizenbierhefe wies sowohl bei der Prüfung mittels Fluoreszenzfärbung als auch beim Plattengußverfahren eine kontinuierliche Abnahme der Viabilität auf, während bei den übrigen Stämmen entsprechend der Mg-ANS-Färbung keine Änderung der Viabilität hätte stattfinden sollen. Tatsächlich konnte jedoch spätestens ab dem 15. Monat nur noch ein äußerst geringer Prozentsatz der Zellen als wirklich zum Anwachsen fähig bezeichnet werden.

Ein anderes Bild lieferten die Reaktivierungen der in flüssigem Stickstoff tiefgekühlten Hefen (Abb. 3 und 4).

Laut Fluoreszenzfärbung wiesen sämtliche Hefen, mit Ausnahme der Altbierhefe, bereits nach einem Monat eine sehr niedrige Viabilität auf, die über den weiteren Untersuchungszeitraum auf mehr oder weniger konstant niedrigem Niveau blieb. Mittels Koch'schem Plattengußverfahren konnte überraschenderweise bei den zwischen dem 15. und 17. Monat reaktivierten Hefen, insbesondere bei der Altbier- und auch bei den beiden Bruchhefen, eine deutliche Erhöhung der Viabilität in der untersuchten Probe



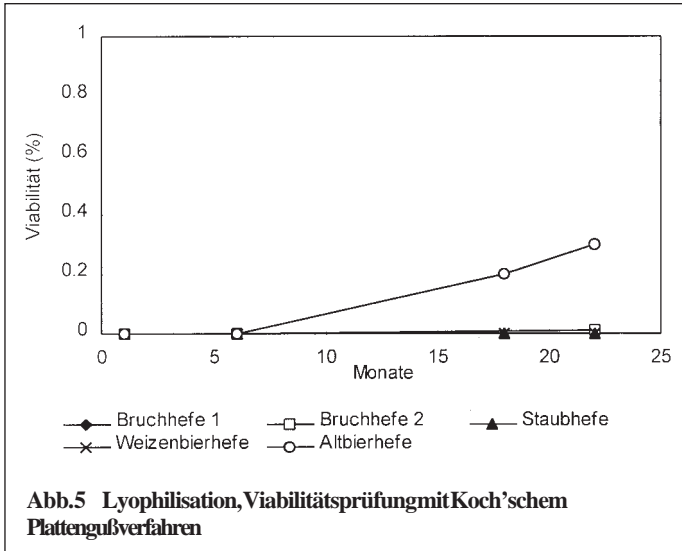


Abb.5 Lyophilisation, Viabilitätsprüfung mit Koch'schem Plattengußverfahren

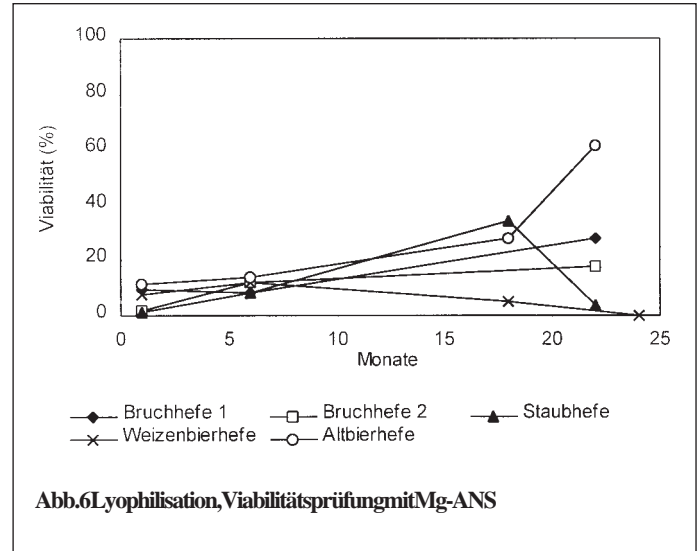


Abb.6 Lyophilisation, Viabilitätsprüfung mit Mg-ANS

ermittelt werden, wohingegen nach zwei Jahren erneut sehr niedrige Werte festgestellt wurden, so daß nicht von einer eindeutigen Änderung der Viabilität über den gesamten Versuchszeitraum auszugehen ist. Erneut fiel hier die Weizenbierhefe mit stets extrem niedrigen Viabilitäten negativ auf.

Die schlechtesten Konservierungsergebnisse, zumindest was die Zahl der tatsächlich angewachsenen Zellen betrifft, wurden mit der Lyophilisation erzielt (Abb. 5 und 6).

Positiv fiel lediglich erneut die Altbierhefe auf, wengleich auch hier die erzielten Viabilitäten, bei Betrachtung der Skalierung der Y-Achse, als sehr niedrig zu bezeichnen sind. Anzumerken ist, daß sich die lyophilisierte Weizenbierhefe bereits nach sechsmonatiger Lagerzeit nicht mehr reaktivieren ließ, wengleich die Mg-ANS-Färbung nach wie vor einen Anteil an lebenden Zellen andeutete, der merklich größer Null war. Gerade am Beispiel der Lyophilisation wird also deutlich, daß es für die Beurteilung einer Konservierungsmethode eminent wichtig ist, neben den Färbemethoden auch Plattenverfahren zur Ermittlung der tatsächlich zum Wachstum fähigen Zellen einzusetzen.

Die sehr niedrigen Überlebensraten, insbesondere bei der Lyophilisation und der Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff, waren Anlaß, noch während des Untersuchungszeitraumes eine Wiederholung der Konservierung durchzuführen, wobei neben einer Modifikation der Durchführung der Konservierung auch das Alter der Vorzucht von 24 bis 72 h variiert wurde. Hier war zu beobachten, daß insbesondere dann zumindest bei der Lyophilisation merklich bessere Viabilitäten von teilweise größer zehn Prozent laut Plattengußverfahren erzielt werden konnten, wenn Zellen aus der stationären Phase (nach 48 bzw. 72 h) konserviert wurden. Eine Kontrolle der Viabilität nach dreimonatiger Lagerung der Lyophilisate deutete, wie schon bei der Tiefkühlung erwähnt, keine eindeutige Veränderung der Überlebensraten an. Entscheidend für den Konservierungserfolg ist demnach offensichtlich die Höhe des Ausgangsniveaus an lebenden Zellen unmittelbar nach deren Konservierung, wobei die während der anschließenden Lagerung auftretende Abnahme der Viabilität als eher gering bezeichnet werden kann. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den bisherigen Erfahrungen mit der Konservierungsmethode Antrocknen an Filterpapierstreifen, bei der, wie bereits zuvor beschrieben, eine stetige Abnahme der vermehrungsfähigen Zellen auftrat.

In direktem Zusammenhang zur Konservierbarkeit der Hefestämme steht zahlreichen Veröffentlichungen zufolge die Menge an

intrazellulär akkumulierter Trehalose (z. B. 13, 19). Hefen, die über eine größere Menge dieses zelleigenen Schutzmittels verfügen, sollten demnach auch eine größere Resistenz gegenüber physiologisch ungünstigen Milieubedingungen wie Trockenheit, subletale Wärme und rasches Einfrieren bei niedrigen Temperaturen besitzen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Weizenbierhefe auch nach der modifizierten Lyophilisation bereits von Beginn an erneut eine auffällig niedrige Viabilität aufwies. Bereits zwölf Monate später war auch hier eine erfolgreiche Reaktivierung nicht mehr möglich.

Parallel zu den Konservierungen wurde auch der Trehalosegehalt in den fünf Hefestämmen ermittelt (Tab.1), und es konnte festgestellt werden, daß just die Weizenbierhefe auch während der stationären Phase extrem wenig Trehalose akkumulierte, was bei nachfolgenden Bestimmungen bestätigt wurde. Hier könnte also eine direkte Beziehung zu den niedrigen Überlebensraten vorliegen, wobei dies jedoch in weiteren Untersuchungen näher zu betrachten ist.

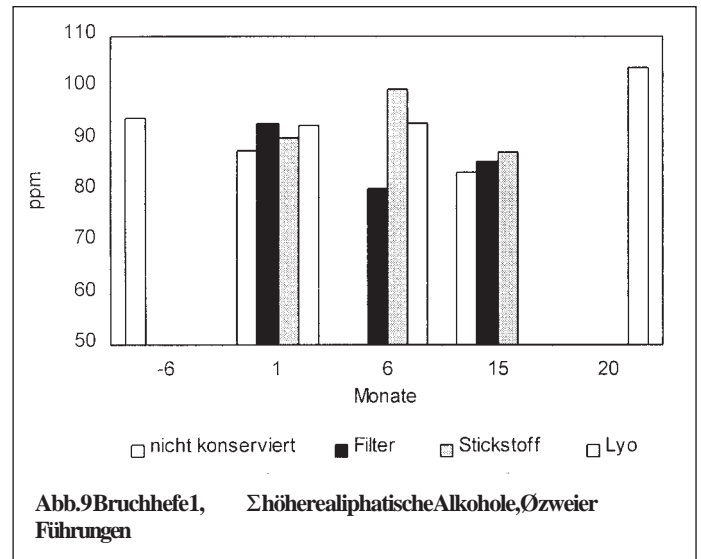
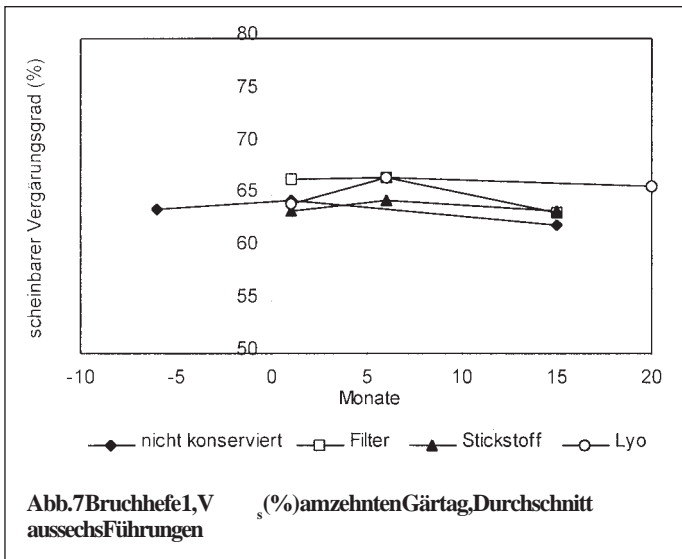
Stellvertretend für die fünf Hefestämmen sollen nun einige Ergebnisse der technologischen Untersuchungen für die beiden Bruchhefen und für die Staubhefe dargestellt werden.

Der Versuchsabschnitt A umfaßte die bereits zuvor erwähnten Gärungen in Steilbrust-Glasflaschen. Anzumerken ist, daß die resultierenden Biere in diesem Fall keiner sensorischen Beurteilung unterzogen wurden. Von Interesse war hier primär die Menge an gebildeten Gärungsnebenprodukten und die Gärleistung der Hefen.

Bei Bruchhefe 1 konnten bei den einen Monat nach der Konservierung durchgeführten Gärungen zunächst gewisse Unterschiede in den durchschnittlich erzielten Vergärungsgraden zwischen den mit verschiedenen Methoden konservierten Hefen festgestellt werden (Abb. 7). Hier zeigte die Filterpapier-Hefe die höchste, die tiefgekühlte Hefe hingegen die niedrigste Gärleistung. Auch sechs Monate später konnte die Filterpapier-Hefe auf quasi gleich

Tab.1 Trehalosegehalte (% TrS) der Hefen nach 72stündiger Vorzucht

Bruchhefe 1	Bruchhefe 2	Staubhefe	Weizenbierhefe	Altbierhefe
4,1	5,3	3,7	0,1	1,9



hohem Niveau gären. Sowohl die lyophilisierte als auch die tiefgekühlte Hefe wiesen in den Gärungen nach sechs Monaten Lagerzeit eine geringfügig bessere Gärleistung auf als nach einem Monat. Gerade die lyophilisierte Hefe erzielte auch nach 20 Monaten unverändert hohe scheinbare Vergärungsgrade. Da die nach 15 Monaten durchgeführten Gärungen aus technischen Gründen leider bei 10 statt wie zuvor bei 12 °C durchgeführt werden mußten, ergaben sich als Konsequenz in allen Ansätzen um 2 bis 4 % niedrigere Vergärungsgrade.

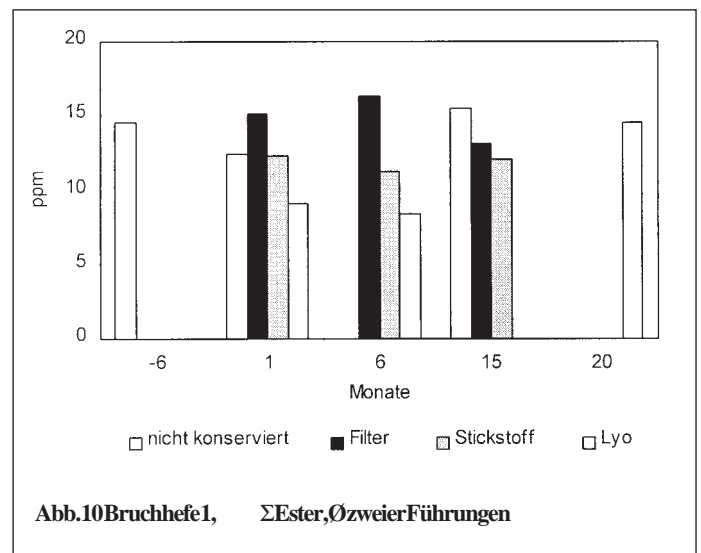
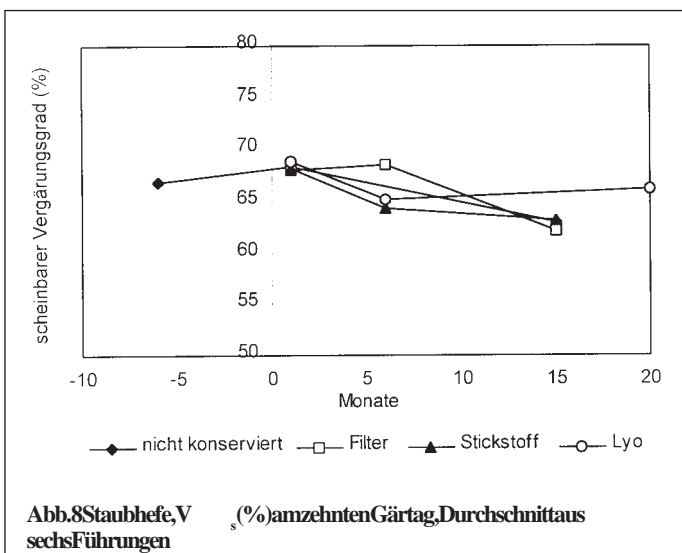
Die nach einem Monat reaktivierten Staubhefen sowie die entsprechende nicht konservierte Hefe zeigten eine ungefähr gleiche durchschnittliche Gärleistung (Abb. 8). Auffällig nach sechs Monaten war, daß mit Ausnahme der Filterpapier-Hefe eine geringfügige Abnahme in der Gärleistung festzustellen war. Nach 15 Monaten konnten, im Vergleich zur mitgeführten nicht konservierten Hefe, zwischen den Filterpapier- und den tiefgekühlten Hefen bei erneut um 2 °C niedrigerer Gärtemperatur keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Die nach 20 Monaten durchgeführten Gärungen mit der lyophilisierten Staubhefe ergaben durchschnittliche Vergärungsgrade auf ähnlichem Niveau wie nach sechs Monaten.

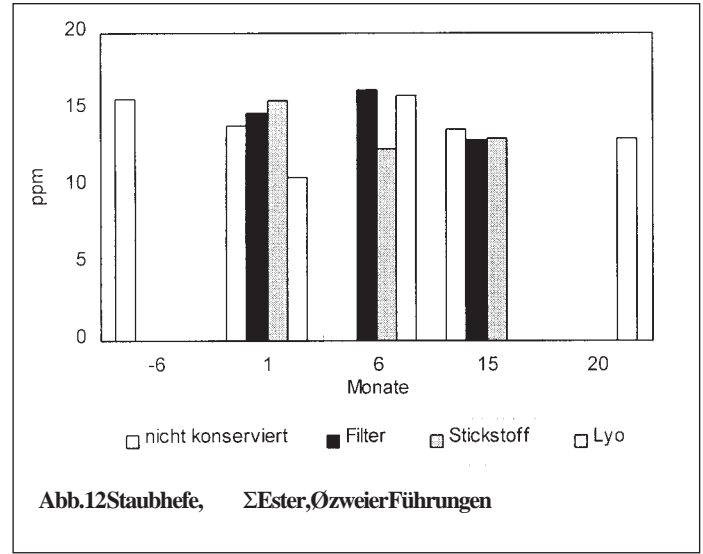
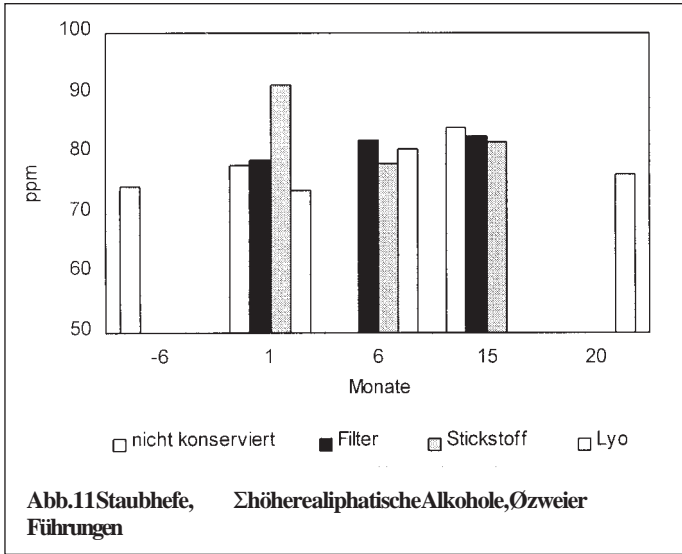
Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß die mit den konservierten Hefen durchgeführten Gärungen bezüglich der erzielten

Vergärungsgrade keineswegs schlechter abschnitten, als dies mit der entsprechenden nicht konservierten Hefe der Fall war. Bezüglich dieses wichtigen Aspektes schien demnach keine der untersuchten Konservierungsmethoden, und das über einen längeren Untersuchungszeitraum, gegenüber der klassischen Methode (Aufbewahrung der Hefen auf Schrägagar) benachteiligt zu sein.

Stellvertretend für die gebildeten Gärungsnebenprodukte sollen an dieser Stelle die zwei für das Bieraroma wichtigsten Gruppen, nämlich die der höheren aliphatischen Alkohole und der Ester, dargestellt werden.

Grundsätzlich konnten bezüglich dieser Gärungsnebenprodukte gewisse Schwankungen zwischen den konservierten und nicht konservierten Bruchhefen 1 festgestellt werden (Abb. 9). Das Gros der Durchschnittswerte bewegte sich hier, von zwei Ausnahmen abgesehen, in der Größenordnung von 82 – 92 ppm. Im Vergleich zur nicht konservierten Hefe wurden von den konservierten Hefen durchschnittlich mehr höhere aliphatische Alkohole gebildet. Bei den untersuchten Estern, hier vor allem Ethylacetat und Isoamylacetat, bewirkten insbesondere die nicht konservierte und die Filterpapier-Hefe in der Summe die durchschnittlich höchsten Konzentrationen. Deutlich weniger Ester wurden hingegen von der lyophilisierten Hefe nach einem und sechs Monaten gebildet (Abb. 10).





Bei der Staubhefe waren, mit einer Ausnahme bei der tiefgekühlten Hefe nach einem Monat, recht gleichmäßige Ergebnisse bezüglich der höheren aliphatischen Alkohole und Ester festzustellen. Eindeutige konservierungsbedingte Unterschiede waren somit hier nicht zu erkennen (Abb. 11 und 12).

Um nun genauere Aussagen über das Flockulationsverhalten der Hefen treffen zu können, wurden im folgenden Versuchsabschnitt B sechs Führungen in EBC-Gärrohren durchgeführt. Dabei wurden sowohl das Absetzverhalten der Hefen als auch mögliche Unterschiede hinsichtlich der erzielten Vergärungsgrade betrachtet. Von besonderem Interesse war primär das Flockulationsverhalten der Bruchhefen 1 und 2, weil sich hier mögliche konservierungsbedingte Einflüsse vermutlich am deutlichsten auswirken werden. Die Hefen wurden für diese Untersuchungen nach 15 Monaten (nicht konserviert, tiefgekühlt bzw. an Filterpapierstreifen getrocknet) sowie nach 20 Monaten (lyophilisiert) aerob unter kontinuierlichem Rühren und permanenter Belüftung bei 20 °C in Steilbrust-Glasflaschen bis in die stationäre Phase propagiert und anschließend für die Gärungen eingesetzt. Ausgehend von annähernd gleichem Ausgangsniveau der Zellzahl waren nach 48 Stunden Propagationszeit gewisse Unterschiede in der maximal erzielten Zelldichte festzustellen. Bei Stamm 1 wies die tiefgekühlte Hefe in diesem Ansatz mit 220 Mio Zellen/ml die höchste Endzellzahl auf, bei Stamm 2 hingegen konnte bei der Filterpapier-Hefe mit 207 Mio Zellen/ml die höchste Zelldichte erzielt werden.

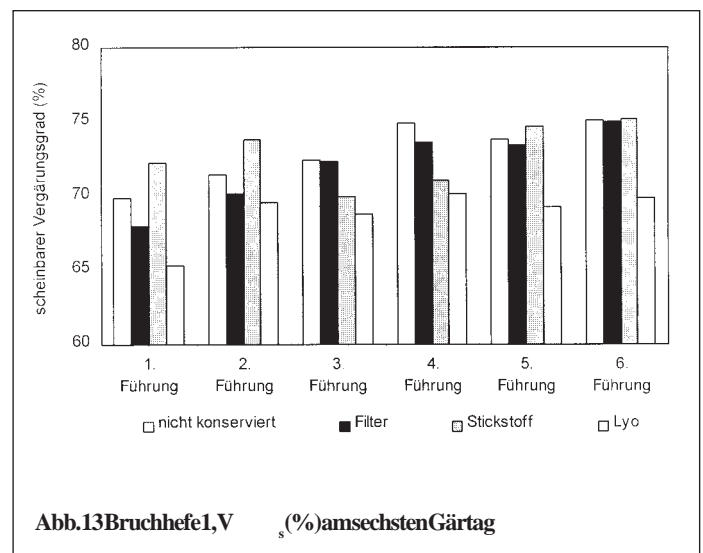
Bei Betrachtung der spezifischen Wachstumsraten μ ist zu erkennen, daß lediglich die lyophilisierte Bruchhefe 2 mit $\mu = 0,094$ gegenüber der nicht konservierten Hefe abfiel (Tab. 2).

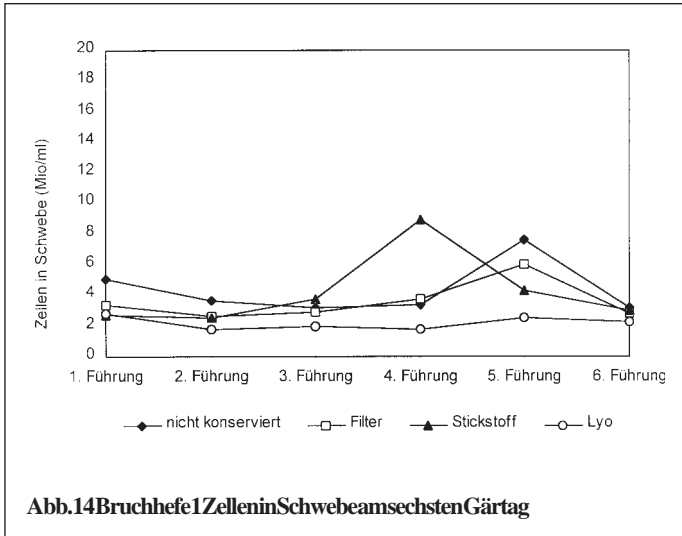
In den folgenden Abbildungen sind die in den anschließenden sechs Führungen erzielten Vergärungsgrade am sechsten Gärtag und die Zahl der noch in Schwebel befindlichen Zellen dargestellt. Betrachtet man zunächst die Gärungen mit der Bruchhefe 1, so fällt auf, daß die aus der Propagation kommenden Hefen insbeson-

dere in den ersten Führungen jeweils unterschiedlich hohe Vergärungsgrade am sechsten Gärtag erzielten (Abb. 13). Mit zunehmender Zahl der Führungen wurde dann jedoch, mit Ausnahme der tiefgekühlten Hefe in der dritten und vierten Führung, ein stetiger Anstieg der Gärleistung beobachtet. Auffällig war hier aber die lyophilisierte Hefe, die ganz offensichtlich in allen Gärungen den mit Abstand niedrigsten Vergärungsgrad erzielte. In diesem Zusammenhang ist natürlich auch das Flockulationsverhalten der Hefen von Interesse. Die Bruchhefe 1 ist erwiesenermaßen eine für Brauereihefen recht stark flockulierende Hefe. Dies kann anhand der dargestellten Zellzahlen in Schwebel am sechsten Gärtag über die gesamte Serie bestätigt werden. Als eine Ursache für die relativ niedrigen Vergärungsgrade der mit der lyophilisierten Hefe hergestellten Biere ist das frühzeitige und durchgehend auch sehr kompakte Absetzverhalten dieser Hefe zu nennen, das sich auch in den gleichmäßig niedrigen Zellzahlen in Schwebel widerspiegelt. Betont werden muß jedoch, daß bei sämtlichen Hefen weder ein eindeutiges „Staubigwerden“ noch eine Zunahme der Flockulationsneigung über die Serie zu beobachten war (Abb. 14).

Die Bruchhefe 2 scheint, bei Betrachtung der Zellzahlen, stammtypisch weniger flockulent aber höhervergärend zu sein als Bruchhefe 1. Die erzielten Vergärungsgrade fielen über die gesamte

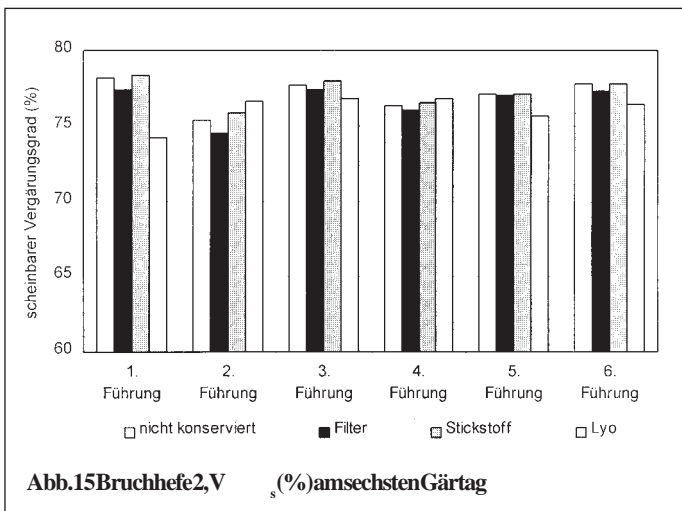
Bruchhefe	nicht-konserviert	Filter	N ₂	Lyo
1	0,092	0,090	0,099	0,099
2	0,104	0,119	0,115	0,094



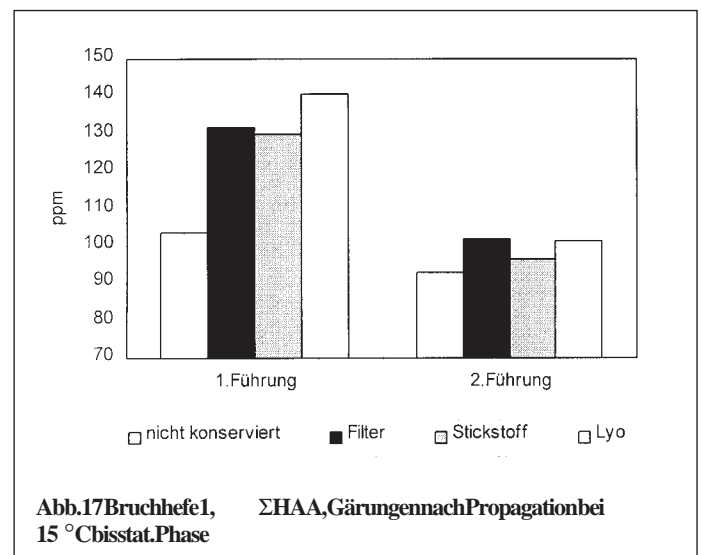
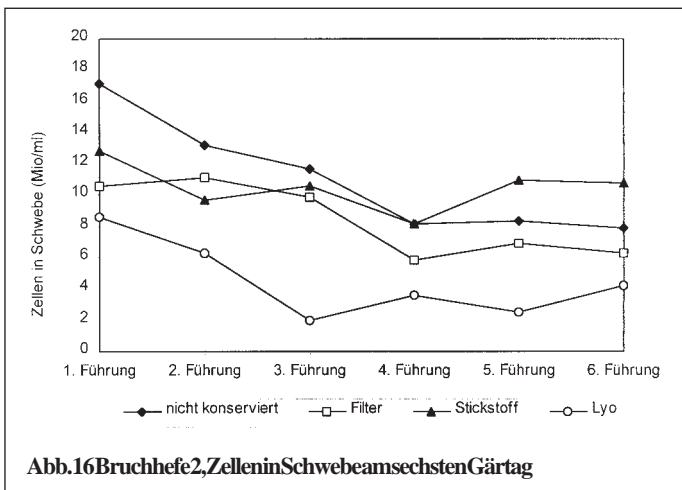


Die Ergebnisse der Bieranalysen, insbesondere hinsichtlich der wichtigen Gärungsnebenprodukte, deuteten im Fall der lyophilisierten Bruchhefen 1 und 2 merkliche Erhöhungen der vicinalen Diketone an, welches konform geht mit der insgesamt stärkeren Flockulationsneigung bzw. der schwächeren Gärleistung. Weiterhin auffällig war bei beiden lyophilisierten Hefen zudem eine deutlich geringere Esterbildung.

Besonders auffällig bei den Propagationsversuchen in Versuchsabschnitt C war, daß hierbei sämtliche konservierten Hefen in der ersten Führung deutlich mehr höhere aliphatische Alkohole (HAA) bildeten als die nicht konservierte Hefe, wobei sich die Konzentrationen in der zweiten Führung stärker anglichen (Abb 17). Hierbei ist zu vermuten, daß die Konservierung zumindest in der ersten Führung den Stoffwechsel der Hefen im Rahmen des Ehrlich-Mechanismus und der Biosynthese von Aminosäuren und damit auch die Synthese der höheren aliphatischen Alkohole nachhaltig beeinflusst hat. Sensorisch wurden die Biere der zweiten Führung in jedem Fall besser und gleichmäßiger beurteilt, wobei hier keine eindeutigen geschmacklichen Unterschiede festzustellen waren.



Bei den bislang durchgeführten Gärungen mit den Staub-, Alt-, und Weizenbierhefen ergab sich prinzipiell ein ähnliches Bild. Sämtliche untersuchten Hefestämme schienen dabei ihren grundsätzlichen Charakter nach der Konservierung beibehalten zu haben. Dennoch konnten, was die Intensität der Ausprägung der stammtypischen Eigenschaften betrifft, durchaus Verstärkungen bzw. Abschwächungen beobachtet werden. An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, daß begleitend zu den technologischen Untersuchungen im Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Berlin eingehende genetische Kontrollen der konservierten Hefen mittels RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) durchgeführt wurden. Hier konnten im Vergleich zu den nicht konservierten Ausgangsstämmen keine Änderungen auf DNA-Ebene festgestellt werden. In weiteren Untersuchungen soll nun ein besonderes Augenmerk auf Maßnahmen zur Verbesserung der Überlebensraten bei den verschiedenen Konservierungsmethoden gelegt werden. Nach Erzielung möglichst hoher Viabilitäten, die unter Voraussetzung einer geeigneten Lagerung der konservierten Hefen auch eine langjährige sichere Aufbewahrung gewährleisten, erscheint es abschließend sinnvoll, erneut die technologischen Eigenschaften der Stämme, auch in Hinblick auf den wichtigen Aspekt Geschmackstabilität, zu überprüfen.



Serie recht gleichmäßig aus, wobei hier die lyophilisierte Hefe trotz stärkerer Flockulation annähernd noch gleichhohe Vergärungsgrade wie die übrigen Hefen erzielen konnte. Die geringfügigen Unterschiede in den Zellzahlen sollten jedoch auf keinen Fall überinterpretiert werden, da sich diese insgesamt auf verhältnismäßig niedrigem Niveau bewegten. Somit schien sich auch während dieser Serie das Flockulationsverhalten nicht wirklich geändert zu haben (Abb. 15 und 16).

4 Zusammenfassung

Es lassen sich die bis dato vorliegenden Ergebnisse der „Konservierungsmethoden für Hefen auf dem Prüfstand“ wie folgt formulieren:

- Die untersuchten Konservierungsmethoden Antrocknen an Filterpapierstreifen, Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff und Lyophilisation unterschieden sich zunächst hinsichtlich der nach der Konservierung erzielten Viabilitäten. Hier schien das Antrocknen an Filterpapierstreifen den Hefen anfänglich weniger Schaden zugefügt zu haben als die Tiefkühlung und die Lyophilisation. Mit zunehmender Lagerzeit der Konserven kam es bei den getrockneten Hefen jedoch zu einer stetigen Abnahme der Viabilität, wogegen die Abnahme der lebenden Zellen bei der Tiefkühlung und Lyophilisation als sehr gering bezeichnet werden kann.
- Es waren zudem deutliche hefestammspezifische Einflüsse festzustellen. In allen Fällen ließ sich vor allem die Weizenbierhefe, auch unter optimierten Bedingungen in der stationären Phase, äußerst schlecht konservieren.
- Die Ergebnisse der technologischen Untersuchungen deuten an, daß durch die verschiedenen Konservierungsmethoden der grundsätzliche Charakter der Hefen, hier insbesondere das Flockulationsverhalten, nicht verändert wurde. Dabei konnten jedoch gewisse Verstärkungen und Abschwächungen der stammspezifischen Eigenheiten, wie die Flockulationsintensität und die Bildung von aromabeeinflussenden Gärungsnebenprodukten, festgestellt werden. Dies betraf in auffälliger Weise die beiden untersuchten lyophilisierten Bruchhefen nach zweijähriger Lagerung, die eine verstärkte Flockulationsneigung aufwiesen, was Biere mit zum Teil deutlich niedrigeren Vergärungsgraden und höheren Diacetylgehalten bedingte. Weiterhin konnte bei einem untersuchten Bruchhefestamm festgestellt werden, daß sämtliche konservierten Hefen gegenüber der nicht konservierten Hefe vor allem in der ersten Führung merklich größere Mengen an höheren aliphatischen Alkoholen bildeten.

Danksagung

Diese Arbeit enthält die Ergebnisse der Forschungsstelle 2 im Forschungsprojekt „Untersuchungen zur Konservierung von Hefestämmen und zum raschen Nachweis von Eigenschaftsänderungen 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 10704N.

5 Summary

Wackerbauer, K., and Beckmann, M.: Various methods of conserving yeast on the test bench — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No. 11/12, 184 – 191, 1999

BC41 Brewers' yeast/44 yeast propagation

Apart from yeast propagation aspects and the treatment of yeast between the generations, the way in which yeast strains are kept in microbiological brewery laboratory or in strain collections is a further part of yeast management. The methods of keeping yeast strains employed most frequently up to now is storage on inclined agars. However, on the one hand the disadvantage is of this the risk of contamination when taking yeast from agar to agar and, on the other hand, the possibility of the occurrence of changes to properties. This concerns more especially the flocculation behaviour and the varying development of aroma-intensive fermentation bi-products. Conservation methods such as lyophilisation, deep freezing in liquid nitrogen and drying on filter paper are alternative methods for keeping yeasts, the suitability of which was studied closely in a research project.

Wackerbauer, K., et Beckmann, M.: Evaluation de différentes méthodes de conservation de levures — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, No 11/12, 184 – 191, 1999

BC41 Levure de brasserie/44 culture pure levure/génération de levain

Le management des levures comporte, à côté de la conservation de la collection de levures, d'autres aspects tels la propagation des levures, le traitement des levures entre les fermentations, en particulier la façon de conserver des souches de levures dans le laboratoire de contrôle microbiologique. La méthode de conservation des collections de levures la plus utilisée jusqu'à présent est la conservation sur moût gélosé incliné. L'aspect négatif de cette méthode est, d'une part le danger de contamination au cours des repiquages sur milieux de culture, et d'autre part l'apparition de changements de propriétés. Ces dernières touchent plus particulièrement le comportement de floculation et la formation irrégulière de produits aromatiques secondaires de fermentation. Une alternative à la conservation des levures est offerte par les méthodes de conservation: lyophilisation, conservation à basse température dans de l'azote liquide et préséchage sur papier filtre qui, dans le cadre d'une recherche, ont été évaluées de façon approfondie.

6 Literatur

1. Thorne, R. S. W., und Nohr, B.: Some observations on the stability of a brewing yeast strain, *The Brewers Digest* 38, 36 – 39, 1963.
2. Rehberg, R.: Kulturerhaltung und Konservierung von Hefestämmen, *M Schr. Brauerei* 30, 222 – 230, 1977.
3. Rehberg, R.: Über Grundprobleme der Gefriertrocknung von Hefen, *Diss. TU Berlin*, 11, 1982.
4. Kirsop, B.: The Stability of Biochemical, Morphological and Brewing Properties of Yeast Cultures maintained by Subculturing and Freeze-Drying, *J. Inst. Brew.* 80, 565 – 570, 1974.
5. Barney, M., und Helbert, J. R.: Use of Lyophilization for Long-Term Storage of Brewer's Yeast, *ASBC Proceedings* 34, 61 – 64, 1976.
6. Richards, M.: Preservation of Brewing Yeast Characteristics by Freeze-Drying, *ASBC Proceedings* 33, 1 – 4, 1975.
7. Kirsop, B.: Maintenance of Yeasts by Freeze-Drying, *J. Inst. Brew.* 61, 466 – 471, 1955.
8. Richards, M., und Elliott, F. R.: Freeze-Drying characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis*, *Antonie van Leeuwenhoek* 34, 227 – 233, 1968.
9. Wynants, J.: Preservation of yeast cultures by lyophilization, *J. Inst. Brew.* 68, 351 – 354, 1962.
10. Hall, J. F., und Webb, T. J. B.: Factors affecting the survival of lyophilized brewery yeast strains, *J. Inst. Brew.* 81, 471 – 475, 1975.
11. Russell, I., und Stewart, G. G.: Liquid Nitrogen Storage of Yeast Cultures compared to More Traditional Storage Methods, *ASBC Proceedings* 39, 19 – 23, 1981.
12. Wellman, A. M., und Stewart, G. G.: Storage of Brewing Yeasts by Liquid Nitrogen Refrigeration, *Appl. Microbiol* 26, 577 – 583, 1973.
13. Fischborn, T.: Untersuchungen zum Trocknungsverhalten untergäriger Hefen, *Diss. TU München*, 1997.
14. Kirsop, B., und Snells, J. J. S.: Maintenance of Microorganisms-First Edition, Academic Press, London, 109 – 130, 1984.
15. Mortimer, R., und Contopoulou, R.: Yeast Genetic Stock Center Catalogue; Sixth Edition, 1987.
16. King, L. M., Schisler, D. O., und Ruocco, J. J.: Epifluorescent Method for Detection of Nonviable Yeast, *ASBC Proceedings* 39, 52 – 54, 1981.
17. O'Connor-Cox, E., Mochaba, F. M., Lodolo, E. J., Majara, M., und Axcell, B.: Methylene Blue Staining: Use At Your Own Risk, *MBAA Technical Quarterly* 34, 306 – 312, 1997.
18. 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.
19. Brambl, R., und Marzluf, G. A.: Regulation of Trehalose Metabolism and Its Relevance to cell Growth and Function, *The Mycota Part III Biochemistry and Molecular Biology*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 395 – 414, 1996.