

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Technische Universität München

**Beurteilung des physiologischen Zustandes von
Brauereihefe mittels Aktivitätsmessungen von
Schlüsselenzymen bei der Propagation
und Gärung**

Urs Wellhoener

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. E. Geiger

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel

3. Prof. Dr.-Ing. T. Kurz, Technische Universität Berlin

Die Dissertation wurde am 09.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.06.2006 angenommen.

Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Auch schaffte er es stets, die für diese Arbeit nötigen finanziellen Unterstützungen zu sichern. Nicht zu vergessen auch sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die fruchtbaren als auch angenehmen Diskussionen.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern und Kollegen des Lehrstuhles Technologie der Brauerei II, sowie den Diplomanden, Semesterarbeitern und wissenschaftlichen Hilfskräften. Durch das hervorragende Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft haben sie wesentlich zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen. Bei den Herren Dr. Springer, Dr. Tenge, Dr. Ilberg, Dr. Fischborn und Dipl.-Ing. Brandl bedanke ich mich für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Danken möchte ich auch den beiden Damen Fr. Volkhart und Fr. Giebels, die mich bei bürokratischen Angelegenheiten unterstützt und für mich unzählige Telefonate getätigt haben.

Diese Arbeit ist meinen Eltern, Constanze und Veit Wellhoener, gewidmet. Insbesondere möchte ich an dieser offiziellen Stelle ihnen Danke sagen, die mir die Ausbildung trotz meines Handicaps so selbstverständlich erscheinen lassen haben und mich von jeher in jeder Hinsicht unterstützt haben. Ohne sie wäre ein erfolgreicher Abschluss meines langen Ausbildungsweges kaum möglich gewesen. Ich danke Euch!

„’Cause tramps like us, baby we were born to run”

(Bruce Springsteen)

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens	4
2.1 HEFE AUS DER SICHT DER BIOTECHNOLOGIE UND IHRE PHYSIOLOGISCHEN	
EIGENSCHAFTEN	4
2.1.1 Bedeutung der Hefe für die Biotechnologie	4
2.1.2 Hefemetabolismus und die Schlüsselenzyme	6
2.1.3 Stand der Forschung in bezug auf die Hefephysiologie	11
2.2 BEDEUTUNG DER ENZYME UND FUNKTIONSDENKEN	14
2.2.1 Allgemeines über Enzyme und ihre Nomenklatur	15
2.2.2 Aufbau und Funktionsweise der Enzyme	16
2.2.3 Enzyme mit einer Schlüsselfunktion im Hefemetabolismus	18
3 Material und Methoden	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 Hefestamm und Fermentationsmedien	26
3.1.2 Reaktoren und Gärtanks	26
3.1.3 French-Press	27
3.1.4 Zentrifugen	27
3.1.5 Spektralphotometer	28
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	28
3.2 METHODEN	29
3.1.1 Vorbereitung der Proben und Proteinbestimmung	29
3.1.2 Enzymaktivitätsmessungen	30
3.1.3 Begleitende Messungen und Untersuchungen	33
4 Ergebnisse	35
4.1 VORGEHENSWEISE UND VERSUCHSPLANUNG	35
4.2 BERECHNUNG DER GÄRLEISTUNG	36
4.3 BETRACHTUNG VON GÄRUNGEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN	
.....	38

4.4 VERHALTEN DER ENZYMAKTIVITÄTEN EINER GESAMTEN HEFEPOPULATION WÄHREND DER GÄRUNG	49
4.5 BETRACHTUNG VON PROPAGATIONEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN	51
4.6 UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄTEN IN EINER KONTINUIERLICHEN KULTUR	61
4.7 VERHALTEN DER AKTIVITÄTEN BEI PROPAGATIONEN MIT HIGH GRAVITY WÜRZEN	64
4.8 VERGLEICH VON GÄRUNGEN IN BELÜFTETER UND UNBELÜFTETER ANSTELLWÜRZE ÜBER MEHRERE FÜHRUNGEN	70
4.9 UNTERSUCHUNG DER ENZYMAKTIVITÄTEN VON GÄRUNGEN IN DER BRAUEREIPRAXIS	88
5 Diskussion der Ergebnisse	95
5.1 MALTASE	95
5.2 PDH, PDC UND ADH	104
5.3 NUTZUNG VON ENZYMAKTIVITÄTSMESSUNGEN ZUR BEURTEILUNG DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DER BIERHEFE	111
6 Ausblick	117
7 Zusammenfassung	118

Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Kapitel 2

Abbildung 1: Hauptkomponenten des Energiestoffwechsels von <i>S. cerevisiae</i>	8
Abbildung 2: Verwertung des Pyruvats.....	9
Abbildung 3: Vereinfachter Überblick über die Positionen der Schlüsselenzyme.....	19
Abbildung 4: Vereinfachter Regulationsmechanismus des Maltase-Gen-Komplexes.....	20
Abbildung 5: Enzymatische Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA.....	21

Kapitel 4

Abbildung 6: Beispiel einer Gärung für die Ermittlung einer Formel für die Gärleistung.....	37
Abbildung 7: Kurven der Gärleistungen mit den Werten aus Tabelle 1.....	38
Abbildung 8: Vergleich der 15°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	40
Abbildung 9: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 15°C.....	41
Abbildung 10: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 15°C.....	41
Abbildung 11: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei 15°C.....	42
Abbildung 12: Vergleich der 10°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	43
Abbildung 13: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 10°C.....	44
Abbildung 14: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 10°C.....	45
Abbildung 15: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei 10°C.....	45
Abbildung 16: Vergleich der 5°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	46
Abbildung 17: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 5°C.....	47
Abbildung 18: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 5°C.....	48
Abbildung 19: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 5°C.....	48
Abbildung 20: Verlauf der Gärleistungen, Vergärungsgrade und Hefezellzahlen.....	49
Abbildung 21: Aktivitäten von Maltase und PDH.....	50
Abbildung 22: Aktivitäten von ADH und PDC.....	51
Abbildung 23: Vergleich der 30°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	52
Abbildung 24: Verlauf der Maltaseaktivitäten und der Hefezellzahlen bei 30°C.....	53
Abbildung 25: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 30°C-Propagationen.....	53

Abbildung 26: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 30°C-Propagationen.....	54
Abbildung 27: Vergleich der 20°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	55
Abbildung 28: Verlauf der Maltaseaktivitäten und der Hefezellzahlen bei 20°C.....	55
Abbildung 29: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 20°C-Propagationen.....	56
Abbildung 30: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 20°C-Propagationen.....	56
Abbildung 31: Vergleich der 10°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad.....	57
Abbildung 32: Verlauf der Maltaseaktivitäten sowie von Maltose und Glucose bei 10°C.....	58
Abbildung 33: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 10°C-Propagationen.....	59
Abbildung 34: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 10°C-Propagationen.....	60
Abbildung 35: Vergleich der ADH-Aktivitäten von Gärung, Propagation und kont. Kultur.....	62
Abbildung 36: Vergleich der PDH-Aktivitäten von Gärung, Propagation und kont. Kultur.....	63
Abbildung 37: Verlauf der Aktivitäten von Maltase, PDC und ADH bei den Propagationen in Würze mit 12 GG-% (P12), 14 GG-% (P14), 16 GG-% (P16) und 18 GG-% (P18).....	66
Abbildung 38: Verlauf der Aktivitäten von Maltase, PDC und ADH bei den Propagationen in Würze mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil.....	68
Abbildung 39: Gärleistungen der Propagationen der Würzen mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil.....	69
Abbildung 40: Verlauf der Hefezellzahlen bei Propagationen mit Glucose- bzw. Maltosezusatz.....	70
Abbildung 41: Gärleistungen belüfteter und unbelüfteter Würze über 2 Führungen.....	72
Abbildung 42: Verlauf der Maltaseaktivitäten über 2 Führungen.....	72
Abbildung 43: Verlauf der PDH-Aktivitäten über 2 Führungen.....	73
Abbildung 44: Verlauf der PDC-Aktivitäten über 2 Führungen.....	74
Abbildung 45: Verlauf der ADH-Aktivitäten über 2 Führungen.....	75

Abbildung 46: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 1. Führung.....	76
Abbildung 47: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 2. Führung.....	77
Abbildung 48: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 3. Führung.....	77
Abbildung 49: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (1. Führung).....	78
Abbildung 50: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (2. Führung).....	79
Abbildung 51: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (3. Führung).....	80
Abbildung 52: Verlauf der ADH-Aktivitäten in belüfteter Würze über 3 Führungen.....	80
Abbildung 53: Verlauf der ADH-Aktivitäten in unbelüfteter Würze über 3 Führungen.....	81
Abbildung 54: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 1. Führung.....	83
Abbildung 55: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 2. Führung.....	84
Abbildung 56: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 3. Führung.....	84
Abbildung 57: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 1. Führung.....	85
Abbildung 58: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 2. Führung.....	86
Abbildung 59: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (Bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 3. Führung.....	86

Abbildung 60: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei konventioneller Gärung über 3 Führungen	87
Abbildung 61: Verlauf der ADH-Aktivitäten in unbelüfteter Würze mit Vorbe- handlung der Hefe (vorbeh.) über 3 Führungen.....	88
Abbildung 62: Gärleistungen von UG1, UG2 und UG3.....	90
Abbildung 63: Gärleistungen der einzelnen Gärproben zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten	91
Abbildung 64: Vergleich der Maltaseaktivitäten von UG1, UG2 und UG3.....	91
Abbildung 65: Vergleich der PDH-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3.....	92
Abbildung 66: Vergleich der PDC-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3.....	93
Abbildung 67: Vergleich der ADH-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3.....	94

Tabellenverzeichnis

Kapitel 2

Tabelle 1: Übersicht über die Methoden zur Bestimmung der Viabilität.....	12
Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsbestimmung.....	14
Tabelle 3: Regulationsmechanismen der Enzyme.....	17
Tabelle 4: Übersicht über die Gene der Enzyme im Pyruvatstoffwechsel.....	22

Kapitel 3

Tabelle 5: Durchschnittliche Zusammensetzung der hellen Vollbierwürze.....	26
--	----

Kapitel 4

Tabelle 6: Werte für Extrakt und Hefezellzahl zweier Gärungen und die zuge- hörigen Gärleistungen.....	37
Tabelle 7: Werte der Gärungen bei 15°C.....	39
Tabelle 8: Werte der Gärungen bei 10°C.....	43
Tabelle 9: Werte der Gärungen bei 5°C.....	46
Tabelle 10: Werte der Propagationen bei 10°C.....	58
Tabelle 11: Werte der Propagationen mit unterschiedlicher Stammwürze.....	65
Tabelle 12: Werte der Propagationen in Würze mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil.....	67
Tabelle 13: Vergleich Vergärungsgrade und Hefezellzahlen bei belüfteter und un- belüfteter Würze über 2 Führungen.....	71

Tabelle 14: Vergleich Vergärungsgrade bei belüfteter und unbelüfteter Würze über 3 Führungen.....	75
Tabelle 15: Vergleich Hefezellzahlen bei belüfteter und unbelüfteter Würze über 3 Führungen.....	76
Tabelle 16: Vergleich Vergärungsgrade bei belüfteter Würze ohne (Konv. bel.) und unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (Vorbeh.) über 3 Führungen.....	82
Tabelle 17: Vergleich Hefezellzahlen bei belüfteter Würze ohne (Konv. bel.) und unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (Vorbeh.) über 3 Führungen	82
Tabelle 18: Einfluss der Flotation auf die Enzymaktivitäten der Anstellhefe.....	89
Tabelle 19: Vergleich Vergärungsgrade und Hefezellzahlen im ZKG von 3 Gärungen in einer Brauerei.....	89

Abkürzungsverzeichnis

ACDH	Acetaldehyddehydrogenase (E.C. 1.2.1.10)
ACS	Acetyl-CoA Synthetase (E.C. 6.2.1.1)
ADH	Alkoholdehydrogenase (E.C. 1.1.1.1)
BSA	Bovine Serum Albumin
Def.	Definition
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EVG	Endvergärungsgrad
FAD ⁺	Flavin-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
FAN	Freier Amino Stickstoff
GG-%	Gewichts/ Gewichtsprozent
Hrsg.	Herausgeber
kDa	Kilo Dalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
M _r	Relative Molmasse
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH ₂	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
PDC	Pyruvatdecarboxylase (E.C. 4.1.1.1)

PDH	Pyruvatdehydrogenase (E.C. 1.2.4.1)
s.a.	siehe auch
U/min	Umdrehungen pro Minute
VG	Vergärungsgrad
z.B.	zum Beispiel
ZKG	Zylindrokonischer Gärtank

1 Einleitung

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den biotechnologisch bedeutendsten Mikroorganismen überhaupt. Die Einsatzgebiete der Hefe in der Industrie sind vielfältig. Sowohl in der gesamten Back- als auch in der Brauindustrie wäre die Produktion ohne diesen Mikroorganismus nicht einmal denkbar. Dabei spielt der physiologische Zustand einer Hefe eine wesentliche Rolle. Die Gleichmäßigkeit und Qualität einer Fermentation und die dabei gebildeten Aromastoffe werden davon im Wesentlichen beeinflusst (QUAIN, 1988). Um optimale Gärungen und ein reproduzierbares sowie stabiles Produkt zu gewährleisten, ist es vorteilhaft, die Vitalität einer Hefe vor ihrem Einsatz bestimmen zu können (LENTINI, 1993).

Im Verlauf der letzten 100 Jahre hat sich *Saccharomyces cerevisiae* aufgrund ihrer Eigenschaften zu einem der herausragenden Modellsysteme für mikrobiologisches, biochemisches und genetisches Arbeiten entwickelt. Das grundlegende Experiment der Biochemie gelang Buchner mit dem Nachweis, dass Stoffwechselfvorgänge auch losgelöst vom lebenden Organismus (Hefe) *in vitro* ablaufen können (BUCHNER, 1898; HAHN 1898). Bei der Erzeugung gentechnischer Produkte in der industriellen Biotechnologie verdrängt die Hefe zunehmend den gentechnologischen Paradewirt *Escherichia coli*, da sie alle Anforderungen eines genetisch optimalen Wirtes genügt (ALTHERR und RODRIGUEZ, 1988). Trotz einer stabilen Zellwand lassen sich Hefezellen leicht aufschließen und für die biochemische Analyse ihrer Proteine einsetzen. Somit hat sich die Hefe als Modell für praktisch alle modernen Genom- und Proteomanalysen durchgesetzt. Die Hefe ist der einzige Organismus, bei dem alle Gene systematisch sequenziert und deletiert sowie alle Proteine exprimiert, isoliert und lokalisiert wurden. Außerdem war die Hefe der erste Organismus, für den DNA-Microarrays hergestellt und analysiert wurden (GOFFEAU et al., 1996).

In den 80er und 90er Jahren lagen die Schwerpunkte der Qualitätssicherung/-kontrolle der Brauereien im Bereich der biologischen Untersuchung auf bierschädliche oder -verderbende Mikroorganismen und der chemisch-technischen Analyse des Produktes in allen Stadien der Bierherstellung. Mittlerweise sind die Methoden weit fortgeschritten und erlauben dem Brauereitechnologen heutzutage eine lückenlose Überwachung des Produktionsprozesses. Bei all diesem Fortschritt wurde aber die wichtigste Komponente in der Bierherstellung übersehen: die Hefe. Im Vergleich zu den hochmodernen Technologien und Untersuchungsmethoden hinken die Hefetechnologie sowie das Hefemana-

gement hinterher, weil dem Organismus Hefe zu wenig Beachtung geschenkt wurde. Erst in den letzten Jahren wurde die Hefe mehr und mehr in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen Forschungen gerückt.

Obwohl der Zellaufbau und die Stoffwechselwege von *Saccharomyces cerevisiae* Laborstämmen weitgehend bekannt sind, gibt es bis jetzt keine Methode, die den physiologischen Zustand einer Bierhefe hinreichend genau beschreiben kann. Zudem muss die zum Einsatz kommende Methode auch eine schnelle Untersuchung ermöglichen. Nur dann kann auch verhindert werden, dass z.B. eine gärschwache Hefe mit ihren negativen Auswirkungen auf das Produkt zum Einsatz kommt. LENTINI (1993) stellte beim Vergleich der verschiedenen Methoden zur Bestimmung des physiologischen Zustands einer Hefe fest, dass nach wie vor nur mit Hilfe von Probegärungen im Labor unter Praxisbedingungen eine genaue Aussage gemacht werden kann. Allerdings liegt das Ergebnis erst nach einigen Tagen vor und da sich die Hefe zu diesem Zeitpunkt bereits im fortgeschrittenem Stadium befindet, ist es für eine nachträgliche Korrektur bzw. Änderung der technologischen Gärungsparameter zu spät. Andere Methoden können zwar zur Beurteilung der Hefe herangezogen werden, erlauben aber nur ansatzweise eine Beurteilung des physiologischen Zustandes. Die aktuellen Forschungen auf dem Gebiet der Hefephysiologie konzentrieren sich verstärkt auf die Vorgänge, die sich innerhalb der Zelle abspielen. Dazu zählen u.a. die Erfassung von Metaboliten (HYSERT et al., 1977) des Stoffwechsels, Durchflusscytometrie (Müller et al., 1997) und die Genexpression mittels DNA Microarrays (De RISI et al., 1997; RYDER, 2003). Ziel dieser Methoden ist ein besseres Verständnis der Vorgänge in der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode eingesetzt, bei der der physiologische Zustand einer Hefe mittels Aktivitätsmessungen von Enzymen mit einer Schlüsselfunktion bei der Propagation und Gärung beurteilt werden soll. In der Medizin stellt die Bestimmung von Enzymaktivitäten ein wichtiges Hilfsmittel zur Diagnosestellung und zur Verlaufskontrolle von Krankheiten dar. Anhand der Aktivitäten von organspezifischen Enzymen (z.B. Herz, Leber) lässt sich feststellen, wie ausgedehnt, schwer und akut die Schädigung des Organs ist (BERGMEYER, 1974). So werden z.B. Schädigungen der Leber anhand der Aktivitäten von Enzymen (z.B. Alaninaminotransferase) festgestellt (SHERWIN, 1984). Diese Möglichkeit sollte auch bei der Hefe Anwendung finden, um Veränderungen im Hefemetabolismus festzustellen. Dazu sollen aus der Vielzahl der Hefeenzyme 4 Enzyme unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich ihrer Aktivitäten untersucht werden. Durch die Untersuchung der Schlüsselenzyme Maltase, Pyruvatde-

hydrogenase (PDH), Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) der Hefe können neue Erkenntnisse über die Vorgänge in der Zelle und für die Hefetechnologie erwartet werden. Über Aktivitätsmessungen der PDH, PDC und ADH sollen die Vorgänge in der Hefe am wichtigen Verzweigungspunkt Pyruvat während der Propagation und Gärung genauer untersucht werden. Die Bedeutung des Pyruvatstoffwechsels wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen hervorgehoben (de JONGGUBBELS, 1998; FLIKWEERT et al., 1996; POSTMA et al., 1989; PRONK et al., 1996; van URK et al., 1989). Die Vorteile von Enzymaktivitätsmessungen liegen auf der Hand: kostengünstig, schnelle Ergebnisse (ca. 2 h pro Hefeprobe) sowie einfache Handhabung. Angesichts der aktuellen Forschungen auf dem Gebiet der Hefephysiologie könnten die hier gefundenen Ergebnisse auch einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge leisten und somit eine Brücke zur Molekularbiologie schlagen.

2 Stand des Wissens

Seit Louis Pasteurs Entdeckung im Jahre 1860 (BARNETT, 2000) sind unzählige Veröffentlichungen publiziert worden, die sich mit dem Organismus Hefe beschäftigen. In den nächsten Kapiteln soll versucht werden, einen Überblick zu schaffen, und die für diese Arbeit relevanten Themen heraus zu greifen.

2.1 Hefe aus der Sicht der Biotechnologie und ihre physiologischen Eigenschaften

Der Begriff „Biotechnologie“ wurde erstmals 1919 von dem ungarischen Ingenieur Karl Ereky geprägt und als Summe aller Verfahren beschrieben, mit denen Produkte aus Rohstoffen unter Zuhilfenahme von Mikroorganismen erzeugt werden (EREKY, 1919). Biotechnologie wurde von Menschen bereits vor ca. 6.000 Jahren betrieben. Ohne die zu Grunde liegenden biologischen Abläufe zu kennen, wurden zu dieser Zeit bereits Mikroorganismen zur Herstellung von Bier und einem dem Wein ähnlichen Getränk verwendet. Die moderne Biotechnologie nutzt sowohl Mikroorganismen als auch höhere Organismen und deren Bestandteile unter Einbeziehung von Erkenntnissen und Methoden aus der Chemie, Physik und Fertigungstechnik. Als eine sanfte Technologie hat sie u.a. in den Bereichen Medikamentenherstellung, Naturstoffproduktion, Lebensmittelverarbeitung oder Abluft-, Abwasserreinigung und Bodensanierung herkömmliche chemische und physikalische Prozesse erfolgreich ersetzt und Verfahren ermöglicht, die mit geringerem Rohstoff- und Energieaufwand bei deutlich verminderter Umweltbelastung stattfinden. Aber auch in der Grundlagenforschung sind die Labormethoden der Zell- und Gewebekulturen vorwiegend den Fortschritten in der Biotechnologie zu verdanken. Als Bestandteile von Organismen besitzen speziell die Enzyme in der Biotechnologie einen hohen Stellenwert.

2.1.1 Bedeutung der Hefe für die Biotechnologie

Wie unzählige Mikroorganismen, die an den biologischen Prozessen beteiligt sind, so spielt auch die Hefe in der Biotechnologie eine tragende Rolle. Bis Anfang des 19. Jahrhunderts konnten sich die Bierbrauer sowie Winzer die Umwandlung eines zuckerhaltigen Mediums in eine „alkoholische Form“ nicht erklären. Die Gärung lief spontan und unkontrolliert ab, da das Medium mit wilden Hefen aus der Umgebungsluft infiziert wurde. Erst als Wissenschaftler wie Pasteur mit Hilfe der Mikroskopie und Biochemie

die Hefe als den Auslöser dieser Prozesse entdeckten, konnte die Hefe gezielter und später durch HANSEN mit Hilfe der Reinzucht als Kulturhefe zur Gärung eingesetzt werden (zur Übersicht ROSE und HARRISON, 1987). Von diesem Zeitpunkt an rückte die Hefe auch immer mehr in den Mittelpunkt der mikrobiologischen und biochemischen Wissenschaften. Einen deutlichen An Schub bekam die Biotechnologie im Jahre 1944 durch Avery, McLeod and McCarty mit dem Nachweis, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist, und 1953 durch die Aufklärung der Doppelhelixstruktur der DNA durch Watson und Crick. Weitere Fortschritte der Molekulargenetik, wie die Entdeckung und Nutzbarmachung von Restriktionsenzymen, führten schließlich Anfang der 70er Jahre zur Gentechnologie als ein neues wichtiges Teilgebiet der Biotechnologie.

In den folgenden Jahren konnte die Hefe zur Produktion von Insulin und Interferon eingesetzt werden. Nach der Verdrängung des gentechnologischen Paradewirts *Escherichia coli* ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mittlerweile der einzige eukaryontische Organismus, bei dem alle Gene systematisch sequenziert und von denen mehr als etwa 80 % funktionell identifiziert wurden, sowie alle Proteine exprimiert, isoliert und lokalisiert wurden. Die Hefe war außerdem der erste Organismus, für den DNA-Microarrays hergestellt und analysiert wurden (GOFFEAU et al., 1996). Seit der „Entschlüsselung“ des menschlichen Erbguts leitet die Hefe als Modellorganismus Hilfestellung zur Analyse der menschlichen Gene (BOTSTEIN et al., 1997). Dazu bedient sich die Bioinformatik verschiedener Methoden, um Genen einen bestimmten Phänotyp zuschreiben zu können (Genzerstörung, automatisiertes Chemotyping, Analyse der Transkripte, two-hybrid array, 2-D Elektrophorese u.a.). Diese Ergebnisse sollen zu einer physiologischen Karte des Proteoms (Def. Proteom: Summe aller Proteine, die in einem Organismus, einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen exprimiert sind) führen, in der alle Protein-Protein-Interaktionen festgehalten werden können. Neben dem Verständnis für die Zellstruktur sind diese Interaktionen auch wichtig für die dynamischen Prozesse einer Zelle und liefern somit wichtige Informationen über den Metabolismus einer Zelle, z.B. bei der Atmung oder Gärung (UETZ et al., 2002). Bei zwei unterschiedlichen Ansätzen konnten 192 bzw. 957 Interaktionen (aus etwa 6200 vorhergesagten Proteinen) beobachtet werden (UETZ et al., 2000), wodurch viele bislang nicht charakterisierte Proteine in einen möglichen biologischen Zusammenhang gesetzt werden können. Als eine Möglichkeit zur weiteren Annäherung kann die Verknüpfung des

Gens mit seiner biochemischen Aktivität betrachtet werden (Biochemische Genomforschung).

Mit Hilfe der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Hefeforschung könnte die Bierherstellung im Hinblick auf die Bierqualität verbessert und optimiert werden. Obwohl die Laborhefestämme in bezug auf ihren Aufbau und ihre Stoffwechselwege erforscht sind, hat die Qualitätssicherung einer Brauerei bisher keine Methode, die den physiologischen Zustand einer Hefe in allen Stadien der Bierherstellung ausreichend genau beschreiben kann. Dazu kommen noch die Forderungen nach einer schnellen, kostengünstigen und einfachen Analyse. In Kapitel 2.1.3 wird auf diese Problematik näher eingegangen. RYDER et al. (2003) nutzten bereits die funktionelle Genomanalyse, indem sie mit Hilfe von DNA-Microarrays die Gene von Praxishefen auf ihre Reprimierung bzw. Induzierung während der Gärung sowie unter Stressbedingungen untersuchten. Allerdings sind hier zum einen die Funktion von über 30 % der gesamten Hefegene unbekannt und zum anderen lassen sich verschiedene Protein-Interaktionen nicht eindeutig erklären. Die Messung von Enzymaktivitäten könnte hier einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis dieser Ergebnisse leisten.

2.1.2 Hefemetabolismus und die Schlüsselenzyme

Die Hefe (im folgenden soll ausschliesslich auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingegangen werden) lebt in Gegenwart von Sauerstoff (aerob), besitzt aber auch die Fähigkeit, sich an ein anaerobes Milieu anzupassen. Um die für die Erhaltung des Lebendzustandes sowie zur Neusynthese von Zellbestandteilen notwendige Energie zu gewinnen, nutzt sie verschiedene Stoffwechselwege, die abhängig von den Lebensbedingungen durch Enzyme reguliert werden. Als Energiequelle dienen die Nahrungsstoffe, die aus der Umgebung der Zelle aufgenommen werden. Bei der Bierherstellung wird die Hefe dazu gezwungen, unter anaeroben Bedingungen in Würze zu leben. Auf diese Art erhält das Bier die geschmacklich gewünschten Produkte wie Alkohol und Bukettstoffe. Die Nährstoffe einer 12%-ige Bierwürze bestehen zum größten Teil aus Kohlenhydraten, die durchschnittlich wie folgt zusammengesetzt sind (WEINFURTNER et al., 1964):

Monosaccharide:	8,8 % Glucose, 1,4 % Fructose
Disaccharide:	45,5 % Maltose, 3,1 % Saccharose

Trisaccharide:	11-12 % Maltotriose
Dextrine:	6-12 % niedrigere, 19-24 % höhere
(Pentosane:	3-4 % β -Glucan: 0,2-0,4 %)

Anhand der Kohlenhydratzusammensetzung ist zu erkennen, dass die Malzzucker Maltose und Maltotriose über 50 % der Würzezusammensetzung ausmachen und somit das Augenmerk der Hefe auf deren Verwertung liegt.

Hefe kann alle Zucker bis auf die Dextrine zur Energiegewinnung und Biosynthese nutzen. Die Einfachzucker werden von der Hefezelle sofort aufgenommen und gelangen durch die erleichterte Diffusion über die Membran in die Zelle (REIFENBERGER et al., 1997). Unter den Kohlenstoffquellen nimmt bei *Saccharomyces cerevisiae* Glucose eine Sonderstellung ein. Erst wenn Glucose in der Würze verbraucht ist, werden die anderen zur Verfügung stehenden Zucker verwertet. Dieses basiert auf zwei Mechanismen der Zelle, die getrennt oder parallel ablaufen. In dieser Zeit findet eine Glucoseinaktivierung statt, was eine sofortige Inhibierung bestimmter Proteine durch Modifizierung oder Degradierung zur Folge hat, oder eine sogenannte Glucoserepression (Katabolit-Repression). Bei letzterem kommt es zu einer Repression der Transkription von Genen, die die Enzyme des Atmungsstoffwechsels und zur Verwertung der alternativen Kohlenstoffe codieren. Zu diesen zählen unter anderem auch die Maltase, Invertase und ADH2 (SCHÜLLER und ENTIAN, 1988; KLEIN et al., 1998).

Sind Glucose und Fructose in der Würze verbraucht, so kommt es zur Verwertung des Disaccharides Saccharose. Die Reihenfolge der Zuckerverwertung trifft allerdings nur für die gut untersuchten Laborhefestämme zu. Bei industriellen Hefestämmen stellte sich heraus, daß Saccharose noch vor den eigentlich bevorzugten Hexosen aufgenommen wird (MENESES und JIRANEK, 2002). Bei Saccharose findet die Spaltung in Glucose und Fructose durch das Enzym Invertase bereits in der Zellwand statt (ESMON et al., 1987) und die freiwerdenden Hexosen gelangen durch die erleichterte Diffusion über die Membran in die Zelle. Erst nach Assimilation der genannten Zucker werden Maltose und schließlich Maltotriose verwertet (PANCHAL et al., 1979; STEWART et al., 1979). Maltose und Maltotriose gelangen durch den aktiven Transport, d.h. unter Mitwirkung spezifischer energieverbrauchender Transportsysteme, ins Cytoplasma (LOUREIRO-DIAS und PEINADO, 1984; SERRANO, 1977) und werden dort zu Glucose gespalten.

Dieser Einfachzucker steht am Beginn des Hefemetabolismus und wird nun der Glykolyse zugeführt. Neben den Zuckern nutzt die Hefe auch Fettsäuren und Aminosäuren, um Energie zu gewinnen, und Vorläuferprodukte für ihre Biosynthese bereitzustellen. Die Prozesse, die der Energiefreisetzung während des Katabolismus dieser Verbindungen dienen und die Vorgänge, durch die die Endprodukte anschließend wieder zu makromolekularen Bausteinen der Zellen zusammengefügt werden, basieren auf relativ wenigen Stoffwechselschritten, die allen Organismen gemeinsam sind. Dies ergibt sich dadurch, dass sich die Stoffwechselwege des Katabolismus vereinen und in zentrale Stoffwechselwege münden, von denen verschiedene anabole Stoffwechselwege ihren Ursprung nehmen und verzweigen. Daher soll in diesem Kapitel kurz nur auf die wichtigsten Stoffwechselwege der Hefe wie die Glykolyse, den Citratzyklus und zusätzlich die alkoholische Gärung eingegangen werden (s. Abbildung 1).

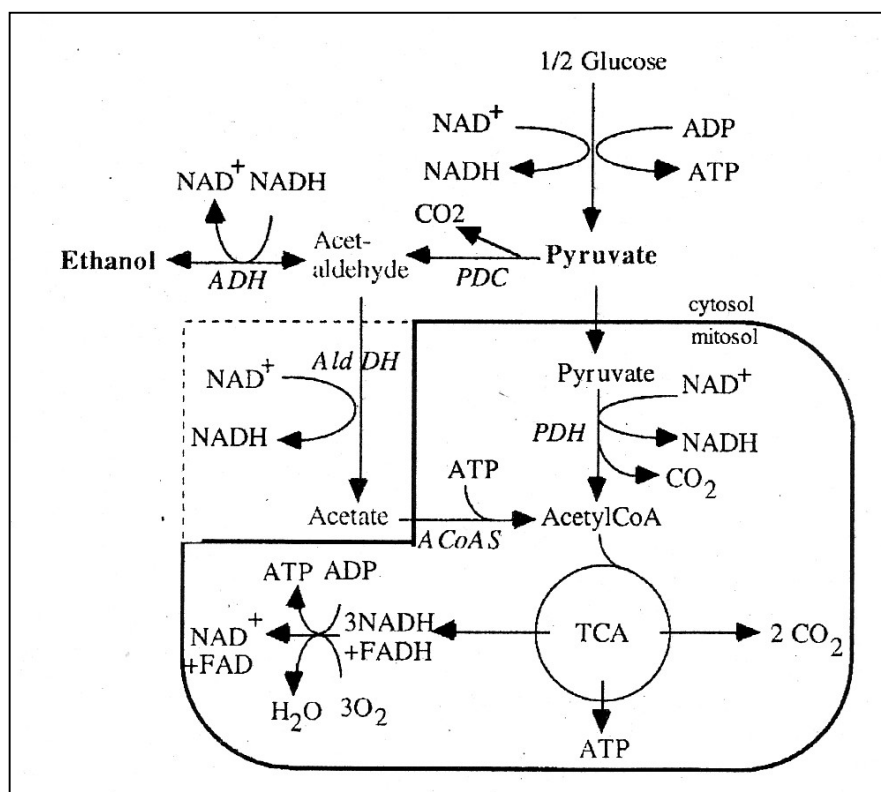


Abbildung 1: Hauptkomponenten des Energiestoffwechsels von *S. cerevisiae* (PHAM et al., 1998)

Die Glykolyse, auch als Embden-Meyerhof-Parnas-Weg bekannt, ist der Abschnitt, bei dem die Glucose zu Pyruvat abgebaut wird, und ist ein Bestandteil sowohl der Fermentation als auch der Respiration (Atmung). Diese läuft im Cytosol ab und lässt sich in 3 Abschnitte mit insgesamt 10 Reaktionsschritten einteilen:

- 1 Glucose-Phosphorylierung und Glucosespaltung (Schritte 1-5)
- 2 Substratkettenphosphorylierung (Schritte 6-7)
- 3 Pyruvat-Bildung (Schritte 8-10)

Als Bilanz des Glucoseabbaus entstehen pro Molekül Glucose jeweils zwei Moleküle ATP und $\text{NADH}+\text{H}^+$. Um den Stoffwechselfluss über die Glykolyse aufrecht zu erhalten, muss das $\text{NADH}+\text{H}^+$, welches bei Schritt 6 der Glykolyse entstanden ist, kontinuierlich zu NAD^+ reduziert werden. Bei vollständiger Atmung (aerob in glucose-armen Medien und mit einer geringen spez. Wachstumsrate) wird Pyruvat vorwiegend oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert (PETRIK et al., 1983). Auch über einen indirekten Weg kann das Pyruvat über PDC, Acetaldehyddehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthetase zum Acetyl-CoA geführt werden (Schritte 2, 3 und 4 in Abbildung 2). Dieser PDH-Bypass dient der Bereitstellung von Acetyl-CoA im Cytosol für die Lipidsynthese (POSTMA et al., 1989; FLIKWEERT et al., 1996). POSTMA et al. (1989) sehen in der Übersättigung des PDH-Bypasses den Auslöser der alkoholischen Gärung unter aeroben Bedingungen.

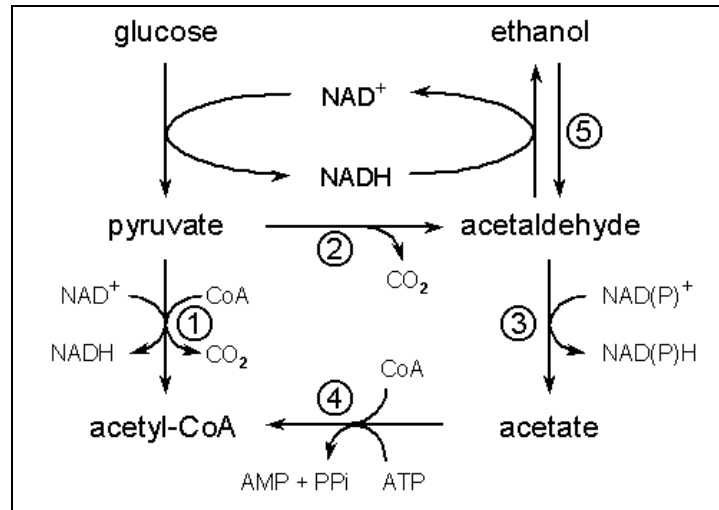


Abbildung 2: Verwertung des Pyruvats (1= PDH; 2= PDC; 3= Acetaldehyddehydrogenase; 4= Acetyl-CoA-Synthetase; 5 = ADH) (FLIKWEERT et al., 1996)

Ist kein Sauerstoff vorhanden, so wird das Pyruvat in der Hefezelle zunächst zu Acetaldehyd decarboxyliert und in einem weiteren Schritt zu Ethanol reduziert. Dieser Weg ist als die alkoholische Gärung bekannt (Schritte 2 und 5 in Abb. 2). Auch unter vollständig aeroben Bedingungen kann es zu einer alkoholischen Gärung kommen. Bei zu hohen Zuckerkonzentrationen tritt trotz eines aeroben Milieus der Crabtree-Effekt, auch

als Glucoserepression bezeichnet, ein. Diese Repression ist auf die nicht ausreichende Atmungskapazität und Hemmung der mitochondrialen Funktion zurückzuführen (FIECHTER et al., 1981; KÄPPELI, 1986; VERDUYN, 1991; SONNLEITNER und KÄPPELI, 1986).

Es ist somit offensichtlich, daß das Intermediärprodukt Pyruvat eine Schlüsselrolle im Hefemetabolismus besitzt. Auch Lei et al. (2001) hob in seinen Berechnungen zur Erstellung eines Strukturmodells für das Wachstum der Hefe die Bedeutung des Pyruvatstoffwechsels hervor. In Kapitel 2.2 wird in Zusammenhang mit den Enzymen PDH und PDC näher auf den Pyruvat-Metabolismus der Hefe und seine Regulation eingegangen.

Unter aeroben Bedingungen wird Acetyl-CoA im weiteren Verlauf entweder als Brennstoff für die Zelle oder für die Biosyntheseprozesse genutzt. Diese „aktivierte Essigsäure“ entsteht nicht nur aus der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat, sondern auch aus dem Abbau langkettiger Fettsäuren und einiger Aminosäuren. Benötigt die Hefezelle viel ATP zur Deckung ihres Energiebedarfs oder für Synthesen, so wird das Acetyl-CoA in den Endabbau, dem Citratzyklus, zugeführt und nach dem „Prinzip der gemeinsamen Endstrecke“ verbrannt. Als Endprodukte fallen CO_2 und H_2O an. Das Kohlendioxid entsteht hauptsächlich durch die Decarboxylierungen im Zyklus. Der durch die Dehydrogenasen des Citratzyklusses freiwerdende Wasserstoff wird über die Coenzyme NAD, NADP und FAD zur Atmungskette transportiert und der biologischen Oxidation unterworfen. Dabei erfolgt die Übertragung des Wasserstoffs auf Sauerstoff und es kommt mit der Wasserbildung zu einer „biochemischen Knallgasreaktion“. Mit allein zwei Wasserstoff-Äquivalenten können in der Atmungskette 3 Moleküle ATP gebildet werden. Insgesamt kann die Hefezelle somit bei der Glucose-Veratmung aus einem Molekül Glucose 38 Mol ATP gewinnen. Unter anaeroben Bedingungen fällt die Energiebilanz deutlich schlechter aus. In diesem Falle stehen ihr aus der Glykolyse nur 2 Mol ATP pro Glucosemolekül zur Verfügung. Dies führt zu einem verstärkten Glucoseumsatz, da die Konzentrationen an intrazellulärem ADP und Phosphat erhöht sind und das ATP nur über die Dehydrogenierung von Glycerinaldehydphosphat vollzogen werden kann. Unter aeroben Bedingungen konkurriert die Atmungskette mit der Glykolyse um das freie ADP und Phosphat mit der Folge, dass die Konzentration an ADP und Phosphat absinkt und der Glucosedurchsatz reduziert wird. Die Phosphofruktokinase am

Anfang der Glykolyse reguliert den Glucosedurchsatz. Liegt viel ATP in der Zelle vor, so wird dieses Enzym allosterisch gehemmt.

Die Hefe ist somit in der Lage, die grundlegenden Stoffwechselwege unter verschiedenen Lebensbedingungen zu regulieren. Dabei kommt es z.B. beim Wechsel von aeroben in anaerobe Verhältnissen oder von vergärbaren Zuckern auf limitierten C-Quellen (Ethanol, Acetat, Glycerin) zu Veränderungen der Enzymfunktionen. Kurzfristig tritt meistens eine allosterische Hemmung ein, indem die Aktivität und/ oder Affinität der Enzyme reversibel erhöht oder reduziert werden. Ebenfalls kurzfristig und meistens irreversibel sind Enzymmodifikationen. Bei einer längerfristigen Anpassung an neue Lebensbedingungen kommt es dagegen zu Enzyminduktionen bzw. -repressionen auf DNA-Ebene mit dem ökonomischen Ziel, nicht benötigte und gegebenenfalls schädliche Enzyme zu vermindern. Um eine schnelle Inaktivierung bzw. einen schnellen Abbau zu gewährleisten, greift die Hefezelle auf ein spezifisches Proteolysesystem zurück. Dieses kann auch einen aktivierenden Einfluss auf die Enzymaktivitäten haben, indem verschiedene Enzyme aus Vorläufern freigesetzt oder nach Abspaltung von Signalpeptiden aktiviert werden (VOGEL, 1987).

2.1.3 Stand der Forschung in bezug auf die Hefephysiologie

Eine der wichtigsten Aufgaben in einer Brauerei ist heutzutage die lückenlose Überwachung und Steuerung der Gärung und Lagerung des Bieres. In den vergangenen Jahren sind unzählige Anstrengungen unternommen worden, um die Bierqualität mit Hilfe technologischer Parameter wie Temperatur, Druck, Anzahl der Führungen, Würzebelüftung, Hefebehandlung u.a. zu optimieren. Dennoch treten immer wieder Inkonsistenzen oder Unregelmäßigkeiten bei der Gärung auf, da der physiologische Zustand der Hefe ständig variiert. Mehrmaliges Anstellen, Ernten und die Lagerung der Hefe führen zwangsläufig zu Veränderungen bezüglich ihrer physiologischen Eigenschaften. Bei dem Ziel, die Hefebehandlung verbunden mit der Bierqualität weiter zu verbessern, beschäftigt sich die aktuelle Forschung verstärkt mit der Frage nach einer geeigneten und genauen Methode zur Bestimmung des physiologischen Zustandes der Hefe.

Physiologie ist die Wissenschaft der natürlichen Lebensvorgänge der Organismen. Abgeleitet aus dem Griechischen bedeutet „physis“ Natur und beschreibt die Grundercheinungen der Lebensvorgänge in funktionellen und dynamischen Zusammenhängen.

Durch ihren physiologischen Zustand beeinflusst die Hefe maßgeblich die Gärung und damit die Qualität und den Geschmack des fertigen Bieres. Ebenso bewirkt ein guter physiologischer Zustand eine rasche Angärung, eine zügige Hauptgärung, eine schnelle Hefevermehrung und einen deutlichen pH-Sturz. Auch die Bildung von Gärungsnebenprodukten sowie das Absetzverhalten stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Zustand der Hefe. Die Bedeutung des physiologischen Zustandes der Hefe wird in der Praxis meist unterschätzt, und die Ursache einer unbefriedigenden Gärung werden vielfach in der Würzezusammensetzung und den Gärparametern gesucht.

Im Zusammenhang mit dem physiologischen Zustand der Hefe sind die Begriffe Viabilität und Vitalität zu unterscheiden. Viabilität beantwortet die Frage, wie viele Hefezellen einer Population in der Lage sind zu wachsen, sich fortzupflanzen und sich mit ihrer unmittelbaren Umgebung austauschen zu können (BENDIAK, 1997). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Methoden zur Bestimmung des Lebend/Tot-Anteils einer Hefepopulation.

Tabelle 1: Übersicht über die Methoden zur Bestimmung der Hefeviabilität

(EBC, 1962; ASBC, 1981; IOB, 1970; LITTEL et al., 1985; MARIC et al., 1980; JONES, 1987; LENTINI, 1993; IMAI et al., 1995; O'TOOLE, 1983; BOULTON et al., 1989)

Grundlage der Messmethode	Beispiel
Zellvermehrung	<ul style="list-style-type: none"> • Standard-Plattenauszahl-Technik • Austrich-Zähl-Technik
Färbung	<ul style="list-style-type: none"> • Brightfield- /Hellfeld-Färbung • Fluoreszenz-Färbung
Messung des Gehaltes bestimmter Zellkomponenten bzw. der metabolischen Aktivität	<ul style="list-style-type: none"> • ATP-Gehalt • NADH-Gehalt • Glykolytische Fluss Rate
Absorptionsmessung	<ul style="list-style-type: none"> • Absorptionsmessung bei 500nm
Intrazellulärer pH-Wert	<ul style="list-style-type: none"> • ICP-Methode
Wärmebildung	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrokolorimetrie
Kapazität der Zelle	<ul style="list-style-type: none"> • Radiosignal-Methode

Der eigentliche Begriff, der den physiologischen Zustand der lebenden Hefezellen beschreibt, ist die Vitalität. Sicher ist die Bestimmung des Lebend/Tot-Anteils von entscheidender Bedeutung, denn schließlich können nur lebende Zellen fermentieren und sich vermehren. Es stellt sich aber vielmehr die Frage, wie „vital“ die lebenden Hefezellen

len in bezug auf ihre Aktivität bzw. Gärleistung sind oder wie ausgeprägt ihre Fähigkeit, unter Stressbedingungen zu leben, ist. Somit spielt nicht die Viabilität, sondern die Vitalität die entscheidende Rolle in bezug auf die fermentative Leistung einer Hefe (MOCHABA et al., 1998). Diese Vitalität oder physiologische Zustand wird während der Bierherstellung von mehreren Faktoren wie Temperatur, Druck, physikalische Behandlung und Lagerung, Belüftung, Anzahl der Führungen, Waschen der Hefe, Nährstoffstress und -angebot, genetische Disposition und Alter der Hefezellen u.a. (D'AMORE, 1992; IMAI, 1999; JONES et al., 1981) beeinflusst. Hinzu kommt die Tatsache, dass diese Faktoren sich wiederum auch untereinander beeinflussen können. Im weiteren müssen die unterschiedlichen Anforderungen an die Hefe bei den verschiedenen Prozessschritten und einige brauereispezifische Stoffwechselphänomene berücksichtigt werden. Die Propagation verfolgt das Ziel, durch das Verschieben des Stoffwechsels in den aeroben Bereich möglichst viel vitale Biomasse zu produzieren. Bei der Gärung schließlich läuft der Hefestoffwechsel ausschließlich anaerob ab. Hier steht physiologisch gesehen der Extraktabbau und die damit verbundene Bildung von Alkohol und Gärungsnebenprodukten im Vordergrund.

Diese Komplexität erschwert die Suche nach einer geeigneten Methode zur Bestimmung des physiologischen Zustands einer Hefe in allen Einsatzstadien bei der Bierherstellung. Eine solche Methode sollte einfach in der Handhabung, schnell durchführbar und kostengünstig sein sowie exakte und direkte Aussagen liefern (BOULTON, 1996).

Zur Bestimmung der Hefevitalität bzw. des physiologischen Zustandes sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben (HEGGART, 2000; LENTINI, 1993). Dabei werden verschieden Ansätze verfolgt. Zum einen wird die Stoffwechselaktivität der Hefe bestimmt, zum anderen werden aussagekräftige Zellinhaltsstoffe gemessen. Die aufgeführten Tests gewähren allerdings nur einen teilweisen Einblick in den physiologischen Zustand einer Bierhefe in allen Einsatzstadien. Die aussagekräftigste Methode ist bis heute immer noch die Durchführung von Gärversuchen im Labormaßstab unter Praxisbedingungen. Obwohl die Erkenntnisse sehr gute Rückschlüsse auf das zu erwartende Gärergebnis in der Praxis zulassen, ist diese aber auf Grund des hohen Zeitaufwandes ungeeignet. Tabelle 2 zeigt einen Überblick über bisher bekannte Methoden, die zur Bestimmung des physiologischen Zustandes eingesetzt werden.

Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsbestimmung
(HEGGART, 2000; LENTINI, 1993; MÜLLER et al.; 1997)

Grundlage der Meßmethode	Beispiel
Metabolische Aktivität	<ul style="list-style-type: none"> • Vitalitätsfärbung (Durchflußcytometer) • Mikrokolorimetrie • Reduktionsvermögen (z.B. Vicinale Diketone) • Magnesium Ion Release Test (MRT) • Spezifische Sauerstoff-Aufnahme-Rate (Q_{O_2}) • Acidification Power Test (APT) • Intrazellulärer pH-Wert (ICP) • Protease-Aktivitäts-Test
Messung zellulärer Komponenten	<ul style="list-style-type: none"> • Adenosinriphosphat (ATP) • Adenylate Energy Charge (AEC) • NADH (fluorometrisch) • Glykogen/ Trehalose • Sterole/ Ungesättigte Fettsäuren • Formazan-Bildung • DNA-Gehalt (Zellzyklusanalyse) • 3β-Hydroxysterolgehalt (Hormone) • Neutrallipide
Glykogen-Fluss-Rate oder Fermentationskapazität	<ul style="list-style-type: none"> • Glykolytische Flussrate • CO_2-Bildung • CO_2 Druckaufbautest • Kurz-Gärtest

2.2 Bedeutung der Enzyme und Funktionsdenken

In Kapitel 2.1.2 sind eine Reihe von Enzymen im Zusammenhang mit dem Hefemetabolismus genannt worden. Diese sorgen für eine Anpassung des Stoffwechsels an sich verändernde Umweltbedingungen und optimieren den Fluss der Metabolite innerhalb der Stoffwechselwege. Dabei wurde nur auf die von ihnen katalysierten Reaktionen eingegangen, nicht aber auf die Funktionsweise bestimmter Proteine und ihre Steuerung. Darauf soll im folgenden Kapitel ein wenig näher eingegangen werden und die Auswahl von bestimmten Schlüsselenzyme für die vorliegende Arbeit begründet werden.

2.2.1 Allgemeines über Enzyme und ihre Nomenklatur

Die Untersuchung der Enzyme und ihrer Mechanismen gehört wegen der grundsätzlichen Bedeutung für die Aufklärung der Organisation des Lebens und in zunehmenden Maße auch für die industriellen Stoffumwandlungen zu den wichtigsten Teilgebieten der Biochemie. Zusätzlich gewannen diese Proteine in den letzten Jahren aufgrund ihrer Spezifität immer mehr an Bedeutung als Analytik- und Synthesehilfsmittel für Naturstoffe und als Werkzeuge für die synthetische Stereochemie. Zu den wichtigsten chemischen Methoden zur Untersuchung von Enzymmechanismen zählen der Einsatz von Substrat und Coenzym-Analogen sowie die chemische Modifizierung von Aminosäuren im aktiven Zentrum.

In lebenden Zellen haben Enzyme die Aufgabe, die chemischen Reaktionen zu katalysieren und tragen somit maßgeblich zur Regulation des Stoffwechsels bei. Sie beeinflussen dabei nicht die Lage des Reaktionsgleichgewichtes, sondern beschleunigen nur die Reaktionsgeschwindigkeit durch eine deutliche Herabsetzung der Aktivierungsenergie. Enzyme zeichnen sich durch ihre Wirkungs-, Stereo- und Substratspezifität aus. Unter der Wirkungsspezifität ist die Fähigkeit zu verstehen, von den verschiedenen Möglichkeiten der chemischen Umsetzungen nur eine ganz bestimmte auszuwählen. Bei der Stereospezifität setzt das Protein dagegen nur eines von mehreren Enantiomeren um. Ebenso besitzen Enzyme eine hohe Substratspezifität, d.h. sie binden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip nur ein ganz bestimmtes Substrat (LICHTENTHALER, 1994). Als Beispiel ist hier Maltase zu erwähnen, die nur Maltose zu Glucose spalten kann, nicht aber Cellobiose und andere Disaccharide. Diese Spezifitäten führten zu einer Klassifizierung der Enzyme in 6 Hauptgruppen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen) und ihre Untergruppen, die abhängig von der Struktur am aktiven Zentrum sind. Jedes Enzym erhielt einen vierstelligen Zahlencode, die sogenannte Enzyme-Commission (EC) und eine systematische Bezeichnung (DECKWER et al., 1999).

Damit Enzyme effizient wirken können, müssen die Reaktionsbedingungen im Bereich des Temperatur- und pH-Optimums liegen. Bei deutlichen Abweichungen vom jeweiligen Optimum führt dies zur einer Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit und es kann unter Umständen zum unwiederbringlichen Funktionsverlust des Enzyms kommen.

In der Zelle unterliegen die Enzyme einer vielfältigen Kontrolle. Ihre Syntheserate sowie die Konzentration in der Zelle unterliegen der genetischen Kontrolle der Zelle und werden von den Stoffwechselintermediaten beeinflusst. Ebenso können die Proteine auch in inaktiver Form vorliegen und abhängig von den physiologischen Faktoren wieder in eine aktive Form gelangen. All diese Kontrollmechanismen ermöglichen eine Anpassung des Stoffwechsels an die Veränderungen der Umwelt, z.B. die Menge und die Verfügbarkeit von bestimmten Nährstoffen.

2.2.2 Aufbau und Funktionsweise der Enzyme

Enzyme sind meist globuläre Proteine, die aus einer oder mehreren Polypeptidketten bestehen und aus mehreren gleichen oder verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sein können, an deren Aufbau 20 verschiedene Aminosäuren beteiligt sind. Ihr mittleres molares Gewicht liegt zwischen 12000 bis 1 Mio. Dalton. Die Aminosäuren zeigen etwa alle 300 Einheiten eine gesetzmäßige Verkettung auf. Die Anordnung ist nicht in einer Ebene, sondern zeigt eine helixartige Struktur. Die Helix ist durch verschiedene Bindungsarten geknäuelt und vielfach gefaltet. Somit entstehen die typischen Falten und Furchen, die dann genau auf das Substrat passen (DARNELL et al., 1994). Proteine, die aufeinander folgende Reaktionsschritte katalysieren wie z.B. die Pyruvatdehydrogenase, werden als Multi-Enzym-Komplexe bezeichnet und bestehen aus mehreren Enzymen als Untereinheiten. Multifunktionelle Enzyme können ebenso mehrere katalytische Funktionen ausüben, besitzen dagegen aber nur einen Polypeptidstrang. In der Zelle liegen die Enzyme gelöst oder membrangebunden, wie z.B. in den Mitochondrien vor.

Die Umsetzungen der Moleküle finden am sogenannten aktiven Zentrum statt. Als aktives Zentrum eines Enzyms wird der Teil des Moleküls verstanden, der unmittelbar an der biologischen Funktion beteiligt ist. Bei konjugierten Enzym-Proteinen wird zusätzlich zwischen dem Apoenzym und der prosthetischen Gruppe unterschieden. Zur prosthetischen Gruppe gehören die Coenzyme bzw. Cofaktoren, die als niedermolekulare Verbindungen bei den Katalysen benötigt werden und verantwortlich sind für die Wirkungsspezifität. Diese bilden mit dem Proteinteil des Enzyms (Apoenzym) das sogenannte Holoenzym. Etwa 50 % aller Enzyme benötigen Coenzyme bzw. Cofaktoren für die Entwicklung einer Aktivität. Zu den wichtigsten Coenzymen zählen u.a. NAD^+ , NADP^+ , ATP , FAD^+ , CoA-SH sowie Spurenelemente.

Bei der Bindung an das Enzym wird das Substrat über einen anderen Reaktionsweg sowie mit einem anderem Übergangszustand umgesetzt (Enzym + Substrat \Rightarrow Enzym-Substrat \Rightarrow Enzym-Produkt \Rightarrow Enzym + Produkt). Die Herabsetzung der benötigten Aktivierungsenergie geschieht durch die Wechselwirkungen zwischen den Substraten und dem Enzym. Diese Wechselwirkungen entstehen entweder über Wasserstoffbrückenbildungen, van-der-Waals-Kräfte oder ionische Bindungen.

Die Bildung katabolischer Enzyme geschieht über die Enzyminduktion. Bei Vorliegen bestimmter Nährstoffe im Milieu bilden sich nur Enzyme, die die vorhandenen Nährstoffe verwerten und seine Abbauprodukte in den Stoffwechsel einschleusen können. Auf der anderen Seite werden die nicht benötigten Proteine in ihrer Bildung unterdrückt. Häufen sich im Milieu die Endprodukte des Stoffwechsels an, so kommt es mit der Enzymrepression zur Bildung anabolischer Enzyme. Dabei geht die Bildung der katabolischen Enzyme, die diese Endprodukte hervorbringen, zurück. Für eine kurzfristige Regulation des Stoffwechselflusses können die Aktivitäten der Enzyme gesteuert werden. Hierzu gibt es mehrere Möglichkeiten, die zu einer Regulierung der Enzymaktivität führen. Bei einer allosterischen Hemmung bindet sich der Inhibitor (negativer

Tabelle 3: Regulationsmechanismen der Enzyme (WENZEL, 1993)

a) Mechanismen zur Regulierung der Enzymaktivität		
<i>Form der Regulation</i>	<i>Physiologische Beobachtung</i>	<i>Enzymmechanismus</i>
Allosterische Aktivierung und Deaktivierung	Reversibler Verlust der Enzymaktivität	Änderungen in der Affinität zum Substrat
Gegenseitige Änderung durch kovalente Modifikation	Reversibler Verlust der Enzymaktivität innerhalb von Minuten	Gewöhnlich durch Phosphorylierung des Enzyms
b) Mechanismen zur Regulierung der Enzymmenge		
<i>Form der Regulation</i>	<i>Physiologische Beobachtung</i>	<i>Enzymmechanismus</i>
Inaktivierung	Irreversibler Verlust der Enzymaktivität	Spezifische Proteolyse des Enzyms
Induzierung	Zunahme der Enzymaktivität als Antwort auf die Anwesenheit eines Induktors (durch ein Substrat oder einer strukturähnlichen Komponente)	Induktor ruft eine Aktivierung der Transkription hervor
Derepression	Zunahme der Enzymaktivität nach Entfernung des reprimierenden Substrates	De-Inhibitierung der Transkription

Effektor) am allosterischen Zentrum und reduziert somit die Aktivität. Dagegen konkurriert der Inhibitor bei der kompetitiven Hemmung mit dem Substrat. Im Gegenzug kann ein positiver Effektor zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Weitere Hemmmechanismen sind Substrat-, Produkthemmung sowie die nicht-kompetitive Hemmung. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Mechanismen, die die Enzymaktivität und die Enzymmenge regulieren.

2.2.3 Enzyme mit einer Schlüsselfunktion im Hefemetabolismus

Von der Vielzahl der in der Hefe vorkommenden Enzyme wurden zur Untersuchung des physiologischen Zustandes der Hefe in der vorliegenden Arbeit die Enzyme Maltase, Pyruvatdehydrogenase (PDH), Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH) ausgewählt. In der Abbildung 3 sind vereinfacht die Positionen dieser Schlüsselenzyme im Stoffwechsel zu sehen.

In Kapitel 2.1.2 wurde das Enzym *Maltase* (*E.C. 3.2.1.20*) bereits angesprochen. Aufgrund der Zusammensetzung der Würze kommt ihr eine entscheidende Bedeutung bei der Verwertung von Maltose zu. Die Fähigkeit einer Hefe, Maltose (und Maltotriose) bei der Gärung möglichst früh und schnell zu verwerten, und somit zu einer zügigeren Gärung beizutragen, gilt heute als eines der Hauptkriterien bei der Wahl eines geeigneten Hefestammes. Die Maltase ist ein Teil des Maltasesystems und befindet sich im Cytosol der Zelle. Maltose muss zunächst über die zugehörigen Permeasen in die Zelle eingeschleust werden, um diese dann in der Zelle katalytisch durch die Maltase zu spalten. Durch hydrolytische Spaltung entstehen aus einem Molekül Maltose zwei Moleküle Glucose. Der Transport von Maltose durch die Zellmembran ist mit einem Energieaufwand verbunden und wird mit Hilfe eines Protons erleichtert (van LEEUWEN et al., 1992).

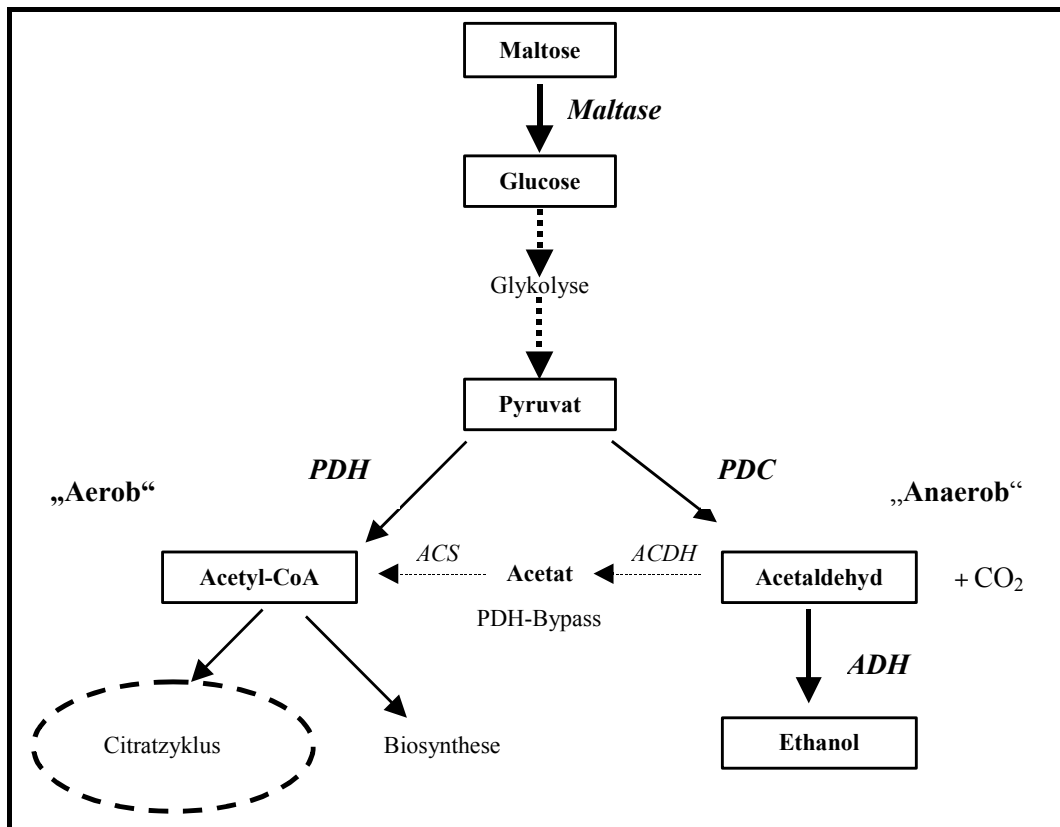


Abbildung 3: Vereinfachter Überblick über die Positionen der Schlüsselenzyme

Für die Maltoseverwertung sind in *Saccharomyces cerevisiae* insgesamt 5 unabhängige MAL Loci erforderlich: *MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* und *MAL6* (CHARRON et al., 1989; NEEDLEMAN et al., 1983; CHOW, 1989). Jeder Locus verfügt über jeweils drei Strukturgene zur Codierung einer Maltase (*MALxS*) (COHEN et al., 1984; HONG et al., 1986), eines Maltose Transporters/ Permease (*MALxT*) (DUBIN et al., 1985; CHANG et al., 1989) und eines positiven Regulator Proteins (*MALxR*) (SOLLITTI et al., 1988). Abbildung 4 stellt die drei Strukturgene und ihre Regulation vereinfacht dar.

Die Gene für diese Enzyme unterliegen sowohl der Glucoserepression als auch der Maltoseinduktion (DE KROON und KONINGSBERGER, 1970). Die Expression von *MALS* und *MALT* wird durch Maltose induziert, während das Regulatorgen konstitutiv transkribiert wird (NEEDLEMAN et al., 1984). Da zu Beginn der Gärung auch der Einfachzucker Glucose in der Würze vorliegt, findet bei Laborhefestämmen und teilweise auch bei Industriehefestämmen eine Reprimierung dieser Gene statt (FEDEROFF et al., 1983; GORTS, 1969; TRUMBLY, 1992; WIJK et al., 1969, HOLZER, 1976). Ebenso können Fructose und Saccharose zu ihrer Reprimierung führen (ENTIAN und SHÜLLER, 1997).

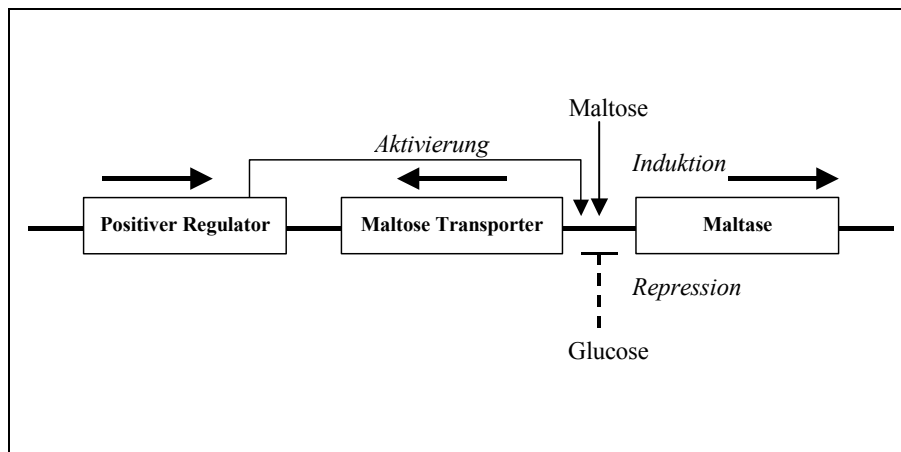


Abbildung 4: Vereinfachter Regulationsmechanismus des Maltase-Gen-Komplexes
(NEEDLEMAN et al., 1991)

Eine Glucose-induzierte Inaktivierung von bereits vorhandenen MALS in einer Hefezelle konnte nicht beobachtet werden (RAUTIO et al., 2001). Erst wenn diese Hexose vollständig aufgebraucht ist, kommt es wieder zur Induzierung des *MAL* locus, Maltose wird verstärkt wieder durch *MALT* aufgenommen und durch *MALS* zu Glucose gespalten. In Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen wie z.B. bei High Gravity Würzen ist die Repression des *MALT* oft der entscheidende Faktor zur Verkürzung der Gärdauer (KODAMA, 1995; D'AMORE et al., 1989; PHAWENI et al., 1993). Saccharose verzögert zu Beginn der Gärung die Maltoseaufnahme durch Inhibitierung des *MALT* (D'AMORE et al., 1989; MENESES, 2002; CASON et al., 1987; RAUTIO und LONDESBOROUGH, 2003). Ebenso kann eine hohe Ethanolkonzentration, wie bei Bieren mit hoher Stammwürze, die Expression der *MAL* Gene beeinflussen, indem es den Grad zu deren Induzierung herabsetzt oder auch als nicht-kompetitiver Inhibitor für den *MALT* fungiert (NEEDLEMAN, 1984; LOUREIRO-DIAS und PEINADO, 1982). Bei Maltotriose ist analog zur Maltose das Enzym Maltotriosepermease für den Transport und die Melibiase für die Spaltung in Einfachzucker zuständig.

In Kapitel 2.1.2 (s.a. Abbildung 1) wurde deutlich, dass der Kohlenhydrat-Stoffwechsel in den Knotenpunkt Pyruvat mündet und von dort aus wieder zu einem respirativen oder fermentativen Zuckerabbauweg verzweigt. An diesem Punkt bestehen drei Möglichkeiten zur Verwertung des Pyruvats während des Wachstums in zuckerhaltigen Medien: (a) oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA, (b) Decarboxylierung zu Acetaldehyd und (c) Carboxylierung zu Oxalacetat.

In bezug auf die Energiegewinnung und zur Bereitstellung von Intermediaten zur Synthese bevorzugt die Hefe den oxidativen Abbau. Dazu ist eine Verbindung der Glykolyse mit dem Citratzyklus über Acetyl-CoA erforderlich. Durch die Pyruvatdehydrogenase (E.C. 1.2.4.1) erfolgt die irreversible oxidative Umwandlung des Pyruvats zum Acetyl-CoA, wobei CO_2 abgespalten wird (HOLZER und GOEDE, 1957; KRESZE und RONFT, 1981). In Abbildung 5 ist der komplexe enzymatische Umwandlungsprozess abgebildet.

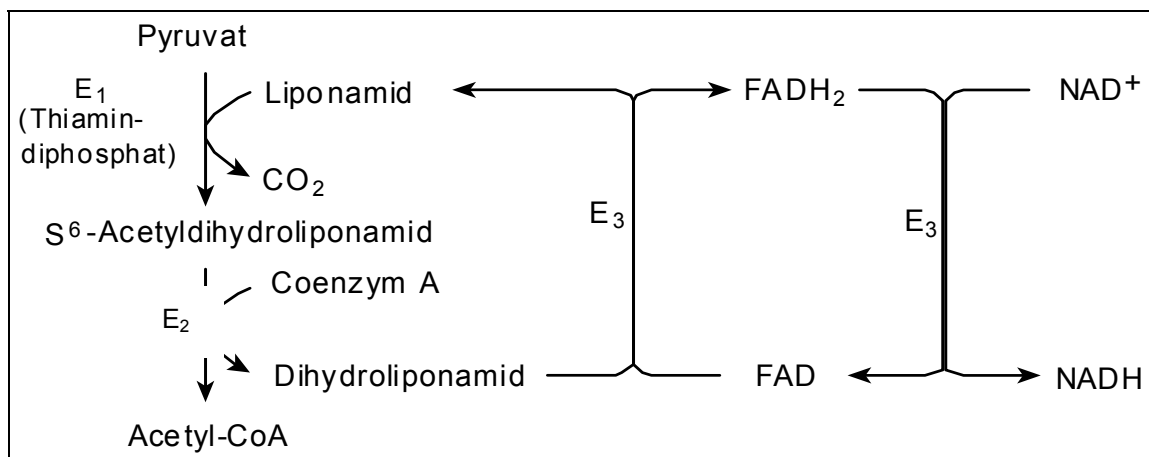


Abbildung 5: Enzymatische Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA

PDH ist ein Multienzymkomplex ($M_r = 8\text{-}9 \cdot 10^6$), bestehend aus drei Untereinheiten (KRESZE und RONFT, 1981):

- E₁: Pyruvatdehydrogenase (EC 1.2.4.1)
- E₂: Dihydrolipolytransferase (EC 2.3.1.12)
- E₃: Dihydrolipolydehydrogenase (EC 1.8.1.4)

Im Gegensatz zu den glykolytischen Enzymen liegt die PDH in den Mitochondrien vor. Ein Pyruvat-Carrier transportiert das Pyruvat in die Mitochondrien der Hefezelle. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die beteiligten Enzyme des Pyruvatstoffwechsels PDH und PDC (ohne Pyruvatcarboxylase) und ihre entsprechenden Strukturgene (aus PRONK et al., 1996). Eine katalytische Funktion von Protein X ist bisher nicht bekannt. Beim ersten Reaktionsschritt (siehe Abbildung 5) durch E₁ und seine beiden Untereinheiten E₁ α und E₁ β wird Pyruvat kovalent an das TPP, einem Cofaktor der PDH, gebunden, und es kommt zum Zwischenprodukt 2- α -hydroxyl-ethyl-TPP (Acetyldihydro-

liponamid, „aktiver Aldehyd“) (HOLZER und KOHLHAW, 1961). Es folgt eine Oxidation der α -hydroxy-Gruppe und das ebenfalls in diesem Komplex enthaltene Enzym E₂, die Dihydroliponamid-Acetyltransferase, überträgt schließlich den Acetylrest vom Dihydroliponamid auf das Coenzym A. Dabei entsteht das Molekül Acetyl-CoA. Die Komponente E₃ des Komplexes, die Dihydroliponamid-Dehydrogenase, reoxidiert das Dihydroliponamid wieder zum Liponamid durch die Übertragung von Elektronen und Wasserstoff auf NAD⁺.

Tabelle 4: Übersicht über die Gene der Enzyme im Pyruvatstoffwechsel

Enzym		Strukturgen	Peptidgröße (kDa)	Referenz
Pyruvatdehydrogenase (heteromultimer)	E1 α Untereinheit	PDA1	45	BEHAL et al., 1989 STUCKA et al., 1991
	E1 β Untereinheit	PDB1	36	MIRAN et al., 1993
	E2 Untereinheit	LAT1	49	NIU et al., 1988
	E3 Untereinheit	LPD1	52	ROSS et al., 1988 ROY und DAWES, 1987
	Protein X	PDX1	42	BEHAL et al., 1989b
Pyruvatdecarboxylase (tetramer)		PDC1	62	KELLERMANN et al., 1986 SCHMITT et al., 1983
		PDC5	62	HOHMANN und CEDERBERG, 1990 SEEBOTH et al., 1990
		PDC6	62	HOHMANN, 1991

Diese Übertragung geschieht in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wird die oxidierte Form des Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD⁺) in die reduzierte Form FADH₂ überführt. Bei der anschließenden Reduzierung der oxidierten Form des NAD⁺ in NADH₂ wird gleichzeitig das FADH₂ wieder in die oxidierte Form FAD zurückgeführt. Obwohl Proteolyse und konkurrierende Enzyme wie die PDC die Messungen der PDH-Aktivitäten erschweren, konnte durch Beobachtungen festgestellt werden, dass die PDH auch unter anaeroben Bedingungen und bei aerobem Wachstum auf Ethanol aktiv ist. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen aktiver Aldehyd und Acetyl-CoA in den Mitochondrien für die Biosynthese von verschiedenen Aminosäuren (Arginin, Leucin) über die PDH bereit gestellt werden (STEENSMA et al., 1990; Ryan et al., 1973). Bisher ist noch unklar, in welchem Umfang die PDH am Aminosäurestoffwechsel beteiligt ist (VAN URK et al., 1990). Auf jeden Fall besitzt die PDH eine bedeutende Aufgabe bezüglich der Regulation des mitochondrialen Acetyl-CoA-Haushalts

(WENZEL et al., 1993). Die transkriptionale Regulation wurde bisher an zwei Strukturgenen untersucht. Die *PDAI* (E1) verhielt sich unter den unterschiedlichsten Bedingungen nahezu konstant (WENZEL et al., 1993) und bei *LPDI* (E3) stellte sich heraus, dass diese bei der Glucoserepression eine bedeutende Rolle spielt (ROY und DAWES, 1987).

Die Hefe beschreitet über die Pyruvatdecarboxylase (E.C. 4.1.1.1) ihren anaeroben Stoffwechsel. Auch SCHMITT et al. (1983) und HOHMANN et al. (1990) bestätigten, dass die PDC während der alkoholischen Gärung induziert wird. Diese wird allosterisch reguliert durch das Substrat Pyruvat (BOITEUX et al., 1970). Auch unter aeroben Bedingungen spielt die PDC eine essentielle Rolle bei der Bereitstellung von cytosolischem Acetyl-CoA über einen Bypass (s. Abbildung 2). Die PDC decarboxyliert irreversibel Pyruvat und andere 2-Oxosäuren zu Aldehyden. Diese Reaktion ist eine einfache Decarboxylierung und nicht mit einer Oxidation von Pyruvat verbunden. Dieser Tetramer mit einer molekularen Masse von 240 kDa liegt im Cytosol vor und besteht aus vier fast identischen Untereinheiten (VAN URK et al., 1990, GOUNARIS et al., 1975, KUO et al., 1986). Jede Untereinheit enthält jeweils ein festgebundenes ThDP Coenzym und ein Magnesium-Ion, die für die Katalyse benötigt werden (GREEN et al., 1941; LOHMANN und SCHUSTER, 1937; NEUBERG und KARCZAG, 1911; Arjunan et al., 1996). Das Hefegenom beherbergt 3 Strukturgene, die jeweils eine aktive PDC codieren (HOHMANN, 1991). Intrazelluläres Phosphat beeinflusst physiologisch als Effektor maßgeblich die *in vivo* Aktivität der PDC (BOITEUX und HESS, 1970; HUBNER et al., 1978). „Shake-flask experiments“, bei denen allerdings hohe glykolytische Flussraten auftreten, zeigten, dass die Aktivität der PDC in *Saccharomyces cerevisiae* mit der Funktion des Zellwachstums und Gärgeschwindigkeit/ -kapazität korreliert (SCHMITT und ZIMMERMANN, 1982). Auch konnte hier ein starker Anstieg der PDC-Aktivität bei einem Wechsel von einem Medium mit nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen (z.B. Ethanol) in ein glucosehaltiges Medium beobachtet werden (BOLES und ZIMMERMANN, 1993; BOLES et al., 1993). SCHMITT et al. (1983) stellten eine Steigerung der Expression von PDC1 bei Anwesenheit von Glucose im Medium fest. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass es in aeroben Medien mit begrenztem Zuckerangebot mit Eintreten der alkoholischen Gärung zu einem deutlichen Anstieg der PDC Aktivität kommt (POSTMA et al., 1989). Allerdings ließ sich die Gärcapazität durch übermäßiges Expressionieren der PDC nicht weiter erhöhen (SCHAAFF et al.,

1989). Einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der PDC besitzt auch die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Medium (WEUSTHUIS et al., 1994).

Nicht näher soll hier auf die Pyruvatcarboxylase eingegangen werden, die die dritte mögliche Verwertung des Pyruvats am Ende der Glykolyse darstellt. Diese Reaktion dient in erster Linie zum Auffüllen des Citratzyklusses, um den Zyklus am Laufen zu halten (SCHLEGEL, 1992). Dieser Weg ist unerlässlich für das Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* auf Glucose, wenn Atmung durch die Glucose reprimiert wird und C₂-Kohlenstoffe (Acetyl-CoA) für die Lipidsynthese erforderlich sind (PRONK et al., 1996).

Es konkurrieren also 3 Enzyme um das Substrat Pyruvat am Ende der Glykolyse. PDH und PDC sind räumlich unterschiedlich lokalisiert (PDH in den Mitochondrien, PDC im Cytosol) und können somit nicht direkt um das Substrat konkurrieren. Allgemein kann gesagt werden, dass am Knotenpunkt Pyruvat Atmung und Gärung um dieses Substrat konkurrieren (RIEGER et al., 1983; VAN URK et al., 1989). Ein wichtiger Faktor bei der Regulation zwischen diesen Enzymen ist der Gehalt an intrazellulärem Pyruvat. Bei niedrigen aeroben Glucoseabbauraten und dementsprechend niedrigem glykolytischen Fluss wird der Weg über die PDC größtenteils umgangen und der respirative Abbau über die PDH vollzogen, da die Pyruvatkonzentration unter der K_m der PDH liegt (POSTMA et al., 1989). Hohe glykolytische Flussraten haben einen vorwiegenden Abbau über die PDC aufgrund seiner hohen K_m zur Folge. Die alkoholische Gärung wird in diesem Falle ausgelöst, wenn zusätzlich die Kapazität des Bypasses mit den Enzymen Acetaldehyddehydrogenase und Acetyl-CoA Synthetase erschöpft ist (POSTMA et al., 1989; HOLZER, 1961; BOITEUX und HESS, 1970). POSTMA et al. (1996) führten den Crabtree-Effekt unter aeroben Bedingungen auf die Sättigung des PDH-Bypasses zurück.

Die Alkoholdehydrogenase (E.C. 1.1.1.1) gehört zur Gruppe der Oxidoreduktasen und reduziert den Acetaldehyd zum Ethanol (siehe Abbildungen 2 und 3), welcher den letzten Schritt der alkoholischen Gärung bildet. Dabei wird die reduzierte Form des NADH₂ in die oxidierte Form NAD⁺ überführt. Im aktiven Zentrum sind Zink-Ionen für den Elektronentransport zuständig. Diese Reaktion kann bei einigen Hefen auch reversibel sein, d.h. sie vermögen den Alkohol zu Acetaldehyd zu oxidieren, der dann weiter zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Auf dieser Weise können die Hefen auch auf Ethanol

als Kohlenstoffquelle wachsen und dabei Aminosäuren, Fettsäuren und Kohlenhydrate synthetisieren.

Insgesamt konnten drei ADH-Isoenzyme in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden: ADH1, ADH2 und ADH3 (LUTSDORF und MEGNET, 1968). Ein viertes Isoenzym ADH4 ist ebenfalls bekannt, konnte aber in den meisten Laborhefestämmen nicht nachgewiesen werden und spielt im Ethanolmetabolismus keine bedeutende Rolle (DREWKE et al., 1988). ADH1 ist die konstitutive Form, die im Cytosol Acetaldehyd zu Ethanol verstoffwechselt und während der anaeroben Fermentation exprimiert wird (YOUNG et al., 1982). Auch ist eine verstärkte Expression der ADH1 bei der Anwesenheit von Glucose bekannt, und diese macht den größten Teil der Aktivität der Alkoholdehydrogenasen aus (DENIS et al., 1983; LESKOVAC et al., 2002). Dieses Tetramer besteht aus 4 identischen Untereinheiten mit einer molaren Masse von 36 kDa (EKLUND und BRÄNDÉN, 1987), die jeweils eine Coenzym Bindungsstelle und ein fest gebundenes Zinkatom aufweisen (LESKOVAC et al., 1976). Bei der ADH2 wird vermutet, dass diese für die Dissimilation von Ethanol zu Acetaldehyd zuständig ist (CIRIACY, 1997). Die cytosolische Form der ADH2 unterliegt der Repression durch Glucose, ebenso wie die mitochondriale ADH3 (WILLS, 1979; YOUNG und PILLGRIM, 1985).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Hefestamm und Fermentationsmedien

Im Focus dieser Arbeit standen die Untersuchungen des Hefestamms W 34/70 (*Saccharomyces cerevisiae* var.) der Hefebank Weihenstephan. Diese untergärige Bruchhefe ist in deutschen Brauereien am weitesten verbreitet und zeichnet sich durch gute Gäreigenschaften aus (DONHAUSER et al., 1987). Die Hefe lag zunächst in gepresster Form vor und wurde vor dem Anstellen mit Bierwürze in einem Erlenmeyerkolben aufgeschlämmt.

Bei den Untersuchungen in der Brauerei (s. Kapitel 4.9) stammte die Hefe ebenfalls von der Hefebank, die in den betriebseigenen Propagatoren auf die benötigte Hefemenge hergeführt wurde.

Als Fermentationsmedien kamen hauptsächlich helle Vollbierwürzen aus einer Brauerei zum Einsatz, um eine möglichst konstante Würzezusammensetzung zu gewährleisten. Diese wurde direkt nach dem Plattenkühler in sterile 20 l-Corneliusbehälter überführt. In Tabelle 5 ist die durchschnittliche Zusammensetzung der Vollbierwürze ersichtlich. Zusammen mit dem Gehalt an FAN (22,2 mg/100ml) kann diese für eine Bierwürze als „ideal“ betrachtet werden.

Tabelle 5: Durchschnittliche Zusammensetzung der hellen Vollbierwürze

	g/100 ml	Prozentualer Anteil (%)
Fructose	0,3	2,4
Glucose	1,1	8,7
Saccharose	0,2	1,6
Maltose	5,9	46,8
Maltotriose	1,2	9,5
Σ vergärbare Zucker	8,7	69,0

3.1.2 Reaktoren und Gärtanks

Die Versuche in Kapitel 4.5 und 4.7 wurden am Lehrstuhl in einem Bioreaktor der Firma Esau und Hueber, Schrobenshausen, durchgeführt. Mit einem Bruttovolumen von 120 l lassen sich mit diesem 60 l-Propagationen und Gärungen untersuchen. Mittels einer frequenzgesteuerten Pumpe kann der Tankinhalt umgewälzt werden. Die Bega-

sung mit Sterilluft, wenn erforderlich, erfolgte während des Umwälzens in der Bypassleitung. In der Diplomarbeit von SCHWEIGER (1999) können detailliertere Informationen über den Bioreaktor entnommen werden.

Für die Fermentationsversuche in 4.6 wurde ein 7 l-Doppelmantel-Bioreaktor aus Glas eingesetzt. Über einen Computer können die Parameter Belüftung und Zulauf bzw. Entnahme gesteuert werden. Ein integriertes Rührwerk mit externem Motor sorgt für eine intensive Durchmischung des Inhalts. Weitere Angaben zu diesem Bioreaktor sind der Diplomarbeit von KÖTKE (2004) zu entnehmen.

Die Gärungen am Lehrstuhl wurden in mantelgekühlten zylindrokonischen Gärtanks mit einem Bruttovolumen von 40 bzw. 20 l durchgeführt. Die computergesteuerte Kühlung erfolgt mit Eiswasser. Die Gärungen in 4.8 fanden in 20 l-Corneliusbehältern statt, die in entsprechend temperierten Räumen (9/4/0°C) untergebracht sind.

3.1.3 French-Press

Mit der French-Press lassen sich Hefezellen schonend aufschließen. Zum Einsatz kam eine SLM Aminco mit der Druckzelle FA-030. Damit können max. 35 ml Probenmaterial mit einem max. Arbeitsdruck von 40.000 psi (ca. 2.830 bar) verarbeitet werden. Der Aufschlußmechanismus ist mit dem eines Hochdruckhomogenisators vergleichbar. Bei einem Druck von 1130 bar lassen sich in einem Durchgang Aufschlussraten von über 50 % erzielen (HUGHES et al., 1971). Damit thermische Einflüsse durch die hohen Drücke nicht die Enzymstruktur zerstören, wurde die Druckzelle vor der Durchführung bei 4 °C aufbewahrt und die Probe im Plastikröhrchen ständig auf Eis kühl gehalten.

3.1.4 Zentrifugen

Für die Gewinnung der Hefe aus den entsprechenden Fermentationsmedien und die Probenvorbehandlungen ist eine Sorvall RC-5B Hochleistungskühlzentrifuge mit dem Sorvall Rotor SS-34 von Kendro, München, genutzt worden.

Um die Ausfällung in den 1,5 ml Safe-Lock-Tubes (Eppendorf) bei der Proteinbestimmung abzuzentrifugieren, kam die Zentrifuge „Pico“ von Heraeus Instruments, Freiburg, zum Einsatz.

3.1.5 Spektralphotometer

In den Versuchen 4.3 und 4.4 sind die Änderungen der Extinktionen mittels eines Spektralphotometers der Firma Kontron, Modell Uvikon 810/820, erfasst worden. Ein Thermoprinter (Uvikon 48) dient zum Ausdruck der Messresultate, während mit dem Uvikon Recorder 21 der Verlauf der Extinktionen aufgezeichnet werden kann. Die Küvettenhalter konnten mit entsprechend temperiertem Wasser (25 °C) umspült werden, um somit isotherme Messbedingungen zu gewährleisten.

Mit dem Spektralphotometer Modell Ultrospec 3100 pro von Amersham Bioscience konnten die Messwerte (außer in 4.3 und 4.4) auf einem Computer gespeichert werden. Die installierte Software (Swift II von Amersham Bioscience) ermöglicht eine schnelle und exakte Auswertung der Messresultate. Mit diesem Spektralphotometer lassen sich die Extinktionsänderungen in 8 Küvetten in der Reihe messen. Auch hier werden die Küvetten von temperiertem Wasser umströmt, um die isothermen Messbedingungen von 25 °C einzuhalten.

Die Küvetten sind 2 ml-Halbmikroküvetten aus Quarzglas Suprasil mit einer Schichtdicke von 10 mm.

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Alkoholdehydrogenase (Yeast), Roche Diagnostics, Mannheim

Brenztraubensäure (Natriumpyruvat), E. Merck, Darmstadt

BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V), Roche Diagnostics, Mannheim

CoA-SH (Coenzyme A, Yeast), Reinheitsgrad I, Roche Diagnostics, Mannheim

CuSO₄, E. Merck, Darmstadt

L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat, E. Merck, Darmstadt

1,3-Diaza-2,4-cyclopentandien (Imidazol), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

EDTA-Na₂ (Titrplex III), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ethanol (96%), E. Merck, Darmstadt

Gluthation (reduziert), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Glycin, E. Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat, J.T. Baker INC., Grieslau

Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, E. Merck, Darmstadt

3-Mercapto-1,2-propandiol (Thioglycerol), E. Merck, Darmstadt
Tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat, E. Merck, Darmstadt
Natriumazid, Roth, Karlsruhe
NaCl₂, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (β-NAD), Reinheitsgrad II, Roche Diagnostics, Mannheim
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH-Na₂), Reinheitsgrad II, Roche Diagnostics, Mannheim
p-Nitrophenyl-α-D-Glucopyranosid (PNPG), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethansulfonylfluorid, E. Merck, Darmstadt
Semicarbazidhydrochlorid, E. Merck, Darmstadt
Thiaminpyrophosphat (Coccarboxylase), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure, J.T. Baker INC., Grieslau
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), E. Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, E. Merck, Darmstadt

Für alle Lösungen wurde bidestiliertes Wasser verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Vorbereitung der Proben und Proteinbestimmung

Zur Gewinnung der Hefe von Proben aus dem Bioreaktor oder Gärtanks wurde wie folgt vorgegangen:

1. Zentrifugation der Probe (40 ml) bei 16.000 U/min (~ 23600g) und 4 °C (15 min)
2. Überstand mit der Würze verwerfen oder für weitere Analysen verwenden
3. Rückstand mit den Hefezellen in 40 ml 0,1 M Kaliumdiphosphatpuffer (pH 7,5; + 10 mM Thioglycerol + 0,02 % Na-Azid) mit einem Glasstab resuspendieren zum „Waschen“ der Hefe
4. 2. Zentrifugation (Parameter wie unter Punkt 1)
5. Überstand verwerfen
6. Rückstand erneut wie unter Punkt 3. resuspendieren und Zugabe von 400 µl PMSF, einem Proteaseninhibitor (PRICE, 1992)

7. Aufschluß der Hefezellen mit Hilfe der French-Press
8. Zentrifugation der Probe bei 16.000 U/min und 4 °C (20 min)
9. Überführung des Überstandes in einen 100 ml Erlenmeyerkolben
10. Verdünnung der Probe mit BSA (5 g/l) zur Proteinstabilisierung im Verhältnis 1:5 bis 1:20 (Verdünnung abhängig von der gewonnenen Hefemenge, außer für die Bestimmung der PDH-Aktivität)

Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Probe ständig auf Eis kühl gehalten.

Die Proteinmenge wurde mit der modifizierten Methode nach Biuret ermittelt (BEISENHERZ et al., 1953). Monatlich einmal erfolgte die Erstellung einer Eichkurve mit BSA.

3.2.2 Enzymaktivitätsmessungen

Die spezifische Aktivität lässt sich aus den Steigungen der Extinktionskurven über die Zeit und dem Proteingehalt des Hefezelleextraktes (Kapitel 3.2.1) berechnen. Die Einheit U (Unit) für die Aktivität drückt aus, wie viel μmol Substrat pro Minute umgesetzt wird. Bei der spezifischen Aktivität (U/mg) wird dieser Umsatz auf die eingesetzte Enzymmenge (= Proteinmenge nach Biuret) bezogen. Der Extinktionskoeffizient beträgt bei der Maltase $18,5 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ (PNPG) und für PDH, PDC sowie ADH $6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ (NADH). Als Küvetten werden 2 ml-Halbmikroküvetten aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Für jedes Enzym ist eine vierfache Bestimmung durchgeführt worden.

Aktivitätsbestimmung der Maltase (E.C. 3.2.1.20)

Prinzip:

In Anlehnung an die Methode von HALVORSON (1966) wird die Bildung von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenyl- α -D-Glycopyranosid (PNPG) durch die Maltase gemessen. Die Messung der Extinktionen erfolgt spektralphotometrisch bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 405 nm.

Lösungen:

1. 0,5 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,8) + 2 mM EDTA- Na_2
2. 13 mM PNPG

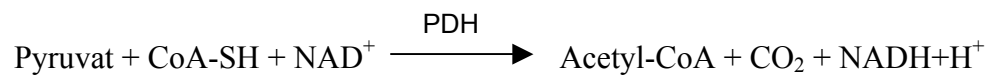
Messung der Maltaseaktivität:

	200 μ l	Kalium-Phosphat-Puffer
	(600 – x) μ l	bidest. H ₂ O
	x μ l	Hefezelleextrakt (verdünnt)
Start:	200 μ l	PNPG

Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdehydrogenase (E.C. 1.2.4.1)

Prinzip:

Die Messung der spezifischen Aktivität erfolgt nach der Methode von KRESZE und RONFT (1981).



Die Bildung von NADH₂ wird spektralphotometrisch bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Lösungen:

1. 0,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) + 5 mM MgCl₂ + 5 mM NaCl₂
2. 42 mM Thiaminpyrophosphat
3. 24 mM NAD⁺
4. 40 mM Na-Pyruvat
5. 20 mM Cystein-Hydrochlorid
6. 10 mM CoA-SH

Vor der Messung werden folgende Lösungen bereits zu einer Lösung zusammen geführt:

Ansatz 1: Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 20:1

Ansatz 2: Lösung 4 und Lösung 5 und Lösung 6 im Verhältnis 1:2:2

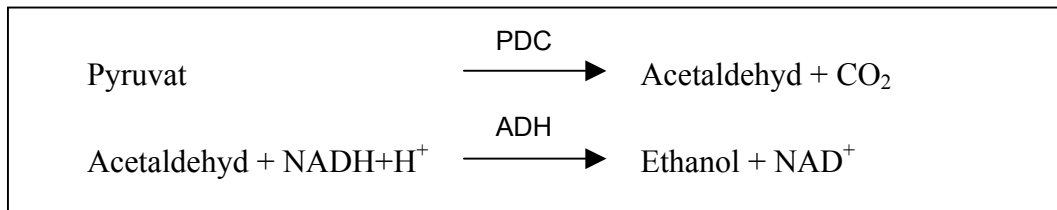
Messung der PDH-Aktivität:

	210 μ l	<i>Ansatz 1</i>
	250 μ l	<i>Ansatz 2</i>
	x μ l	Hefezelleextrakt (unverdünnt)
	(480 – x) μ l	bidest. H ₂ O
Start:	20 μ l	CoA-SH

Aktivitätsbestimmung der Pyruvatdecarboxylase (E.C. 4.1.1.1)

Prinzip:

Es wird die Extinktionsabnahme der NADH über die Zeit in einer gekoppelten Reaktion ermittelt (FLIKWEERT et al., 1996; BERGMAYER, 1974).



Die Abnahme von NADH₂ wird spektralphotometrisch bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 340 nm erfasst.

Lösungen:

1. 0,5 M Imidazol-HCl (pH 6,5) + 50 mM MgCl₂
2. 0,10 M Thiaminpyrophosphat
3. 16 mM NADH-Na₂
4. ADH (300 U/mg); 1:10 verdünnt mit Lösung 1
5. 0,64 M Na-Pyruvat

Folgende Lösungen werden vor der Messung bereits zu einer Lösung zusammen geführt:

Ansatz 3: Lösung 1 und Lösung 2 und Lösung 3 im Verhältnis 10:1:1

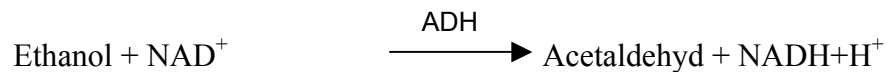
Messung der PDC-Aktivität:

	120 µl	<i>Ansatz 3</i>
	20 µl	ADH
	x µl	Hefezelleextrakt (verdünnt)
	(760 – x) µl	bidest. H ₂ O
Start:	100 µl	Na-Pyruvat

Aktivitätsbestimmung der Alkoholdehydrogenase (E.C. 1.1.1.1)

Prinzip:

Die Messung der spezifischen Aktivität erfolgt nach den Arbeitsvorschriften von Boehringer, Mannheim (1966).



Die Bildung von NADH₂ wird spektralphotometrisch bei einer Temperatur von 25°C und einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Lösungen:

1. 0,1 M Natriumpyrophosphat-Puffer (pH 9,0) + 6,66 mM Glycin + 2 mg/l BSA
2. 2,2 M Semicarbazidhydrochlorid
3. 0,2 M Ethanol (96%)
4. 30 mM NAD⁺
5. 0,3 M Glutathion

Vor der Messung werden folgende Lösungen bereits zu einer Lösung zusammen geführt:

Ansatz 1: Lösung 1 und Lösung 2 und Lösung 3 im Verhältnis 142,9:5,7:1

Messung der PDH-Aktivität:

	908 µl	<i>Ansatz 1</i>
	5 µl	Glutathion
	x µl	Hefezelleextrakt (unverdünnt)
Start:	67 µl	NAD ⁺

3.2.3 Begleitende Messungen/ Untersuchungen

Extrakt:

Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst durch Schütteln entgast und anschließend über ein Faltenfilter (Schleicher&Schüll Nr. 597 ½) filtriert. Mittels einer Präzisionsspindel mit Korrekturskala erfolgte die Bestimmung des Extraktes. Bei kleinen Probenvoluminas (< 100 ml) fand eine digitale Bestimmung mit dem Gerät DMA 35N der Firma Anton Paar statt.

pH-Wert:

Zum Einsatz kam ein pH-Meßgerät der Firma WTW (Modell pH 521). Das Gerät wurde täglich mit zwei Puffern (pH 4,0 und pH 7,0) kalibriert.

Vergärungsgrad:

Der jeweilige Vergärungsgrad wurde nach den Vorschriften der MEBAK ermittelt (PFENNINGER, 1993):

$$V_t = \frac{(P - E) \times 100}{P}$$

P = Stammwürzegehalt in GG-%

E = Scheinbarer Extraktgehalt zum jeweiligen Messzeitpunkt in GG-%

V_t = Vergärungsgrad zum jeweiligen Messzeitpunkt in %

Hefezellzahl

Die Bestimmung der Hefezellzahl erfolgte mittels Thoma-Zählkammer.

Lebend-/ Totanteil:

Die Bestimmung des Lebend-/ Totanteils wurde nach der Methylenblau-Färbemethode durchgeführt (EBC, 1962).

4 Ergebnisse

4.1 Vorgehensweise und Versuchsplanung

In bisherigen Studien sind Enzymaktivitäten von *Saccharomyces* Hefen zwar untersucht worden, allerdings sind diese auf Laborhefestämme beschränkt oder unter Bedingungen durchgeführt worden, die nicht mit der Brauereipraxis zu vergleichen sind. Daher mussten zunächst Erfahrungswerte mit Enzymaktivitäten der Hefe in allen Stadien der Bierherstellung gewonnen werden. Dazu wurden verschiedene Versuche am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II mit dem Hefestamm 34/70 durchgeführt und mit der Messung von Enzymaktivitäten begleitet. Die am Institut gewonnenen Ergebnisse sind zum Ende mit der Enzymaktivitätsmessungen aus einer Brauerei ergänzt worden.

Zu den untersuchten Enzymen zählten Maltase, PDH, PDC sowie ADH, die alle eine Schlüsselfunktion im Metabolismus der Hefe besitzen. Aus dem Verlauf der einzelnen Gärungen bzw. Propagationen und den Aktivitäten der Schlüsselenzyme sollte es möglich sein, Aussagen über die Vorgänge innerhalb der Zelle zu treffen und daraus Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Hefe zu ziehen.

In Kapitel 2.1.3 wurden die Methoden aufgeführt, mit denen eine Aussage über die Vitalität einer Hefe gemacht werden kann. Allerdings erlauben diese nur eine beschränkte Aussage über den physiologischen Zustand einer Hefe (HEGGART, 2000). Dadurch war keine Möglichkeit gegeben, die Aussagefähigkeit von Enzymaktivitätsmessungen bezüglich des physiologischen Zustandes der Hefe mit Hilfe einer zuverlässigen Referenzmethode zu überprüfen. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der angewandten Methode bestand darin, die Hefe verschiedenen Stresssituationen wie oxidativer Stress, osmotischer Stress oder Nährstoffentzug auszusetzen (SMART et al., 2000). Dieses musste allerdings als praxisfern angesehen werden und hatte den weiteren Nachteil, dass es bei dieser Durchführung zu signifikanten Erhöhungen des Totanteils der einzelnen Hefepopulationen kommt. Eine ausreichende Viabilität sollte als Voraussetzung bei der Messung der Vitalität gegeben sein.

Somit bestand die einzige Möglichkeit zur Überprüfung einer Methode zur Beurteilung der Vitalität in der Bestimmung der Gärleistung oder des Gärvermögens, bei der eine Probegärung im Labormaßstab bei definierter Temperatur und gleicher Würzezusammensetzung angesetzt wird. Bei den Versuchen in Kapitel 4.9, in denen ausreichend Probenmaterial gezogen werden konnte, wurden die jeweiligen Hefeproben innerhalb

einer Versuchsreihe alle mit 500 ml identischer autoklavierter Würze im Erlenmeyerkolben angestellt und der Verlauf des Extraktabbaus verfolgt. Diejenige Hefen, die einen zügigen Extraktabbau aufzuweisen hatten, konnten als Hefen in einem „guten Gärungsphysiologischen Zustand“ bezeichnet werden. Diese Anhaltspunkte sollten helfen, das Verhalten der Enzymaktivitäten zu erklären bzw. die jeweils gemessenen Aktivitäten zu einem bestimmten Messzeitpunkt zu beurteilen.

Während der Untersuchungen und bei der Durchführung der Probegärungen trat die Frage auf, zu welcher Phase die Hefe die besten physiologischen Eigenschaften hatte. Anhand der Gärgeschwindigkeit oder der Gärzeit (bis zum Endvergärungsgrad) alleine lassen sich die Hefen nur teilweise qualitativ beurteilen. Dabei werden oft die entsprechenden Hefezellzahlen nicht berücksichtigt. Eine höhere Hefegabe führt zwangsläufig zu einer zügigeren Gärung und daher muss bei der Beurteilung der Gär- bzw. Extraktabbau-geschwindigkeit auch die Hefezellzahl mit einbezogen werden. Dazu wurden in Kapitel 4.2 einige Überlegungen angestellt, um die Gärleistung in Abhängigkeit von der Hefezellzahl und der Fermentationsdauer zu bestimmen.

4.2 Berechnung der Gärleistung

Hefen unter aeroben Bedingungen verwerten deutlich weniger Glucose als solche bei der alkoholischen Gärung, da diese über die Atmungskette ausreichend Energie gewinnen. Eine anaerob wachsende Hefe kann ihre Energie nur aus dem Abbau der Glucose über die Glykolyse bereitstellen und ist somit gezwungen, möglichst viel Glucose abzubauen. Diese Tatsache lässt sich zum Ausdruck zu bringen, wenn der Extraktabbau unter Berücksichtigung der Hefezellzahlen und der Zeit dargestellt wird. Als Ergebnis einer solchen Formel sollten aerob wachsende Hefen wie z.B. bei der Propagation niedrigere Werte aufweisen als solche, die eine vollständig anaerobe Fermentation betreiben. Mit Hilfe der Abbildung 6 soll die Herleitung der Formel beschrieben werden. Die Abbildung zeigt den Extraktabbau und die Entwicklung der Hefezellzahlen einer Fermentation über die Zeit. Zwischen den beiden Messzeitpunkten T_1 und T_2 fand ein Extraktabbau von ΔE_{12} (entsprechend $E_2 - E_1$) statt. Die durchschnittlich an diesem Abbau beteiligten Zellen N_{12} zum Zeitpunkt T_{12} ergeben sich aus $N_1 + (N_2 - N_1)/2$. Somit lässt sich dann aus dem Quotienten von ΔE_{12} und N_{12} den pro Zelle abgebauten Extrakt er-

mitteln. Unter Einbeziehung der Zeitdifferenz ΔT ergibt sich dann die Gärleistung, also der Extraktabbau pro Hefezelle und Stunde.

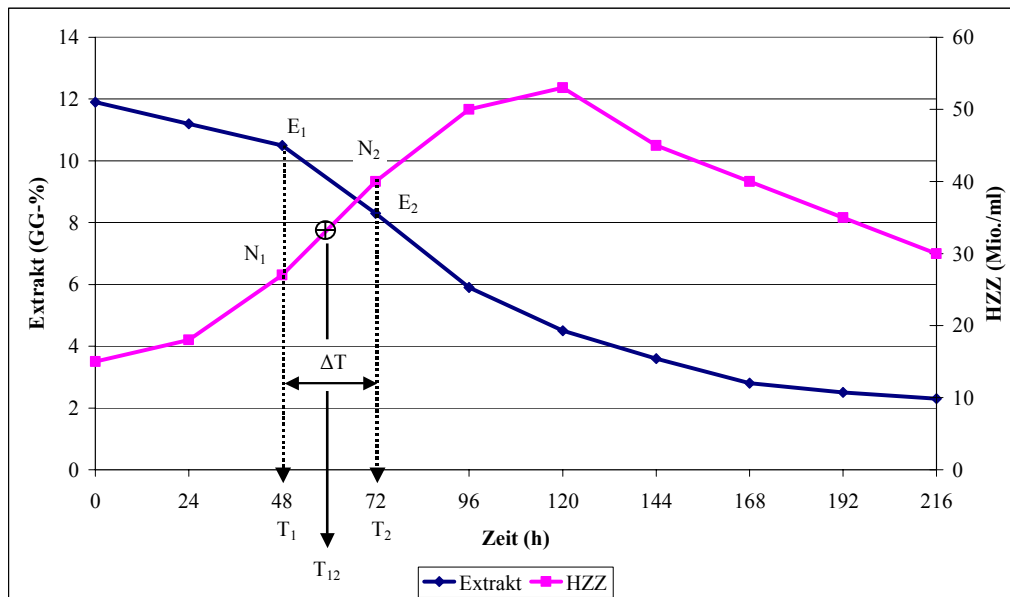


Abbildung 6: Beispiel einer Gärung für die Ermittlung einer Formel für die Gärleistung

Anhand von zwei Gärungen als Beispiele soll die Aussage solcher Gärleistungen erläutert werden. In Tabelle 6 sind die Werte für Extrakt und Hefezellzahl zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt. Dabei sind bewusst für beide Gärungen die gleichen Extraktwerte gewählt worden. Sie unterscheiden sich nur bezüglich der Hefezellzahlentwicklung. ΔHZZ entspricht $N_1 + (N_2 - N_1)/2$ und ΔT dem dazugehörigen Zeitpunkt mit $T_1 + (T_2 - T_1)/2$. Die Werte für die Extraktendifferenz ΔE und die Gärleistung liegen im negativen Bereich, da es sich um eine Extraktabnahme handelt. Je tiefer die Gärleistung ist, umso mehr Extrakt wurde zum Zeitpunkt T_x pro Hefezelle abgebaut.

Tabelle 6: Werte für Extrakt und Hefezellzahl zweier Gärungen und die zugehörigen Gärleistungen

Zeit (h)	E (°P)	VG (%)	Gärung 1					Gärung 2				
			HZZ 1 (Mio./ml)	ΔE 1 (°P)	ΔHZZ 1 (Mio./ml)	ΔT 1 (h)	Gärl. 1 E./.(Z.·h)	HZZ 2 (Mio./ml)	ΔE 2 (°P)	ΔHZZ 2 (Mio./ml)	ΔT 2 (h)	Gärl. 2 E./.(Z.·h)
0	11,9	0	15					10				
24	11,2	6	18	-0,7	17	12	-0,042	16	-0,7	13	12	-0,054
48	10,5	12	27	-0,7	23	36	-0,031	25	-0,7	21	36	-0,034
72	8,3	30	40	-2,2	34	60	-0,066	32	-2,2	29	60	-0,077
96	5,9	50	50	-2,4	45	84	-0,053	38	-2,4	35	84	-0,069
120	4,5	62	53	-1,4	52	108	-0,027	42	-1,4	40	108	-0,035
144	3,6	70	45	-0,9	49	132	-0,018	40	-0,9	41	132	-0,022
168	2,8	76	40	-0,8	43	156	-0,019	35	-0,8	38	156	-0,021
192	2,5	79	35	-0,3	38	180	-0,008	30	-0,3	33	180	-0,009
216	2,3	81	30	-0,2	33	204	-0,006	28	-0,2	29	204	-0,007

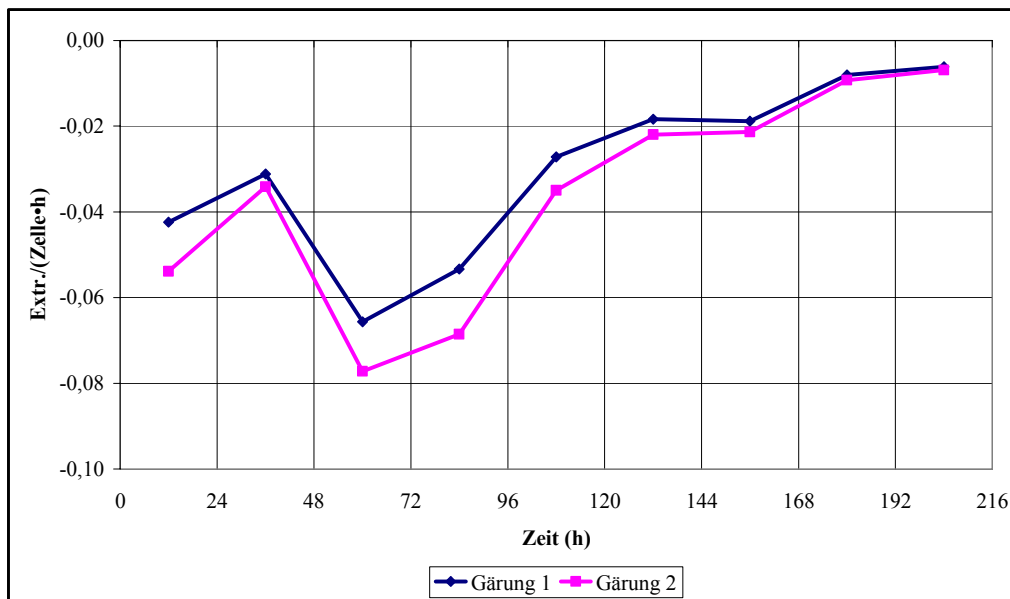


Abbildung 7: Kurven der Gärleistungen mit den Werten aus Tabelle 1

Die Gärleistungen werden über ΔT aufgetragen und es ergeben sich die in Abbildung 7 gezeigten Kurven. Diese Auftragung ist vergleichbar mit einer Auftragung der Geschwindigkeit über die Zeit (= Beschleunigung). Es zeigt sich, dass die Gärung 2 (bedingt durch die niedrigeren Hefezellzahlen) gegenüber Gärung 1 die höheren Gärleistungen aufweist. Dies bedeutet, dass den Hefen in Gärung 2 ein stärkerer Gärcharakter zugrunde liegt, diese also gärkräftiger sind. Allerdings stellt sich die Frage, welche Hefe nun vitaler ist, denn die Hefe in Gärung 1 steht aufgrund des guten Hefewachstums physiologisch gesehen nicht schlechter da. Bei Vorliegen höherer Gärleistungen kann eine Hefe wie in Gärung 2 auch nicht als die vitalere Hefe betrachtet werden, dafür aber als die gärkräftigere Hefe.

Mit Hilfe der Gärleistungen lassen sich Gärungen miteinander vergleichen, die unterschiedliche Stammwürzegehalte oder unterschiedliche Hefeanstellkonzentrationen aufweisen. Des Weiteren lassen sich auch die verschiedenen Phasen wie An-, Haupt- und Nachgärung einzeln betrachten und miteinander vergleichen.

4.3 Betrachtung von Gärungen bei unterschiedlichen Temperaturen

Ziel dieser Versuche war es, erste Informationen über den Verlauf der Enzymaktivitäten bei einer konventionellen Gärung zu erhalten. Da der Hefemetabolismus bei Temperaturen, die dem Temperaturoptimum für das Hefewachstum nahe kommen, schneller abläuft, wurden die Gärungen im unteren Temperaturbereich (15°C / 10°C / 5°C) durchge-

führt. Auf diese Weise können Veränderungen der Enzymaktivitäten aufgrund der langsameren Extraktumsetzung besser verfolgt werden. Jeder Versuch wurde bei entsprechender Temperatur bei betont niedrigeren Hefeanstellkonzentrationen (5 Mio./ml) bis zum Verbrauch des Extraktes durchgeführt. Auf die übliche Reifung und Lagerung ist verzichtet worden, um eine mögliche Schwächung der Hefe aufgrund von Nährstoffarmut und Alkoholstress beobachten zu können. Diese Änderungen des physiologischen Zustandes müssten anhand der Enzymaktivitäten festzustellen sein. Die Vergärung erfolgte stets mit untergäriger, konventionell belüfteter Würze aus einer Brauerei und stets mit gleichem Hefestamm (W 34/70, in Form von Presshefe), dessen physiologischer Zustand bei den einzelnen Versuchen beim Anstellen stark variierte.

Zunächst wurden die Gärungen bei gleichen Temperaturen verglichen. Hierbei sollten der Einfluss der Ausgangsaktivitäten auf den Gärverlauf sowie der weitere Verlauf der Aktivitäten während der Gärung unter Berücksichtigung der gemessenen Werte wie Extrakt und Hefezellzahl untersucht werden. Anschließend sollte ein Vergleich der Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Gärungen zeigen, ob der Faktor Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivitäten ausübt.

Gärungen 15°C

Insgesamt sind 3 Gärungen bei 15°C durchgeführt worden. Tabelle 7 zeigt die entsprechenden Werte.

Tabelle 7: Werte der Gärungen bei 15°C

KW7					KW9					KW12				
Zeit	Extrakt	HZZ	Tote	pH	Zeit	Extrakt	HZZ	Tote	pH	Zeit	Extrakt	HZZ	Tote	pH
(h)	(GG%)	(Mio./ml)	(%)		(h)	(GG%)	(Mio./ml)	(%)		(h)	(GG%)	(Mio./ml)	(%)	
0,0	11,70	6	21	5,14	0,0	11,75	5	18	5,16	0,0	11,30	6	20	4,95
21,0	10,85	32	2	4,88	3,5	11,60	5	17	4,94	19,5	10,60	16	12	4,66
25,0	10,55	40	4	4,81	21,3	10,80	22	7	4,67	27,3	9,85	24	8	4,60
45,0	6,65	58	3	4,50	25,0	10,40	38	4	4,63	43,0	7,20	35	3	4,38
49,0	6,20	65	3	4,36	45,0	7,45	45	3	4,45	51,0	5,85	51	2	4,30
70,0	3,40	67	2	4,45	49,0	6,85	47	5	4,42	68,5	3,70	45	8	4,23
117,0	2,15	35	8	4,50	70,5	4,60	55	4	4,33	96,0	1,75	33	8	4,29
141,0	1,80	26	10	4,52	100,0	2,65	42	5	4,27	121,0	1,65	21	9	4,29
					119,0	2,00	34	6	4,32					
					143,5	1,90	25	7	4,36					

Auf dem ersten Blick lässt sich feststellen, dass die Gärung KW12 früher den EVG erreichte. Dabei muss die Stammwürze berücksichtigt werden, die zu Beginn mit 11,3 GG-% niedriger als die von KW7 und KW9 lag. Des Weiteren variierten die Hefezell-

zahlen in den verschiedenen Wachstumsphasen erheblich. Während Gärung KW7 bis auf 67 Mio./ml stieg, hatten KW9 und KW12 eine maximale Hefezellzahl von maximal 55 Mio./ml aufzuweisen. Einen besseren Vergleich der Gärungen ermöglicht die Betrachtung der Vergärungsgrade und Gärleistungen in Abbildung 8. Die Abbildung zeigt, dass KW12 die zügigste Gärung war und über den fast gesamten Zeitraum höhere Leistungen aufzuweisen hatte. KW7 und KW9 erreichten zum gleichen Zeitpunkt den EVG, wiesen aber Unterschiede in der Haupt- und Nachgärung auf. Zwischen 24 und 48 h war KW7 gärkräftiger, dafür vergor KW9 zwischen 48 und 96 h stärker. Diese Erkenntnisse lassen sich gut mit dem Verlauf der Maltaseaktivitäten vergleichen.

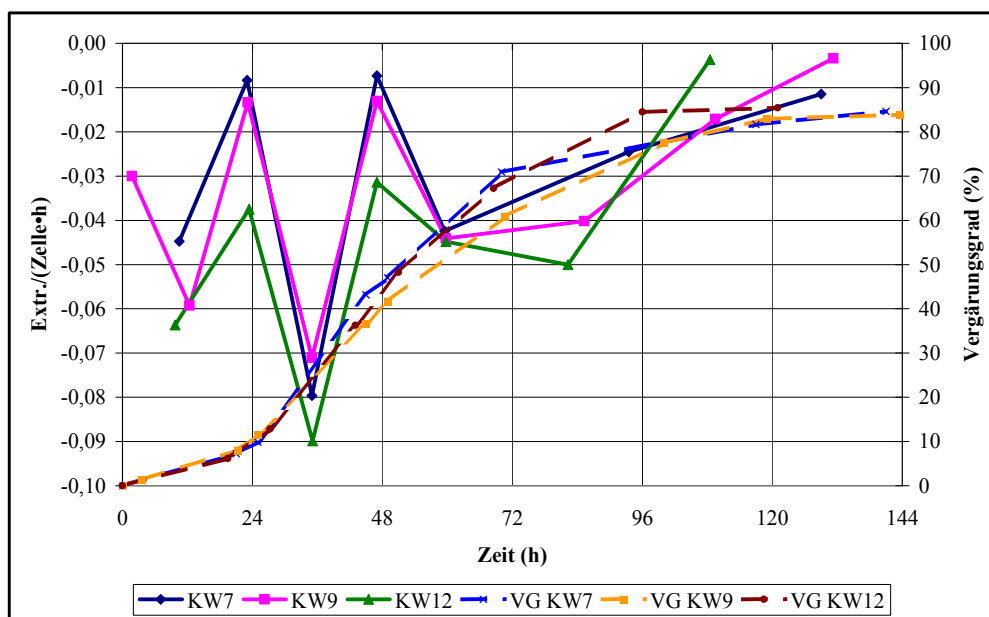


Abbildung 8: Vergleich der 15°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

Abbildung 9 zeigt, dass KW12 über die gesamte Zeit höhere Aktivitäten im Vergleich zu den anderen Versuchen bei 15°C aufzuweisen hatte. Vielleicht spielte hierbei die hohe Ausgangsaktivität im Vergleich zu KW7 und KW9 eine entscheidende Rolle. Alle 3 Gärungen fielen zu Beginn aufgrund der Repression durch Glucose ab und erreichten jeweils ein Maximum nach 48 h. Dieses Maximum fand bei KW7 und KW12 fast zum gleichen Zeitpunkt statt, während das Maximum bei KW9 erst 24 h später gefunden wurde. Dies bestätigt wohl die stärkere Nachgärung von KW9, die zum Schluss im Gegensatz zu den anderen Gärungen nochmals eine Zunahme der Maltaseaktivität zu verzeichnen hatte.

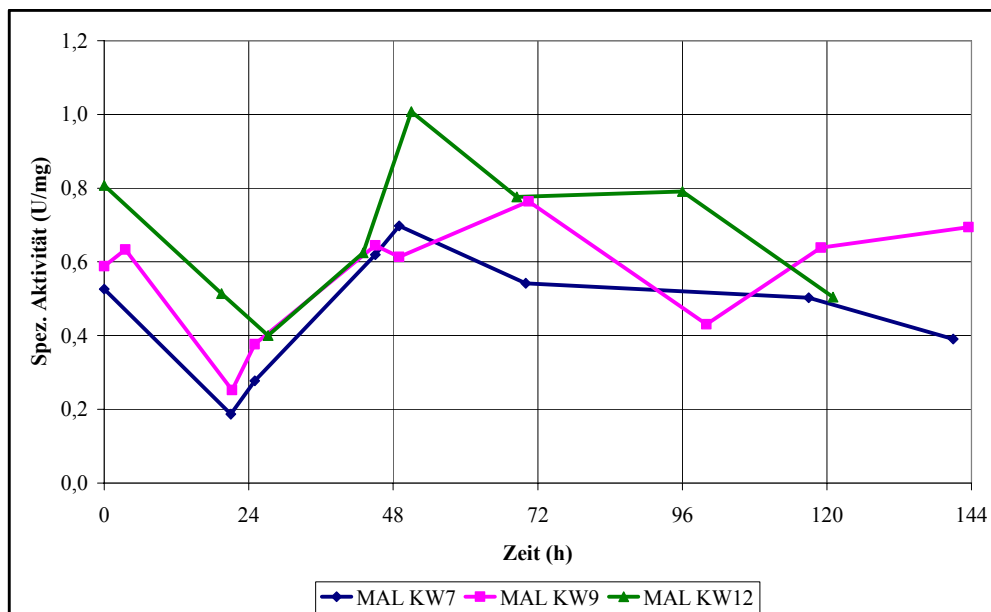


Abbildung 9: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 15°C

Anhand der Abbildung 10 soll das Verhalten der Enzyme am Knotenpunkt Pyruvat erläutert werden. Auch hier waren höhere Aktivitäten der Hefe in KW12 ersichtlich. Zu Beginn verlief PDH bei allen Gärungen gleich bis ca. 48 h. Anschließend setzte sich KW12 deutlich ab, während KW9 im Vergleich zu KW7 24 h später folgte. Ebenso auffällig war die Tatsache, dass das Erreichen des ersten PDH-Maximums im Bereich der höchsten Zellzahlen lag. Weiterhin konnte gesagt werden, dass die Gärungen mit den höheren PDH-Aktivitäten (KW9 und KW12) niedrigere Maximalzellzahlen aufwiesen.

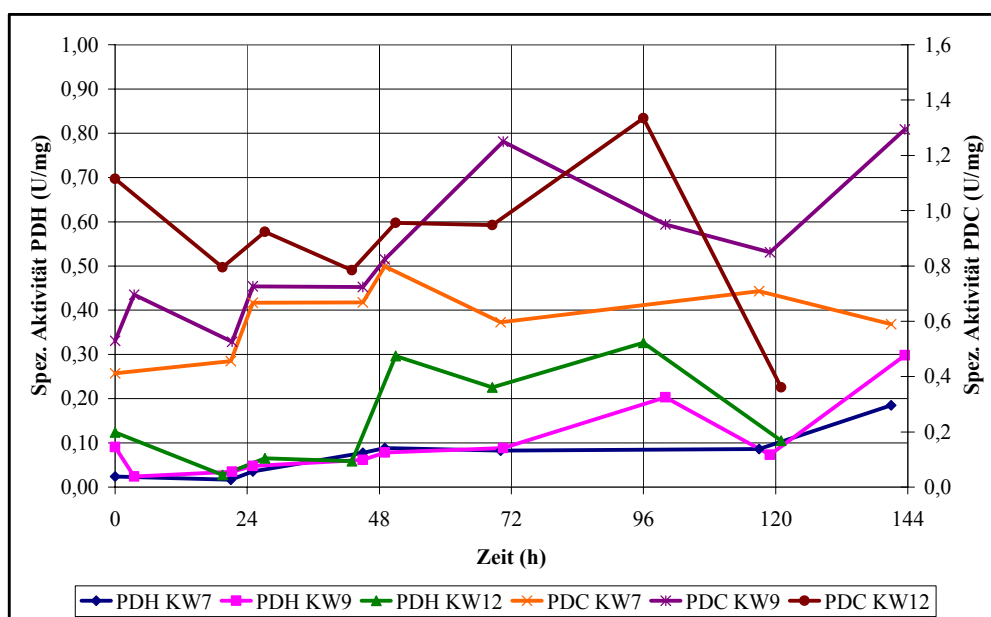


Abbildung 10: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 15°C

Es stellte sich die Frage, wofür das durch die höheren Aktivitäten zusätzlich gebildete Acetyl-CoA benötigt wurde, wenn es nicht für den Aufbau von Biomasse gebraucht wurde und die Einschleusung in den Citratzyklus aufgrund des anaeroben Stoffwechsel ausgeschlossen war. Wahrscheinlich führten diese hohen PDH-Aktivitäten zu einer verstärkten Ester- oder Aminosäurenbildung wie Lysin, Arginin, Valin, Isoleucin und Leucin (WENZEL et al., 1992). Hier fehlte jedoch ein Beweis aufgrund nicht untersuchter Gärungsnebenprodukte.

Bei den PDC-Aktivitäten lässt sich sagen, dass die gärschwächste Hefe (bezgl. der Gärleistungen) die niedrigsten Werte über den gesamten Verlauf aufzuweisen hatte. Auffällig war die Tatsache, dass bei allen Gärungen das Erreichen des jeweiligen ersten Maximums nach der maximalen Gärleistung zu finden war (s. dazu auch Abbildung 8). Ob der Acetaldehyd vollständig über die alkoholische Gärung abgebaut wurde, soll Abbildung 11 mit den Aktivitäten der ADH Aufschluss geben. Die höchsten ADH-Aktivitäten waren bei KW9 und KW12 bereits vor den maximalen PDC-Aktivitäten festzustellen. In KW7 dagegen sind der Verlauf der PDC und ADH fast identisch. Hier schien die Gärung später einzutreten, d.h. die Hefe hatte einen mehr aeroben Charakter bzw. nutzte den PDH-Bypass stärker. Damit könnten auch die höheren Hefezellzahlen und die damit verbundenen niedrigen Gärleistungen erklärt werden. Die zügigste Gärung KW12 sticht hier mit einem fast doppelten Wert bei den ADH-Maxima heraus.

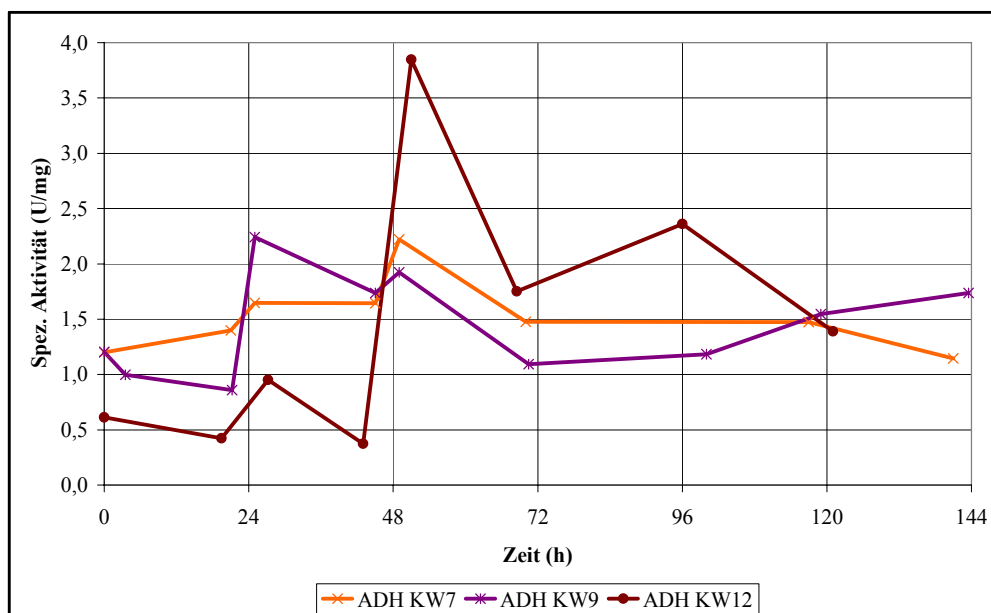


Abbildung 11: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei 15°C

Gärungen 10°C

Zwei Gärungen sind bei 10°C durchgeführt worden und ergaben die in Tabelle 8 ersichtlichen Werte. Beide verliefen auf dem ersten Blick relativ gleich ab und im Vergleich zu den Gärungen bei 15°C trat die Endvergärung bei beiden erst 4 Tage später ein. Beide erreichten die gleiche maximale Hefezellzahl, die allerdings bei KW17 früher erreicht wird. Die Gärleistungen in Abbildung 12 wiesen bei beiden auch recht niedrige Werte im Vergleich zu den 15°C-Gärungen auf.

Tabelle 8: Werte der Gärungen bei 10°C

KW15					KW17				
Zeit (h)	Extrakt (GG%)	HZZ (Mio./ml)	Tote (%)	pH	Zeit (h)	Extrakt (GG%)	HZZ (Mio./ml)	Tote (%)	pH
0,0	11,60	6	15	4,88	0,0	11,80	6	17	5,08
3,0	11,50	8	2	4,85	12,5	11,60	10	7	4,90
18,5	11,30	12	1	4,74	20,5	11,40	13	6	4,85
27,3	11,00	16	4	4,67	36,5	10,95	18	5	4,74
41,5	10,75	21	6	4,61	46,5	10,35	26	4	4,67
51,0	10,20	25	7	4,59	60,0	9,30	32	3	4,61
65,0	9,20	32	5	4,54	69,8	8,30	36	5	4,53
75,5	8,50	40	8	4,47	82,8	7,20	46	5	4,48
92,0	7,25	52	6	4,42	113,5	5,80	62	5	4,47
121,0	5,30	56	10	4,43	136,0	4,90	52	7	4,44
137,3	4,65	60	12	4,35	162,0	3,50	40	8	4,50
167,0	4,28	44	10	4,28	184,0	2,75	28	9	4,52
176,3	3,90	37	9	4,42	206,3	2,00	21	11	4,60
191,0	2,25	27	7	4,43	230,8	1,70	10	15	4,62
214,0	1,70	21	8	4,48					

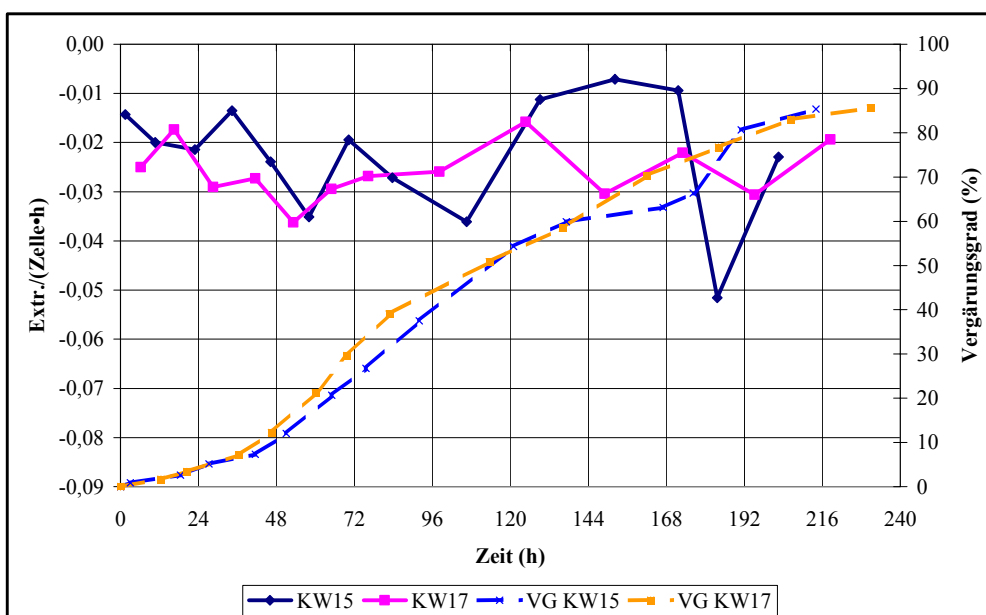


Abbildung 12: Vergleich der 10°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

Diese lagen im Bereich von 0,01 und 0,04 E/(Zelle·h). In KW15 kam es zu einer intensiveren Nachgärung, wie es die Gärleistungen belegen, denn bis 121 h waren beide Verläufe fast identisch. Dadurch erreichte KW15 den EVG ca. 15 h früher.

Die Unterschiede der beiden Gärleistungen spiegeln sich auch im Verlauf der Maltaseaktivitäten wider (s. Abbildung 13). Bis 136 h verliefen die Maltasewerte relativ gleich. Auffällig war die überdurchschnittliche Zunahme der Maltaseaktivität von KW15 zum Ende der Gärung. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch die höchste Gärleistung bei KW15 beobachtet werden.

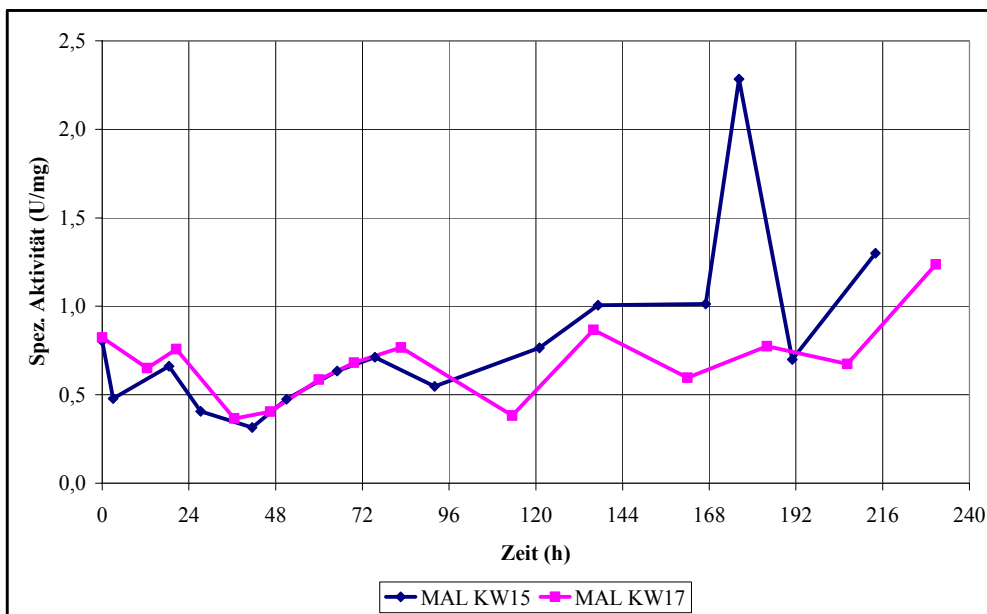


Abbildung 13: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 10°C

Parallelen mit den PDH- und PDC-Aktivitäten der Enzyme aus den Gärungen bei 15°C ließen sich bei den 10°C-Gärungen ansatzweise entdecken (s. Abbildung 14). Auch hier zeigten die höheren PDH-Aktivitäten eine zügigere Gärung ohne dabei auch höhere Hefezellzahlen aufzuweisen. Bei Gärung KW17 konnten wiederum fast parallele Verläufe bezüglich der PDH und PDC festgestellt werden. Wie bei Maltase kam es bei der höchsten Gärleistung zum Ende von Gärung KW15 zu einer deutlichen Zunahme von PDH und PDC. Im Gegensatz zu den Gärungen bei 15°C hatte die zügigste Gärung KW15 über die gesamte Zeit höhere Aktivitäten zu verzeichnen als KW17 und wies nur zu Beginn eine niedrigere PDC-Aktivität auf. Dieses konnte bei der Betrachtung der ADH ebenfalls festgestellt werden (s. Abbildung 15). Beide Verläufe nahmen über die Zeit kontinuierlich zu und erreichten am 8. Tag die maximale Aktivität. Dabei lag die ADH-Aktivität von KW15 mit 6,1 U/mg analog zur PDH überdurchschnittlich hoch.

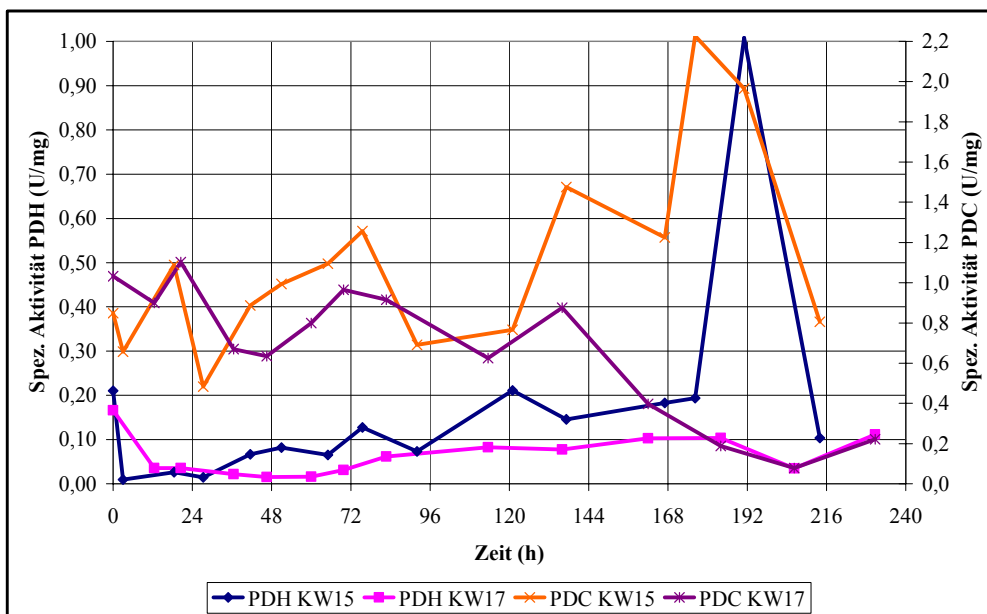


Abbildung 14: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 10°C

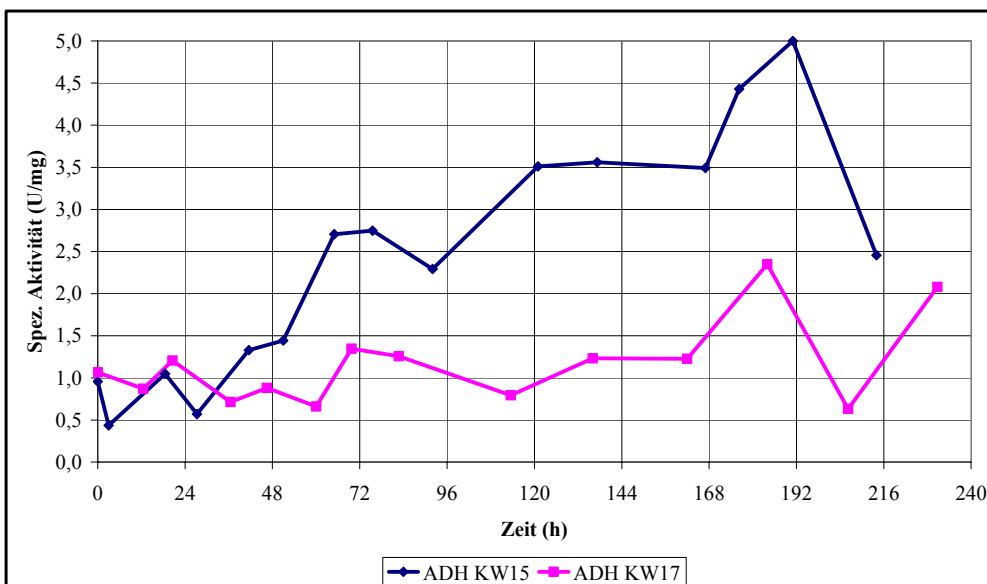


Abbildung 15: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei 10°C

Gärungen 5°C

Zwei Gärungen bei 5°C wurden durchgeführt und bis zum EVG untersucht (s. Tabelle 9). Hier fand zusätzlich eine Bestimmung des Alkohol- sowie des FAN-Gehalts statt. Im Vergleich zu den bisherigen Gärungen sind die Unterschiede hier gravierender. Trotz höherer Stammwürze (13,1 GG-%) und gleicher Hefeanstellkonzentration benötigte KW25 über 7 d weniger zum Erreichen des EVG. Zwar kam es in KW21 zu einer besseren Angärung, wie es die Gärleistungen in Abbildung 16 belegen, die aber ab der 72 h deutlich nach ließen. KW25 dagegen zeichnete sich durch hohe Gärleistungen in der

Hauptgärung (zwischen 48 und 96 h) aus, die auch höher lagen als die maximalen Gärleistungen der wärmeren Gärungen bei 15 und 10°C. In dieser Phase war auch die stärkste Zunahme des Alkoholgehaltes zu verzeichnen. Trotz der höheren Stammwürze von KW25 gab es keine Unterschiede bezüglich der FAN-Ausstattung. Dies würde bedeuten, dass dieser Faktor keinen entscheidenden Einfluss auf die folgende Gärleistung ausübt.

Tabelle 9: Werte der Gärungen bei 5°C

KW21							KW25						
Zeit	Extrakt	HZZ	Tote	pH	Alk.	FAN	Zeit	Extrakt	HZZ	Tote	pH	Alk.	FAN
(h)	(GG%)	(Mio./ml)	(%)		GG-%	mg/100ml	(h)	(GG%)	(Mio./ml)	(%)		GG-%	mg/100ml
0,0	11,84	5	19	5,13	0,01	19,61	0,0	13,11	5	18	4,96	0,02	19,75
33,0	11,49	8	8	4,98	0,11	19,83	24,0	12,61	15	3	4,78	0,24	19,20
50,5	10,74	10	3	4,86	0,14	19,03	48,0	12,08	17	2	4,72	0,46	17,63
72,0	10,14	12	2	4,77	0,26	18,15	72,0	10,82	28	4	4,61	0,98	16,31
104,0	9,89	13	2	4,74	0,41	17,70	96,0	7,03	36	4	4,4	2,57	13,27
124,5	9,39	16	2	4,72	0,62	16,72	120,0	5,69	44	4	4,33	3,16	12,85
168,0	8,98	22	2	4,55	1,27	15,07	168,0	3,68	50	3	4,28	4,05	12,64
196,0	7,64	26	3	4,53	1,76	14,57	192,0	2,75	40	8	4,35	4,42	13,27
213,0	7,06	28	2	4,5	2,02	14,22	216,0	2,35	30	8	4,41	4,69	12,81
244,0	6,59	36	3	4,5	2,22	13,76	240,0	2,22	15	12	4,49	4,73	13,12
270,0	5,85	40	4	4,47	2,55	13,44							
294,0	5,34	42	4	4,45	2,81	13,05							
322,0	4,43	30	8	4,44	3,11	12,80							
343,0	3,75	22	10	4,43	3,35	11,66							
365,5	3,12	20	14	4,43	3,51	10,96							
408,0	2,90	15	15	4,41	3,89	12,19							

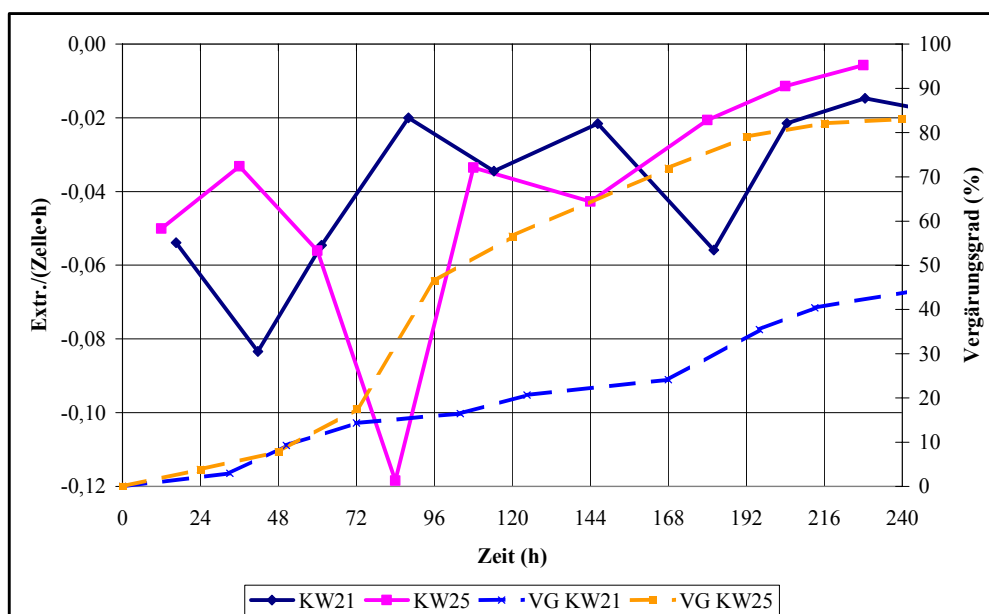


Abbildung 16: Vergleich der 5°C-Gärungen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

Auch bei den Hefezellzahlen ergaben sich trotz gleicher FAN-Konzentrationen Unterschiede. Anscheinend war ein anderes Kriterium bedeutender für das stärkere Hefewachstum von KW25. In den folgenden Abbildungen wurden die Gärungen nur bis 240 h verglichen, da bis zu diesem Zeitpunkt ein direkter Vergleich von KW21 mit KW25 noch gegeben war.

Beim Vergleich dieser Erkenntnisse mit den Maltaseaktivitäten in Abbildung 17 lassen sich einige Gemeinsamkeiten aufdecken. Zum einen wies KW25 über den gesamten Gärverlauf deutlich höhere Aktivitäten auf und schien die anfängliche Repressionsphase schneller zu überwinden als KW21. Zum Zeitpunkt der höchsten Gärleistung erreichte KW25 das erste Maximum, welches bei KW21 erst 96 h später auftrat.

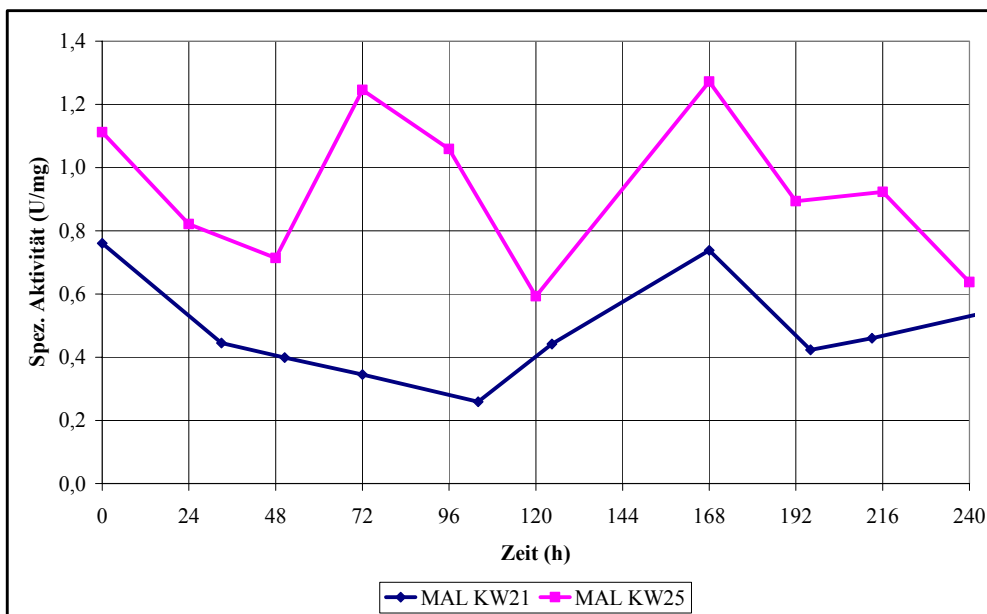


Abbildung 17: Verlauf der Maltaseaktivitäten bei 5°C

Ein zweites Maximum der Maltaseaktivität von KW25 lag im Bereich der maximalen Hefezellzahl bei 168 h. Auch bei den PDC-Aktivitäten erschienen beide Maxima zu fast gleichen Zeitpunkten wie die der Maltase (s. Abbildung 18). Scheinbar wird an diesen Punkten die PDC durch den erhöhten glykolytischen Fluss (bedingt durch die hohe Maltaseaktivität) mit der damit verbundenen Pyruvatanhäufung in ihrer Aktivität verstärkt. Ebenso lassen sich diese Parallelen bei der PDC von KW21 beobachten. Interessant war der direkte Vergleich von PDC und PDH. In KW25 verhielten sich die Aktivitäten gegenläufig: bei Zunahme der PDC fiel die PDH tendenziell ab. Ein hoher glykolytischer Fluss führte dazu, dass das für die Bildung von Biomasse benötigte Acetyl-CoA nur

über den PDH-Bypass bereit gestellt werden konnte. Die zeigte sich sowohl bei KW25 nach 168 h als auch bei KW21 nach 294 h (nicht dargestellt). Das zweite Maximum der PDH-Aktivität wurde bei beiden Gärungen mit Erreichen der maximalen Hefezellzahl festgestellt.

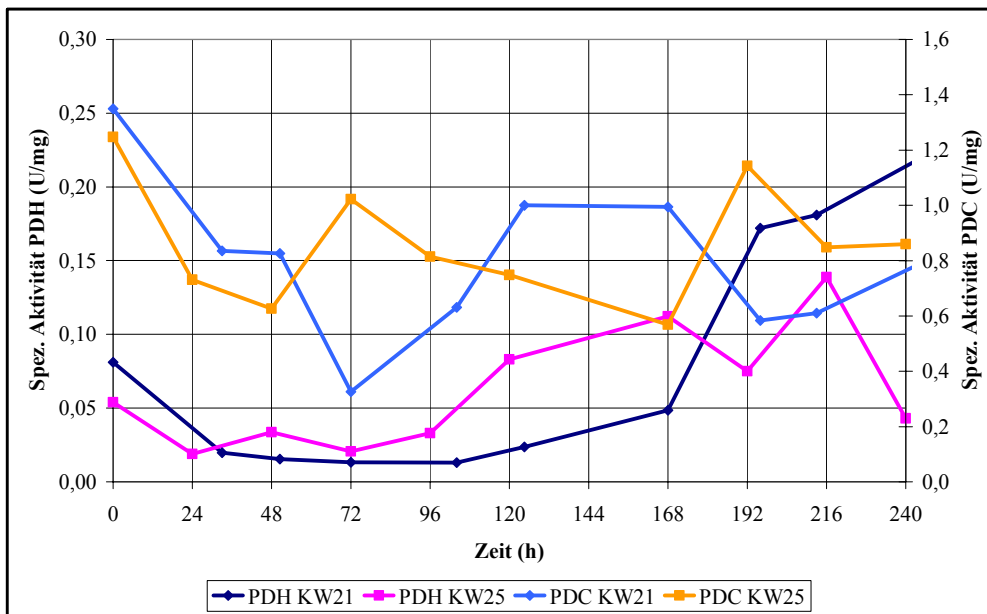


Abbildung 18: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 5°C

Abbildung 19 zeigt den Zusammenhang zwischen den ADH-Aktivitäten und den Alkoholkonzentrationen der Gärungen KW21 und KW25. Hier ist ersichtlich, dass KW25 gerade in der Anfangsphase mehr Alkohol bildete als KW21 und dies stand im Einklang mit dem Verlauf der ADH.

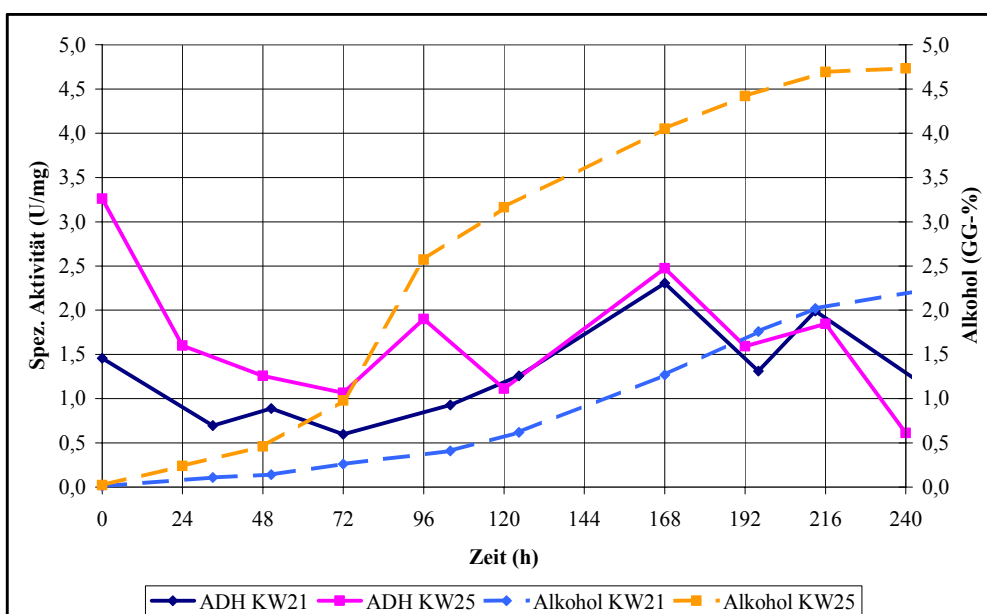


Abbildung 19: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 5°C

Die Werte für die ADH waren für KW25 deutlich höher, die vielleicht auf die höhere Ausgangsaktivität zurück zu führen waren. Eine Übersättigung des PDH-Bypasses zu diesem frühen Zeitpunkt kann auch nicht ausgeschlossen werden. Ab 120 h wiesen die ADH-Aktivitäten beider Versuche fast identische Verläufe auf. Auch die jeweiligen Alkoholgehalte stiegen bei beiden gleich stark an. Der Alkoholgehalt von KW21 lag selbst nach 10 Tagen noch deutlich niedriger als bei KW25. Wahrscheinlich führten die höheren Anfangsaktivitäten auch zu einem frühzeitigeren und stärkeren Anstieg der Alkoholkonzentration von KW25 in den ersten 96 h.

4.4 Verhalten der Enzymaktivitäten einer gesamten Hefepopulation während der Gärung

In Kapitel 4.2 traten besonders am Ende der Gärungen Schwankungen auf, die z. T. nicht nachvollziehbar waren. Ein Grund für diese Schwankungen könnten in der Probenahme zu sehen sein, da zur Messung der Enzymaktivitäten nur die Zellen in Schwebelösung untersucht wurden.

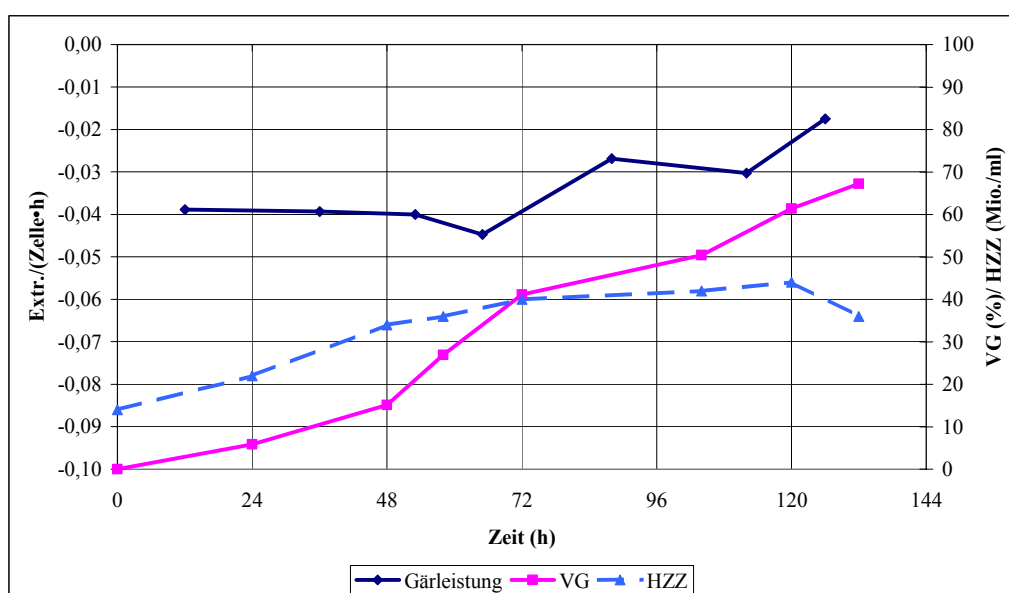


Abbildung 20: Verlauf der Gärleistungen, Vergärungsgrade und Hefezellzahlen

Im Laufe der Gärung setzt sich die Hefe bekanntlich immer mehr im Konus ab und verbleibt dort bis zum Ende der Gärung. Es stellte sich die Frage, ob sich durch eine Untersuchung der gesamten Hefepopulation während der Gärung typische Aktivitätsverläufe ergeben. Dazu wurde Bierwürze mit Hefe angestellt (15 Mio./ml), in gleichen Mengen auf 7 Corneliusbehälter (entsprechend 7 Proben) verteilt und anschließend bei 10°C

vergoren. Vor der Probenahme wurde der Corneliusbehälter des entsprechenden Gärtages kräftig geschüttelt, um eine homogene Durchmischung der gesamten Hefepopulation zu erzielen. Die anschließende Probeentnahme erfolgte direkt nach dem Schütteln von oben.

In Abbildung 20 fällt zunächst auf, dass die Gärung zwischen 48 und 72 h sowohl die höchste Gärleistung als auch die stärkste Extraktabnahme zu verzeichnen hatte. Das Hefewachstum erreichte hier das Ende der logarithmischen Phase. Die Maltase, PDH und ADH waren von Beginn an durch eine deutliche Repression in der Würze geprägt und hatten bei 58 h ihre jeweils niedrigste Aktivität zu verzeichnen (s. Abbildung 21 und Abbildung 22). Ob diese relativ lange Repression allein durch die Glucose bedingt war, konnte aufgrund nicht gemessener Werte für die Kohlenhydrate nicht bestätigt werden. Da die Repression der PDC nicht so ausgeprägt war, kann vermutet werden, dass der gebildete Acetaldehyd hauptsächlich über die ACDH zum Bypass geleitet wurde. Überhaupt konnten eindeutige Kurvenverläufe festgestellt werden, die zunächst bis 58 h abnahmen, um dann bis zum Ende der Gärung wieder anzusteigen. Bei der PDH und der ADH kam es nach Erreichen des Minimums innerhalb von 14 h zu einem raschen Anstieg.

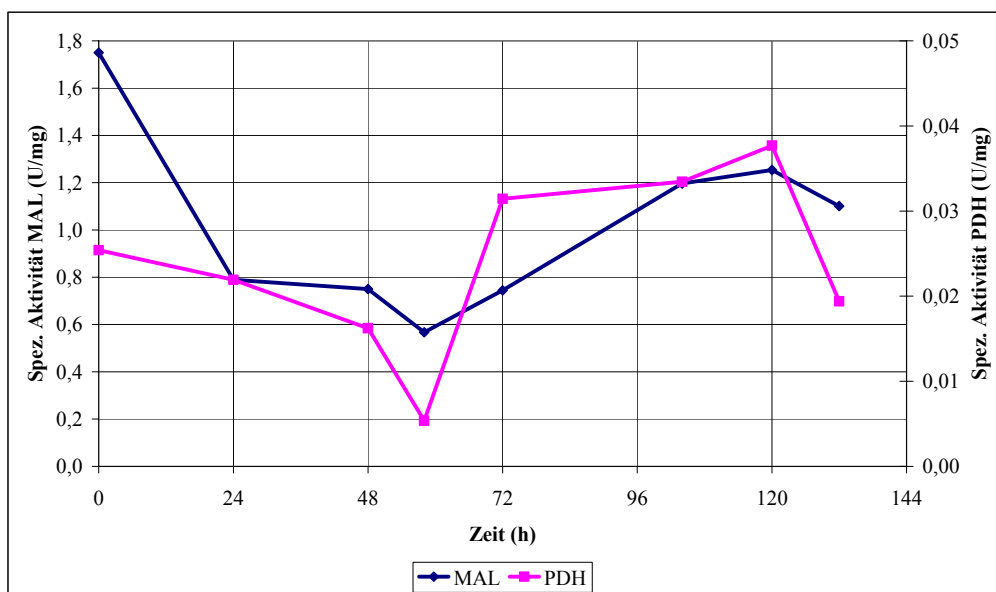


Abbildung 21: Aktivitäten von Maltase und PDH

Im gleichen Zeitraum waren auch die höchste Gärleistung zu verzeichnen, und die Hefen erreichten das Ende der logarithmischen Phase. Bei Maltase und PDH war ab 58 h ein stetiger Anstieg bis zum Ende der stationären Phase zu beobachten.

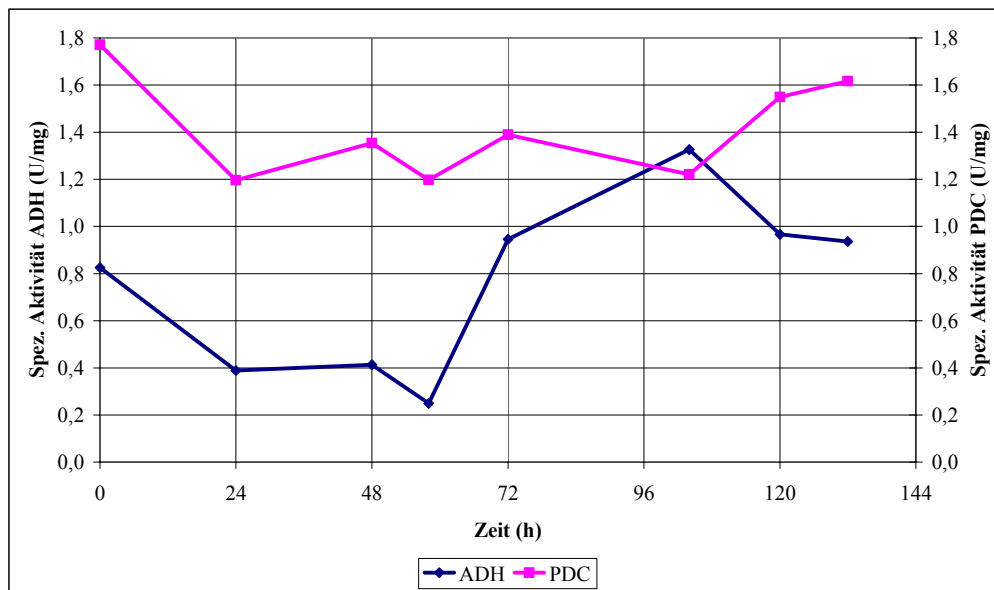


Abbildung 22: Aktivitäten von ADH und PDC

Auch die ADH stieg nach der Repression wieder an, nahm aber im Vergleich zur Malta-
se und PDH früher wieder ab. Die PDC fiel nur in den ersten (Abnahme der Aktivität)
und letzten (Zunahme der Aktivität) 24 h auf. In der Hauptgärung schwankte diese zwi-
schen 1,2 und 1,4 U/mg.

Es konnte hier gezeigt werden, dass sich gleichmäßigere Verläufe der Aktivitäten erge-
ben, wenn die gesamte Hefepopulation analysiert wird.

4.5 Betrachtung von Propagationen bei unterschiedlichen Temperaturen

Ähnliche Ziele wie in Kapitel 4.3 wurden auch bei den Propagationen verfolgt. Nach-
dem die ersten Erfahrungswerte aus den Gärungen vorlagen, sollten nun Erfahrungswerte
über das Verhalten der Enzymaktivitäten bei Hefepropagationen gesammelt werden.
Dazu wurden in einem Bioreaktor wiederum bei verschiedenen Temperaturen (30, 20
und 10°C) (s. dazu Kapitel 3.1.2) Propagationen durchgeführt und verschiedene Para-
meter gemessen. Im Bioreaktor fand eine kontinuierliche Umwälzung des Propagatorin-
halts (300 l/h) statt und die in der Umpumpleitung eingebrachte Belüftungsdüse sorgte
für einen konstanten Sauerstoffüberschuss von 2 mg/l in der Würze.

Propagationen 30°C

Die ersten Propagationen fanden bei 30°C im Bereich des Temperaturoptimums der
Hefe statt. In Kapitel 4.2 wurde bereits angesprochen, dass die Gärleistungen bei aero-

ben Propagationen deutlich niedriger liegen müssten, da die Hefe unter vollständig aeroben Bedingungen weniger Glucose zur Energiegewinnung benötigt. In Abbildung 23 sind die Gärleistungen und Vergärungsgrade zweier Propagationen bis 26 h bei 30°C ersichtlich.

Unerwartet lagen die maximalen Gärleistungen auf einem relativ hohen Wert verglichen mit den Gärleistungen der Gärungen aus 4.3. Besonders 30°C II zeigte eher ein Gärungsprofil auf. Trotz der Abnahme der Gärleistung mit der Zeit, baute Propagation 30°C I in einem kleineren Zeitraum mehr Extrakt ab als 30°C II.

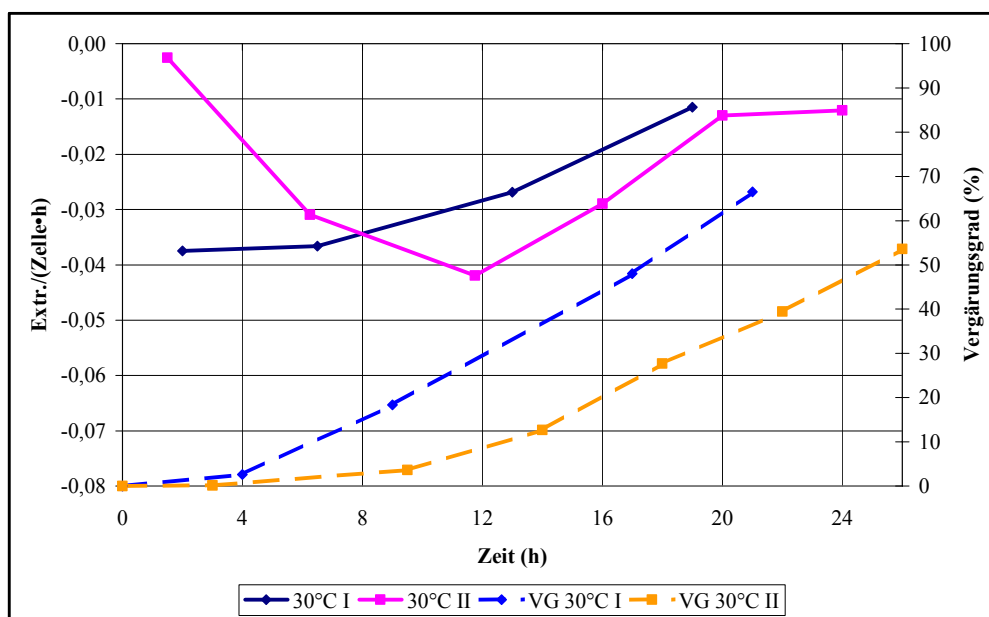


Abbildung 23: Vergleich der 30°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

Daher ist davon auszugehen, dass bei 30°C I eine bessere aerobe Vermehrung und bei 30°C II eine tendenziell stärkere (partielle) Gärung statt fand. Dies verdeutlichen auch die Hefezellzahlen beider Propagationen in Abbildung 24. 30°C II hatte zudem eine deutlich längere lag-Phase zu verzeichnen.

Bei den Maltaseaktivitäten in Abbildung 24 überrascht die Tatsache, dass diese bei 30°C I über den gesamten Verlauf höher liegen als bei 30°C II. Hypothetisch hätte 30°C II aufgrund der stärkeren partiellen Gärung mehr Glucose benötigt und dementsprechend höhere Maltaseaktivitäten vorzeigen müssen. Ein möglicher Grund könnte hier in den Ausgangsaktivitäten liegen, die bei 30°C I höher war. Dieses aber muss erst durch weitere Propagationsversuche bestätigt werden.

Bei den PDH-Aktivitäten waren höhere Werte im Vergleich zu den Gärungen zu erwarten gewesen, da für die Lipidsynthese mehr Acetyl-CoA benötigt wird. Dieses traf nicht zu, wie in Abbildung 25 zu sehen ist. Diese lagen über die gesamte Propagationsdauer auf niedrigem Niveau. Berücksichtigt werden musste hier, dass auch die Ausgangsaktivitäten verhältnismäßig niedrig waren.

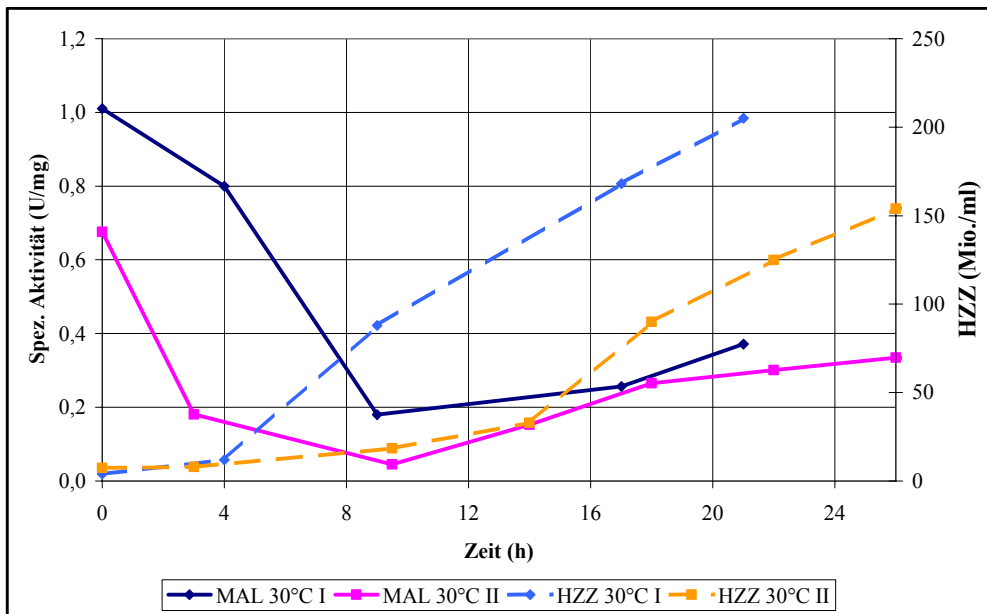


Abbildung 24: Verlauf der Maltaseaktivitäten und der Hefezellzahlen bei 30°C

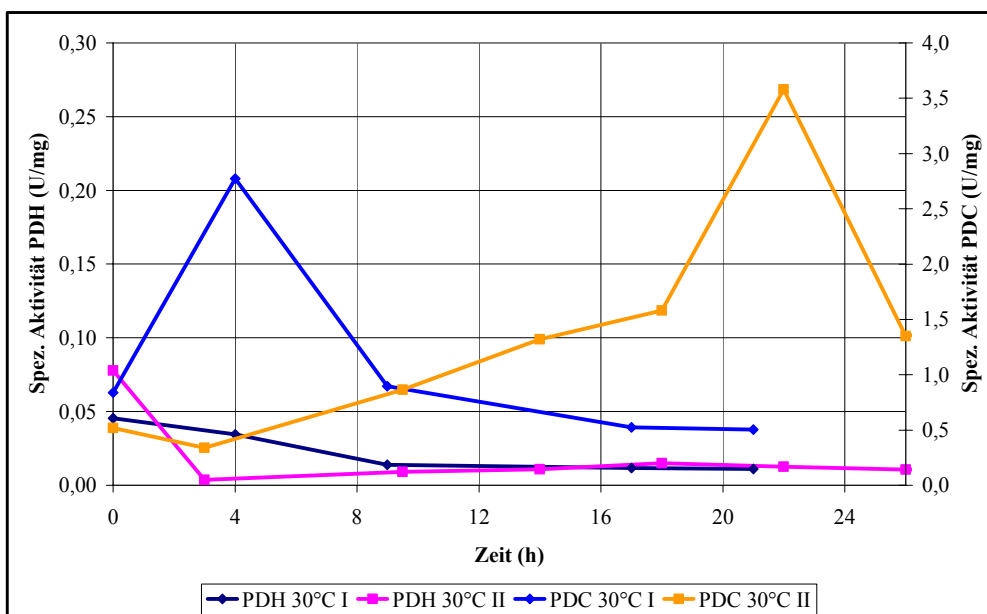


Abbildung 25: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 30°C-Propagationen

Nun stellt sich die Frage, wie das benötigte Acetyl-CoA bei diesen niedrigen PDH-Aktivitäten bereit gestellt wird. Anhand der PDC-Aktivitäten könnte überprüft werden, ob das Acetyl-CoA hauptsächlich über den Bypass (Acetaldehyd > Acetat > Acetyl-

CoA) gebildet wurde. So zeigt Abbildung 25 auch auffällig hohe PDC-Aktivitäten zu bestimmten Stadien, vergleichbar mit denen der Gärungen in 4.3. Bei 30°C I mit den höchsten Zellzahlen wurde ein Maximum bereits nach 4 h registriert, und zu diesem Zeitpunkt begann die logarithmische Phase der Hefevermehrung. Die Aktivität bei 30°C II nahm mit der Propagationsdauer zu und bildete erst nach 22 h am Ende der logarithmischen Phase ein Maximum aus. Auch die ADH-Aktivitäten in Abbildung 26 wiesen analog zur PDC fast identische Verläufe auf. In Zusammenhang mit den Gärleistungen ließ sich daraus schließen, dass die Repression bei 30°C II im Vergleich zu 30°C I stärker ausgeprägt war und somit zu Beginn einen schwächeren Gärcharakter aufwies. Die für eine alkoholische Gärung typischen Merkmale konnten bei 30°C II erst im weiteren Verlauf gefunden werden. Zusätzlich wurden die Alkoholkonzentrationen beider Propagationen gemessen, wobei festzustellen war, dass die Aktivitäten der ADH und die Konzentrationen nicht miteinander korrelierten. Höhere Werte für die ADH resultieren also nicht zwangsläufig in einer höheren Alkoholkonzentration oder in einer verstärkten Alkoholbildung. Hier führten eher die höheren Hefezellzahlen zu den höheren Konzentrationen. Die Alkoholkonzentrationen beider Propagationen nahmen mit dem Beginn der jeweiligen logarithmischen Phase nahezu parallel zu.

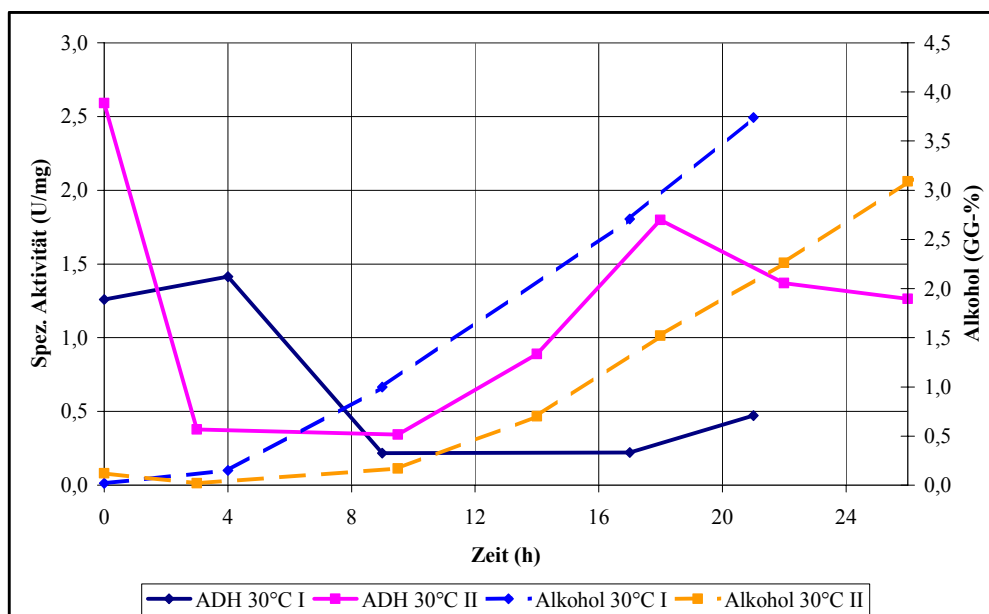


Abbildung 26: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 30°C-Propagationen

Propagationen 20°C

Beim Vergleich zweier Propagationen bei 20°C ergaben sich hinsichtlich Gärleistung Vergärungsgrad, Maltaseaktivität und Hefezellzahl ähnliche Bilder wie bei 30°C (s.

Abbildung 27 und Abbildung 28). In diesem Falle tendierte 20°C II mehr zum aeroben Stoffwechsel. Bei 20°C I konnte anhand der Gärleistungen auch ein stärkerer Gärcharakter als 30°C II beobachtet werden. Verbunden mit einem früheren Eintritt in die logarithmische Phase fand auch eine raschere Zunahme des VG sowie der Hefezellzahl statt.

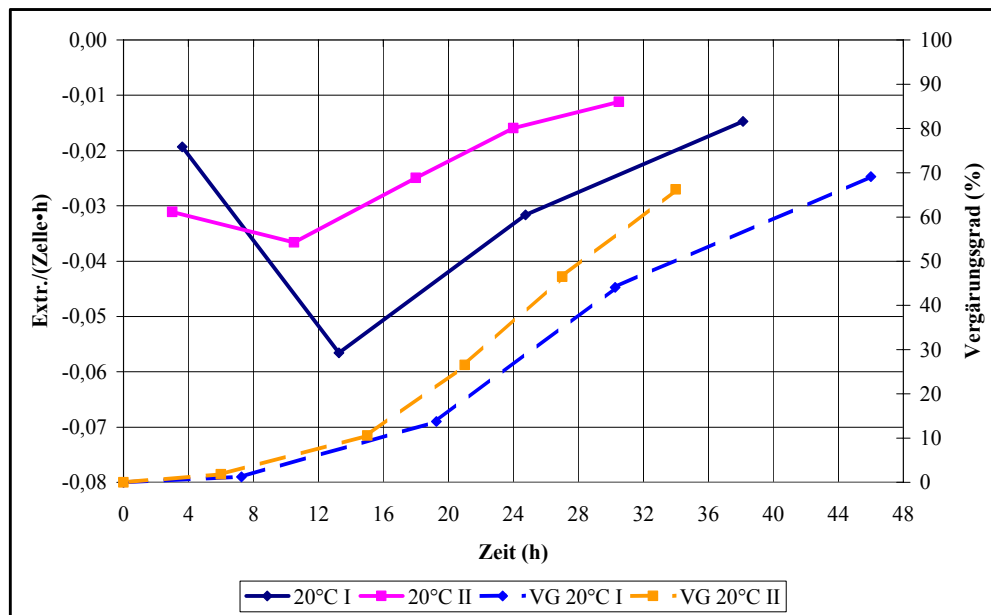


Abbildung 27: Vergleich der 20°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

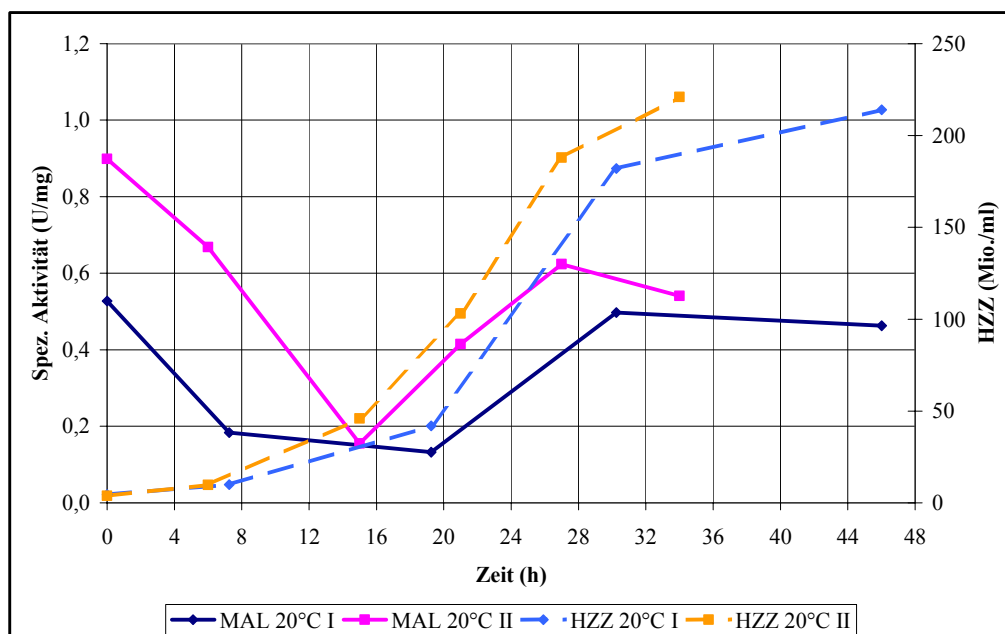


Abbildung 28: Verlauf der Maltaseaktivitäten und der Hefezellzahlen bei 20°C

Von entscheidender Bedeutung schienen wohl nicht nur, wie bereits festgestellt, die Maltase-Ausgangsaktivitäten zu sein, sondern auch die Dauer der Repression durch

Glucose. Bei 20°C II kam es im Vergleich zu 20°C I zu einem frühzeitigeren erneuten Anstieg der Maltaseaktivitäten verbunden mit der Einleitung der logarithmischen Phase. Bei den PDH- und PDC-Aktivitäten (s. Abbildung 29) wurden die bei den 30°C- Propagationen gemachten Erkenntnisse erneut gefunden. Auch hier trat das PDC-Maximum der besseren Propagation (20°C II) früher auf. Die PDH wies wiederum nur zu Beginn hohe Aktivitäten auf und lag über die gesamte Zeit auf niedrigem Niveau.

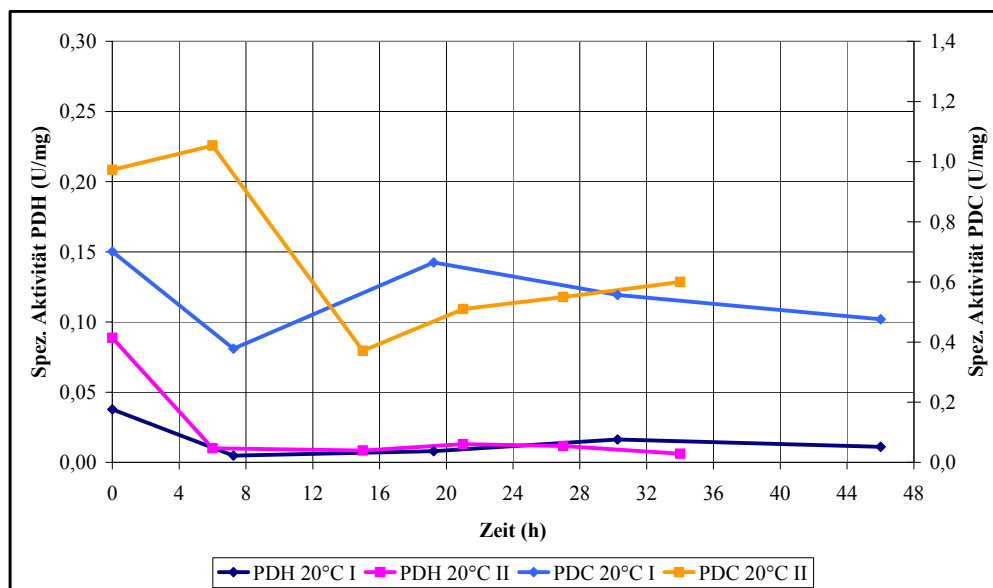


Abbildung 29: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 20°C-Propagationen

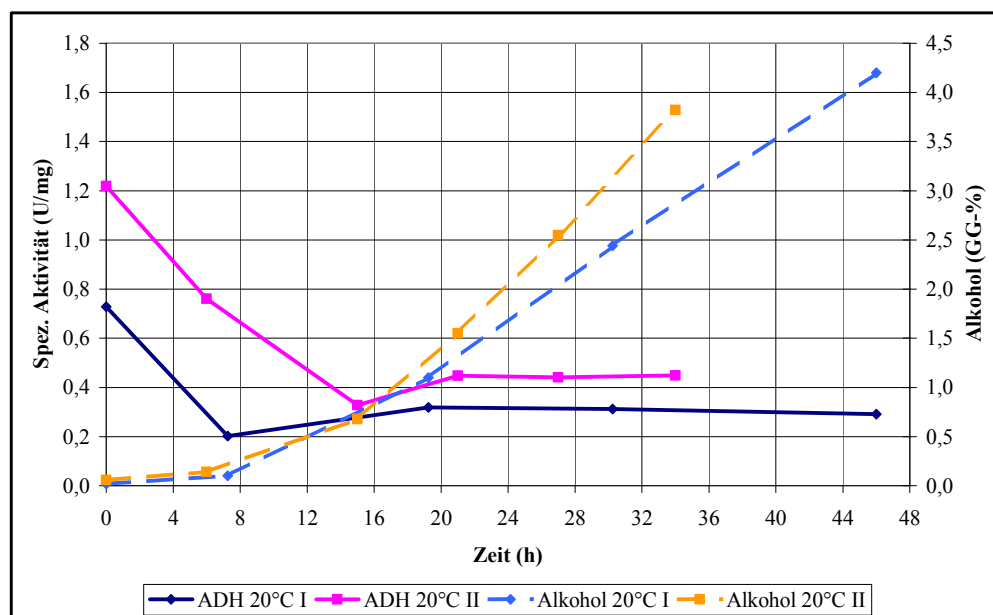


Abbildung 30: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 20°C-Propagationen

Bei Betrachtung der ADH-Aktivitäten der 20°C-Propagationen (s. Abbildung 30) fällt auf, dass diese gleich zu Beginn absanken und im weiteren Verlauf auf einem niedrigerem Niveau blieben. Dieses Niveau war deutlich niedriger als die bei den Gärungen in 4.3 gemessenen Werte. Aufgrund dieser Tatsachen (PDC-Aktivitäten hoch wie bei Gärungen; ADH deutlich kleiner; PDH niedrig) konnte davon ausgegangen werden, dass partielle alkoholische Gärung bei den Propagationen parallel zum aeroben Stoffwechsel auftrat und der über die PDC gebildete Acetaldehyd über den Bypass zum Acetyl-CoA der Lipidsynthese zugeführt wird.

Propagationen 10°C

In bezug auf die bisher gefundenen Ergebnisse bei Propagationen stellte sich die Frage nach dem Einfluss der zugeführten Sterilluft, da die gemessenen Gärleistungen und Aktivitäten auf potentielle Gärungsverhältnisse hindeuteten. Dazu sind zwei Propagationen im Bioreaktor durchgeführt worden, von denen unter sonst identischen Bedingungen nur eine belüftet wurde (konstanter O₂-Gehalt in der Würze von 2 mg/l). Bei der anderen „Propagation“ handelte es sich somit um eine reine Umpumpgärung, bei der der Tankinhalt ohne Belüftung stündlich mit 300 l/h umgewälzt wurde.

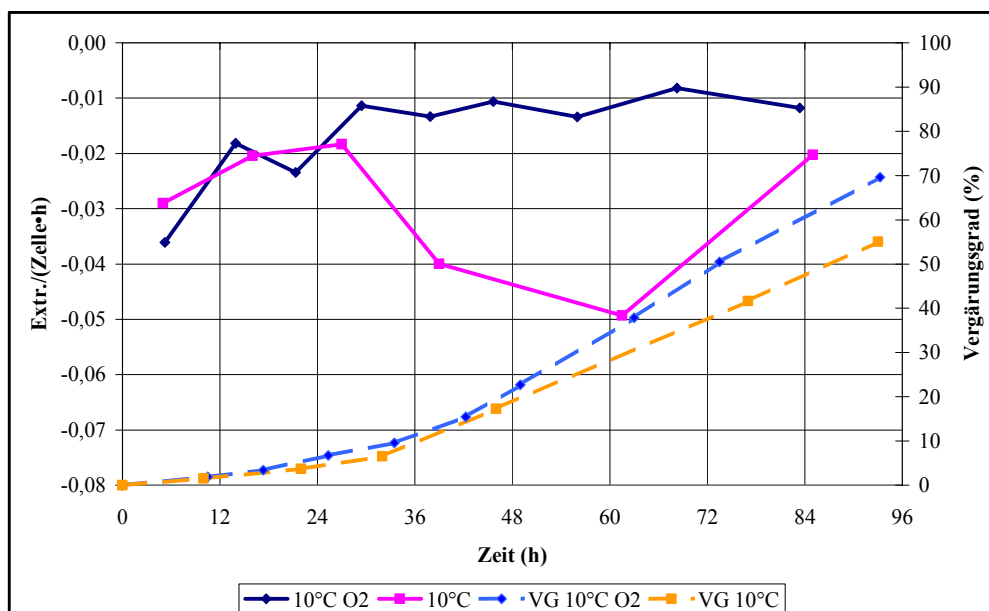


Abbildung 31: Vergleich der 10°C-Propagationen bezüglich Gärleistung und Vergärungsgrad

Abbildung 31 zeigt wie erwartet, dass die mit Sterilluft durchgeführte Propagation (10°C O₂) über die gesamte Messdauer (93 h) mit Ausnahme zu Beginn niedrigere Gär-

leistungen als die Umpumpgärung aufzuweisen hatte. Dies bestätigt die Tatsache, dass unter aeroben Bedingungen deutlich weniger Extrakt pro Zelle verbraucht wird als unter anaeroben Bedingungen. Anhand des Vergärungsgrades wäre dies nicht festzustellen gewesen, da bei diesem Wert nicht die Hefezellzahl berücksichtigt wird. Der Vergärungsgrad der mit Sterilluft gefahrenen Propagation nahm nach 49 h stärker zu als die Umpumpgärung. Ein Grund ist in Tabelle 10 anhand der Hefezellzahlen zu finden, die bei 10°C O₂ ab 49 h deutlich schneller anstiegen als bei der Propagation ohne Sterilluft und erreichte zum Ende auch mehr als doppelt so viele Hefezellen. Bis etwa 30 h liefen beide Versuche in bezug auf Extrakt und Hefezellzahl nahezu gleich. Ein Grund dafür könnte in Abbildung 32 gefunden werden. Nach 40 h war auch Glucose in der belüfteten Würze vollständig aufgebraucht.

Tabelle 10: Werte der Propagationen bei 10°C

10°C mit O ₂				10°C ohne O ₂			
Zeit (h)	Extrakt (GG%)	HZZ (Mio./ml)	Tote (%)	Zeit (h)	Extrakt (GG%)	HZZ (Mio./ml)	Tote (%)
0,0	11,71	5	10	0,0	11,74	4	8
10,5	11,49	7	8	10,0	11,56	8	6
17,3	11,31	13	7	22,0	11,31	16	9
25,3	10,92	21	6	32,0	10,97	21	9
33,5	10,59	38	3	46,0	9,71	42	5
42,2	9,90	66	2	77,0	6,85	74	5
49,0	9,05	94	1	93,0	5,28	81	3
63,0	7,28	170	2				
73,5	5,80	192	4				
93,2	3,56	189	5				

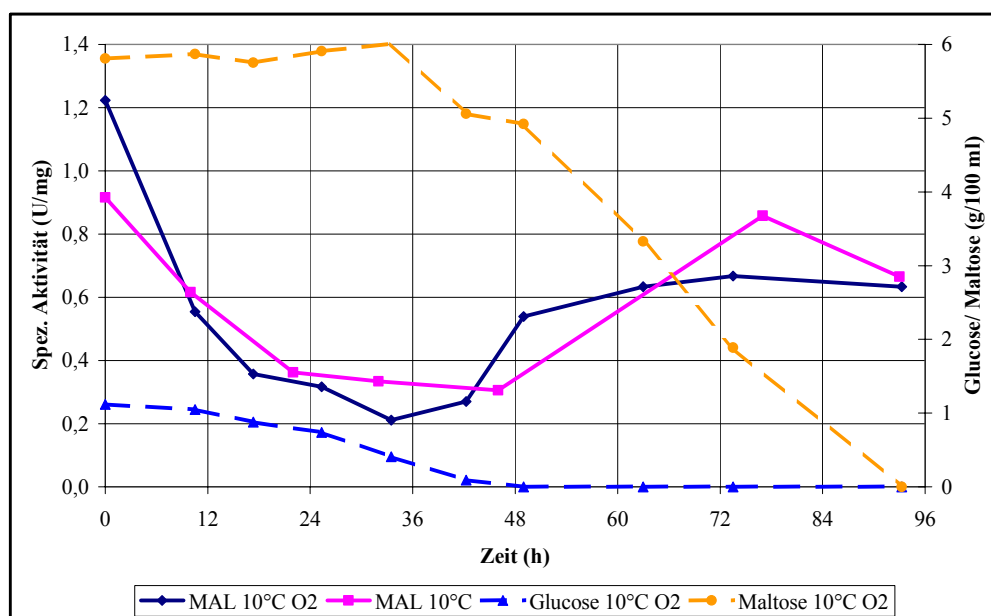


Abbildung 32: Verlauf der Maltaseaktivitäten sowie von Maltose und Glucose bei 10°C

Dies würde bedeuten, dass bis 49 h aufgrund der Anwesenheit von Glucose eine Repression stattgefunden hatte und somit 10°C O₂ trotz Luftzufuhr bis zu diesem Zeitpunkt wie 10°C ohne O₂ einen anaeroben Stoffwechsel betrieben hatte. Die Repressionsdauer war bei beiden gleich. Nachdem die Glucose verbraucht war, konnte die Repression aufgehoben und somit wieder mehr Acetyl-CoA für die Herstellung von Biomasse bereitgestellt werden, wie auch anhand der Hefezellzahlentwicklung beider Versuche festgestellt werden konnte. Die Maltaseaktivitäten beider Propagationen bei 10°C unterlagen zu Beginn ebenfalls der Repression mit der Folge einer Aktivitätsabnahme und stiegen nach dem Verbrauch der Glucose auf ein Maximum. Zum Ende hin wurde Maltose mehr und mehr verbraucht und somit konnte keine weitere Induzierung der Maltase mehr stattfinden.

Beim Betrachten der PDC-Aktivitäten beider Propagationen (s. Abbildung 33) konnte festgestellt werden, dass die Aktivitäten bei der Umpumpgärung insgesamt höher lagen. Dieses stimmt mit der Annahme überein, dass hier eine stärkere Bildung von Acetaldehyd erforderlich war, da der Energiegewinn nur über die alkoholische Gärung vollzogen werden konnte.

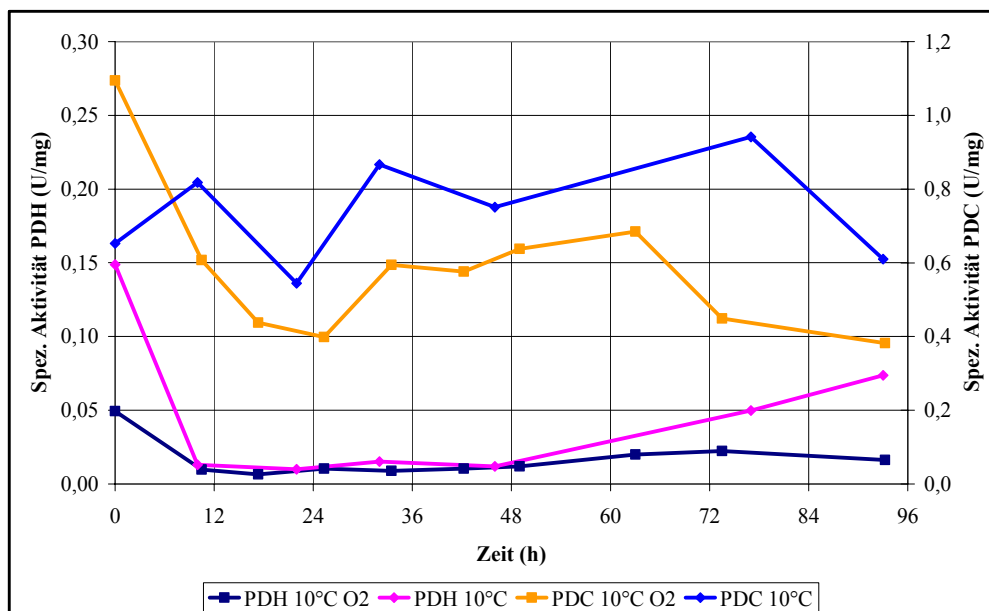


Abbildung 33: Verlauf der PDH- und PDC-Aktivitäten bei 10°C-Propagationen

Nicht erklären ließ sich die stärkere Zunahme der PDH-Aktivität am Ende der Umpumpgärung. Dies wäre bei der belüfteten Propagation zu erwarten gewesen, die aber stattdessen überhaupt keinen deutlichen Anstieg zu verzeichnen hatte. Überhaupt traten

bisher nur bei Gärungen (s. auch Kapitel 4.3) deutlich höhere PDH-Aktivitäten auf als bei den in diesem Kapitel untersuchten Propagationen.

Das Vorliegen eines höheren Alkoholgehalts im Bioreaktor (s. Abbildung 34) konnte auch hier nicht als Maß für das Vorliegen einer alkoholischen Gärung genommen werden, da hier wiederum die Hefezellzahl berücksichtigt werden musste. Die „aerobe“ Propagation 10°C O₂ produzierte ab 48 h deutlich mehr Alkohol als die vollständige anaerobe Umpumpgärung. Ein Blick auf die Tabelle 10 zeigt, dass beide Fermentationen bis etwa 30 h relativ gleiches Hefezellwachstum aufwiesen und 10°C O₂ erst ab 48 h deutlich stärkeres Hefewachstum zu verzeichnen hatte als die Umpumpgärung. Bei einer Betrachtung der Alkoholbildung pro Hefezelle war diese bei der aeroben Propagation somit geringer als bei der anaeroben. Dies belegten auch die gemessenen ADH-Aktivitäten in der Hefe, die zum Schluss bei der Umpumpgärung wesentlich höher lagen als bei Prop 10°C O₂.

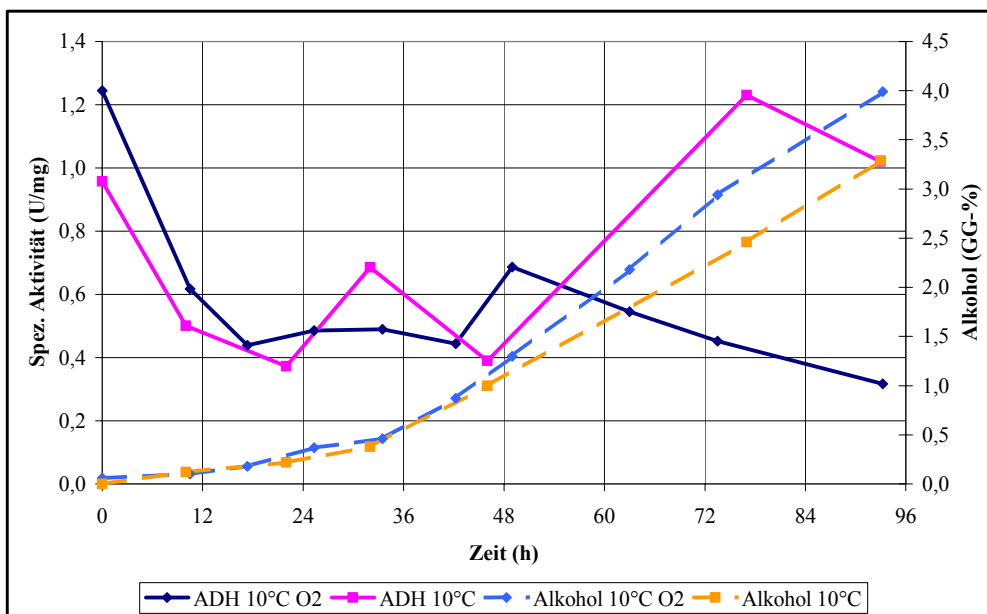


Abbildung 34: Verlauf der ADH-Aktivitäten und Alkoholbildung bei 10°C-Propagationen

Bis 48 h allerdings hatten beide Propagationen fast identische Aktivitätsverläufe und auch die Alkoholbildung verlief nahezu gleich. Dies bestätigte wiederum die These, dass trotz Belüftung in Prop 10°C O₂ das Eintreten der partiellen Gärung durch das Vorliegen von Glucose nicht verhindert werden konnte. Dass aber die Belüftung dennoch zur Vermehrung der Hefe beigetragen hatte, ließ sich leicht anhand der Hefezellzahl bestätigen. Zum Ende (nach 93 h) wies die mit Luft begaste Propagation eine fast doppelt so hohe Konzentration auf als die Propagation ohne Belüftung. Für die fast i-

dentischen Verläufe der Hefezellzahlen konnten neben der Repression auch folgende Vermutungen nahe liegen, dass beide Propagationen bis dahin aerob verliefen, also auch die Umpumpgärung. Bei der Umpumpgärung fand zu Beginn keine Entgasung der im Bioreaktor befindlichen Würze statt, so dass die im Reaktor noch vorhandene Luft (ca. 30 l) solange durch das Umwälzen die gesamte Würze begaste, bis die Luft verbraucht war. Erst dann müsste ein vollständig anaerobes Milieu im Reaktor eingetreten sein. Dieser Zeitpunkt musste zwischen 24 und 36 h gelegen haben, da ab hier die Hefen aus 10°C O₂ ein verstärktes Zellwachstum aufzuweisen hatten. Auch in diesem Falle hätte sich gezeigt, dass eine ausreichende Versorgung mit Luft unabdingbar für eine verbesserte Zunahme an Biomasse gewesen wäre. In diesem Zusammenhang wiederum verwundert es aber, dass bei der Umpumpgärung eine Aktivitätszunahme der PDH ab dem Zeitpunkt der vollständig anaeroben Bedingungen auftrat. Auch die höheren ADH-Aktivitäten der Umpumpgärung zum Ende hin belegen in diesem Falle das Vorliegen eines vollständigen anaeroben Milieus.

4.6 Untersuchung der Aktivitäten in einer kontinuierlichen Kultur

Propagationen werden als statische Kulturen betrachtet, da keine neue Nährlösungen mehr hinzugefügt werden. Am Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II versuchte KÖTKE (2004), Hefe mittels einer chemostatischen Kultur in einem ständig guten physiologischen Zustand zu halten und so jederzeit genügend vitale Hefe zum Anstellen eines Tankes zur Verfügung zu stellen. Durch die Schaffung vollständig aerober Bedingungen und im Bereich des Temperaturoptimums von 25°C sollten Hefen mit hoher Vitalität erwartet werden. SCHINDELDECKER (2004) untersuchte die Hefeenzymaktivitäten der ersten Versuchsreihen. Dabei fielen die ADH-Aktivitäten auf, die deutlich niedriger lagen als alle bisher gemessenen ADH-Aktivitäten. Aus Abbildung 35 lässt sich ablesen, dass die ADH in den Versuchsreihen VR2 und VR3 bis auf die Ausgangsaktivität in einem Zeitraum von 23 Tagen keine höhere Werte als 0,4 U/mg erzielen konnte. Zusätzlich dargestellt sind eine Propagation bei 10°C aus Kapitel 4.4 und eine konventionellen Gärung bei 15°C aus Kapitel 4.3. Auch die durchgeführten Propagationen bei höheren Temperaturen wiesen keine tieferen Werte auf, wie Abbildung 26 zeigt. Vielleicht gelang mit dieser kontinuierlichen Kultur im Fermenter eine Unterdrückung der partiellen Gärung und der PDH-Bypass konnte somit voll ausgeschöpft werden.

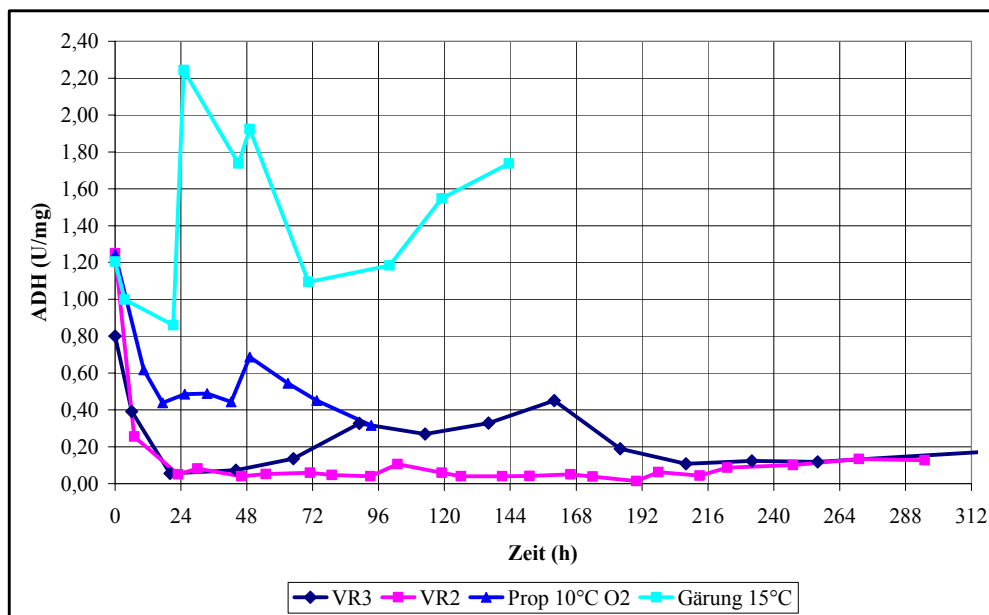


Abbildung 35: Vergleich der ADH-Aktivitäten von Gärung, Propagation und kont. Kultur

Auf diese Weise könnten Hefen in einem guten vitalen Zustand gewonnen werden. Eine auf diese Weise gewonnene Hefe genügt aber nicht den Anforderungen an eine Bierhefe, da die angestellten Gärungen mit Hefen aus der kontinuierlichen Kultur bezüglich ihres Gärverhaltens unbefriedigende Ergebnisse zeigten. In VR2 erreichten die angestellten Gärproben nicht vor 20 Tagen den EVG. Eine Optimierung des Fermenters (andere Nährstoffzusammensetzung, Belüftungsintensität) führte in VR3 zu zügigeren Gärungen, die bereits nach 10-12 Tagen in den Bereich des EVG kamen. Die höchsten Gärleistungen erzielten hier die Proben, die zw. 136 und 160 h gezogen wurden (Daten nicht dargestellt).

In diesem Zeitraum befanden sich die ADH-Aktivitäten der VR3 auf dem höchsten Niveau der gesamten Fermentationsdauer. Daraus ließ sich schließen, dass hohe ADH-Aktivitäten ein entscheidendes Kriterium für eine gärkräftige Hefe darstellen.

Ebenso wünschenswert waren auch hohe PDH-Aktivitäten, wie in Abbildung 36 festgestellt werden kann. Auch in diesem Falle wiesen die Hefen aus VR3 höhere Aktivitäten als die in VR2 auf. Wie bei der ADH lagen diese zwischen 136 und 160 h im Bereich der maximalen Gärleistungen relativ hoch. Dies bestätigt die bisher gemachten Erkenntnisse, dass sich Hefen mit hohen PDH-Aktivitäten positiv auf die Gärungen auswirken. Die gemessenen Aktivitäten der Hefen in kontinuierlichen Kulturen sowie bei statischen Propagationen waren verglichen mit denen bei einer Gärung insgesamt deutlich kleiner. Bei der Gärung schien mehr Acetyl-CoA gebildet worden zu sein als bei

der aeroben Propagation. Dies war unverständlich, da das Acetyl-CoA zur Bildung von Biomasse bei einer Hefevermehrung eher benötigt wird als bei der Gärung, und unter

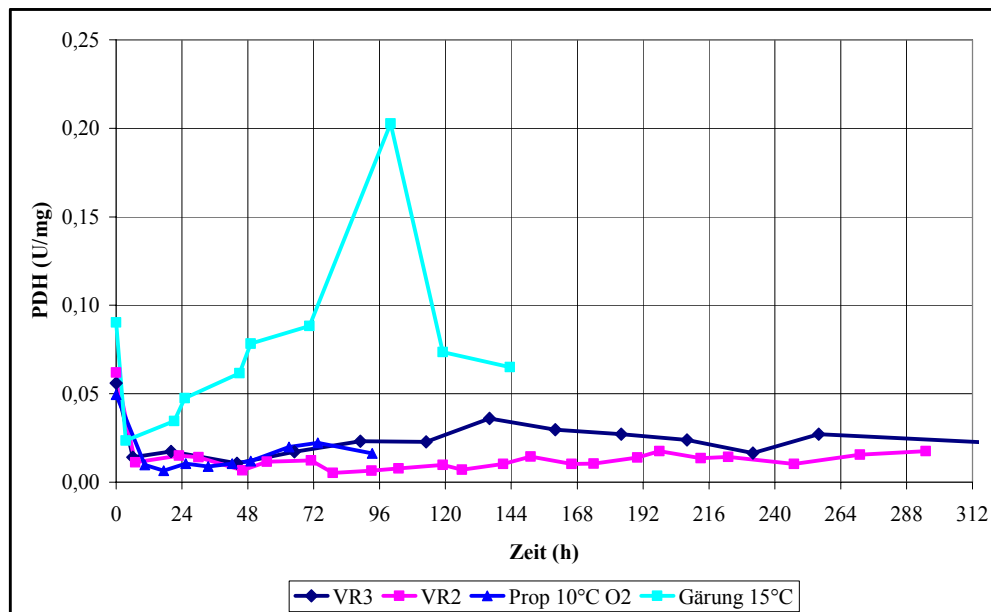


Abbildung 36: Vergleich der PDH-Aktivitäten von Gärung, Propagation und kont. Kultur

anaeroben Bedingungen mehr Pyruvat gebildet und aufgrund des höheren K_m der PDC über diese bevorzugt abgebaut wird. Wahrscheinlich findet hier eine schnellere Entleerung des Pyruvatpools statt, der es dann auch der PDH ermöglicht, das Pyruvat abzubauen. Da es bei der Gärung zu einer stärkeren Bildung von höheren Alkoholen kommt, müssen diese aufgrund deren toxischer Wirkung mit Acetyl-CoA in Ester umgewandelt werden. Ebenso ist auch ein verstärkter FAN-Stoffwechsel bei der Gärung nicht auszuschließen.

Keine eindeutigen Unterschiede waren beim Vergleich der Aktivitätsverläufe von Maltase und PDC in VR2 und VR3 zu beobachten. Auch ließen sich keine Gemeinsamkeiten zwischen den festgestellten Aktivitäten und Gärleistungen erkennen. Die in den Fermenterversuchen VR2 und VR3 gemessenen hohen Maltaseaktivitäten schienen für eine gärkräftige Hefe hier nicht ausschlaggebend zu sein. Vielleicht rückte das Vorliegen niedriger ADH-Aktivitäten die Bedeutung der Maltaseaktivitäten in den Hintergrund.

Bei der PDC war tendenziell eine Abnahme der Aktivitäten mit zunehmender Fermentationsdauer zu beobachten. Bei den bisher durchgeführten Gärungen konnte generell eine Zunahme dieser Aktivitäten beobachtet werden. Dieses würde mit der These, dass bei der alkoholischen Gärung das Pyruvat verstärkt über die PDC und ADH abgebaut wird,

übereinstimmen. Allerdings müssen hier die Ausgangsaktivitäten berücksichtigt werden, da bei niedrigen Werten generell ein Anstieg die Folge war.

4.7 Verhalten der Aktivitäten bei Propagationen mit High Gravity Würzen

Das Brauen mit hoher Stammwürze (High Gravity Brewing) ist ein im Ausland weit verbreitetes Verfahren, um die Produktionskapazitäten zu erhöhen und die Wirtschaftlichkeit des Brauprozesses auch in energetischer Hinsicht zu verbessern. Eine solche High Gravity Würze wird entweder vor oder nach der Gärung mit Brauwasser auf die gewünschte Konzentration gebracht (NARZISS, 1992). Am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität wurde der Einsatz und Nutzen von High Gravity Würzen für die Hefepropagation untersucht (NAGEL, 2004). Vier Würzen mit unterschiedlichem Stammwürzegehalt (12, 14, 16 und 18 GG-%) kamen für die Propagation bei 15°C im Bioreaktor zum Einsatz. Um Stammwürzen von über 12 GG-% zu erreichen, musste die Vorderwürze zunächst verdünnt und nach der Hopfengabe (5 g α -Säure auf 40 l) auf den entsprechenden Stammwürzegehalt gekocht werden. Zusätzlich wurden 2 Propagationen angesetzt, bei denen die normale Ausschlagwürze mit Glucose bzw. Maltosesirup auf einen Extraktgehalt von 16 GG-% gebracht wurden. Das Hauptaugenmerk der Messungen lag im Verhalten der Enzymaktivitäten zu Beginn (Inoculum), in der lag- sowie logarithmischen Phase der Hefevermehrung.

Propagationen mit unterschiedlichem Stammwürzegehalt

In Tabelle 11 sind die einzelnen Messzeitpunkte der Propagationen mit unterschiedlichem Stammwürzegehalt (12, 14, 16 und 18 GG-%) ersichtlich sowie die dazugehörigen Werte einschließlich der PDH-Aktivitäten. Die verschiedenen Messzeitpunkte waren so gewählt, dass diese sich innerhalb der entsprechenden Wachstumsphasen befanden. Bei P12 (Stammwürze mit 12 GG-%) lag die Hefezellzahl der Probe im Vergleich zu den anderen Propagationen in der log-Phase deutlich höher. Hier war zu berücksichtigen, dass diese über 4 h länger propagiert wurde. Bei P14 und P16 lagen die Werte für die Hefezellzahl im gleichen Bereich, während mit der 18 GG-%igen Würze (P18) im gleichen Zeitraum deutlich niedrigere Hefezellzahlen gemessen worden sind. Mit zunehmend höherer Stammwürze nimmt der Gehalt an Glucose und Maltose in der Würze zu. Da Maltose erst nach der Repression durch Glucose verwertet werden kann, wurde

erwartet, dass die Maltose bei High Gravity Würzen erst zu späteren Zeitpunkten abgebaut wird.

Tabelle 11: Werte der Propagationen mit unterschiedlicher Stammwürze

P12	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Fructose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	7	11,9		15,3	0,4	70,3	0,012
Lag-Phase	14	30	10,8		11,1	0,2	53,7	0,006
Log-Phase	26	137	9,0		0,0	0,0	24,7	0,013
P14	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Fructose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	10	14,2	0,00	14,1	0,3	76,3	0,037
Lag-Phase	14	27	13,0	0,49	1,0	0,8	63,4	0,011
Log-Phase	20	55	11,9	0,90	0,3	0,3	65,1	0,011
P16	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Fructose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	10	16,1	0,00	14,8	0,4	80,6	0,037
Lag-Phase	15	28	15,0	0,48	12,6	0,8	85,8	0,009
Log-Phase	21	56			1,0	0,8	84,3	0,009
P18	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Fructose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	10	17,9	0,00	19,6	0,9	103,3	0,024
Lag-Phase	16	29	16,7	0,55	12,8	0,8	95,3	0,009
Log-Phase	22	44	15,9	0,83	0,8	0,8	98,2	0,009

Bei P12 war bis zur logarithmischen Phase die stärkste Abnahme des Maltosegehalts zu beobachten. In der Würze mit 14 GG-% (P14) fand nur eine leichte, bei P16 und P18 dagegen so gut wie keine Abnahme der Maltose statt. Bei beiden letztgenannten Propagationen wurde Glucose (sowie Fructose) über die lag-Phase hinaus wohl als einzige Kohlenhydratquelle genutzt, die aber spätestens in der log-Phase bei allen Propagationen fast vollständig verbraucht wurde. Obwohl die Glucoserepression somit spätestens nach Ende der lag-Phase vorbei war, kam es bei P16 und P18 noch nicht zu einer merklichen Abnahme des Maltosegehalts. Offensichtlich fand bis zu diesem Zeitpunkt noch die Verwertung von anderen Kohlenhydratquellen in der Würze wie Fructose und Saccharose statt.

Hinsichtlich der Alkoholbildung ließ sich anhand der gemessenen Werte von P14 und P18 festhalten, dass diese sich bei allen Propagationen bis zur logarithmischen Phase gleich verhielt.

Bei einem hohen Glucosegehalt in der Würze liegen auch hohe Konzentrationen an intrazellulärem Pyruvat vor, so dass das Pyruvat aufgrund der niedrigen K_m der PDH vorwiegend über die PDC (hoher K_m -Wert) abgebaut wird (HOLZER, 1961; BOITEUX

und HESS, 1970). Daher kam es zu einer Abnahme der PDH-Aktivitäten bei allen Propagationen in der lag-Phase. Nach dem Verbrauch der Glucose kam es mit dem Abbau von Maltose wieder zu einem Anstieg der PDH-Aktivitäten, wie es bei P12 in der logarithmischen Phase der Fall ist.

Wenn Pyruvat vorwiegend über die PDC abgebaut wird, so führt dies nicht zwangsläufig nicht zu höheren Aktivitäten der PDC in der logarithmischen Phase, wie in Abbildung 37 zu sehen ist.

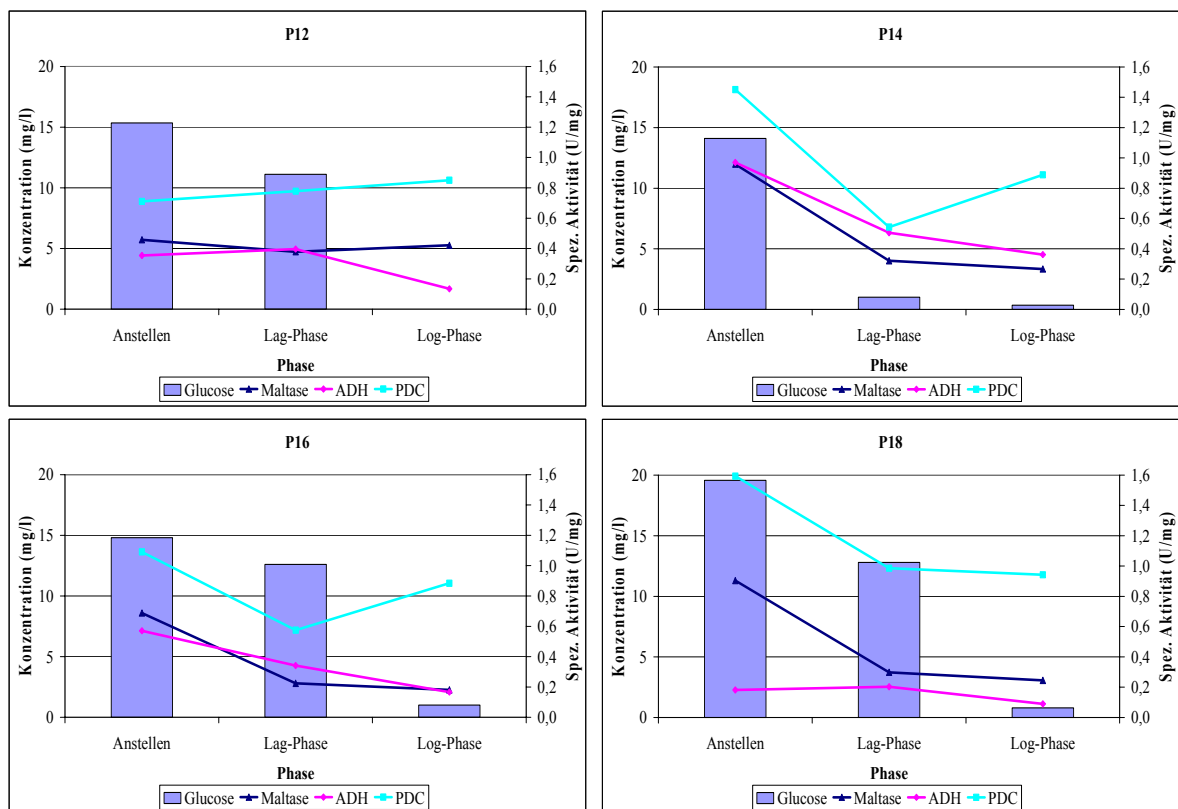


Abbildung 37: Verlauf der Aktivitäten von Maltase, PDC und ADH bei den Propagationen in Würze mit 12 GG-% (P12), 14 GG-% (P14), 16 GG-% (P16) und 18 GG-% (P18)

Hier waren die PDC-Ausgangsaktivitäten (außer bei P12) bereits hoch, so dass es zunächst zu einer Abnahme der Aktivitäten führen musste. Erst in der logarithmischen Phase war wieder eine Zunahme zu verzeichnen (außer bei P18). Dass in diesem Falle keine verstärkte alkoholische Gärung eintrat und der Acetaldehyd über einen Bypass als Acetyl-CoA zur Verfügung gestellt wurde, ließ sich anhand der ADH-Aktivitäten erklären. Diese wiesen bis in die logarithmischen Phase hinein in allen Versuchen eine abnehmende Tendenz auf, obwohl das für die Umwandlung von Acetaldehyd in Ethanol zuständige Isoenzym ADH1 durch die Anwesenheit von Glucose eine verstärkte Expression erfahren müsste (DENIS et al., 1983).

Wie zu erwarten war, kam es bei der Maltase bei allen Propagationen zu einer Repression, solange Glucose in der Würze vorlag. Je höher die Ausgangsaktivität, umso stärker war die Aktivitätsabnahme. Bereits in der lag-Phase wurden die niedrigsten Werte gemessen. Diese Werte blieben solange auf diesem Niveau bis die Glucose verbraucht war, wie bei P12 zu sehen war. Hier konnte keine Glucose mehr nachgewiesen werden und es kam somit bereits in der logarithmischen Phase zu einem Anstieg der Maltaseaktivitäten.

Vergleich von Propagationen in Würze mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil

In einem weiteren Versuch wurde normale Ausschlagwürze (12 GG-%) zum einen mit Glucosesirup und zum anderen mit Maltosesirup auf eine Konzentration von 16 GG-% gebracht. In Tabelle 12 sind die Werte der beiden Propagationen zu den verschiedenen Phasen ersichtlich sowie zum Vergleich eine normale Würze mit 16 GG-% dargestellt. Erkennbar waren die jeweils höhere Glucose- und Maltosegehalte durch die Sirupzugabe.

Tabelle 12: Werte der Propagationen in Würze mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil

P16 Glucose	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	11	15,7	0,00	18,1	88,5	0,073
Lag-Phase	16	32	14,6	0,62	11,0	89,1	0,014
Log-Phase	22	58	13,9	0,92	0,4	90,8	0,009
P16 Maltose	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	12	16,5	0,00	15,3	108,9	0,048
Lag-Phase	16	30	15,6	0,60	1,0	103,6	0,009
Log-Phase	22	60			0,4	102,5	0,010
P16	Zeit	HZZ	Extrakt	Alkohol	Glucose	Maltose	PDH
	(h)	(Mio./ml)	(GG-%)	(GG-%)	(mg/l)	(mg/l)	(U/mg)
Anstellen	0	10	16,1	0,00	14,8	80,6	0,037
Lag-Phase	15	28	15,0	0,48	12,6	85,8	0,009
Log-Phase	21	56			1,0	84,3	0,009

Bei der normalen Würze (P16) und der Würze mit Glucosezusatz (P16 Glucose) fand im Vergleich zur Würze mit Maltosezusatz (P16 Maltose) bis zur logarithmischen Phase keine Abnahme des Maltosegehalts statt. Durch den erhöhten Maltoseanteil hat wahrscheinlich bei P16 Maltose eine sogenannte Maltaseinduktion statt gefunden, was mit einer leichten Zunahme der Maltaseaktivität verbunden war (s. Abbildung 38). Dazu hat auch die starke Glucoseabnahme in der mit Maltose angereicherten Würze beigetragen,

die bereits in der lag-Phase auf 1,0 mg/l abgesunken war. Die langsamste Glucoseverwertung wurde bei der Würze ohne Zusätze beobachtet, obwohl der Extraktabbau hier nach 16 h insgesamt hoch war.

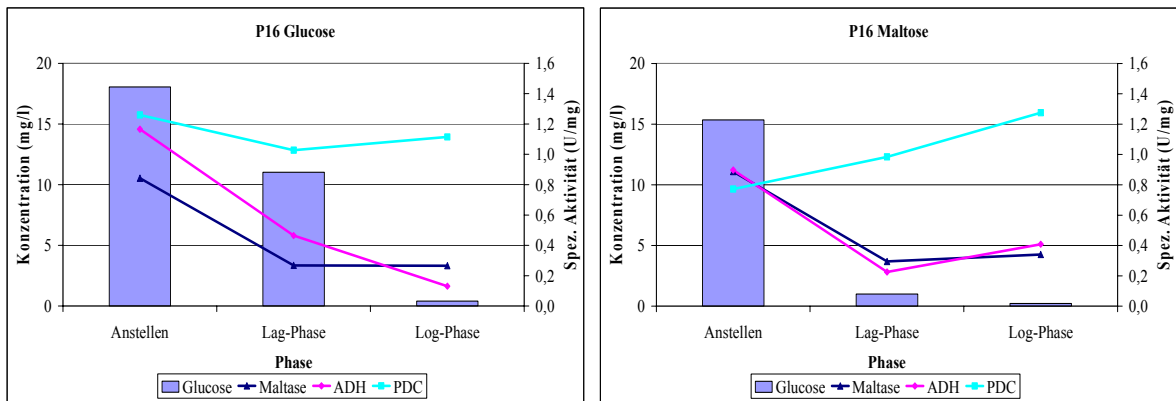


Abbildung 38: Verlauf der Aktivitäten von Maltase, PDC und ADH bei den Propagationen in Würze mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil

Keinen wesentlichen Einfluss hatte die unterschiedliche Verwertung von Glucose und Maltose der 3 Propagationen auf die Hefezellzahlentwicklung. Alle erreichten zu den einzelnen Messzeiten fast gleiche Hefezellzahlen.

Bei den PDH-Aktivitäten wurde bei allen Propagationen eine Abnahme auf 0,009 U/mg festgestellt. Diese Abnahme dauerte bei der normalen Würze länger, das wahrscheinlich auf die höheren Ausgangsaktivitäten zurück zu führen war.

Die Aktivitäten der Maltase in Abbildung 38 zeigten ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede auf. Bei der normalen Würze (s. auch Abbildung 35) schien der Aktivitätsabfall durch die Repression stärker gewesen zu sein. In bezug auf die ADH- und PDC-Aktivitäten konnten bei den Propagationen mit Zusatz größere Unterschiede festgestellt werden. Die mit Maltose versetzte Ausschlagwürze hatte einen stetigen Anstieg der PDC-Aktivität zu verzeichnen und auch die ADH-Aktivität nahm im Vergleich zu allen anderen Propagationen hier bereits in der logarithmischen Phase zu. Anscheinend trat hier die alkoholische Gärung früher bzw. stärker in Erscheinung als bei den anderen. Der rasche Glucoseabbau deutet ebenfalls auf eine verstärkte alkoholische Gärung hin, da unter anaeroben Bedingungen mehr Glucose abgebaut wird als unter aeroben.

Ein Blick auf die Gärleistungen (s. Abbildung 39) soll zeigen, welche Propagation den stärksten Gärcharakter über die gesamte Zeit (max. 32 h) aufzuweisen hatte. Zusätzlich

sind zum Vergleich auch die Gärleistungen der Propagation mit normaler Anstellwürze (P12) dargestellt.

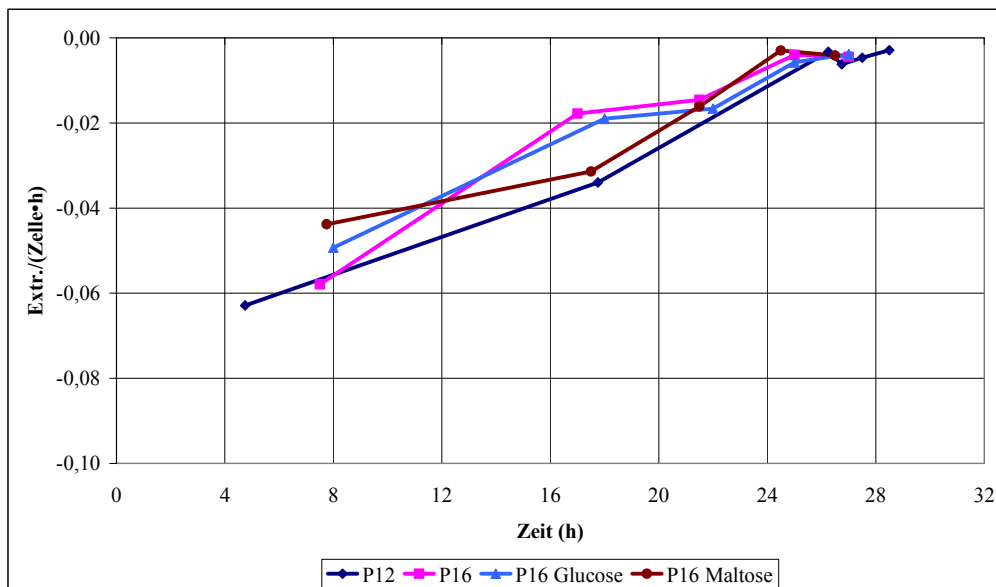


Abbildung 39: Gärleistungen der Propagationen der Würzen mit hohem Glucose- bzw. Maltoseanteil

Die höchsten Gärleistungen waren aufgrund der Auslösung des Crabtree-Effektes durch die hohe Glucosekonzentration eigentlich bei der mit Glucosesirup versetzten Würze zu erwarten. Anhand der Gärleistungen konnte abgeleitet werden, dass die Repression bei den mit normaler Würze und normaler High Gravity Würze mit 16 GG-% angesetzten Propagationen sogar stärker ausfiel.

In den ersten 22 h waren die Hefezellzahlen bei allen Propagationen (s. Abbildung 40) relativ gleich, so dass im Grunde nichts gegen einen Einsatz von High Gravity Würzen bei der Propagation spricht. Denn der Crabtree-Effekt trat, ob mit Glucose- oder Maltosezusatz, in jedem Falle ein. Entscheidend ist letztendlich wohl die Ausstattung der Würze mit den erforderlichen Nährstoffen der Hefe wie Aminosäuren, Fettsäuren, Mineralstoffen.

Überhaupt gab es bei allen durchgeführten Propagationen keine großen Unterschiede bezüglich der Hefevermehrung. Die maximale Hefezellzahl wurde frühestens nach 26 h (P16 Maltose) erreicht, die langsamste Propagation mit 18 GG-% folgte ca. 4 h später. Die maximalen Hefezellzahlen lagen im Bereich von 140-150 Mio./ml. Auch die anschließende Vergärung der verschieden hergeführten Hefen zeigte bezüglich der Gärungsnebenprodukte und Sensorik keine großen Unterschiede. Lediglich die Gärge-

schwindigkeiten und das Absetzverhalten variierten teilweise stark, wobei Zusammenhänge (z.B. höhere Stammwürze bei der Propagation = langsamere Gärung mit normaler Würze) nicht gefunden werden konnten (NAGEL, 2004).

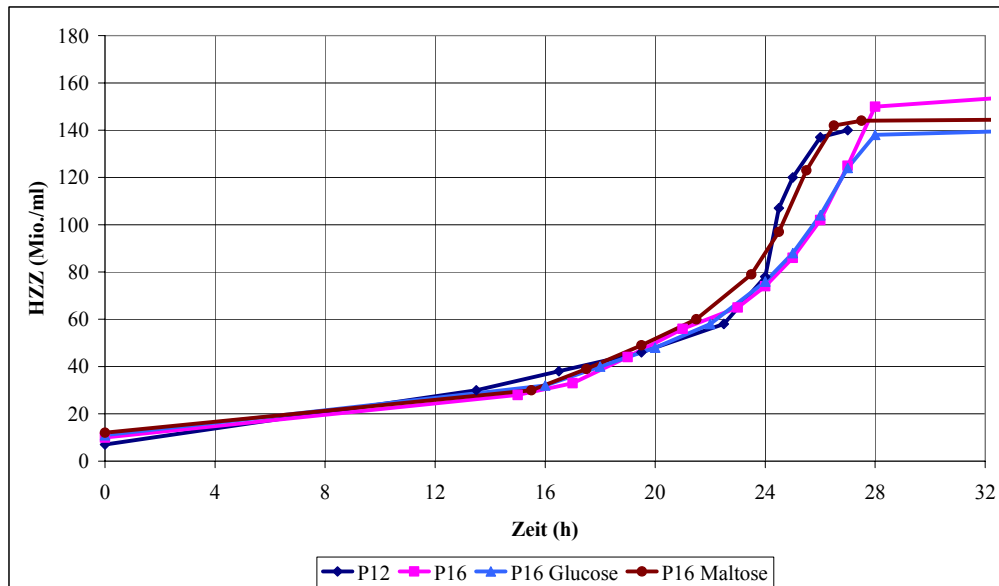


Abbildung 40: Verlauf der Hefezellzahlen bei Propagationen mit Glucose- bzw. Maltosezusatz

4.8 Vergleich von Gärungen in belüfteter und unbelüfteter Anstellwürze über mehrere Führungen

Bei den bisherigen Gärungen wurde die bestmögliche Vergleichbarkeit angestrebt. Dennoch konnten die Versuche aus organisatorischen Gründen nicht mit identischer Hefevitalität, gleichen Messzeitpunkten und identischen Messbedingungen durchgeführt werden. Faktoren wie unterschiedliche Würzezusammensetzungen oder unregelmäßige Probennahmen könnten den Vergleich der Messergebnisse negativ beeinflusst haben. Zusätzlich soll der Frage nachgegangen werden, wie sich die Aktivitäten der Hefeenzyme über mehrere Führungen verhalten.

Dazu wurden Gärungen mit belüfteter und unbelüfteter Würze parallel durchgeführt und die jeweiligen Hefeproben zu gleichen Zeitpunkten gemeinsam untersucht. Diese Gärungen sollten zudem Aufschluss über den Einfluss der Würzebelüftung beim Anstellen geben. Durch die konventionelle Belüftung der Würze beim Anstellen soll eine gute Angärung und gute Hefevermehrung gewährleistet werden. Allerdings wird in diesem Prozessschritt auch Luft eingebracht, die zu einer oxidativen Schädigung der Würze führen und somit die Haltbarkeit des Bieres drastisch reduzieren kann (Burkert et al.,

2003). Mit einer Hefe in einem guten physiologischen Zustand beim Anstellen könnte eine Belüftung der Würze entfallen.

Insgesamt wurden 2 Versuchsreihen mit jeweils einer belüfteten und unbelüfteten Würze durchgeführt. In einer dritten Versuchsreihe sind die unbelüfteten Würzen mit Hefe angestellt worden, die vor dem Anstellen in Wasser mit Sauerstoff im Überschuss vorbehandelt wurden. Auf diese Weise konnte eine oxidative Schädigung der Anstellwürze ebenfalls ausgeschlossen werden.

Versuchsreihe 1

Tabelle 13 zeigt die einzelnen Vergärungsgrade und die Entwicklung der Hefezellzahlen der Gärungen über zwei Führungen mit jeweils einer belüfteten und einer unbelüfteten Würze.

In der ersten Führung gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gärungen. In beiden Fällen konnte der Extrakt zügig abgebaut und auch die Hefezellzahlen verhielten sich nahezu parallel. Ab der zweiten Führung kam es zu Differenzen. Trotz einer höheren Anstellkonzentration konnte die unbelüftete Würze nicht annähernd so gut wie die belüftete vergoren werden. Ein Blick auf die Hefezellzahlen zeigt, dass die maximale Hefezellzahl in der unbelüfteten Würze während der Hauptgärphase deutlich unter der der Vergleichsgärung war. Bis zum 3. Tag nach dem Anstellen konnten noch identische Werte festgestellt werden. Gerade in der Anfangsphase wäre aufgrund der Belüftung der Würze eigentlich eine zügigere Hefevermehrung zu erwarten gewesen und eine damit verbundene zügigere Verwertung des Extraktes.

Tabelle 13: Vergleich Vergärungsgrade und Hefezellzahlen bei belüfteter und unbelüfteter Würze über 2 Führungen

	Führung 1					Führung 2			
	Belüftet	Unbelüftet	Belüftet	Unbelüftet		Belüftet	Unbelüftet	Belüftet	Unbelüftet
Zeit	Vergärungsgrad	Vergärungsgrad	HZZ	HZZ	Zeit	Vergärungsgrad	Vergärungsgrad	HZZ	HZZ
(h)	(%)	(%)	(Mio./ml)	(Mio./ml)	(h)	(%)	(%)	(Mio./ml)	(Mio./ml)
0	0	0	15	15	0	0	0	11	16
24	5	4	23	25	25	3	6	15	18
47	9	11	33	29	43	5	7	13	13
100	33	31	50	42	67	18	10	25	25
120	40	37	48	59	89	32	18	32	20
149	48	44	45	36	113	45	23	37	29
175	57	54	35	31	138	55	28	42	25
195	61	60	35	37	163	64	34	33	28
216	66	65	23	32	194	73	41	39	23

Beim Betrachten der Gärleistung aller vier Versuche zeigt sich das gleiche Bild (s. Abbildung 41). In der ersten Führung sind beide Verläufe nahezu identisch, während die unbelüftete Würze in Führung 2 außer zu Beginn deutlich niedrigere Gärleistungen aufwies als die Vergleichsgärung. Die Gärleistungen der belüfteten Würze in Führung 2 verhielten sich nahezu analog zu denen der 1. Führung.

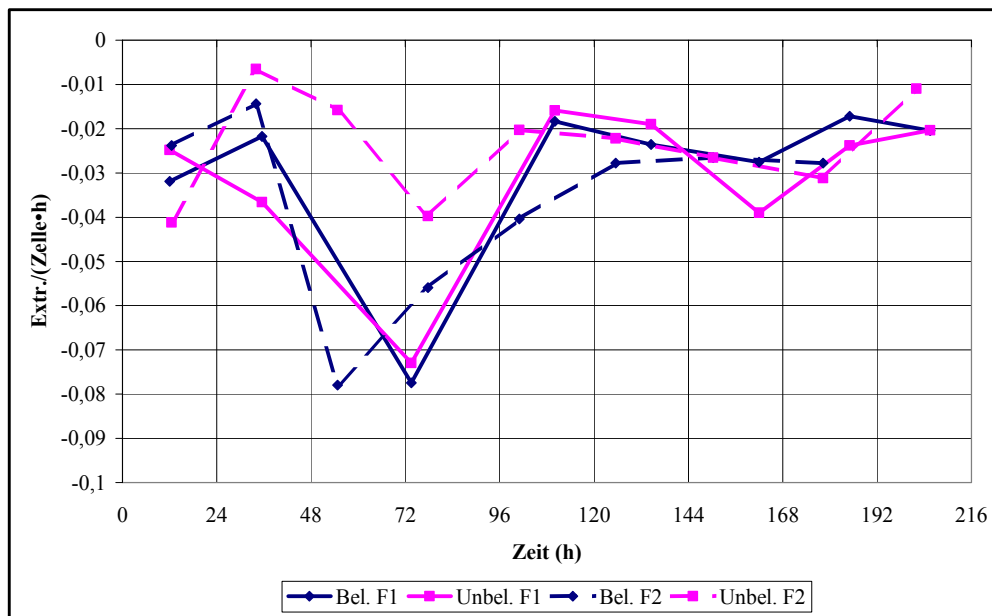


Abbildung 41: Gärleistungen belüfteter und unbelüfteter Würze über 2 Führungen

Auch zeigte sich, dass die Hefe mit Belüftung in Führung 2 ab dem 2. Gärtag gärkräftiger war und dementsprechend zum Ende höhere Vergärungsgrade als in Führung 1 erreichte.

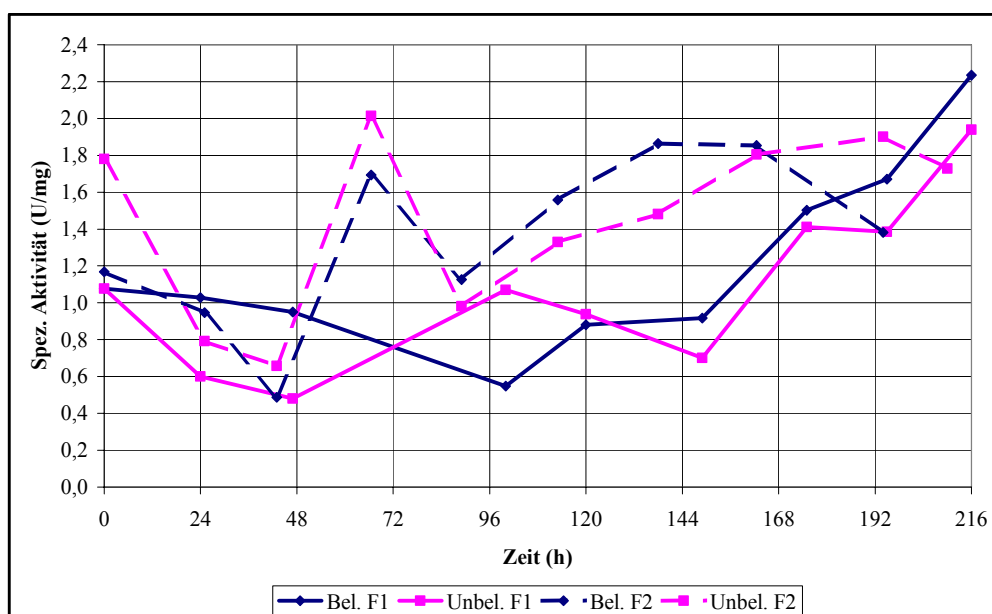


Abbildung 42: Verlauf der Maltaseaktivitäten über 2 Führungen

Beim Vergleich der Maltaseaktivitäten konnten ansatzweise Informationen gewonnen werden, wie der Abbildung 42 zu entnehmen ist. Die Aktivitäten waren in der 2. Führung bis auf die Repression zu Beginn höher als in der 1. Führung, die mit Presshefe angestellt wurde. Die Aktivitäten verliefen innerhalb einer Führung ähnlich. So zeigte sich in der 1. unbelüfteten Führung zwar eine kürzere Repressionsdauer im Vergleich zur belüfteten, die dann zum Ende hin aber identisch verliefen.

Beim Betrachten der jeweiligen Gärleistungen von Führung 1 ließ sich eine gute Übereinstimmung mit den Maltaseaktivitäten finden. Die unbelüftete Würze verzeichnete bis 47 h eine bessere Angärung, welches mit der kürzeren Repressionsdauer der Maltase im Einklang stand. Nach 5 Tagen (120 h) kam es bei beiden zu einem starken Anstieg der Aktivitäten, die allerdings auf die Gärleistungen keinen Einfluss nahmen. In Führung 2 waren bei der belüfteten Würze hohe Gärleistungen festzustellen, die nicht im Einklang mit den Aktivitäten der Maltase standen. Bis 67 h wies die belüftete Würze niedrigere Maltase-Werte auf, die erst ab 89 h entsprechend den höheren Gärleistungen auch höhere Werte erreichte. Eine Vermutung für die höheren Maltaseaktivitäten der schwächeren Gärung könnten hier in der höheren Ausgangsaktivität gelegen haben.

Einige Aussagen konnten bei den gemessenen PDH-Aktivitäten getroffen werden, wie in Abbildung 43 dargestellt ist. Alle Aktivitäten wiesen einen recht identischen Verlauf auf und auch die Werte unterschieden sich bis 144 h kaum. Auffällig hierbei war die Tatsache, dass die Gärung mit der höheren maximalen Hefezellzahl zum Ende hin auch

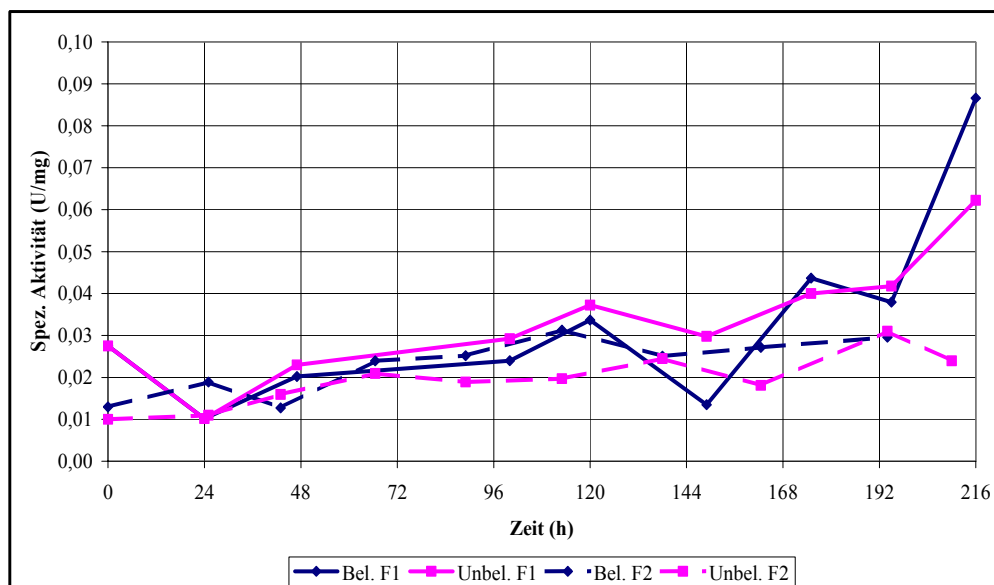


Abbildung 43: Verlauf der PDH-Aktivitäten über 2 Führungen

höhere Werte für die PDH aufwies.

Die Verläufe der PDC-Aktivitäten waren vergleichbar mit denen der Maltase (s. Abbildung 44). Auffällig waren hier jedoch die einzelnen Maxima. Jede Gärung wies bis zum 6. Tag zwei Maxima auf (s. Pfeile). So waren die beiden Maxima der schwächsten Gärung alle deutlich niedriger im Vergleich zu den anderen. Die kräftigste Gärung in bezug auf die Gärleistungen zeigte hier die entsprechend höchsten Maxima auf. Auch in Führung 1 spiegeln die PDC-Aktivitätsverläufe die beiden Gärungen wider. Am 2. Tag war die unbelüftete Führung 1 gärkräftiger und wies auch höhere PDC-Aktivitäten auf. Ab dem 5. Gärtag liefen beide Aktivitäten wie auch die Gärleistungen nahezu gleich. Bei allen Gärungen kam es zum Ende zu einem Anstieg auf ein 3. Maximum. Dies hatte allerdings keine weiteren Auswirkungen auf den Gärverlauf.

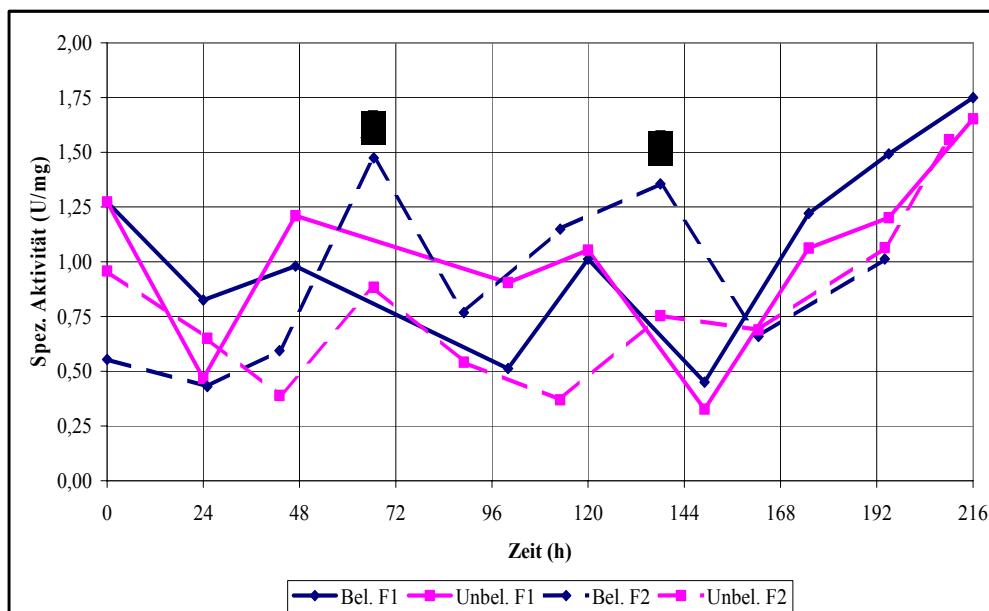


Abbildung 44: Verlauf der PDC-Aktivitäten über 2 Führungen

Höhere ADH-Aktivitäten wurden bei der Gärung mit unbelüfteter Würze erwartet. In Führung 1 war dies nur zum Ende hin der Fall (s. Abbildung 45). Bei der unbelüfteten Würze in der 2. Führung fiel nur die hohe Ausgangsaktivität der ADH auf. Während die anderen Gärungen stets ein Maximum über der Ausgangsaktivität vorweisen konnten, war die unbelüftete Würze zu keinem Zeitpunkt in der Lage, ihren Ausgangswert zu übertreffen. Die zügigste Gärung in der 2. Führung (belüftete Würze) wies die höchsten Werte der ADH vor. Dies bestätigt das Vorliegen eines anaeroben Stoffwechsels bedingt durch die Glucoserepression, die trotz Belüftung nicht verhindert werden kann.

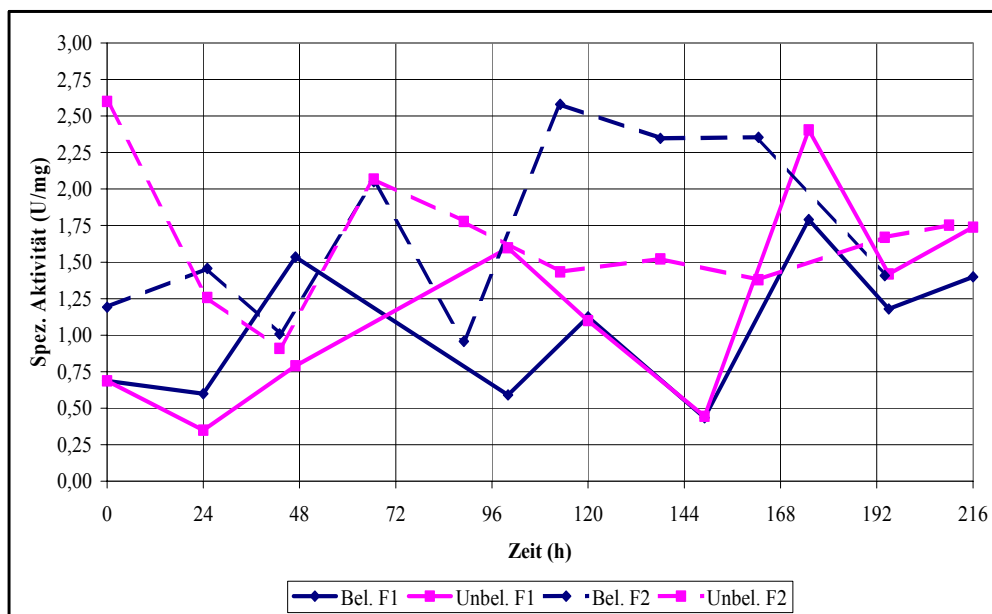


Abbildung 45: Verlauf der ADH-Aktivitäten über 2 Führungen

Versuchsreihe 2

In Versuchsreihe 2 sollten die Ergebnisse aus Versuchsreihe 1 bestätigt und zusätzliche Informationen über den Verlauf der Aktivitäten gewonnen werden. In Tabelle 14 und Tabelle 15 können die Vergärungsgrade sowie die Entwicklung der Hefezellzahlen entnommen werden.

In der 1. Führung zeigte die unbelüftete Würze bei nahezu gleichen Hefezellzahlen eine zügigere Vergärung nach 184 h als die belüftete Würze. Auch in der 2. Führung schnitt die unbelüftete Würze gut ab und wies nach 192 h nur einen um 5 % niedrigeren Vergärungsgrad auf.

Tabelle 14: Vergleich Vergärungsgrade bei belüfteter und unbelüfteter Würze über 3 Führungen

	Führung 1			Führung 2			Führung 3	
	Belüftet	Unbelüftet		Belüftet	Unbelüftet		Belüftet	Unbelüftet
Zeit (h)	VG (%)	VG (%)	Zeit (h)	VG (%)	VG (%)	Zeit (h)	VG (%)	VG (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	8	8	24	8	8	20	4	3
40	23	22	50	19	17	49	18	17
67	32	34	69	26	23	73	26	26
88	41	40	93	32	30	96	34	35
117	49	51	118	47	42	120	48	44
134	53	55	142	56	48	142	57	50
165	58	62	165	63	57	169	68	60
184	63	67	192	72	67			

Tabelle 15: Vergleich Hefezellzahlen bei belüfteter und unbelüfteter Würze über 3 Führungen

	Führung 1			Führung 2			Führung 3	
	Belüftet	Unbelüftet		Belüftet	Unbelüftet		Belüftet	Unbelüftet
Zeit	HZZ	HZZ	Zeit	HZZ	HZZ	Zeit	HZZ	HZZ
(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)	(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)	(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)
0	10	11	0	12	11	0	12	11
15	16	17	24	24	18	20	18	15
40	21	24	50	36	30	49	34	25
67	57	52	69	39	34	73	36	29
88	31	33	93	36	35	96	42	34
117	27	30	118	36	34	120	39	35
134	29	25	142	36	35	142	32	31
165	20	27	165	21	33	169	30	22
184	18	16	192	18	33			

In Führung 3 konnte der Vergärungsgrad der belüfteten Würze im unbelüfteten Ansatz nicht erreicht werden, was auf die schlechtere Hefezellzahlentwicklung zurückgeführt werden kann. Dagegen kam es in Führung 1 bezüglich der Gärleistungen nur bei der Angärung zu einem nennenswerten Unterschied zwischen belüfteter und unbelüfteter Führung (s. Abbildung 46), und hier zeigte sich ein positiver Einfluss der Belüftung.

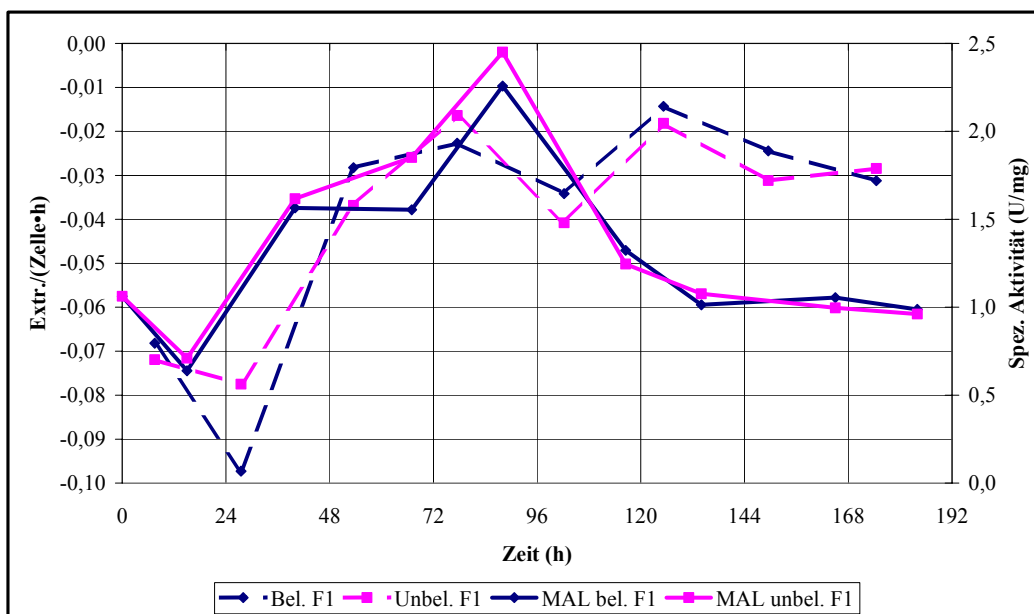


Abbildung 46: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 1. Führung

Bei Betrachtung des weiteren Verlaufes zeigte sich jedoch, dass auf eine Belüftung verzichtet werden kann, wenn die Hefe in einem physiologisch guten Zustand zum Anstellen verwendet wird. Bezüglich der Maltaseaktivitäten waren nur in der Hauptphase Unterschiede zu finden, bei der die unbelüftete Hefe geringfügig höhere Aktivitäten erreichte.

Zu niedrigeren Gärleistungen in beiden Würzen kam es in den ersten 48 h der 2. Führung (s. Abbildung 47). Dabei hatte die unbelüftete Würze eine bessere Angärung zu verzeichnen. Dagegen war die Nachgärung der belüfteten Würze bezogen auf die Gärleistungen stärker.

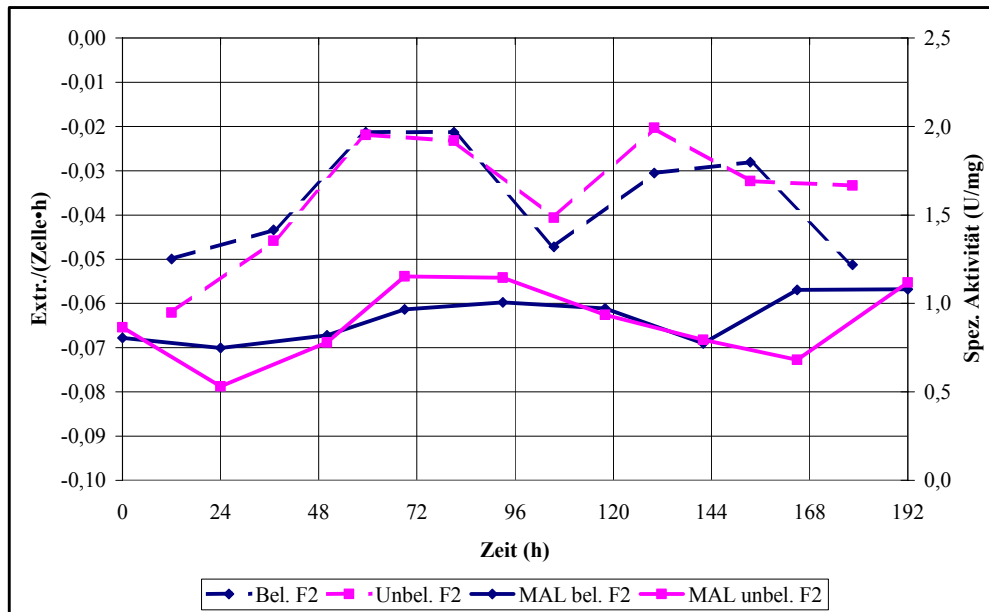


Abbildung 47: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 2. Führung

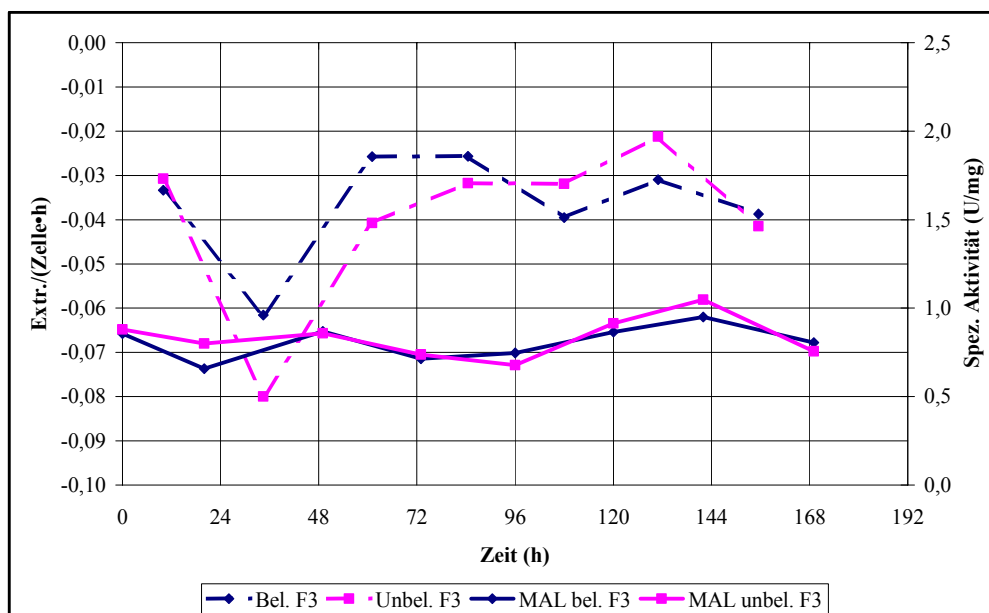


Abbildung 48: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter und unbelüfteter Würze in der 3. Führung

Auch die Maltaseaktivitäten (maximal 1,12 U/mg) waren deutlich niedriger verbunden mit einer längeren Repressionsphase im Vergleich zu Führung 1. Die maximalen Akti-

vitäten wurden hier wie in Führung 1 am Ende der logarithmischen Phase gemessen. Das höhere Maximum der unbelüfteten nach 72 h im Vergleich zur belüfteten Würze könnte die bessere Angärung erklären, da bis zu diesem Zeitpunkt somit mehr Maltose umgesetzt und dementsprechend der Extrakt schneller abgebaut werden konnte.

In Führung 3 (s. Abbildung 48) kam es bezogen auf die Gärleistungen wiederum zu einer besseren Angärung der unbelüfteten Würze. Die Haupt- und Nachgärung ab 96 h war dafür wie auch bei der belüfteten Würze weniger intensiv. Zu einem weiterem Absinken der Aktivitäten von Maltase kam es in Führung 3, und im Gegensatz zu den bisherigen Führungen lagen die jeweiligen Maxima nicht deutlich über dem Ausgangsniveau. Zwischen den beiden Gärungen konnten keine gravierende Unterschiede festgestellt werden.

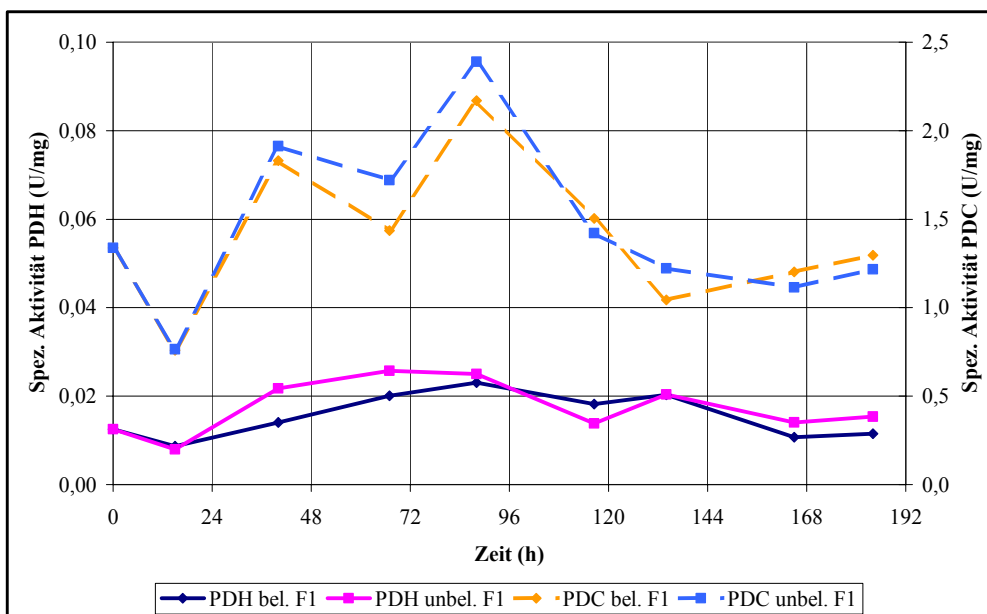


Abbildung 49: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (1. Führung)

In der Versuchsreihe 1 (s. Abbildung 49) waren keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der PDH-Aktivitäten zu beobachten. In Versuchsreihe 2 allerdings wies die belüftete Würze niedrigere Aktivitäten (40 bis 88 h) auf. Wieder konnte gezeigt werden, dass die PDH-Aktivitäten unter vollständig anaeroben Bedingungen höher waren. Bis 15 h waren die gemessenen PDH-Aktivitäten in Führung 1 gleich hoch und somit schien die Anstelltechnologie bis dahin keinen Einfluss auf die Aktivitäten auszuüben.

Bei den PDC-Aktivitäten wies die unbelüftete Würze wie schon bei der PDH im Zeitraum von 40 bis 88 h höhere Aktivitäten als die belüftete auf. Zusammen mit den PDH-

Aktivitäten kann hier auf eine bessere Verstoffwechslung des Pyruvats bei der unbelüfteten Würze geschlossen werden. Auch die schwachen Gärleistungen belegen, dass der glykolytische Fluss in unbelüfteter Würze niedriger sein musste und somit ein Abbau des Pyruvats über die PDH möglich wurde. Ab 96 h konnten bei der PDC wie auch bei der PDH keine wesentliche Unterschiede mehr festgestellt werden.

In der zweiten Führung lag das Niveau beider PDC-Aktivitäten insgesamt niedriger als in der 1. Führung (s. Abbildung 50). In Versuchsreihe 1 kam es bei der PDC in der 2. Führung in belüfteter Würze zu höheren Maximalaktivitäten. In Versuchsreihe 2 konnte die unbelüftete Würze trotz einer stärkeren Repression das Maximum der belüfteten annähernd zum gleichen Zeitpunkt erreichen. Bei der PDH lagen die Aktivitäten in unbelüfteter Würze erst zu Gärende (ab dem 5. Tag) auf einem höheren Niveau.

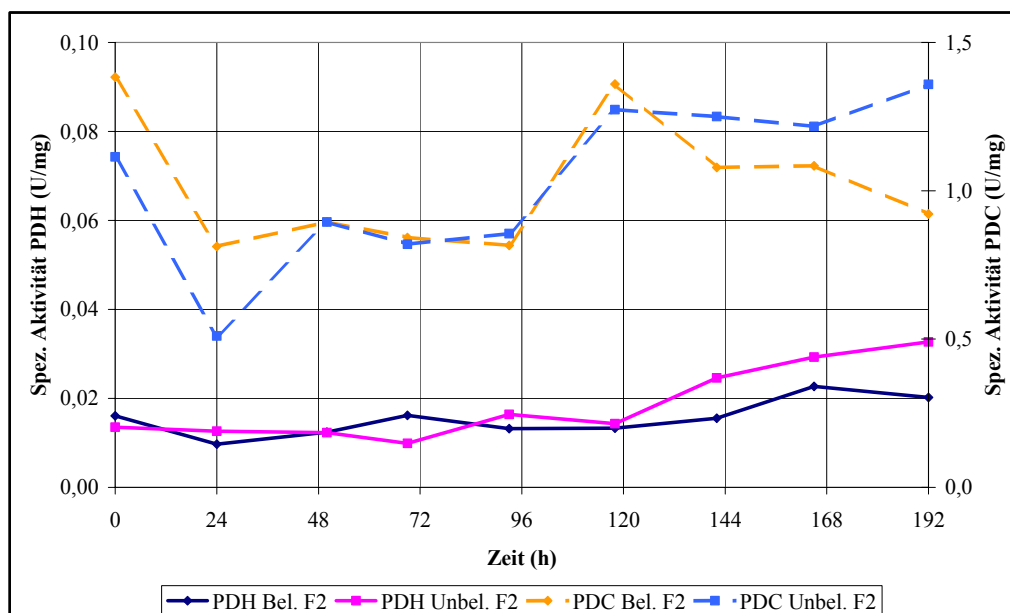


Abbildung 50: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (2. Führung)

Ein weiteres Absinken des PDC-Niveaus konnte in der 3. Führung beobachtet werden. Abbildung 51 zeigt auch, dass die PDC-Aktivitäten fast identisch verlaufen, und lediglich zum Zeitpunkt 48 h zeigte die belüftete Würze ein leicht höheres Maximum als die unbelüftete auf. Das Absinken des PDC-Niveaus mit zunehmender Führung konnte anhand der Gärverläufe oder der Gärleistungen nicht erklärt werden. Höchstens lassen sich Gemeinsamkeiten mit den Maltaseaktivitäten feststellen, die ebenso mit zunehmender Führung bei beiden Anstelltechnologien abnahmen.

Bei der PDH waren in dieser Führung fast identische Verläufe zu beobachten. Insgesamt lassen sich in der 2. Versuchsreihe keine direkten Zusammenhänge zwischen den

Werten für die PDH bzw. PDC mit den Gärleistungen als auch mit der Entwicklung der Hefezellzahlen erkennen.

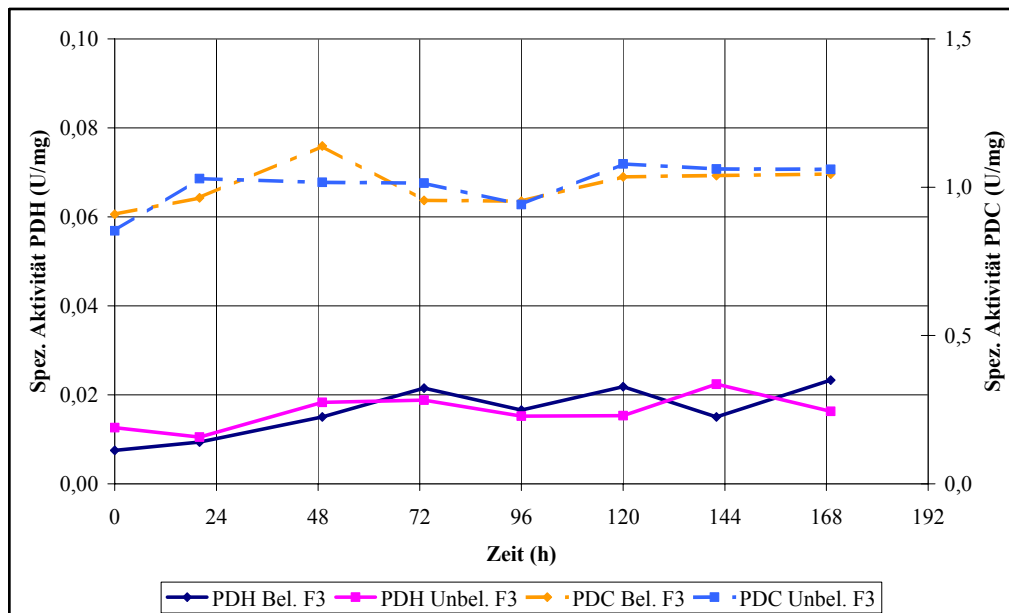


Abbildung 51: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter und unbelüfteter Würze (3. Führung)

In den Abbildungen 52 und 53 sind die ADH-Aktivitäten jeweils von belüfteter und unbelüfteter Würze der 3 Führungen dargestellt.

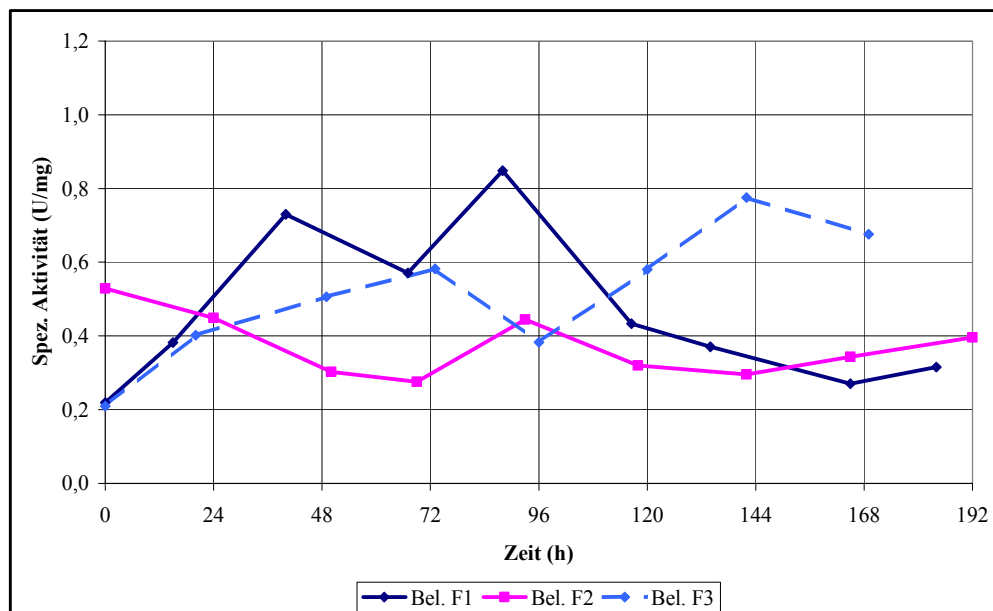


Abbildung 52: Verlauf der ADH-Aktivitäten in belüfteter Würze über 3 Führungen

Beim Vergleich der ADH-Aktivitäten zwischen belüfteter und unbelüfteter Würze in der 1. Führung waren jeweils 2 Maxima bei 40 und 80 h zu beobachten. Die Maxima lagen bei der belüfteten Würze, die zu Beginn auch die höchsten Gärleistungen zu verzeichnen hatte, deutlich höher. Auch bei der 2. Führung konnten diese Maxima beo-

bachtet werden, die allerdings zu späteren Zeitpunkten (93 und 192 h) auftraten. Ebenso waren hier wie bei den anderen Enzymen im Vergleich zur ersten Führung deutlich niedrige Aktivitäten gemessen worden. In dieser Führung zeigte sich eine ausgeprägt lange Repressionsphase von über 72 h bei der belüfteten Würze. Dies könnte durch die hohe Ausgangsaktivität bedingt sein. Zu einer Erhöhung der ADH-Aktivitäten kam es in der 3. Führung. Auffällig bei beiden Gärungen war das Erreichen eines außergewöhnlich hohen Maximalwertes am Ende der Gärung bei 143 h. Auch nach dem 3. Anstellen vergoren die Hefen in belüfteter und unbelüfteter Würze noch zügig den Extrakt. Bei Betrachtung der Enzymaktivitäten waren dennoch große Unterschiede zu verzeichnen, die zur Annahme verleitete, dass ein zügige Gärung stets dann noch gegeben ist, wenn die Aktivitäten der MAL, PDC und ADH noch über einem bestimmten Mindestniveau liegen.

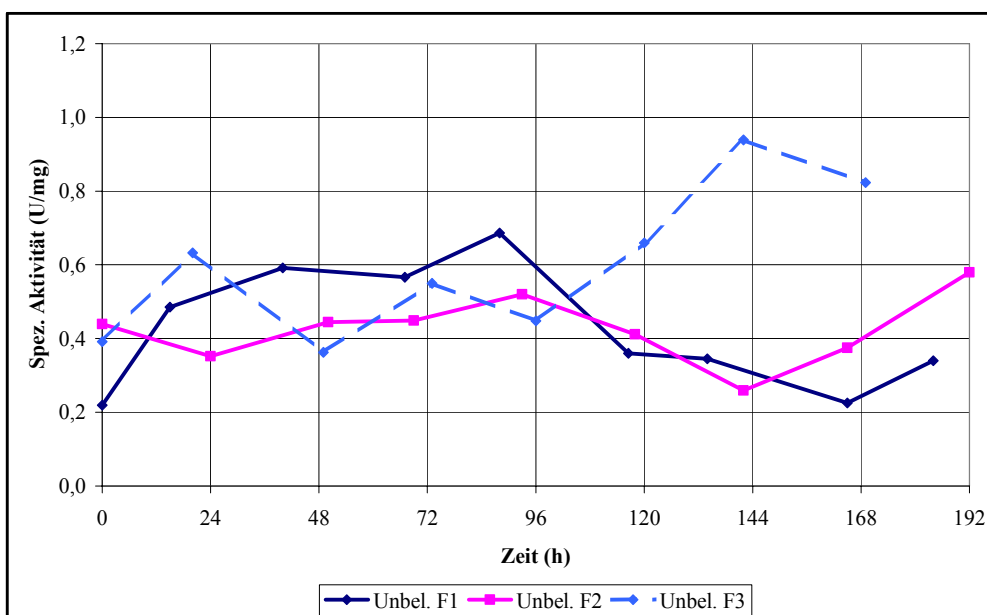


Abbildung 53: Verlauf der ADH-Aktivitäten in unbelüfteter Würze über 3 Führungen

Erst wenn dieses Niveau unterschritten wird, können Gär Schwierigkeiten auftreten. Als Beispiel wären die ADH-Aktivitäten zu nennen, wie sie in den Fermenterversuchen gemessen worden sind (s. Kapitel 4.5). Diese lagen alle deutlich unter 0,2 U/mg und zeigten sich in den anschließend durchgeführten Fermentationen als besonders gärschwach.

Versuchsreihe 3

In dieser Versuchsreihe fand für die Hefe der unbelüfteten Würze eine Vorbehandlung mit aktivem Sauerstoff statt, wodurch ebenfalls eine potentielle Schädigung der gesamten Anstellwürze vermieden werden konnte. Dazu wurde zum einen Würze mit konventioneller Belüftung (8 mg O₂/l Würze) angestellt und zum anderen mit einer Würze, die vor dem Anstellen mit Stickstoff entgast wurde. Das Anstellen der entgasten Würze erfolgte mit einer Hefe, die zuvor in Wasser mit Sauerstoff im Überschuss vorbehandelt wurde.

In Tabelle 16 und Tabelle 17 sind die einzelnen Vergärungsgrade und die zugehörigen Hefezellzahlen zu entnehmen. In der 1. Führung überraschte die mit vorbehandelter Hefe angestellte Würze positiv und erreichte verbunden mit höheren Hefezellzahlen eine zügigere Vergärung im Vergleich zur konventionell angestellten Würze. Auch in der 2. Führung waren höhere Hefezellzahlen zu verzeichnen. Der Vergärungsgrad dagegen nach 166 h lag geringfügig niedriger als in konventionell behandelter Würze.

Tabelle 16: Vergleich Vergärungsgrade bei belüfteter Würze ohne (Konv. bel.) und unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (Vorbeh.) über 3 Führungen

	Führung 1			Führung 2			Führung 3	
	Konv. bel.	Vorbeh.		Konv. bel.	Vorbeh.		Konv. bel.	Vorbeh.
Zeit	VG	VG	Zeit	VG	VG	Zeit	VG	VG
(h)	(%)	(%)	(h)	(%)	(%)	(h)	(%)	(%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	2	3	20	5	7	22	3	5
43	14	14	46	16	18	49	19	16
69	27	29	69	29	31	73	38	29
92	40	42	97	41	44	101	55	43
117	54	58	120	50	52	125	63	50
143	64	69	140	58	58	143	65	55
166	69	74	171	68	63	171	70	62

Tabelle 17: Vergleich Hefezellzahlen bei belüfteter Würze ohne (Konv. bel.) und unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (Vorbeh.) über 3 Führungen

	Führung 1			Führung 2			Führung 3	
	Konv. bel.	Vorbeh.		Konv. bel.	Vorbeh.		Konv. bel.	Vorbeh.
Zeit	HZZ	HZZ	Zeit	HZZ	HZZ	Zeit	HZZ	HZZ
(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)	(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)	(h)	(Mio./ml)	(Mio./ml)
0	15	15	0	14	16	0	16	13
17	19	20	20	22	20	22	22	16
43	37	38	46	35	42	49	37	24
69	41	48	69	43	46	73	46	28
92	40	45	97	58	63	101	39	28
117	38	43	120	36	41	125	20	29
143	33	28	140	35	34	143	18	22
166	24	26	171	26	25	171	11	19

In der 3. Führung konnte mit vorbehandelter Hefe trotz niedriger Hefezellzahl der Vergärungsgrad aus Führung 2 im gleichen Zeitraum erreicht werden. Die konventionell angestellte Würze erreichte bedingt durch die höhere Anstellkonzentration höhere Hefezellzahlen und einen um 8 % höheren Vergärungsgrad. Die im Vergleich zu den bisherigen Führungen niedrigeren Hefezellzahlen der Würze mit vorbehandelter Hefe erreichten maximal 29 Mio. Zellen/ml, während die konventionelle Gärung noch 46 Mio. Zellen/ml aufweisen konnte. Bei Betrachtung der Gärleistungen in Führung 1 (s. Abbildung 54) konnten keine wesentliche Unterschiede festgestellt werden. Lediglich in der Angärung war die konventionell belüftete Würze geringfügig besser. Zu diesem Zeitpunkt war auch eine höhere Maltaseaktivität dieser Würze zu erkennen. In der folgenden Gärung verliefen die Aktivitäten jedoch fast identisch und hatten beide ein Maximum bei 69 h. Zu diesem Zeitpunkt besaßen beide Gärungen die maximale Hefezellzahl und befanden sich somit am Ende der logarithmischen Phase.



Abbildung 54: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 1. Führung

Etwas deutlicher waren die Unterschiede bezüglich der Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in der 2. Führung, wie in Abbildung 55 gezeigt wird. Die mit vorbehandelter Hefe angestellte Würze wies eine bessere Angärung auf. Dagegen konnte die belüftete Würze eine zügigere Hauptgärung und intensivere Nachgärung verzeichnen. Wie bereits in Versuchsreihe 1 und 2 konnte auch hier ein Absinken des Niveaus der Maltaseaktivi-

täten beobachtet werden. Die belüftete Würze wies eine relativ lange Repressionsphase auf.

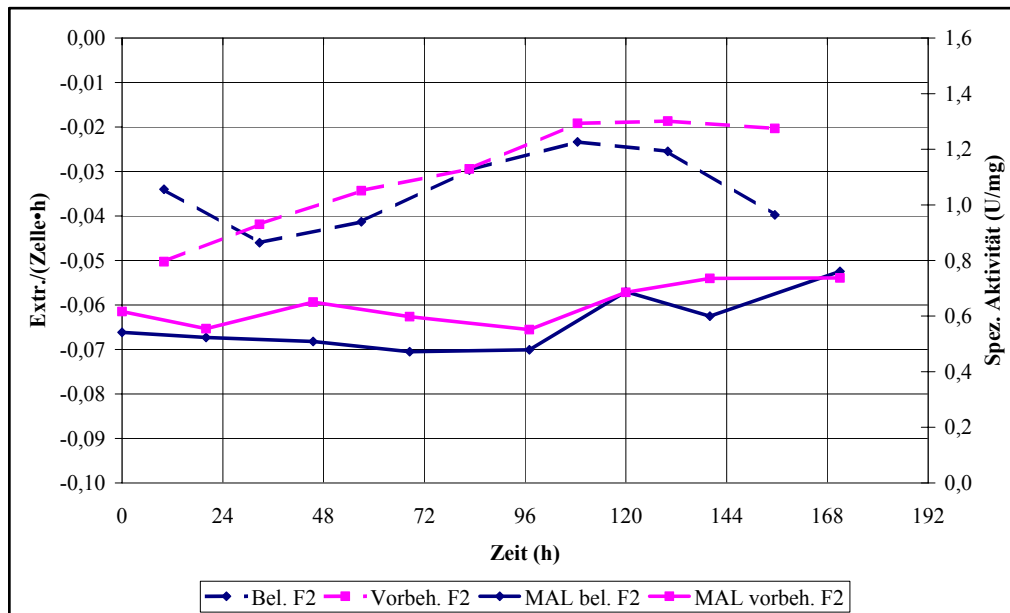


Abbildung 55: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 2. Führung

(96 h) auf, welches wohl in einer schwächeren Angärung resultierte und erreichte das Maximum erst am Anfang der stationären Phase (120 h). Die unbelüftete Würze verzeichnete über den gesamten Gärverlauf höhere Aktivitäten, welche sich aber nicht auch

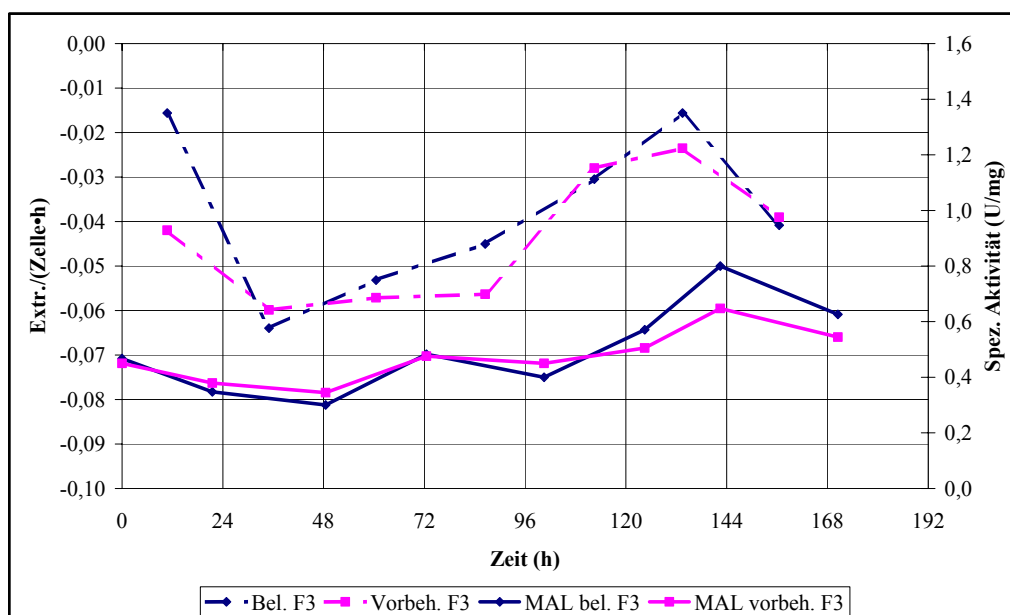


Abbildung 56: Gärleistungen und Maltaseaktivitäten in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 3. Führung

in einer zügigeren Gärung äußerten. Erst beim 2. Maximum der Maltaseaktivität wurde diesmal die maximale Hefezellzahl festgestellt. Wie in den bisherigen Versuchsreihen kam es trotz eines weiteren Absinken des Aktivitätsniveaus der Maltase in der 3. Führung zu verbesserten Gärleistungen (s. Abbildung 56). Beide Maltaseaktivitäten erreichten hierbei ein deutlich über dem Ausgangswert liegendes 2. Maximum (143 h) zum Ende der Gärung. Das Maximum der konventionell angestellten Würze lag zwar höher, repräsentierte aber nicht bezüglich der Gärleistungen die kräftigste Gärung. Die insgesamt gärkräftigste Fermentation wurde in dieser Führung mit der vorbehandelten Hefe erreicht.

In Abbildung 57 sind die Verläufe der PDH- und PDC-Aktivitäten der 1. Führung dargestellt. Bei der PDH verliefen beide bis 92 h identisch. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Würze mit vorbehandelter Hefe ihr 1. Maximum, während das höhere Maximum der konventionell angestellten Würze erst zum nächsten Messzeitpunkt bei 117 h gemessen wurde. Im Zusammenhang mit den Hefezellzahlen ließ sich feststellen, dass diese Maxima am Anfang der stationären Phase zu finden waren. Trotz gleicher Gärleistungen waren bei der konventionell belüfteten Würze insgesamt höhere PDC-Aktivitäten zu beobachten.

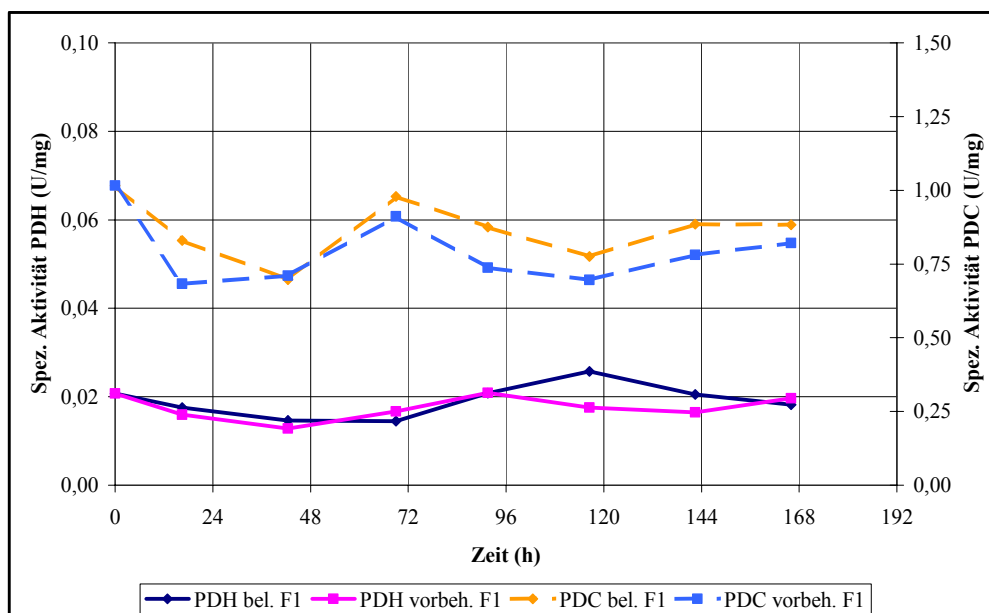


Abbildung 57: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 1. Führung

Nahezu identische PDH-Aktivitäten über den gesamten Gärverlauf hatten beide Gärungen in der 2. Führung zu verzeichnen (s. Abbildung 58), obwohl bezüglich der Gärleis-

tungen wesentliche Unterschiede bestanden. Die vorbehandelte Hefe konnte in dieser Führung höhere Hefezellzahlen erzielen als die Hefe bei der konventionellen Gärung. Dieses ließ sich anhand der PDH nicht bestätigen. Es konnte aber festgestellt werden, dass bei Erreichen der jeweiligen Maxima (bei 97 h) die maximalen Hefezellzahlen vorlagen.

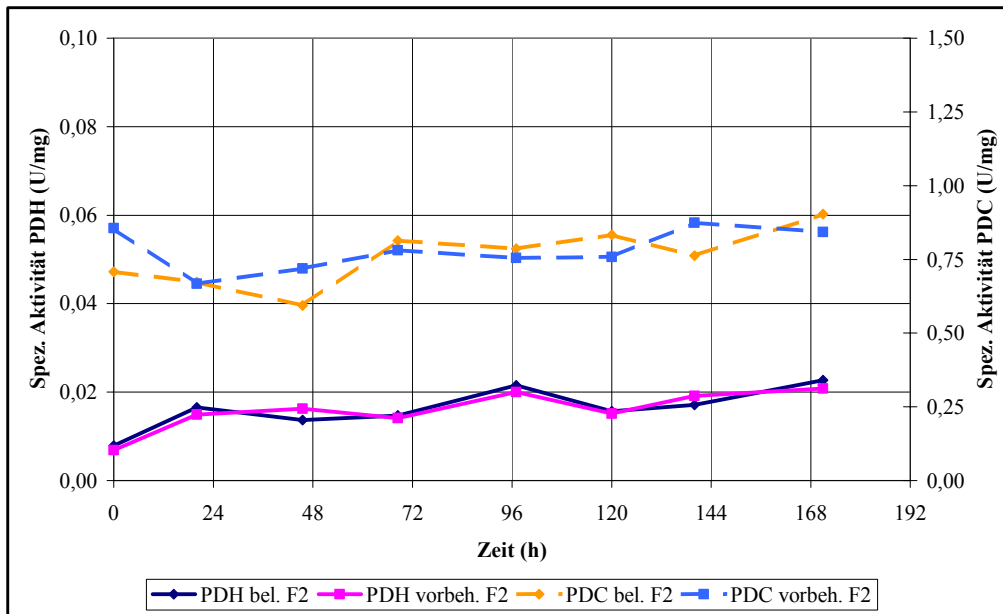


Abbildung 58: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 2. Führung

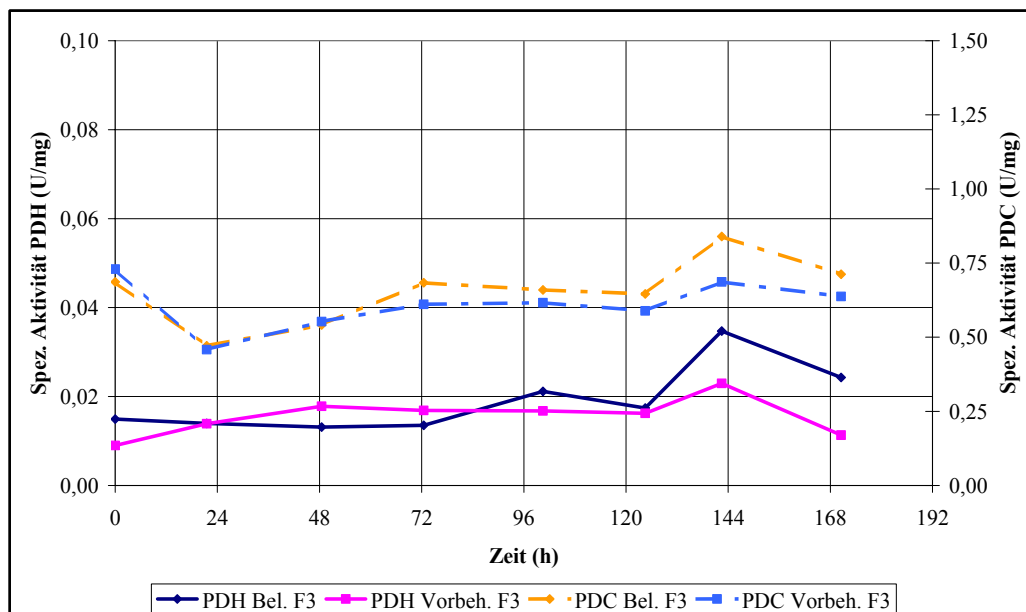


Abbildung 59: Aktivitäten der PDH und PDC in belüfteter Würze ohne (Bel.) und in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) 3. Führung

Bei der PDC konnte ein geringfügiges Absinken des Niveaus bei beiden Gärungen festgestellt werden. Ein vielleicht entscheidender Grund für die zügigere Angärung und leicht höheren Zellzahlen bei vorbehandelter Hefe könnten in der kürzeren Repressionsphase (17 h) ihre Ursache haben.

In Führung 3 hatte die vorbehandelte Hefe in der Angärung die höheren PDH-Aktivitäten aufzuweisen, wie in Abbildung 59 zu sehen ist. Diese stiegen gleich zu Beginn an, welches im Einklang mit der besseren Angärung stand. Eine deutlich längere Repressionsphase prägte den Verlauf der PDH bei der Hefe in belüfteter Würze. Dafür stieg diese ab 101 h überdurchschnittlich an und erreichte nach 143 h die höchsten bisher in dieser Versuchsreihe gemessenen Aktivitäten. Auch die vorbehandelte Hefe erreichte den bisher höchsten Wert nach 143 h, der allerdings unter dem der konventionell angestellten Hefe war.

War der Verlauf der PDC-Aktivitäten beider Gärungen bis 48 h noch identisch, so verzeichnete die konventionell belüftete Würze ab 72 h höhere Aktivitäten parallel zur Gärung mit vorbehandelter Hefe. Das Vorliegen der höheren Aktivitäten bei PDH und PDC zum Ende der Gärung zog keine Verbesserung der Gärleistungen mit sich oder hatte Auswirkungen auf die Entwicklung der Hefezellzahl.

In den Abbildungen 60 und 61 konnten speziell bei der 3. Führung Gemeinsamkeiten bei den ADH-Aktivitäten mit denen aus der 2. Versuchsreihe aufgezeigt werden. Auch

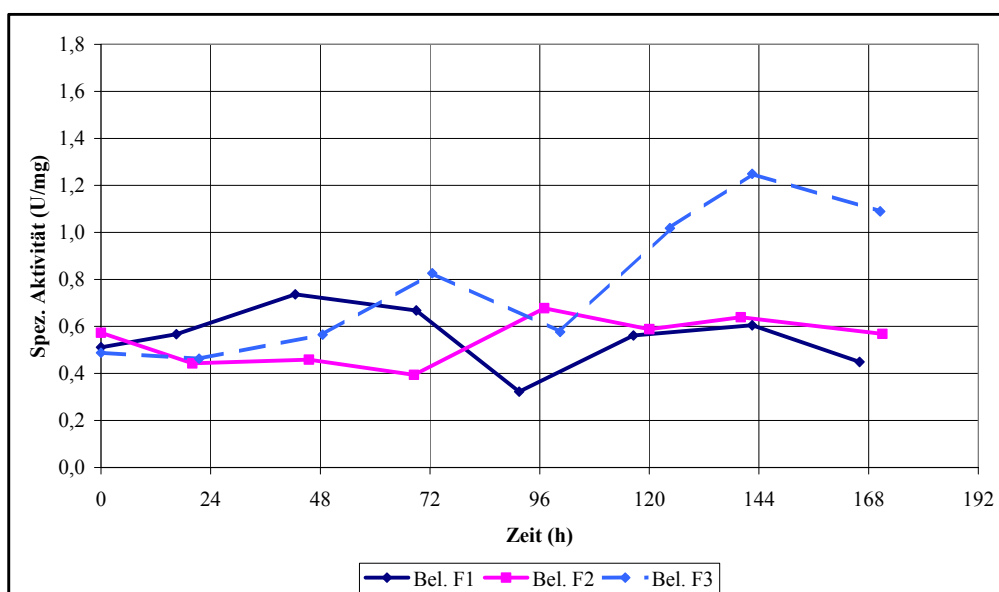


Abbildung 60: Verlauf der ADH-Aktivitäten bei konventioneller Gärung über 3 Führungen

hier kam es zu hohen Aktivitäten am Ende der Gärung. Zu Gärende wurde jeweils ein Maximum erreicht, das mehr als das Doppelte der Ausgangsaktivität besaß. Diese hohen Aktivitäten könnten zur Annahme führen, dass die Hefen ab der 3. Führung ihren anaeroben Stoffwechsel verstärken. Wahrscheinlich kann der Bypass nicht mehr ausreichend genutzt werden und die Bereitstellung von Acetyl-CoA nimmt ab. Dies belegen auch die Hefezellzahlen, die in der 3. Führung die maximalen Hefezellzahlen aus der 1. und 2. Führung nicht mehr erreichen konnten.

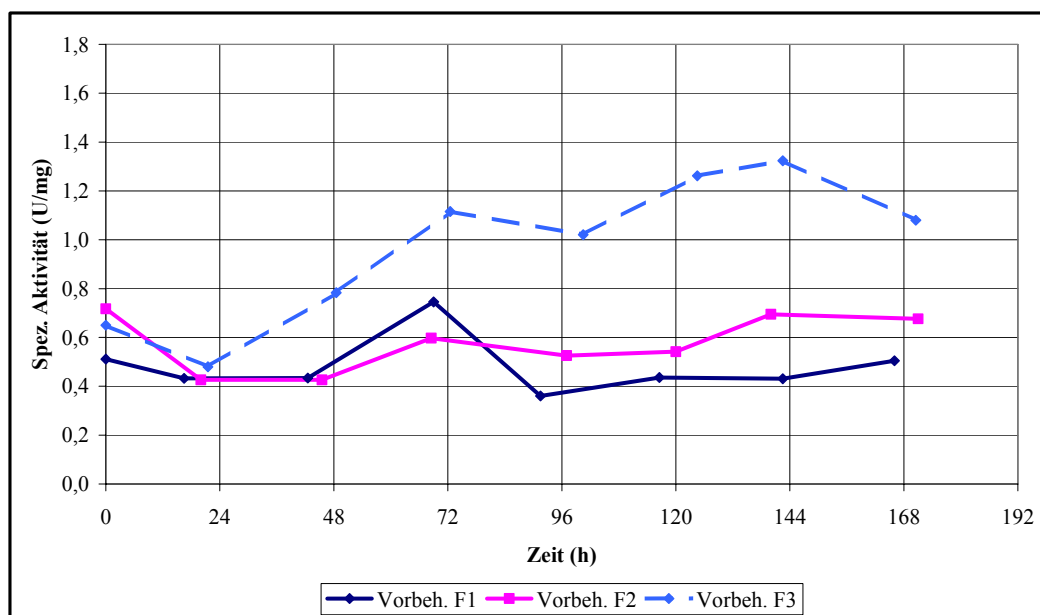


Abbildung 61: Verlauf der ADH-Aktivitäten in unbelüfteter Würze mit Vorbehandlung der Hefe (vorbeh.) über 3 Führungen

4.9 Untersuchung der Enzymaktivitäten von Gärungen aus der Brauereipraxis

Anhand von Untersuchungen in einer Brauerei sollte gezeigt werden, ob die im Labormaßstab ermittelten Enzymaktivitäten auch in der Praxis gefunden werden können. Dazu wurden 3 Gärungen mit Stamm W 34/70 bezüglich der Enzymaktivitäten verfolgt und die dazugehörigen Werte wie Extrakt und Hefezellzahl ermittelt.

In der Leitung wird der Würze aus dem Sudhaus die Anstellhefe zudosiert und anschließend zur Ausscheidung des Kühltrubes zunächst in einen Flotationstank geleitet, wo diese überbelüftet wird. Nach einer Verweildauer von ca. 8 h erfolgt das Umpumpen dieser angestellten Würze in einen ZKG bei 10°C. In Tabelle 18 sind die Auswirkungen dieser Flotation auf die Aktivitäten dargestellt. Dabei handelte sich bei UG1 und UG3 jeweils um Reinzuchthefer und in UG2 um Erntehefe aus der 3. Führung. Alle Aktivitäts-

ten der Erntehefe (außer der PDH) fielen im Vergleich zu beiden Reinzuchthefen vor der Flotation durch höhere Werte auf. Durch die Überbelüftung erfuhren diese Aktivitäten der Erntehefe im Gegensatz zur Reinzuchtheife keine gravierende Änderungen.

Tabelle 18: Einfluss der Flotation auf die Enzymaktivitäten der Anstellhefe

	HRZ UG1	n. Flotation	EH UG2	n. Flotation	HRZ UG3	n. Flotation
Enzym	Spez. Aktivität	Spez. Aktivität	Spez. Aktivität	Spez. Aktivität	Spez. Aktivität	Spez. Aktivität
	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)
<i>Maltase</i>	0,78	0,35	1,02	1,01	0,85	0,45
<i>PDH</i>	0,040	0,021	0,031	0,032	0,026	0,013
<i>PDC</i>	0,82	0,53	1,30	1,24	0,71	0,62
<i>ADH</i>	0,72	0,45	1,49	1,40	0,85	0,51

Bei der Flotation von Reinzuchtheife dagegen kam es zu einer weiteren Abnahme der bereits niedrigen Aktivitäten aller Enzyme um zum Teil mehr als auf die Hälfte. Dies überrascht, da die Reinzucht aus aeroben Verhältnissen stammte und daher eigentlich keine größeren Umstellungen des Stoffwechsels bewältigen musste. Bei Ernteheife dagegen war durch die Überbelüftung eher mit einer Umstellung ihres bisher anaeroben Stoffwechsels zu erwarten.

In Tabelle 19 sind die jeweiligen Vergärungsgrade und Hefezellzahlen ab der 8. Stunde beim Anstellen im ZKG bei 10°C dargestellt. Etwas irritierend sind die relativ niedrigen Hefezellzahlen bei den mit Reinzuchthefen angestellten Gärungen. So wurden nach der

Tabelle 19: Vergleich Vergärungsgrade und Hefezellzahlen im ZKG von 3 Gärungen in einer Brauerei (n. Schl. = nach dem Schlauchen)

UG1 (HRZ)				UG2 (EH)				UG3 (HRZ)			
Zeit	VG	HZZ	Temp.	Zeit	VG	HZZ	Temp.	Zeit	VG	HZZ	Temp.
(h)	(%)	(Mio./ml)	(°C)	(h)	(%)	(Mio./ml)	(°C)	(h)	(%)	(Mio./ml)	(°C)
8	13	2	10°C	8	9	25	9°C	10	15	3	10°C
14	15	8		24	20	33		25	16	18	
33	18	12		32	23	50		33	16	19	
57	25	26		48	39	58		49	18	21	
65	28	27		56	42	55		57	20	24	
113	41	33		72	55	60	7°C	73	28	31	
130	57	28	8°C	80	56	57		81	32	32	
137	60	29		104	67	40	5°C	97	40	35	
161	66	30		127	74	55		121	52	39	8°C
177	73	28	5°C	144	77	35	n. Schl.	129	55	35	
185	75	29		176	80	20		145	64	37	
201	77	28						169	72	34	5°C
225	79	19	n.Schl.					177	75	32	
								193	82	31	
								241	83	24	n.Schl.

Flotation in den ZKGs deutlich niedrigeren Konzentrationen (2 bzw. 3 Mio./ml) im Vergleich zu den mit Erntehefe angestellten Tanks gemessen. Somit konnten über die gesamte Gärzeit die maximalen Hefezellzahlen von UG2 (Erntehefe) mit 60 Mio./ml nicht erreicht werden. In dem Tank mit UG2 konnte bedingt durch die hohen Zellkonzentrationen somit bereits nach 6 Tagen (144 h) geschlaucht werden.

UG1 sowie UG3 benötigten bis zur Schlauchreife 9 bzw. 10 Tage. Da aufgrund der unterschiedlichen Hefekonzentrationen ein direkter Vergleich über die Vergärungsgrade und Hefezellzahlen nicht möglich war, mussten hier wieder die Gärleistungen hinzugezogen werden (s. Abbildung 62).

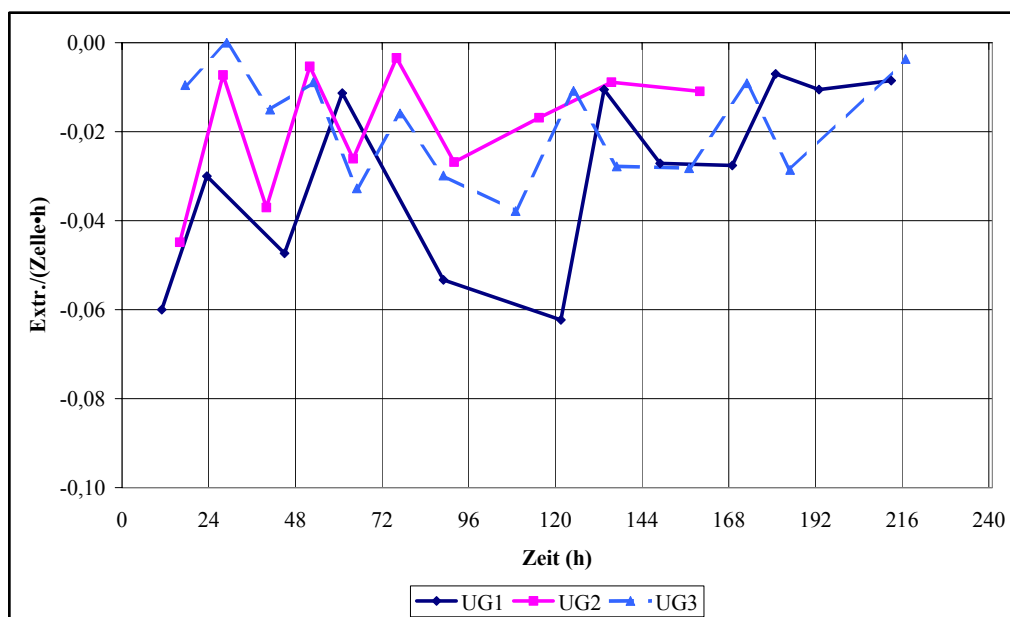


Abbildung 62: Gärleistungen von UG1, UG2 und UG3

Hier hatte UG1 die höchsten Werte zu verzeichnen und stach besonders in der Hauptgärung zwischen 72 und 144 h hervor. Bei UG2 (Erntehefe) wurden trotz der höheren Hefezellzahlen niedrigere Gärleistungen beobachtet. Die Reinzuchthefer UG3 benötigte eine längere Adaptionsphase, welches anhand der stetigen Zunahme der Gärleistung bis 121 h beobachtet werden konnte.

Zusätzlich zu den Gärleistungen in den ZKGs wurden die einzelnen Hefeproben aus den Gärtanks in identischer Würze (500 ml) und bei gleicher Temperatur (10°C) angestellt, um weitere Informationen über den physiologischen Zustand in den einzelnen Stadien zu erhalten. Die in diesen Fermentationen ermittelten Gärleistungen ergaben sich aus den Extraktwerten und Hefezellzahlen der Vergärung in 48 h und sind in Abbildung 63

ersichtlich. Hier konnten bei den Proben von UG3 bis zum Ende der Gärung im ZKG zunehmend steigende Gärleistungen beobachtet werden.

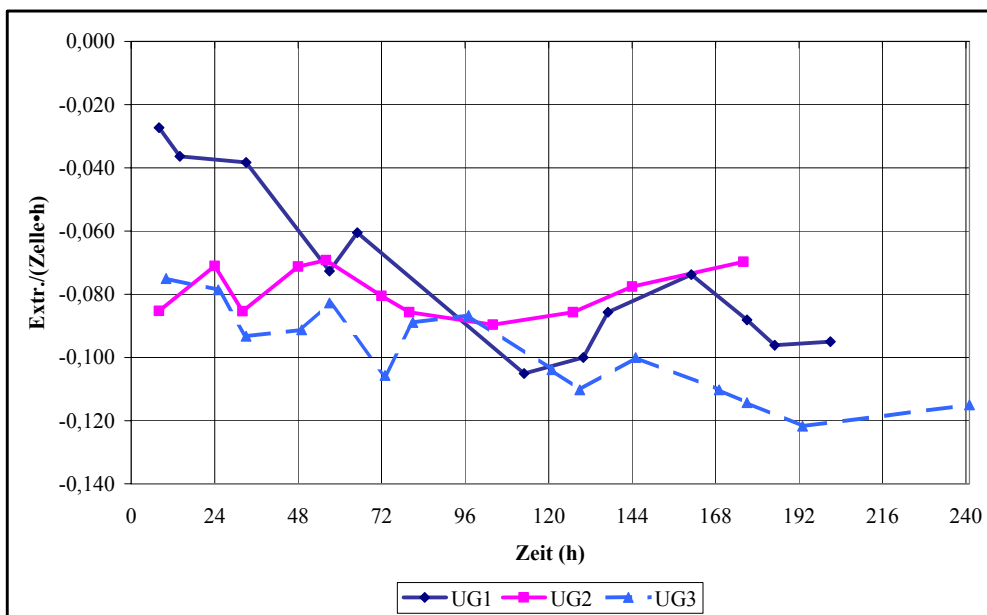


Abbildung 63: Gärleistungen der einzelnen Gärproben zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten

Die ebenfalls mit Reinzuchthefer angestellte UG1 zeigte ebenso stetig steigende Gärleistungen, allerdings nur bis zu einem Maximum bei 120 h. Zu diesem Zeitpunkt der maximalen Gärleistung befand sich UG1 am Ende der logarithmischen Phase. Auch bei UG2 konnte die maximale Gärleistung am Ende der logarithmischen Phase (113 h) gefunden werden. Dieser Wert unterschied sich aber nicht wesentlich von seinem Anfangswert. Somit vergoren die Hefen aus UG2 mit zunehmender Gärdauer nicht zügiger

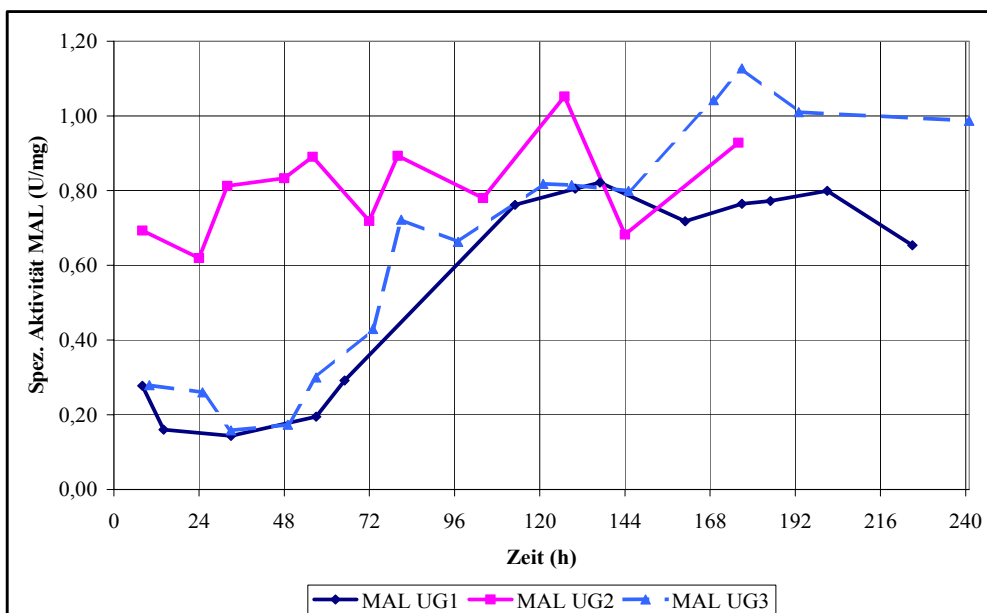


Abbildung 64: Vergleich der Maltaseaktivitäten von UG1, UG2 und UG3

wie es in UG1 und UG3 der Fall war. Zum Schluss waren hier sogar schlechtere Gärleistungen im Vergleich zu den ersten Gärproben aus dem ZKG zu finden.

Eine gute Übereinstimmung konnte hier zwischen den Werten für die Gärleistungen und den Maltaseaktivitäten (s. Abbildung 64) gefunden werden. Bei den mit Reinzuchthefer angestellten Tanks (UG1 und UG3) stiegen die Aktivitäten analog zu den Gärleistungen kontinuierlich an. Besonders UG3 hatte einen stetigen Anstieg zu verzeichnen und erreichte erst nach 177 h sein Maximum. Dieses Maximum lag im Vergleich zu den Maxima von UG1 und UG2 deutlich höher. Auch stiegen UG1 und UG2 analog zu den Gärleistungen an, wobei UG2 nur relativ leicht zunahm gegenüber dem Ausgangswert. Auch bei den PDH-Aktivitäten (s. Abbildung 65) erreichte die Hefe in UG3 nach einer stetigen Zunahme die höchste maximale Aktivität. Die Reinzuchthefer UG1 wies dagegen trotz der höheren Ausgangsaktivität die niedrigsten Werte aller drei Fermentationen im ZKG während der Hauptgärung auf.

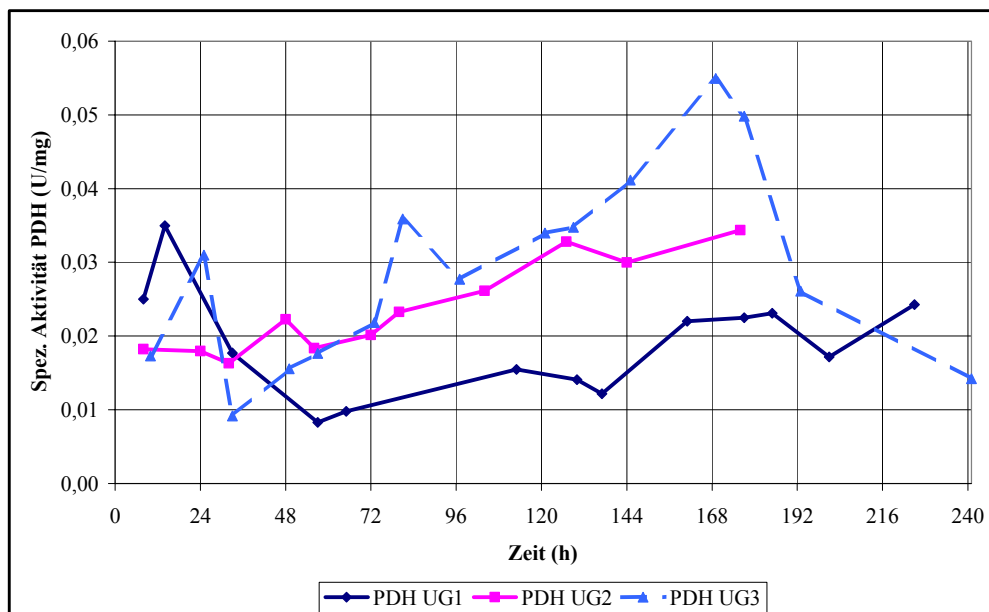


Abbildung 65: Vergleich der PDH-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3

Es stellte sich die Frage, ob während der Gärung hohe PDH-Aktivitäten positiv zu bewerten sind. Unter Hinzunahme der Werte von UG2 müsste Ersteres der Fall sein. Bei der Tankgärung von UG2 stiegen die PDH-Aktivitäten analog zu UG3 bis auf ein Maximum nach 185 h an. Zu Beginn war UG2 im Vergleich zu den Reinzuchthefen auch nicht von einer Repression geprägt, was auf eine bessere Adaption an die Gärbedingungen im ZKG hindeuten könnte. Bei UG1 führten höhere Ausgangsaktivitäten zu einer stärkeren Repression, die wohl auch in einer schwächeren Angärung resultierten. Erst

mit dem Anstieg der PDH verbesserten sich die Gärleistungen im ZKG und der Probegärungen.

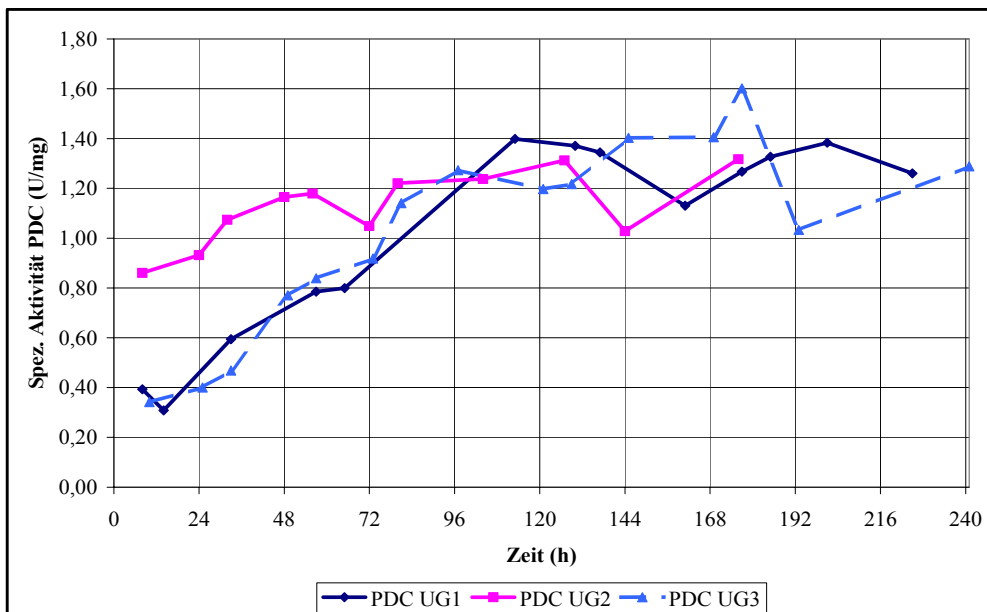


Abbildung 66: Vergleich der PDC-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3

In Abbildung 66 waren anhand der PDC-Aktivitäten ebenfalls Unterschiede zwischen den mit Reinzuchthefen und Erntehefe geführten Gärungen zu erkennen. Diese Abbildung zeigt eine gute Übereinstimmungen der Aktivitäten mit den Maltaseaktivitäten. Ausgehend von niedrigen Ausgangsaktivitäten stiegen die Reinzuchthefen bis 96 h nahezu gleich an und erreichten ihre jeweils maximalen Aktivitäten nach 113 (UG1) und 177 h (UG3). Wie auch bei Maltase war bei UG2 wohl aufgrund der bereits hohen Ausgangsaktivität nur eine relativ (zu UG1 und UG3) leichte Zunahme zu beobachten.

Wie in Abbildung 67 ersichtlich, waren die niedrigsten ADH-Aktivitäten bei UG1 zu beobachten. Zum Zeitpunkt des 1. ADH-Maximums wurden auch die maximalen Gärleistungen der Probegärungen festgestellt. Die Reinzuchtheffe UG3 erreichte das höhere 1. Maximum bereits nach 86 h. Verglichen mit den ADH-Aktivitäten von UG1 waren hier speziell in der Hauptgärung höhere Werte zu verzeichnen. Trotz eines stetigen und starken Auf und Ab, wie auch bei den Gärleistungen im ZKG, waren die Aktivitäten der mit Erntehefe angestellten Gärung mit Abstand am höchsten. Der anaerobe Stoffwechsel schien hier ausgeprägter im Vergleich zu den mit Hefereinzucht geführten Gärungen zu sein. Dies stand im Zusammenhang mit den entsprechenden Hefezellzahlen, denn unter Berücksichtigung der jeweiligen Hefeanstellkonzentration hatten UG1 und UG3 den höchsten Biomassezuwachs zu verzeichnen.

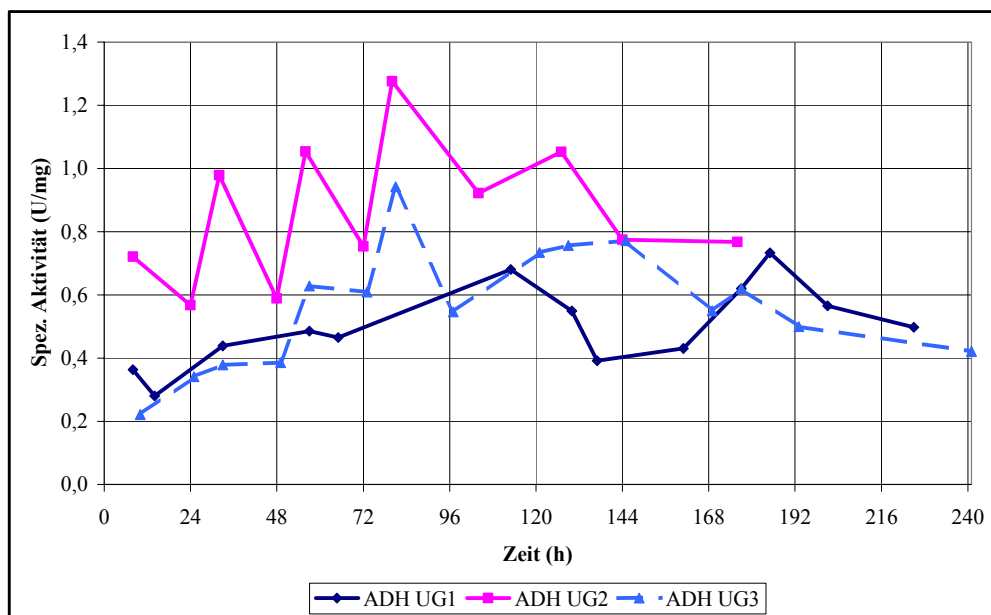


Abbildung 67: Vergleich der ADH-Aktivitäten von UG1, UG2 und UG3

Somit sind bei gutem Wachstum niedrigere ADH-Aktivitäten zu erwarten, da in diesem Falle vermehrt Acetyl-CoA anstelle von Alkohol gebildet wird. Ausgehend von 2 bzw. 3 Mio./ml wurde bei den Reinzuchthefen ein Zuwachs um das 15-fache, bei der Erntehefe UG2 nur um mehr als das Doppelte seiner Anstellkonzentration erreicht. Auffällige Veränderungen der Aktivitäten aller Enzyme konnten während der einzelnen Phasen nicht gefunden werden, bei denen die Temperatur im ZKG herunter gefahren wurde.

5 Diskussion der Ergebnisse

In folgenden Kapiteln soll ein Überblick über die bisher gewonnen Erkenntnisse verschafft werden. Dazu werden zunächst die einzelnen Enzyme und das Zusammenspiel zwischen den Enzymen in den einzelnen Versuchen untersucht. Die gewonnen Erkenntnisse der einzelnen Versuche werden anschließend miteinander verglichen, um dann die Möglichkeit, mittels Enzymaktivitätsmessungen den physiologischen Zustand zu beurteilen, zu diskutieren.

5.1 Maltase

Bedeutung der Ausgangsaktivität von Maltase

Ein wichtiges Untersuchungskriterium bei den Versuchen waren die Auswirkungen der Ausgangsaktivitäten von Maltase auf die folgende Gärung bzw. Propagation. Bei hohen Maltaseaktivitäten geht eine zügige Verwertung des Substrates Maltose einher und ist somit ein wichtiges Kriterium für die Gärdauer (MENESES et al., 2002). Allerdings muss hierbei zusätzlich berücksichtigt werden, dass die Maltase der Repression durch Glucose unterliegt. Darauf wird noch im weiteren Verlauf dieses Kapitels eingegangen.

In Kapitel 4.3 konnten mit den Gärungen bei 15°C und 5°C festgestellt werden, dass die jeweils zügigste Gärung auch die höchste Ausgangsaktivität vorzuweisen hatte. In beiden 10°C-Gärungen lagen zu Beginn identische Maltaseaktivitäten vor, und diese zeigten bezüglich VG und Gärleistungen bis zum 4. Gärtag das gleiche Bild. Auffällig war hier, dass die Höhe der Ausgangsaktivitäten den weiteren Verlauf der Aktivitäten von Maltase beeinflusst haben. Je höher die Aktivität zu Beginn, umso höher waren auch die folgenden gemessenen Werte bzw. war das Niveau der weiteren Aktivitäten.

Beim Vergleich zweier Gärungen mit belüfteter und unbelüfteter Würze in Versuchsreihe 1 (Kapitel 4.8) wurden in der 1. Führung bei gleichen Ausgangsaktivitäten identische Gärverläufe beobachtet. In der zweiten Führung führten höhere Maltaseaktivitäten zu Beginn in der unbelüfteten Würze zwar zu höheren Aktivitäten während der Fermentation, hatten aber eine deutlich langsamere Gärung zur Folge. Es muss aber festgestellt werden, dass hier deutlich niedrigere Hefezellzahlen im Hauptgärstadium wegen fehlender Belüftung vorzufinden waren. Es ist zu vermuten, dass eine gute Hefevermehrung gewährleistet sein muss, um mit einer höheren Ausgangsaktivität auch eine zügigere Vergärung zu erzielen. So waren in der 2. Führung die Hefezellzahlen bis 67 h trotz

unterschiedlicher Ausgangsaktivitäten identisch, was wiederum zeigte, dass die Maltaseaktivitäten keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung des Hefewachstums besitzen. Bei den Versuchen der 2. Reihe waren über alle drei Führungen jeweils identische Ausgangsaktivitäten der Maltase vorzufinden. Die jeweiligen Gärungen wiesen bezüglich VG und Gärleistungen Unterschiede in den einzelnen Gärstadien (Angärung, Hauptgärung, Nachgärung) auf. Auffälliger in dieser Versuchsreihe war mehr das Absinken der Maltaseausgangsaktivität mit jeder neuen Führung. Diese Abnahme stand im Zusammenhang mit den Gärleistungen, die sich mit jeder weiteren Führung verschlechterten. Diese Beobachtungen trafen auch auf die 3. Versuchsreihe zu, in der die Hefe für die unbelüftete Würze zuvor in Wasser mit Luft vorbehandelt wurde. In der zweiten Führung konnten leicht höhere Aktivitäten mit vorbehandelter Hefe erzielt werden, die auch im weiteren Verlauf der Gärung höher lagen als die der konventionell angestellten Hefe. Dies führte zwar zu einer besseren Angärung, aber resultierte nicht auch in höheren Gärleistungen während der Haupt- und Nachgärung.

In Kapitel 4.9 wurden drei Praxis-Fermentationen mit untergäriger Hefe im ZKG einer Brauerei verfolgt. So führte die vorangegangene Flotation bei den Reinzuchthefen zu einer drastischen Abnahme der Maltaseaktivitäten, während bei der Erntehefe dagegen keine Veränderungen festzustellen waren. Trotz der mehr als doppelt so hohen Ausgangsaktivität der Erntehefe im ZKG kam es hier nicht zwangsläufig auch zu deutlich höheren Gärleistungen. So konnte bei einer mit Reinzuchthefer angestellten Gärung über den gesamten Verlauf mehr Extrakt pro Hefezelle verstoffwechselt werden.

Von größerer Bedeutung schienen die Ausgangsaktivitäten bei der Hefepropagation zu sein. So konnte bei den einzelnen Propagationen (30 und 20°C) ein deutlich stärkeres Wachstum bei den mit hohen Maltaseaktivitäten ausgestatteten Hefen gefunden werden. Diese führten zwar kurzfristig zu einem stärkeren Gärcharakter bedingt durch die Repression in der Adaptionphase, der aber im folgenden immer mehr „aerobe Züge“ annahm. Dieses äußerte sich in einer Abnahme der Gärleistungen. Diese Erscheinung konnte auch beim Vergleich der Propagation mit einer Umpumpgärung bei 10°C festgestellt werden. Hier führte kurz nach dem Anstellen die Hefe mit der höheren Maltaseaktivität trotz Belüftung zu einer höheren Gärleistung als die Hefe bei der Umpumpgärung.

Bei der kontinuierlichen Kultur (Kapitel 4.6) fand die Untersuchung der Maltaseaktivitäten über einen längeren Zeitraum statt. Zu verschiedenen Messzeitpunkten wurde mit

der Hefe zusätzlich eine Probegärung angestellt. In VR2 benötigten die Gärungen mehr als 20 Tage bis zum Erreichen des EVG. Durch die Veränderung der Substratzusammensetzung konnte in VR 3 eine Verkürzung dieser Zeit auf 10-12 Tage erreicht werden. Dabei fielen bei Betrachtung der Maltaseaktivitäten in VR3 die deutlich höheren Aktivitäten im Vergleich zu VR2 auf. So wurden in VR3 bis auf den Anfang stets Werte über 1,0 U/mg ermittelt, während in VR2 dies nur vereinzelt der Fall war. Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen konnten aber keine eindeutigen Zusammenhänge gefunden werden. Nur ansatzweise führten höhere Maltaseaktivitäten auch zu höheren Gärleistungen. Möglicherweise wurde die Adaption an das Gärmilieu durch die deutlich niedrigeren ADH-Aktivitäten erschwert und somit rückte das Vorliegen günstiger Maltaseaktivitäten in den Hintergrund. Dies bestätigen die Untersuchungen der ADH-Aktivitäten in VR3 zwischen 48 und 216 h, bei der die im Vergleich zur VR2 höheren Werte wohl zu einer Verkürzung der Gärzeit beigetragen haben.

Einfluss der Repression von Maltase auf den Gärverlauf

Bezüglich der Gärdauer kommt der Repression eine entscheidende Bedeutung zu (KODAMA et al., 1995). Durch die Kataboliten-Repression (auch als Glucose-Repression oder Crabtree-Effekt bezeichnet) kommt es zu einer Reduzierung der Maltaseaktivitäten, da in diesem Stadium Glucose als Kohlenhydratquelle bevorzugt wird. Diese Repression löst selbst unter aeroben Bedingungen die alkoholische Gärung aus (KÄPPELI, 1986). Erst nach Verbrauch der Glucose kann die Maltase wieder induziert werden. Diese Beobachtung wurde bisher hauptsächlich bei Laborhefestämmen gemacht und trifft nur teilweise auch auf Industriehefestämme zu (FEDEROFF et al., 1983). Verschiedene Autoren unterstrichen die Bedeutung der Repression, dass eine verspätete Maltoseverwertung erhebliche Auswirkungen auf die Gärdauer ausübt (D'AMORE et al., 1989; PHAWENI et al., 1993). Im Folgenden sollen die Intensität der Aktivitätsabnahme zu Beginn und die Dauer der Repression auf den weiteren Fermentationsverlauf diskutiert werden.

Alle 15°C-Gärungen in Kapitel 4.3 unterlagen zu Beginn einer Repression der Maltase. Diese Aktivitätsabnahme war hier bei allen gleich stark ausgeprägt und innerhalb der ersten 24 h abgeschlossen. Wohl bedingt durch die höheren Ausgangsaktivitäten nahm die Aktivität bei der Hefe mit der zügigsten Gärung nur bis auf 0,4 U/mg am Ende der Repressionsphase ab, während bei den anderen ein Wert von ca. 0,2 U/mg gemessen

wurde. Durch die höhere Aktivität am Ende der Repressionsphase könnte die insgesamt stärkere Induzierung der Maltase bei der zügigsten Gärung erklärt werden. Durch die niedrigeren Temperaturen fand eine längere Repressionsphase bei den 10°C-Gärungen statt (ca. 46 h). Die Abnahme der Aktivitäten von Maltase war bei beiden gleich stark ausgeprägt. In dieser Phase konnten keine Unterschiede bezüglich des Angärverhaltens gefunden werden. Wichtige Erkenntnisse bezüglich der Repression konnten mit den 5°C-Gärungen gewonnen werden. Die Gärung mit der längsten Repressionsphase (104 h) und stärksten Aktivitätsabnahme (von 0,8 auf 0,3 U/mg) benötigte deutlich länger zum Erreichen des EVG als die unter identischen Rahmenbedingungen durchgeführte Fermentation. Bei Letzterem stieg die Maltaseaktivität bereits nach 48 h wieder an. Bis zu diesem Zeitpunkt sank die Aktivität von 1,1 auf nur 0,7 U/mg, die dann wohl in einer frühzeitigeren und stärkeren Induzierung der Maltase resultierte. Die langsamere Gärung sank anfangs bis auf unter 0,3 U/mg ab und konnte erst nach 96 h eine Aktivitätszunahme verzeichnen.

In der 1. Versuchsreihe beim Vergleich zwischen konventionell angestellter und unbelüfteter Würze konnten bei den 5°C-Gärungen deutlich unterschiedliche Repressionsphasen beobachtet werden. Die Maltaseaktivität stieg in belüfteter Würze erst nach 100 h wieder an, während dies bei der Maltase der unbelüfteten Würze bereits nach 47 h geschah. Die Intensität der Abnahme war bei beiden gleich stark und sank auf einen Wert von ca. 0,5 U/mg ab. Bei Betrachtung der jeweiligen VG als auch der Gärleistungen konnte bei der Würze mit kürzerer Repressiondauer eine zügigere Angärung festgestellt werden. In der Haupt- und Nachgärung verliefen beide bis auf die Hefezellzahlen nahezu identisch. In unbelüfteter Würze wurde hier eine höhere maximale Hefezellzahl erreicht. In der 2. Führung der 1. Versuchsreihe wiesen beide Gärungen die gleiche Repressionsdauer auf (43 h) und fielen beide auf ein Minimum von 0,5 U/mg (belüftet) bzw. 0,6 U/mg (unbelüftet). Die stärkste Aktivitätsabnahme wurde bei der unbelüfteten Würze beobachtet. In den ersten 43 h war zwar noch eine leicht bessere Angärung in der unbelüfteten Würze zu verzeichnen (bedingt durch die höhere Ausgangsaktivität), dafür vergor die belüftete Würze ab 43 h zügiger. Dieser Versuch bestätigte erneut, dass die Angärung der Würze abhängig von der Dauer und Intensität (Differenz der Aktivitätsabnahme bzw. Wert der niedrigsten Aktivität) der Maltaserepression ist.

In Versuchsreihe 2 lag die Repressionsdauer der jeweiligen Führungen bei maximal 24 h. Diese war im Vergleich zu den Führungen der 1. Versuchsreihe deutlich kürzer und

führte wohl dementsprechend zu zügigeren Angärungen. Dazu haben scheinbar auch die geringen Aktivitätsverluste am Anfang der Fermentation beigetragen. Innerhalb dieser Versuchsreihe tendierten die Hefen in der 1. und 3. Führung mit der stärksten Abnahme der Maltaseaktivität und unabhängig von der Form der Belüftung zu einer schwächeren Angärung.

Dieses traf bis auf Abweichungen auch auf die Gärungen der Versuchsreihe 3 zu. In Führung 2 dieser Versuchsreihe wies die belüftete Würze eine überdurchschnittlich lange Repressionsphase von 96 h auf. Zwar wurde noch eine relativ zügige Angärung erreicht, die dann aber durch niedrige Gärleistungen während der Hauptgärung geprägt waren. Hier konnte deutlich gemacht werden, dass die Angärung der Würze nicht nur von der Dauer, sondern auch von der Intensität der Repression abhängig ist. Durch den geringen Aktivitätsverlust mit weniger als 0,1 U/mg konnte die lange Repressionsphase wohl teilweise kompensiert werden.

In Kapitel 4.9 konnte im Rahmen von Aktivitätsmessungen in der Praxis festgestellt werden, dass es nur bei Reinzuchthefen während der 8-stündigen Flotation zu einer starken Repression der Maltase bis auf die Hälfte ihrer Ausgangsaktivität kam. Eine mögliche Erklärung dafür könnte im aeroben Charakter der Reinzuchtheffe gelegen haben. Während der Propagation unter respirofermentativen Bedingungen wird weniger Glucose (und damit auch Maltose) für den Energiegewinn verbraucht als unter vollständig anaeroben Verhältnissen. Damit verbunden ist eine Reprimierung der Maltase, die bei erneuter Belüftung wie bei einer Flotation fortgesetzt wird. Dagegen erfolgt bei einer Hefe aus anaeroben Verhältnissen erst eine Umstellung ihres Stoffwechsels, weshalb sie erst nach einer gewissen Adaptionsphase mit der Reprimierung beginnen kann. Im ZKG war die Höhe des Aktivitätsverlustes bei allen gleich stark ausgeprägt. Dabei erreichten die Reinzuchthefen mit weniger als 0,2 U/mg die niedrigsten Maltaseaktivitäten. Dazu kam im Gegensatz zur Ernteheffe auch eine längere Repressionsdauer, da aufgrund der niedrigeren Anstellkonzentration von ca. 3 Millionen Zellen pro ml mehr Zeit benötigt wurde, um die Glucose aus der Würze vollständig zu verwerten. Trotz dieser negativen Voraussetzungen konnten zu Gärbeginn mit Reinzuchtheffe höhere Gärleistungen im ZKG als mit Ernteheffe erzielt werden. Eine zweite Gärung, die ebenfalls mit Reinzuchtheffe angestellt wurde, zeigte dagegen mit den niedrigsten Gärleistungen das Gegenteil. Dafür war hier eine bessere Hefevermehrung zu verzeichnen.

In Kapitel 4.4 wurden die Maltaseaktivitäten einer gesamten Hefepopulation während der Gärung untersucht. Auf diese Weise werden nicht nur die Aktivitäten der Zellen in Schwebelag repräsentiert, sondern auch die der bereits abgesetzten Hefen mit eingeschlossen. Hier konnte am Ende der Repressionsphase die höchsten Gärleistungen festgestellt werden, und das Hefewachstum erreichte das Ende der logarithmischen Phase.

Auch bei der aeroben Propagation reprimiert Glucose das Enzym Maltase und löst zusätzlich den Crabtree-Effekt aus. Die Propagationen bei 30 und 20°C (siehe Kapitel 4.5) zeigten jeweils starke Abnahmen der Maltaseaktivitäten zu Beginn bis auf 0,2 U/mg. Diese waren analog zu den bei den Gärungen gefundenen Erkenntnissen. Die Dauer der lag-Phase des Hefewachstums war abhängig von der Repressionsdauer und von der Intensität des Maltaseaktivitätsabfalls. Eine überdurchschnittlich hohe Maltaseaktivität der Hefe zu Beginn schien den Aktivitätsverlust besser kompensieren zu können als bei niedrigen Maltaseaktivitäten. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Maltaserepression und der Intensität der alkoholischen Gärung gefunden werden. Je ausgeprägter die Repression bezüglich Dauer und Intensität, desto höher waren auch die Gärleistungen und zeigten somit einen stärkeren Gärcharakter. Bei den Untersuchungen der 10°C-Propagation mit Luftzufuhr konnte anhand der gemessenen Kohlenhydrate bestätigt werden, dass nach dem Verbrauch der Glucose die Maltaseaktivität wieder ansteigt und zu diesem Zeitpunkt der Abbau von Maltose beginnt. Die Verläufe der Gärleistungen und Hefezellzahlen in der Repressionsphase (ca. 42 h) belegten, dass bei der Propagation trotz der Begasung mit Luft bedingt durch den Crabtree-Effekt die Gärung eintritt.

Die Propagationen mit verschiedenen High Gravity Würzen bestätigten ebenfalls die Tatsache, dass die Maltase solange reprimiert wird, bis die Glucose in der Würze verbraucht ist und dann erst mit der Verwertung von Maltose beginnt. In der lag-Phase kam es stets zu einer Abnahme der Maltaseaktivität auf ca. 0,2 bis 0,4 U/mg, welche als deutlich niedrig eingestuft werden können. Eine Ausnahme stellte die Würze, die mit Maltosezusatz auf 16 GG-% gebrachte wurde, dar. Hier kam es trotz des Vorhandenseins von Glucose bereits in der lag-Phase zu einer Erhöhung der Maltaseaktivität. Dies könnte auf eine mögliche Induzierung der Maltase durch den erhöhten Maltoseanteil der Würze hindeuten.

Untersuchung der Maxima

Nach der Repression durch Glucose konnte bei allen Versuchen ein Anstieg der Maltaseaktivitäten auf ein Maximum festgestellt werden. Dieses resultiert aus der Induzierung der Maltase durch die Maltose, dem Hauptbestandteil der Würze. Da eine Hefe mit hoher Maltaseaktivität für eine zügige Verwertung der Maltose steht, soll in diesem Zusammenhang die Entwicklung dieser Maxima diskutiert werden. Für eine zügige Verwertung des Disaccharides muss neben einer hohen Aktivität auch eine entsprechende Hefezellvermehrung gegeben sein.

Bei den Gärungen in Kapitel 4.3 konnte festgestellt werden, dass sich die Zeitpunkte der jeweiligen Maxima in Abhängigkeit von der Repressionsdauer verschieben. Generell kann gesagt werden, dass der Peak mit der hohen Aktivität umso früher auftritt, je kürzer die Repressionsphase ist. Die jeweils zügigsten Gärungen bei 15 und 5°C stachen mit deutlich höheren Maximalwerten im Vergleich zu den anderen Gärungen hervor. Zusätzlich war zu beobachten, dass zum Zeitpunkt der maximalen Aktivitäten auch die höchsten Hefezellzahlen gemessen wurden. Bei den 15°C-Gärungen konnte außerdem festgestellt werden, dass die Höhe der Maxima stark von der Intensität der Repression abhängig war (je stärker die Repression, umso höher das Maximum). Ebenso wichtig für eine zügigere Vergärung schien die Dauer der Induktionsphase zu sein, d.h. die Zeitspanne zwischen Ende der Repressionsphase und dem Zeitpunkt des Maximums. So lassen sich bei der Beurteilung der Maxima die gleichen Kriterien (Dauer und Intensität) wie bei der Repression finden. Bei den zügigsten Gärungen dieser Versuchsreihe trat am Ende der Gärung noch ein zweites Maximum auf. Ein Zusammenhang konnte nicht gefunden werden, da zu diesem Zeitpunkt die Gärleistungen trotz hoher Maltaseaktivitäten abnehmende Tendenz aufwiesen.

In Führung 1 der 1. Versuchsreihe (s. Kapitel 4.8) wurde die jeweils höchste Hefezellzahl im Bereich der maximalen Aktivitäten gemessen. Dieses bedeutete aber nicht, dass durch höhere Maltaseaktivitäten eine schwache Hefevermehrung ausgeglichen werden kann, wie es auf die unbelüftete Würze in Führung 2 zutraf.

In der 2. Versuchsreihe konnte beim Vergleich von belüfteter und unbelüfteter Würze über 3 Führungen gezeigt werden, dass Zusammenhänge zwischen der Höhe der Maltaseaktivitäten und den Gärleistungen bestehen. So konnten die jeweils zügigsten Gärungen nicht nur innerhalb der Führungen, sondern auch im Vergleich zu den anderen die jeweils höchsten Maxima verzeichnen. In Führung 3 der 2. Versuchsreihe wurden die

Maxima der Maltaseaktivitäten beider Gärungen früher erreicht, welches nach den bisherigen Erkenntnissen als Grund für die zwischenzeitlich hohen Gärleistungen (24-48 h) der ansonsten langsamen Gärungen (im Vergleich zu Führung 1 und 2) gesehen werden kann. Das Vorliegen zweier Maxima war in den letzten beiden Führungen zu beobachten. Dieses trug wohl zu den insgesamt höheren Gärleistungen in Führung 2 und ansatzweise auch in Führung 3 bei.

In Versuchsreihe 3 (Vergleich mit vorbehandelter Hefe) waren die höchsten Gärleistungen bei den Gärungen in der 3. Führung zu beobachten, die auch die höchsten Maxima vorzuweisen hatte. Im Gegensatz zu den anderen Führungen wurden hier zum Ende der Gärung hin deutlich über den Ausgangsaktivitäten liegende Werte gemessen, während in den ersten beiden Führungen keine ausgeprägten Maxima zu finden waren. Ein Zusammenhang zwischen maximaler Aktivität und höchster Hefezellzahl konnte in der 3. Führung wiederum gefunden werden.

In Kapitel 4.9 erreichten die Reinzuchthefen im ZKG im Vergleich zur Erntehefe deutlich über ihrem Ausgangswert liegende Maximalaktivitäten. Diese Erscheinung deutet wohl auf eine kontinuierliche Verbesserung des gärungsphysiologischen Zustandes der Hefe hin. Dies belegen die Gärleistungen sowohl im ZKG als auch die der Probegärungen, die mit zunehmender Gärdauer zunahmen. Diese Zunahme auf fast das Dreifache ihrer Ausgangsaktivität wurde bei der mit Erntehefe angestellten Gärung im ZKG nicht beobachtet. Dies zeigte, dass Hefen mit bereits hohen Maltaseaktivitäten keine weitere deutliche Zunahme erfahren können. Im Gegensatz zur Reinzuchthefer war auch kein Zusammenhang zwischen maximaler Maltaseaktivität und maximaler Hefezellzahl gegeben.

Bei der Untersuchung der gesamten Hefepopulation in Kapitel 4.4 befand sich die höchste Maltaseaktivität erst am Ende der stationären Phase des Hefewachstums. Dennoch zeigte sich auch hier, dass im Bereich der höchsten Zellzahlen auch die höchsten Aktivitäten erreicht werden.

Anders verhielten sich die Maximalaktivitäten von Maltase bei den untersuchten Propagationen in Kapitel 4.5. Während bei den Gärungen die Maximalaktivitäten stets höher lagen als die Ausgangsaktivitäten, erreichten die Maltaseaktivitäten der propagierten Hefen zu keinem Zeitpunkt wieder ihre Ausgangsaktivität. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass unter aeroben Bedingungen weniger Glucose benötigt wird als unter anaeroben Bedingungen. Dies führt zu niedrigeren Maltaseaktivitäten als es bei der Gä-

rung der Fall ist. Der Vergleich von Propagation und Umpumpgärung bestätigte dies ebenfalls. So erreichten die Maximalaktivitäten bei der Umpumpgärung (anaerob) den Ausgangswert, während diese bei der Propagation (aerob) dagegen trotz höherer Ausgangsaktivitäten weiter unter dem Ausgangswert blieb. Dennoch konnte anhand der 30 und 20°C-Propagation gezeigt werden, dass bei den Propagationen mit der stärksten Hefezellzahlzunahme die höheren Maximalaktivitäten am Ende der logarithmischen Phase vorliegen. Berücksichtigt werden sollte hier, dass auch die Ausgangsaktivitäten bei den Propagationen mit dem stärksten Hefezuwachs deutlich höher lagen. Diese könnten auch zu den höheren Maximalaktivitäten beigetragen haben.

Maltaseaktivität und Gärleistungen

Unter anaeroben Bedingungen wird bekanntlich mehr Glucose für die Energiegewinnung benötigt als unter vollständig aeroben Bedingungen. Wenn wie bei der Fermentation von Würze Maltose als Kohlenhydratquelle zur Verfügung steht, führt dies in Abwesenheit von Glucose zu einer Erhöhung der Maltaseaktivitäten. Ähnlich verhält es sich mit den Gärleistungen, die in Abhängigkeit von der Hefezellzahl den pro Zeiteinheit verbrauchten Extrakt darstellen. Steigt der Bedarf an Maltose unter anaeroben Bedingungen zur Energiegewinnung, so zeigt sich dies in einer Zunahme der Gärleistungen. Umgekehrt verhalten sich die Gärleistungen bei aeroben Fermentationen. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen den Maltaseaktivitäten und den Gärleistungen besteht.

Die gemessenen Maltaseaktivitäten und Gärleistungen in Kapitel 4.3 zeigten ansatzweise Gemeinsamkeiten. Im Bereich hoher Gärleistungen lagen auch auffällig hohe Maltaseaktivitäten vor. So konnte eine zügigere Angärung mit einer hohen Anfangsaktivität in Zusammenhang gebracht werden. Beim Vergleich der Gärungen bei gleicher Temperatur waren bei der jeweils zügigsten Gärung sowohl Gärleistung als auch Maltaseaktivität deutlich höher. Im Gegensatz dazu konnten wie z.B. bei der 10°C-Gärung bei niedrigen Maltasewerten auch niedrige Leistungen festgestellt werden. Auch äußerten sich auffällig hohe Maltaseaktivitäten am Ende der Gärung in einer intensiven Nachgärung. Beim Vergleich von belüfteter und unbelüfteter Würze konnte dies ebenfalls innerhalb der Führungen beobachtet werden. Allerdings ergaben sich keine Zusammenhänge zwischen der Höhe der Maltaseaktivität und der Gärleistung. So wurden in der 2. Führung höhere Maltaseaktivitäten verzeichnet, die aber nicht zwangsläufig auch zu einer zügi-

geren Gärung führten. Hier lagen stark unterschiedliche Wachstumsraten vor und daher muss wie bereits angesprochen, eine zügige Hefevermehrung gegeben sein, damit die Hefe die hohen Maltaseaktivitäten auch nutzen kann. In Versuchsreihe 2 konnten in allen 3 Führungen jeweils die gleichen Ausgangsaktivitäten gemessen werden, die auch in fast identischen Gärleistungen in der Angärung resultierten. Die zügigsten Fermentationen im weiteren Verlauf der jeweiligen Führungen zeichneten sich durch höhere Aktivitäten bei der Maltase aus. Allerdings fanden außer in Führung 3 keine zeitlichen Übereinstimmungen statt. So wurden zum Teil die höchsten Maltaseaktivitäten zum Zeitpunkt der niedrigsten Gärleistungen registriert oder die höchsten Gärleistungen lagen während der Repressionsphase vor. Diese Erkenntnisse trafen z.T. auch auf die Ergebnisse in Versuchsreihe 3 zu. Dennoch zeigten sich Gemeinsamkeiten zwischen den Maltaseaktivitäten und Gärleistungen. So fielen in Führung 3 die im Vergleich zu den bisherigen Führungen niedrigen Gärleistungen auf. Dies belegten auch die Aktivitäten der Maltase, die in dieser Führung maximal eine Aktivität von 0,8 U/mg erreichte.

Die Gärungen im ZKG zeigten ansatzweise ebenfalls Zusammenhänge zwischen dem Gärverlauf und der Maltaseaktivität. So konnte trotz der deutlich niedrigeren Maltasewerte bei den Reinzuchthefen eine zügige Angärung im ZKG erreicht werden. Dafür fanden sich aber Übereinstimmungen mit den in den Probegärungen ermittelten Gärleistungen. Diese nahmen bei den mit Reinzuchthefer angestellten Tanks ebenso wie die Maltaseaktivität zu und wiesen zum gleichen Zeitpunkt die höchsten Werte auf.

Die Propagationen bei verschiedenen Temperaturen ergaben nur teilweise direkte Zusammenhänge. Es konnte festgestellt werden, dass hohe Maltaseaktivitäten am Anfang auch mit einer stärkeren Gärleistung zu Beginn einhergingen. Im weiteren Verlauf der Propagationen kam es trotz hoher Werte für die Maltase zu niedrigen Gärleistungen. Hierzu kann gesagt werden, dass das Vorliegen hoher Aktivitäten bei gleichzeitig niedrigen Gärleistungen einen positiven Einfluss auf das Hefewachstum bei der Propagation ausübt.

5.2 PDH, PDC und ADH

Die Enzyme PDH, PDC und ADH gehören dem Stoffwechsel an den Knotenpunkten Pyruvat und Acetaldehyd an. Unter vollständig aeroben Bedingungen und in Medien mit niedrigen Kohlenhydratkonzentrationen wird Pyruvat bevorzugt über die PDH zu

Acetyl-CoA abgebaut. Bei hohen Pyruvatkonzentrationen bzw. bei einem hohen glykolytischen Fluss wie bei der Gärung wird es aufgrund des höheren K_m -Wertes der PDC (6mM; POSTMA et al., 1989) bevorzugt in Acetaldehyd überführt. Der Aldehyd kann über die Acetaldehyddehydrogenase dem PDH-Bypass zum Acetyl-CoA zugeführt werden. Bei einer Übersättigung dieses Bypasses reduziert die ADH den Acetaldehyd zum Ethanol und vervollständigt auf diese Weise die alkoholische Gärung. Demnach sollten für eine Hefe in einem guten vermehrungsphysiologischen Zustand hohe PDH-Aktivitäten vorliegen, während hohe PDC- und ADH-Aktivitäten einen guten gärungsphysiologischen Zustand darstellen. Hohe PDC-Aktivitäten bei gleichzeitig niedrigen ADH-Werten sprechen für das Vorliegen eines respirofermentativen (oxido-reduktiven) Stoffwechsels in der Hefezelle, wie es zum Beispiel bei Propagationen in Würze der Fall ist.

Beim Vergleich der 15°C-Gärungen fielen die deutlich höheren Aktivitäten der PDH bei der zügigsten Gärung auf. Hier kann vermutet werden, dass die ebenfalls höheren PDC-Aktivitäten zu einer stärkeren Reduzierung der Pyruvatkonzentration in der Zelle führten und die Aktivierung der PDH ermöglichten. Bei der langsamsten Gärung konnte das Pyruvat aufgrund der hauptsächlich niedrigeren PDC-Aktivitäten nur schwach abgebaut werden. Keine Zusammenhänge ergaben sich aus dem Aktivitätsverläufen der PDH und PDC. Während bei der zügigsten Gärung die Maximalwerte beider Enzyme zeitgleich eintraten, wurden die Maximalaktivitäten der PDC bei den anderen frühzeitiger beobachtet. Der Blick auf die ADH zeigte, dass diese bei der Gärung mit den höchsten Gärleistungen anfangs deutlich niedriger lagen und erst zu einem späteren Zeitpunkt eine dafür umso höhere Maximalaktivität erreichte. Dies zeigte, dass bis zum Erreichen dieser Maximalaktivität der größte Teil des Acetaldehyds über den Bypass geführt werden konnte und eine späte Sättigung des Bypasses sich positiv auf die Gärleistungen auswirkte. Ebenfalls höhere PDH-Aktivitäten wurden bei der zügigsten 10°C-Gärung festgestellt. Analog zur PDC kam es hier zu einer stetigen Zunahme bis auf ein überdurchschnittliches Maximum am Ende der Gärung. Dies bestätigte wiederum die Annahme, dass höhere PDC-Aktivitäten mit einer stärkeren Reduzierung der Pyruvatkonzentration verbunden sind, so dass Pyruvat trotz des niedrigen K_m -Wertes über die PDH Acetyl-CoA für die Bildung von Aminosäuren bereit stellen konnte (WENZEL et al., 1993; RYAN et al., 1973). Eine stetige Zunahme auf ein Maximum zum Ende war auch bei den ADH-Aktivitäten zu beobachten. Dabei erreichte im Vergleich zu den anderen die

zügigste Gärung ein deutlich höheres Maximum. Im Gegensatz zu den 15°C-Versuchen fanden sich hier die Maxima mit denen der PDH und PDC erst am Ende wieder. Dies erklärt auch die intensive Nachgärung, wie die hohen Gärleistungen belegen. Bei der weniger intensiven Gärung nahmen dagegen die PDC-Aktivitäten zum Ende hin ab. Größere Unterschiede traten bei den 5°C-Gärungen auf. Die schwächste Fermentation benötigte über 7 Tage länger, um den Ausstoßvergärungsgrad zu erreichen. Wie in den bisherigen Versuchen wurden die höchsten PDH-, PDC- und ADH-Aktivitäten bei der zügigsten Gärung gefunden. Die langsamere Gärung wies zudem eine längere Repressionsphase bei allen Enzymen auf verbunden mit starken Aktivitätsabnahmen. Die Folge war somit eine langsamere Pyruvatverwertung. Dieses wird durch die ebenfalls beobachtete lange Maltoserepression bestätigt. So konnte nur wenig Pyruvat über die Glykolyse bereit gestellt werden mit der Folge einer Aktivitätsabnahme der am Pyruvatstoffwechsel beteiligten Enzyme.

Anhand der Untersuchung der Enzymaktivitäten einer gesamten Hefepopulation (s. Kapitel 4.4) konnte belegt werden, dass durch Repression von Maltase in der Angärphase auch die Aktivitäten der Enzyme PDH und ADH abnehmen. Während bei Maltase von einer Glucoserepression gesprochen wird, ist dies bei der PDH aufgrund des hohen Glucosedurchsatzes mit der damit verbundenen hohen Pyruvatkonzentration zu erklären. Bei der ADH kann diese Aktivitätsabnahme auf ihre glucose-sensitiven Isoenzyme zurück geführt werden, wie auch die Ergebnisse von WITT (1966) gezeigt haben. Da bei der PDC der Aktivitätsverlust vergleichsweise geringer ausfiel, wird der Acetaldehyd zum größten Teil über den Bypass geleitet. Erst zum Ende der logarithmischen Phase stiegen Maltase, PDH sowie ADH wieder an und zu diesem Zeitpunkt konnten auch die höchsten Gärleistungen festgestellt werden. Die PDC verhielt sich nach einer kurzen Repressionsphase bezüglich der Aktivitäten relativ konstant und erst zum Ende der stationären Phase konnte eine deutliche Aktivitätszunahme verzeichnet werden.

Belüftete und unbelüftete Würze zeigten in Kapitel 4.8 keine Unterschiede bezüglich der Gärleistungen. Ohne Belüftung wurde aber eine leicht höhere Maximalhefekonzentration festgestellt und dies könnte in den höheren PDH- und PDC-Aktivitäten in der logarithmischen Wachstumsphase begründet sein. Die höheren Aktivitäten führten somit zu der stärkeren Bildung von Acetyl-CoA bei der unbelüfteten Würze. Die anfangs niedrigeren ADH-Werte deuten auf eine stärkere Nutzung des Bypasses bei der unbelüfteten Würze im Vergleich zur belüfteten Würze. In Führung 2 blieb die unbelüftete

deutlich hinter der konventionell angestellten Gärung. Hier wies die konventionelle Fermentation die höchsten PDH- und PDC-Aktivitäten auf. Die höchsten PDH-Aktivitäten wurden (wie auch in Führung 1) im Bereich der höchsten Hefezellzahlen am Ende der logarithmischen Phase gemessen. Wie schon in Führung 1 kam es am Ende der logarithmischen Phase zu höheren ADH-Aktivitäten bei der zügigeren Gärung. Negativ schien hier die relativ hohe Ausgangsaktivität der ADH bei der unbelüfteten Würze zu sein, die im weiteren Verlauf der Gärung (im Gegensatz zur belüfteten Würze) nicht mehr erreicht wurde. In der Versuchsreihe 2 waren in der 1. Führung bezüglich der Gärleistungen als auch der Enzymaktivitäten nur geringe Abweichungen zwischen belüfteter und unbelüfteter Würze zu verzeichnen. Da die jeweiligen Hefezellzahlen keine Unterschiede zeigten, kann lediglich aufgrund der etwas höheren Aktivitäten von PDH und PDC sowie der niedrigen ADH-Aktivitäten von einer verstärkten Acetat-Ausscheidung bei der unbelüfteten Würze ausgegangen werden (HOLZER und GOEDE, 1957). Anders war dies in Führung 2 zu sehen, bei der die belüftete Würze anfangs als Folge der höheren PDC- bei gleichzeitig niedrigerer ADH-Aktivität eine bessere Hefevermehrung aufwies. Am Ende der Gärung fanden sich höhere Hefezellzahlen verbunden mit höheren PDH- und PDC-Aktivitäten in der unbelüfteten Würze vor. Die ADH-Aktivitäten waren dabei geringfügig niedriger. In Führung 3 konnten nur geringe Unterschiede zwischen den jeweiligen Aktivitäten von PDH und PDC beobachtet werden, trotz der anfangs höheren Gärleistungen bei der unbelüfteten Würze. Dafür waren die Aktivitäten der ADH bei der konventionell angestellten Würze anfangs niedriger.

Bei den Fermentationen mit vorbehandelter Hefe (Hefe wurde vor dem eigentlichen Anstellen in unbelüfteter Würze in Wasser mit Sauerstoff begast) wurden in Führung 1 anfangs Unterschiede bezüglich der Gärleistungen und Hefezellzahlen beobachtet. Die höheren Gärleistungen der konventionell angestellten Würze standen im Zusammenhang mit den ebenfalls höheren PDC- und ADH-Aktivitäten. Dagegen verliefen die PDH-Aktivitäten nahezu identisch, so dass von einem stärkeren Gärcharakter bei der unbehandelten Hefe ausgegangen werden kann, da der PDH-Bypass schneller übersättigt wurde. Die zum späteren Zeitpunkt beobachteten höheren PDH-Aktivitäten dieser Hefe zeigten keine Auswirkungen auf den Gärverlauf. Auch in der 2. Führung kam es bedingt durch die höheren Ausgangsaktivitäten der PDC und ADH zu einer besseren Angärung der vorbehandelten Hefe. Zum Ende hatte die konventionell angestellte Würze aufgrund der höheren Werte für die ADH höhere Gärleistungen zur Folge. Die PDC

beider Hefen erreichte in der 1. Führung zum Zeitpunkt der höchsten Hefezellzahl ihr Maximum (PDH-Maximum folgte später). In Führung 2 traf dies sowohl auf die PDC als auch auf die PDH zu. Dies führte zu den deutlich höheren Hefezellzahlen in Führung 2 aufgrund der verstärkten Bereitstellung von Acetyl-CoA. In Führung 3 konnten die höchsten ADH-Aktivitäten dieser Versuchsreihe beobachtet werden. Als Folge dieser kam es zu ebenfalls überdurchschnittliche Gärleistungen im Vergleich zu den Fermentationen in Führung 1 und 2. Bei vorbehandelter Hefe waren die Gärleistungen ebenso wie die ADH-Aktivitäten höher als bei der unbehandelten Hefe. Als Folge dessen konnte in der Hauptgärung mit dieser Hefe die Hefezellzahl von 30 Millionen Zellen/ml nicht überschritten werden, während bei konventionell angestellter Würze die maximale Hefezellzahl 46 Millionen Zellen/ml betrug. Zu den höheren Zellzahlen trugen die höheren PDH- und PDC-Aktivitäten der konventionell angestellten Hefe in diesem Gärstadium bei und deutet somit auf eine bessere Auslastung des Bypasses.

In Kapitel 4.9 fand eine Untersuchung der Enzyme der Ernte- bzw. Reinzuchtheefe vor und nach einer achtstündigen Flotation statt. Dabei überraschten die Reinzuchtheffen im Gegensatz zur Erntehefe mit einer drastischen Abnahme aller Aktivitäten, obwohl bei Erntehefe durch die Zufuhr von Sauerstoff eine stärkere Umstellung des Stoffwechsels zu erwarten war. Dennoch fand trotz der niedrigeren Aktivitäten und niedrigeren Hefezellzahl eine zügigere Angärung bei den mit Reinzucht angestellten Tanks statt. Dieses sprach gegen die bisherigen Ergebnisse, dass bei höheren Aktivitäten (wie dies hier bei der Erntehefe der Fall war) zwangsläufig auch eine stärkere Vergärung gegeben ist. Eine Erklärung hierfür könnte die quantitative Enzymausstattung der Hefe sein. Möglicherweise hatte die Erntehefe im Gegensatz zur Reinzuchtheefe vor der Flotation quantitativ weniger Enzyme mit einer höheren Aktivität vorliegen. Da diese Proteine nicht mehr benötigt wurden, kam es zur Proteolyse dieser Enzyme, um die freiwerdenden Aminosäuren für den Aufbau von anderen Enzymen zu nutzen. Damit ließe sich die starke Abnahme beim Anstellen erklären, die sich allerdings im Laufe Gärung mit der Zeit auf die anaeroben Bedingungen im ZKG einstellten und wieder das Aktivitätsniveau der Erntehefe erreichten. Dies belegen auch die mittels Gärproben gefundenen Gärleistungen. Hier kam es bei den Reinzuchtheffen zu einer Erhöhung der Gärleistungen mit zunehmender Gärdauer im ZKG. Dies zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der Aktivitäten der Maltase und PDC zwischen Reinzucht- und Erntehefe. Während sich bei der Reinzuchtheefe die Aktivitäten der Maltase und PDC der der Erntehefe anglichen,

konnte dies bei der ADH nicht beobachtet werden. Dies zeigt, dass eine bessere Hefevermehrung erreicht wird, wenn niedrige ADH-Werte vorliegen bei gleichzeitig hohen PDC-Aktivitäten, wie dies bei beiden Reinzuchthefen der Fall war. Beim Vergleich der beiden Reinzuchthefen untereinander erzielte die bezüglich der Gärleistungen „schlechtere“ Reinzuchtheife höhere PDH-Aktivitäten, die sich ebenfalls in einer stärkeren Hefevermehrung äußerten. Dies zeigt, dass wenn Pyruvat sowohl über die PDH als auch über den Bypass verwertet werden kann, resultiert dieses in einer verstärkten Acetyl-CoA-Bildung.

Die Erkenntnisse in den Gärversuchen zeigen, dass bei einer aeroben Hefeführung hohe PDH- und PDC-Aktivitäten verbunden mit niedrigeren ADH-Aktivitäten angestrebt werden sollten, um eine hohe Acetyl-CoA-Bildung für die Hefevermehrung zu erreichen. Dieses traf auf die Propagationen bei 30°C nur bedingt zu. Anfangs lagen nur die Enzymaktivitäten der PDC bei der Propagation mit dem stärksten Hefewachstum höher, trotz der ebenfalls deutlich hohen ADH-Aktivitäten. Erst mit dem Ende der lag-Phase nahmen die Aktivitäten der Enzyme ab. Die Propagation mit dem schwächsten Wachstum verhielt sich umgekehrt. Anfangs lagen die Aktivitäten als auch die Gärleistungen auf niedrigerem Niveau und stiegen dann mit zunehmender Propagationsdauer an. Da die PDH beider Propagationen außer in der Anfangsphase (hier war die PDH der Hefe mit dem stärksten Wachstum am höchsten) nahezu identisch waren, musste die Ursache in den Aktivitäten der PDC und ADH gelegen haben. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die hohen Ausgangsaktivitäten von PDH, PDC und ADH eine Verkürzung der lag-Phase bewirkten. Durch die fast gleichzeitige Zunahme der Enzyme PDC und ADH und den hohen Gärleistungen wies die Hefe mit der schwächeren Hefevermehrung eine stärkere partielle Gärung auf, die somit in einer schwächeren Acetyl-CoA-Bildung resultierte. Geringere Unterschiede bezüglich der Zellvermehrung wurden bei den 20°C-Propagationen gefunden. Beide erreichten die gleiche maximale Hefezellzahl und unterschieden sich nur hinsichtlich der Dauer der lag-Phase. Im Verhalten der PDH-Aktivitäten wie bei den 30°C-Propagationen wurden keine Unterschiede außer bei den Ausgangsaktivitäten beobachtet. Die ADH-Aktivitäten beider Propagationen nahmen gleich zu Beginn ab und verblieben auf einem niedrigem Niveau, das bei der Propagation mit dem stärksten Hefewachstum geringfügig höher lag. Dagegen konnte die Propagation mit der kürzeren lag-Phase (ebenso wie bei den 30°C-Propagationen) das PDC-Maximum bereits in dieser Phase erreichen. Dieses könnte auf die höhere PDC-

Ausgangsaktivität zurückzuführen sein und lässt den Schluss zu, dass höhere PDC-Aktivitäten zu Beginn einer Propagation eine schnellere Bereitstellung von Acetyl-CoA gewährleisten und damit zu einer Verkürzung der lag-Phase beitragen. Der Vergleich zwischen einer Propagation und einer Umpumpgärung bei 10°C zeigte, dass sich die PDH-Aktivitäten in den ersten 48 h unabhängig von den Bedingungen auf gleichem Niveau befanden und erst dann die PDH der Umpumpgärung im Gegensatz zur Propagation einen stetigen Anstieg verzeichnete. Dies könnte, wie bei den Gärungen angesprochen, auf die höheren PDC-Aktivitäten zurück zu führen sein, die in einer zügigeren Reduzierung der Pyruvatkonzentration münden. In den ersten 48 h unterlagen beide Fermentationen der Repression durch die Anwesenheit von Glucose, und bedingt durch den Crabtree-Effekt löst dies trotz aerober Bedingungen die alkoholische Gärung aus, wie die ADH-Aktivitäten und Gärleistungen belegten. Die ADH-Aktivitäten der aeroben Propagation lagen wie die der Umpumpgärung in den ersten Stunden 48 h auf gleichem Niveau, ehe sich die Umpumpgärung zum Ende hin mit deutlich höheren ADH-Aktivitäten und Gärleistungen absetzte. Insgesamt konnte anhand der Propagationen festgehalten werden, dass die PDH ebenso wie die ADH bei der aeroben Propagation stets auf niedrigem Niveau bleibt und damit zur Überprüfung der für die Hefevermehrung in Bierwürze erforderlichen Bedingungen dienen kann. Kommt es zu einem Anstieg der PDH, so kann dies ein Indiz für das Eintreten einer anaeroben Fermentation sein. Ein gutes Hefewachstum im Fermenter allein sagt allerdings nichts darüber aus, ob mit dieser Hefe eine zügige Gärung unter anaeroben Bedingungen gewährleistet ist, wie dies anhand der Fermenterversuche in Kapitel 4.6 gezeigt werden konnte. Werden sowohl niedrige PDH- als auch ADH-Aktivitäten angestrebt, kann dies Gär Schwierigkeiten wie schleppende Angärung oder Steckenbleiben zur Folge haben.

Die Propagationen mit High-Gravity-Würzen bei 15°C zeigten bezüglich des Hefewachstums in den ersten 22 h (lag-Phase) keine wesentlichen Unterschiede. Unabhängig von der Stammwürze des Bieres konnte bei PDH und ADH analog zur Maltase eine Aktivitätsabnahme festgestellt werden, die sich bis in die logarithmische Phase (ca. 20 h bei 15°C) hineinzog. Die PDH fiel unabhängig von der Höhe der Ausgangsaktivität auf ein Minimum von 0,009 U/mg (eine Ausnahme mit 0,006 U/mg) ab, während die ADH sich im Bereich von 0,10-0,40 U/mg einpendelte. Anders war bei den Propagationen mit High-Gravity Würze das Verhalten der PDC-Aktivitäten in der Anfangsphase. Hier kam der Ausgangsaktivität eine entscheidende Bedeutung zu. Bei Hefen mit relativ niedrige-

ren PDC-Aktivitäten von unter 0,8 U/mg wurde eine Zunahme von Beginn an beobachtet, während die höheren stets eine Reprimierung aufwiesen, die spätestens nach der lag-Phase abgeschlossen war. Ein sofortiger bzw. schneller Anstieg der PDC-Aktivitäten schien die Hefevermehrung positiv zu beeinflussen, wie es in der mit Maltose angereicherten Würze der Fall war. Da analog zur PDC auch die Maltase anstieg, kann hier von einem Zusammenhang zwischen Maltase- und PDC-Aktivität ausgegangen werden. Eine verstärkte Maltosespaltung erhöht die Pyruvatkonzentration und da diese aufgrund des hohen K_m -Wertes nur über die PDC abgebaut werden kann, kommt es somit zu einer Erhöhung der PDC-Aktivität.

5.3 Nutzung von Enzymaktivitätsmessungen zur Beurteilung des physiologischen Zustandes der Bierhefe

Aus den in den Kapiteln 5.1 und 5.2 diskutierten Ergebnisse können Ansätze gewonnen werden, wie der physiologische Zustand einer Bierhefe mittels Enzymaktivitäten beschrieben werden kann. Im Folgenden sollen die Möglichkeiten dargestellt werden, wie diese Methode genutzt und wie das Verhalten der Enzymaktivitäten während der Fermentation gedeutet werden kann.

Vor dem Anstellen lassen sich über die Aktivität des Enzyms Maltase bereits Informationen über den Verlauf der folgenden Fermentation gewinnen. So führen höhere Werte für die Maltase beim Anstellen in gleicher Würze generell zu einer zügigeren Vergärung des Substrates und erzielen auch höhere Gärleistungen. So konnte mit Reinzuchthefer im ZKG gezeigt werden, dass mit zunehmender Maltaseaktivität auch zunehmend höheren Gärleistungen in den Probegärungen erreicht wurden.

Für die Propagation bedeutet in diesem Falle die zügige Verwertung des Kohlenhydrates Maltose eine stärkere Hefevermehrung. Allerdings hat eine hohe Maltaseausgangssaktivität bei der Propagation anfangs einen stärkeren Gärcharakter zur Folge. Durch höhere Maltasewerte können bei anaeroben Fermentationen Defizite bei der Gärung wie fehlende Belüftung beim Anstellen ausgeglichen werden. Ebenso war festzustellen, dass mit jeder Führung ein Aktivitätsverlust der Maltase einhergeht. Dies äußert sich in einer Verschlechterung der Gärleistungen mit der Anzahl der Führungen. Stellt sich die Frage nach der „Höhe“ der Maltaseaktivität, bei der sich die Hefe in einem guten physiologischen Zustand befindet, kann dies ansatzweise beantwortet werden. Zügige Gärungen bzw. Propagationen mit starkem Hefewachstum hatten meist Ausgangssaktivitäten von

über 0,8 U/mg zu verzeichnen. Allerdings zeigte sich bei der kontinuierlichen Kultur, dass hohe Aktivitäten der Maltase allein nicht zwangsläufig zu einer zügigen Gärung führen. Die deutlich niedrigeren ADH-Aktivitäten ($< 0,3$ U/mg) dieser Versuchsreihe zeigten, dass neben der Maltase auch die anderen Enzyme wie PDH, ADH und PDC die erforderliche Aktivität aufweisen müssen, um die gewünschte Fermentation zu erzielen. Auch können höhere Maltaseausgangsaktivitäten nicht automatisch zu einer zügigeren Gärung führen, wenn ein gutes Hefewachstum nicht gewährleistet werden kann wie z.B. bei einer schlechten O_2 -Versorgung. Die Bedeutung der Ausgangsaktivität der Enzyme PDH und PDC lässt sich nicht eindeutig beurteilen, da die PDH nur bei hohen Aktivitäten der PDC und der damit verbundenen Reduzierung der Pyruvatkonzentration aktiviert werden kann. Anhand der Gärleistungen konnte gezeigt werden, dass hohe PDC- und ADH-Aktivitäten (beide größer 1,0 U/mg) auf eine Hefe in einem guten gärungsphysiologischen Zustand hindeuten. Bei der Propagation wurde in diesem Falle eine Verkürzung der lag-Phase erzielt. Möglicherweise kann sich eine solche Hefe besser an das Crabtree-Milieu zu Beginn anpassen.

Ob eine gute Enzymausstattung der Anstellhefe auch effektiv genutzt werden kann, hängt von den Fermentationsbedingungen ab. Mittels den Enzymaktivitätsmessungen ist die Möglichkeit gegeben, anhand der Aktivitätsverläufe während der Gärung bzw. Propagation die Auswirkungen der Veränderungen technologischer Parameter auf den physiologischen Zustand zu erkennen. Um anhand der Maltase die Auswirkungen beurteilen zu können, sollten folgende Kriterien näher untersucht werden: Dauer der Repression, Höhe der Aktivitätsabnahme in der Repressionsphase, Zeitpunkt und Höhe des 1. Maximums nach der Repression sowie allgemein das Niveau der Aktivitäten. So weisen zügigere Gärungen meist kürzere Repressionsphasen auf oder haben einen geringeren Aktivitätsverlust zur Folge. Bei den Propagationen wird eine Verkürzung der lag-Phase erreicht. Zwar spielt hierbei die Glucosekonzentration der Würze eine entscheidende Rolle, dennoch sind Hefen in der Lage, trotz der Anwesenheit von Glucose die Maltase wieder zu induzieren. Dies konnte anhand der Propagationen mit High Gravity Würzen bei der mit Glucose angereicherten Würze gefunden werden. Wahrscheinlich ist eine Hefe in gutem physiologischen Zustand ausschlaggebend für eine Verkürzung der Repressionsphase und kann die Maltase frühzeitiger wieder induzieren. Ein weiterer Vorteil hoher Ausgangsaktivitäten der Maltase ist, dass dadurch teilweise eine bessere Kompensation des Aktivitätsverlustes zu Beginn einer Fermentation gegeben ist. Dies

ermöglicht dann eine frühzeitigere Verwertung des Hauptsubstrates der Würze, der Maltose.

Ein weiteres Kriterium für die Bewertung des Maltaseverlaufes ist der Zeitpunkt und die Höhe des 1. Maximums nach der Repressionsphase. Der Zeitpunkt des 1. Maximums hängt zwar von der Repressionsdauer ab, dennoch wurde beim Vergleich zweier Gärungen unter identischen Bedingungen bei der zügigsten Gärung dieses Maximum frühzeitiger trotz gleicher Repressionsdauer erreicht. Dies kann auf eine stärkere Induzierung der Maltase bei der vitaleren Hefe zurück zu führen sein. Ebenso aussagekräftig ist die Höhe des Maximums. So waren die höchsten Gärleistungen stets trotz gleicher Maltaseausgangsaktivitäten bei den Gärungen mit dem höheren Maximum zu beobachten. Ein weiteres Untersuchungskriterium ist der Vergleich des Maximums mit dem Ausgangswert. Ein deutlich über dem Ausgangswert liegendes Maximum deutet auf eine Verbesserung des gärungsphysiologischen Zustandes der Hefe hin, wie dies bei den mit Reinzuchthefen angestellten ZKGs der Fall war. Dies bestätigten auch die mittels Probegärungen ermittelten Gärleistungen. Bei den Propagationen konnten zu keinem Zeitpunkt Maltaseaktivitäten gemessen werden, die über ihren Ausgangswerten lagen. Ebenso sind diese niedriger als die bei den Gärungen gemessenen Maximalaktivitäten. Dies steht im Einklang mit der These, dass unter aeroben Bedingungen aufgrund des höheren Energiegewinns weniger Maltose bzw. Glucose benötigt wird und daher keine hohen Maltaseaktivitäten erforderlich sind. Dennoch konnten die höchsten Hefewachstumsraten bei den Propagationen mit dem höheren Maltasemaximum beobachtet werden, da hier die Bildung des Pyruvats verstärkt wird und somit vermehrt Acetyl-CoA zur Verfügung steht. Bei den durchgeführten Gärungen und Propagationen zeigte sich auch, dass die Maltasemaxima stets im Bereich der höchsten Hefezellzahlen lagen (Ende log-Phase /Anfang der stationären Phase). In welchem Zusammenhang die Höhe beider Parameter zueinander stehen, konnte nicht geklärt werden, da mit höheren Maxima nicht auch höhere Hefezellzahlen verbunden waren. Andererseits können die im gleichen Propagator gemachten Erkenntnisse bestätigt werden, dass bei einer Hefepropagation in normaler Würze der ideale Zeitpunkt für die Hefeernte bei einer Hefezellzahl von 100 Mio./ml liegt, also am Ende der log-Phase und damit in einem Zustand mit maximaler Maltaseaktivität (TENGE, 2003).

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Gärungen im Labormaßstab war ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Maltaseaktivitäten (Aktivitätsniveau) und der Gärleistung

gen über den gesamten Gärverlauf gegeben. Die zügigsten Gärungen zeigten stets ein deutlich höheres Niveau. Allerdings war die zeitliche Übereinstimmung nicht immer gegeben und es traten z.B. auch in der Repressionsphase hohe Gärleistungen auf.

Bei den Aktivitätsuntersuchungen der Hefe in der Brauerei konnten keine Übereinstimmungen mit den Gärleistungen im ZKG entdeckt werden. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von MENESES et al. (2002) überein, die den Aktivitäten der Maltosepermease eine größere Bedeutung für die Maltoseaufnahme beimessen. Dagegen korrelierte die Höhe der Maltaseaktivität bestens mit den mittels Probegärungen ermittelten Gärleistungen. Auch ERNANDES et al. (1993) fanden heraus, dass Hefen, die sich bereits in einem Maltosemedium befinden, sich in der darauf folgenden Fermentation besser adaptieren konnten. Es zeigte sich, dass günstige Maltaseaktivitäten bzw. eine Hefe in gutem vitalem Zustand aufgrund veränderter Bedingungen (z.B. Abkühlung auf Schlauchtemperatur im ZKG; Änderung des Tankdruckes) sich nicht automatisch auch in höheren Gärleistungen äußern können. Hierzu sind zusätzlich die Untersuchung der Enzyme PDH, PDC und ADH erforderlich. Dennoch ist durch die Messung von Maltaseaktivitäten die Möglichkeit zur Überprüfung des physiologischen Zustandes der Hefe über mehrere Führungen gegeben, wenn mit den gleichen technologischen Parametern wie Temperatur, Druck u.a. gearbeitet wird. Keine Übereinstimmungen zwischen den Gärleistungen und den Maltaseaktivitäten waren bei den durchgeführten Propagationen zu beobachten. Dennoch sind zu Beginn der Propagation die Gärleistungen umso höher, je höher die Maltaseaktivität der Anstellhefe ist. Das Vorliegen höherer Maltaseaktivitäten während der Propagation schlägt sich ebenfalls auch in höheren Hefezellzahlen nieder.

Mit Hilfe der Aktivitätsmessung von Maltase lassen sich bereits wichtige Informationen gewinnen. Diese ermöglichen keine Beantwortung der Frage, ob das Endprodukt der Glykolyse unter den jeweiligen Bedingungen (Gärung, Propagation) auch effektiv genutzt wird. Unter aeroben Bedingungen und niedrigem Kohlenhydratgehalt wird die maximale Energieausbeute erreicht und der Glucosedurchsatz ist somit gering, und Pyruvat wird hauptsächlich über die PDH zu Acetyl-CoA abgebaut. Bei anaeroben Bedingungen oder bei Fermentationen mit Bierwürze (Crabtree-Effekt) erhöht sich der Glucosedurchsatz, da der Energiegewinn über die Atmungskette nicht möglich ist. Dies führt zu einem Abbau des Pyruvats über die PDC aufgrund seines höheren K_m -Wertes gegenüber der PDH zum Acetaldehyd. Über den PDH-Bypass gelangt dieses dann zum Ace-

tyl-CoA und kann somit zur Biosynthese von Zellbausteinen genutzt werden. Kommt es zur Erschöpfung dieses Bypasses, so löst dies die alkoholische Gärung aus und Acetaldehyd wird verstärkt zu Ethanol reduziert (POSTMA et al., 1989).

Anhand der gemessenen Aktivitäten der PDH, PDC und ADH sowie der Berechnung der Gärleistungen konnten zusammen mit Maltase Informationen über den physiologischen Zustand der Hefe gewonnen werden. Aus gärungsphysiologischer Sicht hätten theoretisch hohe PDC- und ADH-Aktivitäten angestrebt werden müssen, während dagegen unter vermehrungsphysiologischen Gesichtspunkten hohe PDH-Aktivitäten erwünscht wären. Bei den Untersuchungen stellte sich aber heraus, dass die PDH bei den Gärungen höhere Werte erreichte als bei der Propagation. Dieses stand im Widerspruch zu den angesprochenen Thesen. Bereits WENZEL et al. (1993) konnten zeigen, dass das Gen *PDA1* (codiert die E1 α -Untereinheit der PDH) unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird und nicht in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Medium reguliert wird. Unter Berücksichtigung des niedrigen K_m -Wertes der PDH konnte davon ausgegangen werden, dass bei der Hauptgärung niedrigere intrazelluläre Pyruvatkonzentrationen vorliegen als bei der Propagation. Die Gründe dafür liegen in einer niedrigeren Maltase- oder höheren PDC-Aktivität während der Hefevermehrung. Während niedrige Maltaseaktivitäten den Pyruvatpool nur langsam füllen können, leert eine hohe PDC-Aktivität diesen zügig. So kann aber auch das Vorliegen hoher Maltaseaktivitäten zu einer niedrigeren Pyruvatkonzentration führen, wenn deutlich hohe PDC-Aktivitäten vorliegen. Höhere PDC-Werte wiederum führen zu einer Anhäufung des Acetaldehyds. Dieses kann die Erschöpfung des Bypasses bzw. den Acetaldehydstau verstärken, so dass ein Abbau über die ADH erforderlich und damit die vollständige alkoholische Gärung auslöst wird. Dies äußert sich dann in höheren ADH-Aktivitäten, wie bei den Gärungen festgestellt werden konnte. Dies konnte durch die höheren Gärleistungen bei Vorliegen höherer ADH-Aktivitäten bestätigt werden, da auf diese Weise mehr Acetaldehyd reduziert wird. Auch zeigte sich, dass ein spätes Auftreten der Maxima sich positiv auf die Gärleistungen auswirkte. Wird das Maximum zu früh erreicht, kann dies auf eine zu frühe Sättigung des PDH-Bypasses zurückzuführen sein. Dies hat zur Folge, dass nicht genügend Acetyl-CoA für die Lipidsynthese bereit gestellt werden kann und somit ein geringeres Hefewachstum resultiert. Stärkeres Hefewachstum konnte dementsprechend meist auch nur bei hohen PDH- und PDC-Aktivitäten bei gleichzeitig niedrigen ADH-Aktivitäten beobachtet werden.

Ein Zusammenhang bestand zwischen den Aktivitäten der Maltase und PDC. Eine hohe Maltaseaktivität führt zu einem hohen glykolytischen Fluss, der eine hohe Pyruvatkonzentration zur Folge hat. Daraus resultiert dann eine hohe PDC-Aktivität, da die PDC gegenüber der PDH einen höheren K_m -Wert aufweist und dementsprechend nur über die PDC abgebaut werden kann. Überhaupt konnte gezeigt werden, dass alle die Enzyme des Pyruvatstoffwechsels einer Repression unterliegen, wenn die Maltase reprimiert wurde. Dies erscheint logisch, da bei niedrigeren Maltaseaktivitäten auch nur wenig Pyruvat bereit gestellt werden kann.

Bei den Propagationen zeigte sich, dass die PDH und die ADH als Indikatoren für das Eintreten der Gärung dienen können. Treten während der Hefevermehrung hohe PDH-Aktivitäten auf, so deutet dies auf ein verstärktes anaerobes Milieu hin und wirkt sich nachteilig auf das Wachstum aus. Auch das Vorliegen hoher ADH-Aktivitäten ist ein Indiz für das Vorliegen anaerober Bedingungen und führt zu einer schlechteren Hefevermehrung. Allerdings muss gesagt werden, dass ein Streben nach optimalen Zuwachsraten nicht auch zu einer für das Anstellen einer Gärung optimalen Hefe führt. Zu niedrige PDH- als auch ADH-Aktivitäten können letztendlich zu Gär Schwierigkeiten führen. Positiv auf eine Verkürzung der lag-Phase bei der Hefepropagation wirkten sich hohe Aktivitäten von PDH und PDC aus. Wahrscheinlich kann auf diese Weise mehr Acetyl-CoA für das Zellwachstum bereit gestellt werden.

6 Ausblick

Mit den Aktivitätsmessungen der Enzyme Maltase, PDH, PDC und ADH wurden in dieser Arbeit wichtige Informationen über den Metabolismus der Hefe während der Propagation und Gärung gewonnen. In Zukunft sollten diese Enzymaktivitätsmessungen einen festen Platz in der Routineanalytik der Brauerei finden. Das Hauptaugenmerk gilt hierbei dem Pyruvatstoffwechsel, wobei zusätzlich auch die Enzyme des PDH-Bypasses (ACDH und ACS) untersucht werden sollen. Aus der Fülle an neu gewonnenen Informationen kann eine noch bessere und vor allem aussagekräftigere Beurteilung des physiologischen Zustandes der Hefe in allen Einsatzstadien für die jeweilige Brauerei erreicht werden.

Neben der Beurteilung des physiologischen Zustandes von Bierhefen leistet der Einsatz von Enzymaktivitätsmessungen einen wichtigen Beitrag auf dem Gebiet der Fluxomics. Unter dem Begriff Fluxom wird die Gesamtheit der enzymkatalysierten Stoffumsetzungen und ihrer Geschwindigkeiten oder Flüsse unter bestimmten Umweltbedingungen zusammengefasst. Diese wiederum steht in einem engen Zusammenhang mit dem Metabolom, der die Gesamtheit aller Metabolite und ihrer zellulären Konzentrationen beschreibt (BRO et al., 2003). Eine Untersuchung der Metabolite trägt zu einem besseren Verständnis der Stoffumsetzungen unter den gegebenen Bedingungen bei und gewährt einen Einblick in die Funktionsweise der Gene. Entsprechende Modelle zum Verständnis des biochemischen Netzwerkes sind bereits veröffentlicht worden (FELL, 1997; TEUSINK et al., 2000; LEI et al., 2000; SCHUSTER, 1999). Zudem müssen außer auf dem Gebiet der Fluxomics und Metabolomics auch die Vorgänge auf der Ebene des Proteoms (Gesamtheit aller Proteine und ihr Zusammenspiel), Transkriptom (Gesamtheit der Genabschriften) und Genoms (Gesamtheit der genetischen Informationen) untersucht werden. Diese Vorgehensweise gleicht einem „metabolic engineering“ der Hefezelle (OSTERGAARD, 2000) und könnte zu einer exakten Beurteilung des physiologischen Zustandes der Hefezelle führen. Eine zutreffende Formulierung stammte von KACZER (1986): "One thing is certain: to understand the whole, you must look at the whole". Werden hier die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Ebenen erkannt, so könnte in Zukunft durch Messungen auf nur einer Ebene (z.B. Enzymaktivitätsmessungen) ausreichend Informationen über den aktuellen Zustand der gesamten Zelle gewonnen werden.

7 Zusammenfassung

Obwohl die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sich in den letzten 50 Jahren als Modell für alle Genom- und Proteomanalysen durchgesetzt hat und der einzige vollständig „entschlüsselte“ Organismus ist, so gibt es bis jetzt keine Methode, die eine aussagekräftige und exakte Beurteilung des physiologischen Zustandes einer Bierhefe in allen Einsatzstadien der Bierherstellung ermöglicht. Die Vitalität einer Hefe wird heutzutage meist anhand von Globalbestimmungsmethoden wie Zellvermehrungsrate, Gärgeschwindigkeit, pH-Sturz u.a. beurteilt, die allerdings keine Aussagen über die Vorgänge innerhalb einer Zelle machen. Das Ansetzen von Probegärungen liefert die Ergebnisse frühestens nach 3 Tagen und bis dahin findet sich die Hefe bereits im Einsatz, so dass nachträgliche Korrekturen nicht mehr möglich sind und es wird in Kauf genommen, dass eine gärschwache Hefe zum Einsatz kommt. Weitere Nachteile der heutigen Analysen sind die hohen Kosten und der Bedarf an entsprechend geschultem Personal, um die Geräte zu bedienen oder um den zusätzlichen Arbeitsaufwand zu bewältigen.

Mit Hilfe einfacher enzymkinetischer Methoden wurde versucht, einen Einblick in die Vorgänge innerhalb der Zelle zu bekommen. Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag in den Aktivitäten der Enzyme Maltase (MAL), Pyruvatdehydrogenase (PDH), Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Alkoholdehydrogenase (ADH), die alle eine Schlüssel-funktion im Metabolismus der Hefe besitzen. Da die bisherigen Studien dieser Enzyme sich auf Laborhefestämme beschränkte, mussten zunächst Erfahrungswerte mit den Aktivitäten der Hefe in allen Stadien der Bierherstellung gewonnen werden. Dazu wurden verschiedene Fermentationen im Labormaßstab am Institut mit der Messung von Enzymaktivitäten begleitet und mit Untersuchungen in einer Brauerei ergänzt. Mit Hilfe einer erstellten Formel zur Berechnung der Gärleistung war die Möglichkeit zum Vergleich der verschiedenen Fermentationen gegeben.

Die Aktivität der Maltase ist bedeutend für die Verwertung des Hauptzuckers in der Würze, der Maltose. Die Maltase wurde nach den Kriterien Bedeutung der Ausgangsaktivität, Einfluss der Repression, Untersuchung der Maxima sowie Zusammenhang zwischen Maltaseaktivität und Gärleistung untersucht. Mit Hilfe der Maltaseausgangsaktivitäten lassen sich bereits wichtige Informationen über den folgenden Fermentationsverlauf gewinnen. Höhere Werte führen generell zu einer zügigeren Vergärung und errei-

chen höhere Gärleistungen, wenn keine anderen Faktoren wie Würzezusammensetzung oder fehlende Belüftung das Hefewachstum negativ beeinflussen. Bei der Propagation resultierte eine höhere Aktivität in einer stärkeren Hefevermehrung. Eine zu hohe Maltaseaktivität allerdings kann zu einem stärkeren Gärcharakter zu Beginn der Hefevermehrung führen. Anhand einer kontinuierlichen Hefevermehrung konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen niedriger ADH-Aktivitäten trotz höherer Maltaseaktivitäten zu unbefriedigenden Gärungen führen kann.

Ob eine gute Enzymausstattung der Anstellhefe auch positiv in den folgenden Fermentationsverlauf eingebracht wird, hängt von den gewählten technologischen Bedingungen und seinen Auswirkungen auf die Aktivitäten der Enzyme ab. So konnte die Maltase anhand der Dauer der Repressionsphase, der Aktivitätsabnahme in der Repressionsphase, dem Zeitpunkt und der Höhe des 1. Maximums nach der Repression sowie des Aktivitätsniveaus beurteilt werden. Zügigere Gärungen wiesen eine deutlich kürzere Repressionsphase auf, und bei Propagationen war die Dauer der lag-Phase abhängig von Repressionsdauer und Aktivitätsverlust. Bezüglich der Aktivitätsabnahme zeigte sich, dass mit hohen Ausgangsaktivitäten beim Aktivitätsabfall eine bessere Kompensation einherging und somit eine stärkere Induzierung der Maltase nach der Repression erreicht wurde. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass ein frühzeitigeres Erreichen des 1. Maximums nach der Repression und die Höhe dieses Maximums wichtige Kriterien für eine zügigere Hauptgärung bzw. stärkere Hefevermehrung darstellen. Bei den Untersuchungen der Gärungen im ZKG stellte sich heraus, dass über dem Ausgangswert liegende Aktivitäten der Maltase auf eine Verbesserung des physiologischen Zustandes der Hefe hindeuten. Bei der Propagation dagegen lagen die Aktivitäten der Maltase stets unter dem Ausgangswert. Dies bestätigte die Tatsache, dass unter aeroben Bedingungen weniger Maltose für den Energiegewinn benötigt wird. Auch konnten bei der Propagation und Gärung ansatzweise Zusammenhänge zwischen der Höhe des Aktivitätsniveaus und den ermittelten Gärleistungen gefunden werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, unter den gegebenen Bedingungen wie Gärung oder Propagation auch effektiv genutzt wurde, wurden die Enzyme des Pyruvatstoffwechsels (PDH, PDC und ADH) untersucht. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die PDH-Aktivität unter aeroben Bedingungen am höchsten ist. Das Gegenteil war der Fall, denn niedrige Pyruvatkonzentrationen ermöglichten der PDH, trotz ihres niedrigen K_m -Wertes, ebenfalls neben der PDC das

Pyruvat abzubauen. Dieses wirkte sich zusammen mit hohen PDC-Aktivitäten positiv auf die Hefezellzahlentwicklung aus. Dagegen wurden bei Propagationen überhaupt keine Zunahme der PDH-Aktivitäten festgestellt. Auf diese Weise konnte die PDH als Indikator für das Vorliegen anaerober Verhältnisse genutzt werden. Auch mit den Aktivitäten der ADH konnte gezeigt werden, ob der durch die PDC gebildete Acetaldehyd über den PDH-Bypass zum Acetyl-CoA geführt wird oder den letzten Schritt der alkoholischen Gärung als Wasserstoffakzeptor vollzieht. Das Vorliegen hoher ADH-Aktivitäten deutete auf eine Überlastung des PDH-Bypasses hin mit der Folge, dass die alkoholische Gärung verstärkt wird und sich negativ auf die Hefevermehrung auswirkt. Dies zeigte sich auch anhand der höheren Gärleistungen. Lagen dagegen niedrige ADH-Aktivitäten bei gleichzeitig hohen PDC-Aktivitäten vor, so fand eine stärkere Bildung von Acetyl-CoA für die Lipidsynthese statt, wie dies bei den Propagationen der Fall war. Zu einer Verkürzung der lag-Phase bei der Hefepropagation führten Hefen mit hohen PDH-, PDC- und ADH-Aktivitäten. Möglicherweise wird hierbei eine bessere Adaption der Hefe an das Crabtree-Milieu erreicht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mittels Enzymaktivitätsmessungen von Schlüsselenzymen der Hefe wichtige Aufschlüsse über die Vorgänge innerhalb der Zelle gewonnen werden können. Für die Zukunft sollten zusätzlich die Aktivitäten der Enzyme des PDH-Bypasses (Acetaldehyddehydrogenase, Acetyl-CoA Synthetase) untersucht werden, um weitere Informationen über die Vorgänge im Pyruvatstoffwechsel bei der Gärung und Propagation zu gewinnen. Des Weiteren könnten Informationen aus dem Gebiet der Metabolomics, Proteomics, Transkriptomics und Genomics zu einem besserem Verständnis des Zellmetabolismus beitragen. Dieses gleicht einem sogenannten „metabolic engineering“. Sind die Zusammenhänge zwischen diesen Ebenen bekannt, so könnte in Zukunft der physiologische Zustand einer Hefe allein durch die Messung auf einer Ebene vielleicht ausreichend beschrieben werden. Dies hätte eine tiefgreifende Optimierung des Hefemanagements in der Praxis zur Folge und könnte somit weitere technologische sowie wirtschaftliche Vorteile ermöglichen.

Summary

Despite the fact that the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has frequently been the focus of genomic and proteomic research over the past 50 years and is the single organism to have been completely sequenced, there is still no method available for accurately determining the physiological state of a brewer's yeast during the various steps of beer production. The vitality of yeast is currently evaluated using common analysis methods, such as yeast proliferation rate, fermentation rate, pH decline, etc., none of which provides insight into the operations inside the cell. Testing yeast performance through fermentation in the laboratory is possible, however, the results are first available three days later at the earliest, at which time the yeast is already in use. Therefore, subsequent corrections are impossible, even in the case of weakly fermenting yeast. Further disadvantages of the current analysis methods include their high cost and the need for trained staff to operate the required equipment and carry out any additional work.

With the help of uncomplicated methods for measuring enzyme kinetics, we attempted to gain insight into the inner workings of the cell. The primary focus of this analysis was the enzyme activity of maltase (MAL), pyruvate dehydrogenase (PDH), pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH), all of which have a key function in yeast metabolism. Due to the fact that past studies of these enzymes were conducted with laboratory strains, our first task was to gather data on yeast enzyme activity during all stages of beer production. For this purpose, a number of laboratory-scale fermentations were performed at the institute and the enzyme activity was measured and further supplemented with analysis results from a brewery. With the help of a formula for calculating fermentation performance, it was possible to compare the various fermentations conducted as part of this research.

The activity of maltase is significant for the utilization of maltose, the primary sugar present in wort. Maltase was evaluated according to the following criteria: the level of initial activity, the effects of enzyme repression, analysis of the enzyme maxima as well as relationship between maltase activity and fermentation performance. The initial maltase activity can be used to predict the nature of the subsequent fermentation. Higher levels generally lead to a more rapid fermentation during which an increase in fermentation performance is observed, given that other factors, such as the composition of the wort or the absence of aeration, do not strongly impact the growth of the yeast. During

propagation, higher activity results in an increase in cell concentration. If the maltase activity is too high, the yeast exhibit a tendency to start fermenting at the beginning of yeast multiplication. Through continuous yeast multiplication, we were able to show that the existence of lower ADH-activity, regardless of the level of the maltase activity, lead to poor fermentation performance.

The performance of pitching yeast containing abundant enzymes is also subject to the technological conditions present during fermentation, which can also have an impact on enzyme activity. Therefore, maltase can be evaluated by measuring the following: the duration of the repression phase, the decrease in activity during the repression phase, the time and level of the first maximum after repression, as well as the overall level of enzyme activity. More rapid fermentations showed a distinctly shorter repression phase. During propagation, the duration of the lag-phase was dependant on the duration of repression and the reduction in activity. Better compensation for this reduction in enzyme activity and correspondingly a stronger induction of maltase after repression was observed when the initial enzyme activity was high. Furthermore, an early first maximum after repression and the level of this maximum are important factors in determining the rate of fermentation and the degree of yeast proliferation, respectively. During fermentation in cylindroconical tanks, it was observed that maltase activity exceeding the initial activity was indicative of an improvement in the physiological state of the yeast. In contrast, maltase activity during propagation always remained below the initial activity. This confirms the fact that under aerobic conditions, maltose is utilized to a lesser degree for energy yield. Basic correlations were evident between the level of enzyme activity and the estimated fermentation performance during propagation and fermentation. In order to find out whether pyruvate, the end-product of glycolysis, is used as effectively under these circumstances as it is during fermentation and propagation, the enzymes of pyruvate metabolism (PDH, PDC and ADH) were examined. Originally, it was assumed that PDH activity is highest under aerobic conditions. However, this is not the case, because the low pyruvate concentrations enable the PDH, in spite of its low k_m -value, to also catabolise the pyruvate in conjunction with PDC. This, together with the high PDC activity, has a positive effect on yeast cell count. In contrast, no increase in PDH activity was detected during propagation. In this manner, PDH can be used as an indicator for the existence of anaerobic conditions. Also, through examination of ADH activity, it is possible to determine, whether the acetaldehyde formed by PDC has

been sent through the PDH bypass to acetyl-CoA or whether it has served as a hydrogen acceptor in the last step of alcoholic fermentation. The presence of high ADH activity is indicative of an overloaded PDH bypass, which results in an increase in alcoholic fermentation and suppressed yeast multiplication. This was evident through an increase in fermentation performance. Conversely, when low ADH activity was coupled with high PDC activity, a stronger formation of acetyl-CoA for lipid synthesis took place, as was the case during propagation. During yeast propagation a contraction of the lag phase was observed with yeast which exhibited high PDH, PDC and ADH activity. This may have enabled the yeast to adapt more readily to the Crabtree environment.

These results show that measuring the enzyme activity of key yeast enzymes provides important clues about intracellular processes. Further research could be conducted on the enzyme activity involved in the PDH bypass (acetaldehyde dehydrogenase; acetyl-CoA synthetase), to clarify the interactions of the processes responsible for pyruvate metabolism during fermentation and propagation. Furthermore, information from the fields of metabolomics, proteomics, transcriptomics and genomics could contribute to a better understanding of cell metabolism, all of which combine to form “metabolic engineering”. Were the relationships among these various fields of study well-known, the physiological state of yeast could be effectively evaluated on the basis of data from one area alone. This would significantly alter the current methods of yeast management practiced within the brewing industry and would bring with it both technological and economic advantages.

Literaturverzeichnis

- Altherr, M. und Rodriguez, R. (1988): Plasmid Vectors for the Analysis of Regulatory Sequences in Yeast. In: Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. Rodriguez, R.L. und Denhart, D.T., Eds. (Boston: Butterworths), 405–433.
- American Society of Brewing Chemists (1980): Report of sub-committee on microbiology. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **38**, 109.
- Arjunan, P.; Umland, T.; Dyda, F.; Swaminathan, ; Furey, W.; Sax, M.; Farrenkoph, B.; Dao, Y.; Zhang, D. und Jordan, F. (1996): Crystal structure of the Thiamin Diphosphate-dependent Enzyme Pyruvate Decarboxylase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **256**, 590-604.
- Barnett, J.A. (2000): A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**, 755-771.
- Beisenherz, G.; Boltze, H.J.; Bücher, T.; Czok, R.; Garbade, K.H.; Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953): Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturf.* **8b**, 555-577.
- Behal, R. H.; Browning, K. und Reed, L. J. (1989): Nucleotide and deduced amino acid sequence of the alpha subunit of yeast pyruvate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 941-946.
- Behal, R. H.; Browning, K.; Hall, T. B. und Reed, L. J. (1989): Cloning and nucleotide sequence of the gene for protein X from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **86**, 8732-8736.
- Bendiak, D. (2000): Review of metabolic activity tests and their ability to predict fermentation performance. In: *Brewing Yeast Performance*. Smart, K.A., Ed. (Oxford: Blackwell Sciences), 34-45.
- Bergmeyer, H. U. (1974): *Methoden der Enzymatischen Analyse*. 3. Auflage, Band I. Verlag Chemie, Weinheim, 7-73 und 543-544.
- Boiteux, A. und Hess, B. (1970): Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* **9**, 293-296.
- Boles, E. und Zimmermann, F.K. (1993): Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the concentrations of 3-carbon glycolytic intermediates. *Arch. Microbiol.* **160**, 324-328.
- Boles, E.; Heinisch, J. und Zimmermann, F.K. (1993): Different signals control the activation of glycolysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 761-770.
- Botstein, D.; Chervitz, A. und Cherry, J.M. (1997): Yeast as a model organism. *Science* **277**, 1259-1260.
- Boulton, C.A. (1996): A critical assessment of yeast vitality testing. *Ferment* **9** (4), 222–226.

- Boulton, C.A.; Maryan, P.; Loveridge, D. und Kell, D.B. (1989): The application of a novel biomass sensor to the control of the yeast pitching rate. Proc. 22rd Eur. Brew. Conv. Congr., Zürich, 653-661.
- Bro, C.; Regenber, B.; Lagniel, G.; Labarre, J.; Montero-Lomeli, M. und Nielsen, J. (2003): Transcriptional, Proteomic, and Metabolic Responses to Lithium in Galactose-grown Yeast Cells. *J. Biol. Chem.* **278** (34), 32141-32149.
- Buchner, E. (1898): Über zellfreie Gärung. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **31**, 568-574.
- Burkert, J.; Wittek, D.; Geiger, E. und Wabner, D. (2003): Warum Würzebelüftung?. *Brauwelt* **4/5**, 109.
- Cason, D.; Reid, G. und Gatner, E.M. (1987): On the differing rates of fructose and glucose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **93**, 23-25.
- Chang, Y.; Dubin, R.A.; Perkins, E.; Michels, C.A. und Needleman, R.B. (1989): Identification and characterization of the maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. of Bacteriol.* **171** (11), 6148-6154.
- Charron, M.J.; Read, E.; Haut, R. und Michels, C.A. (1989): Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. *Genetics* **115**, 307-316.
- Chow, T.; Sollitti, P. und Marmur, J. (1989): Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **122**, 60-69.
- Ciriacy, M. (1997): Alcohol dehydrogenase In: *Yeast Sugar Metabolism*. Zimmermann, F.K. und Entian, K.D., Eds. (Lancaster, PA: Technomic), 213-233.
- Cohen J.D.; Goldenthal, M.J.; Buchferer, B. und Marmur, J. (1984): Mutational analysis of the MAL1 locus of *Saccharomyces*: identification and functional characterization of three genes. *Mol. Genetics and Genomics* **196** (2), 208-16.
- D'Amore, T. (1992): Improving yeast fermentation performance. *J. Inst. Brew.* **98**, 375-382.
- D'Amore, T.; Russel, I. und Stewart, G.G. (1989): The effect of carbohydrate adjunct of brewers wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis). *J. Inst. Brew.* **95**, 333-336.
- Darnell, J. E.; Kerr, I. M. und Stark, G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.
- Deckwer, W.D.; Pühler, A. und Schmid, R.D. (1999): In: *Römpp Lexikon: Biotechnologie und Gentechnik*. Deckwer, W.D.; Pühler, A. und Schmid, R.D., Eds. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag), 250-252.
- De Jong-Gubbels, P. (1998): Metabolic fluxes at the interface of glycolysis and TCA cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Delft (NL).
- De Kroon, R.A. und Koningsberger, V.V. (1970): An inducible transport system for α -glucosidase in protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **204**, 590-609.

- Denis, C.L.; Ferguson, J. und Young, E.T. (1983): A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **148**, 355-368.
- De Risi, J.L.; Iyer, V.R. und Brown, P.O. (1997): Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- Donhauser, S.; Wagner, D. und Guggeis, H. (1987): Hefestämme und Bierqualität. *Brauwelt* **127**, 1273-1280.
- Drewke, C. und Ciriacy, M. (1988): Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase-IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **950** (1), 54-60.
- Dubin, R.A.; Needleman, R.B.; Gossett, D. und Michels, C.A. (1985): Identification of the structural gene encoding maltase within the MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* **164** (2), 605-610.
- Eklund, H. und Brändén, C.-I. (1987): Alcohol dehydrogenase. In: *Biological Macromolecules and Assemblies: Active Site of Enzyme* Jurnak, F.A. und McPherson, A., Eds. (New York: Wiley), **Vol. 3**, 73-142.
- Entian, K.D. und Shüller, H.J. (1997): Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In: *Yeast Sugar Metabolism*. Zimmermann, F.J. und Entian, K.-D., Eds., (Technomic Publishing Company: Lancaster, UK), 410-434.
- Entian, K.D. und Barnett, J.A. (1992): Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Biochemical Sciences* **17** (12), 506-510.
- Ereky, K. (1919): *Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Großbetrieb*. Verlag Paul Parey, Berlin. 84.
- Ernandes, J.R.; Williams, J.W.; Russel, I. und Stewart, G.G. (1993): Effect of yeast adaptation to maltose utilization on sugar uptake during the fermentation of brewer's wort. *J. Inst. Brew.* **99**, 67-71.
- Esmon, P.C.; Esmon, B.E.; Schauer, I.E.; Taylor, A. und Schekman, R. (1987): Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.* **262** (9), 4387-4394.
- European Brewery Convention (1962): Report of the yeast group. *J. Inst. Brew.* **68**, 14.
- Federoff, H.J.; Eccleshall, T.R. und Marmur, J. (1983): Carbon catabolite repression of maltase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **156**, 301-307.
- Fell, D.A. (1997): *Understanding the control of metabolism*. Portland Press, London.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F. und Käppeli, O. (1981): Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physiol.* **22**, 123-183.
- Flikweert, M.T.; van der Zanden, L.; Janssen, W.M.T.M.; Steensma, H.Y.; van Dijken, J.P. und Pronk, T. (1996): Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* **12**, 247-257.

- Goffeau, A.; Barel, B.G.; Bussey, B. et al. (1996): Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-567.
- Gorts, C.P.M. (1969): Effect of glucose on the activity and the kinetics of the maltose uptake system and of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **184**, 299-305.
- Goumaris, A.D.; Turkenkopf, I.; Civerchia, L.L. und Grennlie, J. (1975): Pyruvate decarboxylase III. Specificity restrictions for thiamine pyrophosphate in the protein association step, subunit structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **405**, 492-499.
- Green, D.E.; Herbert, D.E. und Subramanyan, V. (1941): Carboxylase. *J. Biol. Chem.* **138**, 327-339.
- Hahn, M. (1898): Das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **31**, 200-201.
- Halvorson, H.; Neufeld, E. und Ginsberg, V. (1966): Alpha-Glucosidase. In: *Methods in enzymology*. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Eds. (New York: Academic Press), 559.
- Heggart, H.; Margaritis A.; Stewart, R.J.; Pilkington, H.; Sobczak, J. und Russel, I. (2000): Measurement of brewing yeast viability and vitality: a review of methods. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **37** (4), 409-430.
- Hohmann, S. (1991): Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**, 7963-7969.
- Hohmann, S. und Cederberg, H. (1990): Autoregulation may control expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. *Eur. J. Biochem.* **188**(3), 615-621.
- Holzer, H. (1976): Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 178-181.
- Holzer, H. und Kohlhaw, G. (1961): Enzymatic formation of alpha-acetolactat from alpha-hydroxyethyl-2-thiamine pyrophosphate (active acetaldehyde) and pyruvate+. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **5** (6), 452-456.
- Holzer, H. (1961): Regulation of carbohydrate metabolism by enzyme competition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 277-288.
- Holzer, H. und Goede, W.H. (1957): Zwei Wege von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A in Hefe. *Biochem. Z.* **329**, 175-191.
- Hong, H. und Marmur, J. (1986): Primary structure of the maltase gene of the MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* **41**(1), 75-84.
- Hubner, G.; Weidhase, R. und Schellenberger, A. (1978): The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase, a first approach. *Eur. J. Biochem.* **92**, 175-181.
- Hughes, D.E.; Wimpenny, J.W.T. und Lloyd, D. (1971): The disintegration of microorganism. In: *Methods of microbiology*. Norris, J.R. und Ribbons, D.W., Eds. (Orlando: Academic Press), **Vol. 4**, 1-54.

- Hysert, D.W. und Morrison, N.M. (1977): Studies on ATP, ADP, AMP concentrations in yeast and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **35**, 160–167.
- Imai, T. (1999): The assessment of yeast vitality-the past and the future. *Brew. Guard.* **128** (6), 20-27.
- Imai, T. und Ohno, T. (1995): The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiolog.* **61** (10), 3604-3608.
- Institute of Brewing (1970): Analysis committee report on measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew.* **76**, 442.
- Jones, R.P. (1987): Measures of yeast death and deactivation and their meaning. *Process Biochemistry* **22**(5), 130-133.
- Jones, R.P.; Pamment, N. und Greenfield, P.F. (1981): Alcohol fermentation by yeast – the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry* **16** (3), 42-49.
- Käppeli, O. (1986): Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* **28**, 181-209.
- Kacser, H. (1986): On parts and wholes in metabolism. In: *The organization of cell metabolism*. G.R. Welch and J. Clegg, Eds. (New York: Plenum Press), 327-337.
- Kellermann, E.; Seeboth, P. G. und Hollenberg, C. P. (1986): Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **14**, 8963-8977.
- Klein, C.J.L.; Olsson, L. und Nielsen, J. (1998): Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic function. *Microbiology* **144**: 13-24.
- Kodama, Y.; Fukui, N.; Ashikari, T. und Shibano, Y. (1995): Improvement of Maltose Fermentation Efficiency: Constitutive Expression of MAL Genes in Brewing Yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53** (1), 24-29.
- Kötke, H. (2004): Grundlegende Untersuchungen zur kontinuierlichen Propagation von Anstellhefe im Labormaßstab. Diplomarbeit TU München-Weihenstephan.
- Kresze, G.B. und Ronft, H. (1981): Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. Properties and some kinetic and regulatory properties. *Eur. J. Biochem.* **119**, 573-579.
- Kresze, G.B. und Ronft, H. (1981): Pyruvat dehydrogenase complex from baker's yeast. Molecular structure, dissociation, and implication for the origin of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **119**, 581-587.
- Kuo, D.J.; Dikdan, G. und Jordan, F. (1986): Resolutions of brewer's yeast decarboxylase into two isoenzymes. *J. Biol. Chem.* **261**, 3316-3319.
- Lei, F.; Rotboll, M. und Jorgensen, B. (2001): A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnology* **88**, 205-221.
- Lentini, A. (1993): A review of the various methods available for monitoring the

- physiological status of yeast: yeast viability and vitality. *Fermentation* **6**, 321-327.
- Leskovac, V.; Trivic, S. und Pericin, D. (2002): The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **2**, 481-494.
- Leskovac, V.; Trivic, S. und Latkoskova, M. (1976): State and accessibility of zinc in yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* **155**, 155-161.
- Lichtenthaler; F. W. (1994): Hundert Jahre Schlüssel-Schloß-Prinzip: Was führte Emil Fischer zu dieser Analogie?. *Angew. Chem.* **106**, 2456-2467.
- Littel, K.J. und LaRocco, K.A. (1985): Bioluminescent standard curves for quantitative determination of yeast contaminants in carbonated beverages. *Journal of Food Protection* **48** (12), 1022-1024.
- Lohmann, K. und Schuster, P.H. (1937): Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem. Z.* **294**, 188-214.
- Lutsdorf, U. und Megnet, R. (1968): Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys* **126**, 933-944.
- Loureiro-Dias, M. und Peinado, J. (1984): Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*, effect of pH and potassium ion. *J. Biochem.* **222**, 293-298.
- Loureiro-Dias, M. und Peinado, J. (1982): Effects of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **4**, 721.
- Maric, V. und Einsele, A. (1980): The influence of low dissolved oxygen levels in fermentors on ethanol production by *Candida tropicalis*. *Adv. Biotechnol.* **1**, 335-338.
- Meneses, F.J.; Henschke P.A. und Jiranek, V. (2002): A Survey of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Numerous Altered Patterns of Maltose and Sucrose Utilisation. *J. Inst. Brew.* **108** (3), 310-321, 2002.
- Meneses, F.J. und Jiranek, V. (2002): Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar metabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics. *J. Inst. Brew.* **108** (3), 322-335.
- Miran, G.; Lawson, J.E. und Reed, L.J. (1993): Characterization of PDH β 1, the structural gene for the pyruvate dehydrogenase β subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.A.)* **90**, 1252-1256.
- Mochaba, F.; O'Connor-Cox, E.C. und Axell, B.C. (1998): Practical procedures to measure yeast viability and vitality prior to pitching. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56** (1), 1-6.
- Müller, S.; Hutter, K.J.; Bley, T.; Petzold, L. und Babel, W. (1997): Dynamics of yeast cell states during proliferation and non proliferation periods in a brewing reactor monitored by multidimensional flow cytometry. *Bioprocess Engineering* **17**, 287-293.
- Nagel, M. (2004): Hefepropagation mit High-Gravity Würzen. Diplomarbeit TU Mün-

chen-Weihenstephan.

- Narziss, L. (1992): Die Technologie der Würzebereitung. 7. Auflage, (Enke Verlag: Stuttgart), 352-354.
- Needleman, R.B. (1991): Control of maltase synthesis in yeast. *Mol. Microbiol.* **5**, 2079-2084.
- Needleman, R.B.; Kaback, D.B.; Dubin, R.A. et. al. (1984): MAL6 of *Saccharomyces*: A complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **81**, 2811-2815.
- Needleman, R.B.; Kaback, D.B.; Dubin, R.A. et. al. (1983): Repeated family of genes controlling maltose fermentation in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 796-802.
- Neuberg, C. und Karczag, L. (1911): Über zuckerfreie Hefegärungen. IV. Zur Kenntnis der Carboxylase. *Biochem. Z.* **36**, 68-75.
- Niu, X.; Browning, K. ; Behal, R. H. und Reed, L. J. (1988): Cloning and nucleotide sequence of the gene for dihydrolipoamide acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.A.)* **85**, 7546-7550.
- Ostergaard, S.; Olsson, L. und Nielsen, J. (2000): Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64(1)**, 34-50.
- O'Toole, D.K. (1983): Methods for the direct and indirect assessment of the bacterial content of milk. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 187-201.
- Panchal, C.J. und Stewart, G.G. (1979): Utilization of wort carbohydrates. *Brew. Dig.* **54**, 26-48.
- Petrik, M.; Käppeli, O. und Fiechter, A. (1983): An expanded concept for glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short and long-term regulation. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 43-49.
- Pfenninger, H. (1996): Methylenblaufärbung. *Mitteleuropäische Brautechnische Analysen Kommission, Selbstverlag der MEBAK (Freising-Weihenstephan), Band III, 3. Auflage*, 308-309.
- Pham, H.T.B.; Larsson, G. und Enfors, O. (1998): Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: simulation and model verification. *Biotechnol. Bioeng.* **60** (4), 474-482.
- Phaweni, M.; O'Connor, E.C.; Pickerell, A.T.W. und Axcell, B. (1993): Influence of adjunct carbohydrate spectrum on the fermentative activity of brewing yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51** (1), 10-15.
- Postma, E.; Verduyn, C.; Scheffers, W.A. und van Dijken, J.P. (1989): Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 468-477.
- Price, N.C. (1992): Techniques for enzyme extraction. In: *Enzyme Assay A practical approach*. Eienthal, R. und Danson, M.J., Eds. (Oxford: Oxford University Press), 264-265.

- Pronk, J.; Steensma, H.Y. und Van Dijken, J. (1996): Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1607-1633.
- Quain, D.E. (1988): Studies on yeast physiology-impact of fermentation performance and product quality. *J. Inst. Brew.* **95**, 315.
- Rautio, J. und Londesborough, J. (2003): Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort. *J. Inst. Brew.* **109** (3), 251-261.
- Rautio, J.; Markkula, T.; Hammond, J.R.M.; Lancashire, W. und Londesborough, J. (2001): Daily changes in maltopermease and maltase activities during normal and high gravity fermentations by ale and lager strain In: Proceedings of the 28th International Congress of the European Brewery Convention, Budapest, 37.
- Reifenberger, E.; Boles, E. und Ciriacy, M. (1997): Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanism of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**, 324-333.
- Rieger, M.; Käppeli, O. und Fiechter, A. (1983): The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 653-661.
- Rose, A.H. und Harrison, J. (1987): Introduction. In: The yeasts (2nd ed.). Rose A.H. and Harrison, J.S., Eds. (London: Academic Press), **Vol. 1**, 1-4.
- Ross, J.; Reid, G. A. und Dawes, I. W. (1988): The nucleotide sequence of the LPDI gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between eukaryotic and prokaryotic sequences for related enzymes and identification of potential upstream control site. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1131-1139.
- Roy, D.J. und Dawes, I.W. (1987): Cloning and characterization of the gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133** (4), 925-33.
- Ryan, E.D.; Tracy, J.W. und Kohlhaw, G.B. (1973): Subcellular localization of leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* **116** (1), 222-225.
- Ryder, D. (2003): Form and Function - A Microarray Appreciation of Stress to Membrane Function and Glycolysis. Vortrag auf dem "EBC-Joint Meeting of the Yeast Genetics & Physiology and Emerging Fermentation Systems Sub-Groups", Dresden.
- Schaaff, I., Heinisch, J. und Zimmermann, F.K. (1989): A deletion of the PDC1 gene for pyruvate decarboxylase of yeast cause a different phenotype than previously isolated point mutation. *Curr. Genet.* **15**, 75-81.
- Schindeldecker, H. (2003): Vitalitätsuntersuchungen der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* mittels Enzymaktivitätsmessungen in einem Fermenter. Diplomarbeit TU München-Weihenstephan.
- Schlegel, H.G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie. 7., überarbeitete Auflage. Stuttgart und New York: Georg Thieme Verlag, 528-558.
- Schmitt, H.D.; Ciriacy, M. und Zimmermann, F.K. (1983): The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger-RNA level.

- Molecular & General Genetics **192** (1-2), 247-252.
- Schmitt, H.D. und Zimmermann, F.K. (1982): Genetic analysis of the pyruvate decarboxylation reaction in yeast glycolysis. *J. Bacteriol.* **151**, 1146-1152.
- Schüller, H.J. und Entian, K.D. (1988): Molecular characterization of yeast regulatory gene CAT3 necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. *Gene* **67**, 247-257.
- Schuster, S.; Dandekar, T. und Fell, D.A. (1999): Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnology* **17**, 53-60.
- Schweiger, S. (1999): Gärverfahren und Hefepropagation in einem 60 l-Fermenter. Diplomarbeit TU München-Weihenstephan.
- Seeboth, P.G.; Bohnsack, K. und Hollenberg, C. P. (1990): *pdcl*^o mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of PDCS, a gene homologous to PDCI. *J. Bacteriol.* **172**, 678-685.
- Serrano, R. (1977): Energy requirement for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* **80**, 97-102.
- Sherwin, J.E. (1984): Liver function. In: *Clinical Chemistry, theory, analysis, and correlation*. Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., Eds. (St. Louis: Mosby), 420-438.
- Sollitti, P. und Marmur, J. (1988): Primary structure of the regulatory gene from the MAL6 locus of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Molecular and General Genetics* **213** (1), 56-62.
- Sonnleitner, B. und Käppli, O. (1986): Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 927-937.
- Steensma, H.Y.; Holterman, L.; Dekker, I.; Sluis, C.A. und Wenzel, T.J. (1990): Molecular cloning of the gene for the E1 α subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **191**, 769-774.
- Stewart, G.G.; Erratt, J.; Garrison, I.; Goring, T. und Hancock, I. (1979): Studies on the utilization of wort carbohydrates by brewers's yeast strain. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **16**, 1-7.
- Stucka, R., Dequin, ; Salmon, J. M. und Gancedo, C. (1991). DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strain. *Mol. Genetics and Genomics* **229**, 307-315.
- Tenge, C. (2003): Kritische Betrachtung zur Würzebelüftung. Vortrag auf dem Technologischen Seminar, Freising-Weihenstephan.
- Teusink, B.; Passarge, J.; Reijenga, C.A.; Esgalhado, E.; van der Weijden, C.C.; Schepper, M.; Wlash, M.C.; Bakker, B.M.; van Dam, K.; Westerhoff, H.V. und Snoep, J.L. (2000): Can yeast glykolyysis be understood of in vitro kinetics of the constituent enzymes? *Testing biochemistry. Eur. J. Biochem.* **267**, 5313-5329.

- Trumbly, R.J. (1992): Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 15-21.
- Uetz, P. (2002): Protein-Protein-Interaktionen im Modell Hefe. *BIOforum* **1-2**, 2-4.
- Uetz, P.; Giot, L.; Cagney, G.; Mansfield, T.A.; Judson, R.; Knight, J.R.; Lockshon, D.; Narayan, V.; Srinivasan, M.; Pochart, P. et al. (2000): A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-631.
- Van Leeuwen, C.C.M.; Weusthuis, R.A.; Postma, E.; van den Broek P.J. und van Dijken J.P. (1992): Maltose Proton Cotransport In *Saccharomyces cerevisiae* - Comperative-Study With Cells And Plasma-Membrane Vesicle. *Biochem. J.* **284**, 441-445.
- Van Urk, H.; Voll, W.L.; Scheffers, W.A. und van Dijken, J.P. (1990): Transient-state analysis of metabolite fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negatives yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 282-286.
- Van Urk, H.; Schipper, D.; Breedveld, D.J.; Mak, P.R.; Scheffers, W.A. und van Dijken, J.P. (1989): Localization and kinetics pf pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochimica et Biophysica Acta* **992**, 78-96.
- Verduyn, C. (1991): Physiology of yeasts in relation to growth yields. *Antonie van Leeuwenhoek* **60**, 325-353.
- Vogel, R.F. (1987): Untersuchungen zum Mechanismus der durch Glucose ausgelösten Inaktivierung von Enzymen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Universität Tübingen.
- Wenzel, T.J.; Luttkik, M.A.H.; van den Berg, J.A. und Steensma, H.Y. (1993): Regulation of the *PDA1* gene encoding the E1 α subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 297-308.
- Weinfurtner, F., Wullinger, F. und Piendl, A. (1964): Zusammensetzung der Brauereiwürze an vergärbaren und nichtvergärbaren Kohlenhydraten. *Brauwelt* **79**, 1515-1521.
- Weusthuis, R.A.; Visser, W.; Pronk, J.T.; Scheffers, W.A. und van Dijken, J.P. (1994): Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continious-culture study of the Kluuyver effect. *Microbiology* **140**, 703-715.
- Wijk, R.V.; Ouwehand, J.; Bos, T.V.D. und Koningsberger, V.V. (1969): Induction and catabolite repression of α -glucosidase synthesis in protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **186**, 178-191.
- Wills, C. (1979): Amino acid substitution in two functional mutants of yeast alcohol dehydrogenase. *Nature* **279**, 734-736.
- Witt, I.; Kronau, R. und Holzer, H. (1966): Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. *Biochimica et Biophysica Acta* **118**, 522-537.

- Young, E.T. und Pillgrim, D. (1985): Isolation and DNA sequence of ADH3, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **5**, 3024-3034.
- Young, E.T.; Williamson, V.; Taguchi, A.; Smith, M.; Sledziewski, A.; Russel, D.; Ostermann, J.; Denis, C.; Cox, D. und Beier, D. (1982): The alcoholdehydrogenase genes from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, structure and regulation. In: *Genetic Engineering of Microorganism for Chemicals*. Hollaender, A., DeMoss, R.D., Kaplan, Konisky, J., Savage, D. und Wolfe, R., Eds. (New York: Plenum), 335-361.

Urs Wellhoener

Geboren am 10. Juni 1971
in Bonn



Familienstand: ledig

Eltern: Constanze Wellhoener geb. Schönle, Lehrerin i.R.
Veit Wellhoener, Diplom-Braumeister i.R.

Geschwister: keine

Konfession: römisch-katholisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotion

10/2000 – 7/2006

„Beurteilung des physiologischen Zustandes von Brauereihefe mittels Aktivitätsmessungen von Schlüsselenzymen bei Propagation und Gärung“

Lehrstuhl für Technologie der Brauerei II

Technische Universität München-Weihenstephan

Praktische Tätigkeiten

Wissenschaftlicher Angestellter

10/2000 – heute

Organisation und Durchführung projektverwandter Auftragsforschung: Beurteilung der Vitalität von Praxishefen; Durchführung von Laborfermentationen und Untersuchung von Scale-up-Möglichkeiten

	<p>Betreuung von Studenten im Rahmen der Diplom- bzw. Semesterarbeiten</p> <p>Gestaltung , Organisation und Durchführung des Bromatologischen, Gärungstechnologischen Praktikums sowie der Seminare „Biologische Betriebsüberwachung“ und „Qualitätsüberwachung“</p> <p>Dozent im Rahmen der Ringvorlesungen „Bier und seine physiologischen Eigenschaften“, „Biologische Betriebsüberwachung“ und „Ausgewählte Kapitel der Gärung, Reifung und Lagerung“</p>
11/2000 – heute	Qualitätskontrolleur bei der Brauerei Müllerbräu GmbH in Pfaffenhofen a.d. Ilm
05/1999 – 09/2000	Aufbau eines Hefemanagements in der Brauerei C.& A. Veltins, Meschede-Grevenstein
01/1998 – 06/1998	Praktikum bei der Brauerei Müllerbräu GmbH in Pfaffenhofen a.d. Ilm (im Rahmen der Semesterarbeit)
07/1993 – 10/1993	Praktikum bei der Brauerei C.& A. Veltins, Meschede-Grevenstein
10/1992	Praktikum bei der Privatbrauerei Sester, Köln (Einführung in die Reinigung und Abfüllung von Kegs)
Ausbildung	
Diplomarbeit	„Prozessoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren unter Berücksichtigung der technologischen Prozeßführung im Hinblick auf ein konventionelles Verfahren und der Inbetriebnahme einer Hefereinzuchtanlage“

Semesterarbeiten	<p>„Rationelle und aussagefähige Labortätigkeiten in einer mittelständischen Brauerei“ (Müllerbräu GmbH, Pfaffenhofen a.d. Ilm)</p> <p>„Quantifizierung von FCKW in Polyurethanschäumen mittels Thermodesorption-GC-MS“</p>
11/1993 – 04/1999	<p>Studium für Brauwesen und Getränketechnologie Technische Universität München-Weihenstephan Diplom-Ingenieur Universität (Note: 2,3)</p>
08/1991 – 07/1993	<p>Lehre zum Brauer und Mälzer bei der Brauerei Felsenkeller, Monschau und Mälzerei Thywissen Malz, Köln-Hürth</p>
09/1982 – 06/1991	<p>Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Wiehl Allgemeine Hochschulreife (Abitur)</p>
Seminare / Kurse	<p>Hochschuldidaktisches Seminar „ Sicher auftreten – frei reden“</p> <p>Teilnahme am Hochschulkurs „Getränkeschankanlagen“</p> <p>Inhaber des DLG-Prüferpasses als sensorischer Sachverständiger zur Bewertung von Bier</p>