

Die Suche nach neuen Brauhefen abseits der *Saccharomyces*

INNOVATIONEN GESUCHT | Das traditionelle Getränk Bier verliert auf Grund vieler neuer und innovativer Getränke eine große Anzahl von Konsumenten. Innovationen im Biersektor wie neue Hopfensorten oder der gezielte Einsatz verschiedener Malze sowie verschiedenste Biermischgetränke haben diesem Trend bereits entgegen gewirkt [1]. Anknüpfend daran wird hier eine Methode vorgestellt, die neue Bierhefen hervorbringen soll.

DIE ROHSTOFFE FÜR DIE HERSTELLUNG von Bier sind bekanntlich Wasser, Hopfen, Malz und Hefe. Trotz einer steigenden Beliebtheit bei der Variation der Hefe, welche einen wesentlichen Anteil an der Aromazusammensetzung des Bieres hat, ist der Einsatz traditioneller Hefen meist das Mittel der Wahl [2]. Die Anzahl der Hefespezies, welche für die Bierherstellung verwendet werden, beschränkt sich, bis auf einige Ausnahmen, auf *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pastorianus* [3]. Viele andere Hefespezies, welche bisher nur als sogenannte Bier- oder Getränkeschädlinge in Ungnade gefallen sind, können vielfältige Aromen bilden und so zu einer Verbesserung der Aromazusammensetzung der Biere beitragen [2, 4]. Oenologen haben diesen Trend seit mehreren Jahren erkannt und forschen erfolgreich auf dem Gebiet der Nicht-*Saccharomyces*-Hefen. Um entscheiden zu können, ob ein Hefestamm für die Herstellung eines Bieres brauchbar ist, wurde am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelquali-

tät ein Programm erstellt, durch welches derzeit viele Stämme verschiedener Spezies geführt werden. Dieses soll im Folgenden näher erläutert und erste Ergebnisse präsentiert werden.

■ Identifizierung

Zu Beginn werden die verschiedenen Hefen mit Hilfe der Real-Time-PCR untersucht (Abb. 1 (1)). Hierbei wird mit spezifischen Primern festgestellt, zu welcher Spezies sie gehören. Es folgt die Erstellung zweier genetischer Fingerabdrücke mit Hilfe der Systeme RAPD 21 und GTG5, welche ein spezifisches Muster auf Stammebene darstellen [6, 5]. Diese sind in erster Linie für die Qualitätssicherung notwendig, um Kreuzkontaminationen bei solch einer großen Anzahl an verschiedenen Stämmen zu erkennen. Außerdem können so Verwandtschaftsgrade der einzelnen Stämme untereinander näher beleuchtet werden.

■ Erste Tests

Auf die Identifizierung folgt die erste Testreihe (Abb. 1 (2)). Es wird zunächst die Verwertung der verschiedenen Würzezucker überprüft. Da die Zusammensetzung der Würze meist aus geringen Konzentrationen an Glucose, Fructose, Saccharose und hohen Konzentrationen an Maltose und Maltotriose besteht, ist die Fermentation einiger oder aller

dieser Zucker wünschenswert. Ein weiteres Kriterium ist der Einfluss der verschiedenen Hopfenfraktionen wie iso- α - und β -Säuren auf den Metabolismus der verschiedenen Stämme. Es gilt zu klären, ob dieser das Wachstum bzw. bestimmte Stoffwechselfvorgänge einschränkt [8]. Zuletzt werden in diesem ersten Abschnitt des Programms die Ethanoltoleranz sowie das Wachstum bei verschiedenen pH-Werten untersucht, um einen Einblick in die Möglichkeiten, welche dieser Stamm bieten könnte, abzustecken. Hefen mit hohen Ethanoltoleranzen könnten demnach für die Post-Fermentation (Nachgärung) verwendet werden oder für die Herstellung von Bieren mit besonders hohem Alkoholgehalt. Es ist möglich, alle diese Tests auf einer 96-Well Multititer-Platte in einem Versuch pro Stamm durchzuführen. So kann die große Menge an Stämmen relativ schnell bearbeitet und potenziell verwendbare Stämme können selektiert werden.

Phenolische Aromen

Der darauffolgende Test untersucht die Bildung sogenannter Phenolic-Off-Flavours (Abb. 1 (3)). Viele obergärige Hefen besitzen die Fähigkeit, phenolische Aromen zu bilden, welche im Weißbier teils gewollt (nelkig), in anderen Bierstilen hingegen ungewollt sind. Hierfür werden Agarplatten mit verschiedenen Ausgangsstoffen (Precursor) für phenolische Aromen, wie z. B. Ferulasäure, Zimtsäure und Kumarsäure, bestückt. Auf diesen Platten werden die verschiedenen Hefestämme ausgestrichen und drei Tage lang bebrütet. Die Fähigkeit, phenolische Aromen zu bilden, kann anhand der verschiedenen phenolischen Gerüche wie z. B. 4-Vinyl-Guajakol (Nelke), 4-Vinylbenzol (Styropor) bzw. 4-Vinylphenol („Medizinschrank-Geruch“) identifiziert werden [9].

Autoren: Maximilian Michel, Tim Meier-Dörnberg, Prof. Dr. Fritz Jacob und Dr. Mathias Hutzler, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, TU München, Freising

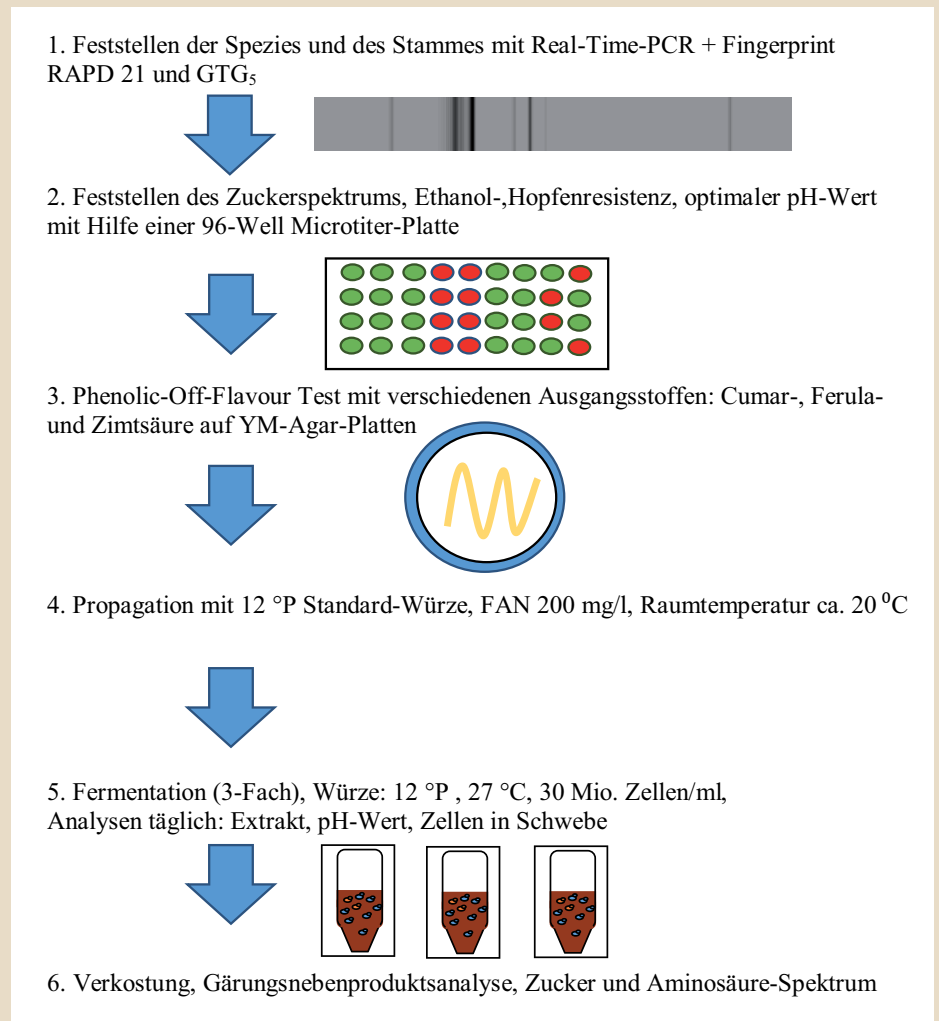


Abb 1. Aufbau und Reihenfolge der verschiedenen Untersuchungen zur Charakterisierung von „Nicht-Saccharomyces-Hefen“ [7]

Propagierbarkeit

Die so bereits zum Teil charakterisierten Hefestämme werden nun zunächst bei Raumtemperatur in einer Würze propagiert, welche aus Extrakt hergestellt wurde (Abb. 1 (4)). Dieser standardisierte Prozess dient zum einen der Reproduzierbarkeit und zum anderen der Vergleichbarkeit der verschiedenen Hefestämme untereinander. Diese Würze kann beliebig oft hergestellt werden und unterliegt nicht den natürlichen Schwankungen, welche bei der Herstellung konventioneller Würze Einfluss nehmen. Dieser Würzeextrakt wurde aus einer Reihe verschiedener Extrakte aufgrund seiner guten Eigenschaften bzgl. Aminosäure-Zusammensetzung, FAN-Gehalt und Zuckerzusammensetzung ausgewählt. Weiterhin ist diese Würze ungehopft, um den reinen Einfluss der Hefe auf die entstehenden Aromen bewerten zu können. Die Zellzahl sowie die Vitalität und Viabilität wird nach fünf Tagen bestimmt, um eine Aussage über die Propagierbarkeit

treffen zu können. Hierbei wird weiterhin die optimale Temperatur für das Wachstum der verschiedenen Stämme angepasst.

Mit den nun propagierten Stämmen werden Test-Fermentationen in 2 l Schottflaschen in Dreifachbestimmung angesetzt (Abb. 1(5)). Die Anstellparameter für diese Fermentationen sind 30 Mio Zellen/ml Anstellzellzahl und eine Stammwürze von 12 °P bei einer Temperatur von 27 °C. Hierbei werden täglich der Extraktabbau, Zellen in Schwebe sowie der pH-Wert gemessen. Die Temperatur mag vielen Brauern hoch erscheinen, ist für viele „Nicht-Saccharomyces-Hefen“ jedoch optimal und bringt weiterhin hohe Konzentrationen an flüchtigen Aromastoffen hervor. Diese Aromen werden nach abgeschlossener Fermentation von einem Panel geschulter Verkoster bewertet und beschrieben. Weiterhin werden Gärungsnebenprodukte, Zuckerverwertung, pH-Wert, Ethanol-Konzentration sowie org. Säuren der fertigen Biere analysiert (Abb. 1 (6)).

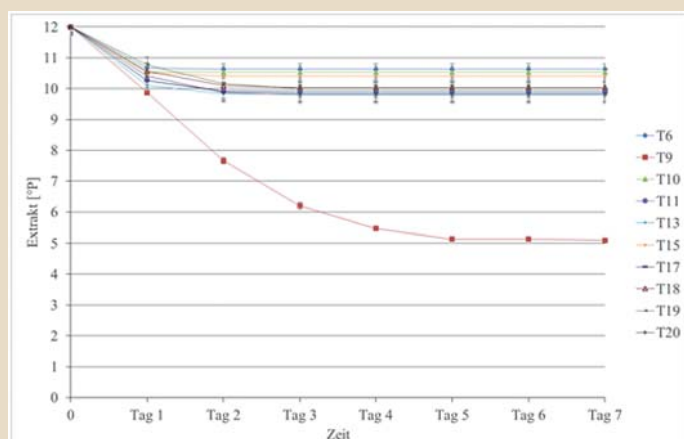


Abb. 2 Gärverläufe der untersuchten Stämme

Aus über 200 Stämmen sind so in den ersten Durchgängen der Versuche insgesamt 5 potenzielle Stämme gefunden worden, welche weiterhin untersucht werden.

Eine der untersuchten Spezies ist bereits aus der Weinherstellung bekannt. *Torulasporea delbrueckii* gilt als eine sehr osmotolerante Hefe, welche in der Weinherstellung für mehr „Fruchtigkeit“ in bestimmten Weinsorten eingesetzt wird [10]. Für den ersten Durchlauf des Programms wurden 10 Stämme aus verschiedensten Habitaten und Stammsammlungen gewählt (siehe Tab. 1).

Ergebnisse

Die untersuchten Stämme verwerteten bis auf den Stamm T9 keine Maltose oder Maltotriose. Sie zeigten keine Sensitivität gegenüber Hopfen, und alle Stämme – bis auf T10 und T6 – zeigten bis zu einer Ethanolkonzentration von 8% Wachstum. Der Phenolic-

(Farbstoff Propidiumiodid). Eine Messung der Vitalität anhand des Acidification-power-tests (AP) ergab eine gute bis sehr gute Vitalität der Hefe bei Werten von 2,4-2,5 AP [11].

Die untersuchten Hefestämme zeigten während der Versuchsgärungen die anhand des ermittelten Zuckerspektrums vorhergesagten Gärverläufe (Abb. 2). Der Stamm T9, welcher als einziger die Verwertung von Maltose und Maltotriose im vorhergegangenen Test zeigte, vergor innerhalb von 7 Tagen bis auf einen Restextrakt von 5,1 °P. Alle anderen Stämme zeigten nach zwei Tagen keine weitere Änderung des Extraktes, welcher zwischen 9,8 und 10,8 °P lag. Die Zuckerverwertung der einzelnen Hefestämme zeigten eine ca. 80-95-prozentige Verwertung von Glucose, Fructose und Saccharose. T9 erreichte eine 94,8-prozentige Vergärung von Maltose sowie eine 58,9-prozentige Vergärung von Maltotriose. Die Ethanolkonzentration lag im Mittel bei 4% vol. für die Biere vergoren mit

off-flavour Test ergab, dass keine der Hefen diese bestimmte Fähigkeit zur Bildung der oben beschriebenen Aromen besaßen.

Die Propagation bei Raumtemperatur erbrachte Zellzahlen im Bereich von 110-180 Mio. Zellen/ml, welche Viabilitäts-

T9 sowie zwischen 0,8 und 0,9% vol. bei allen anderen Stämmen.

Die Bewertung der Verkostungen der verschiedenen Biere erfolgte anhand drei verschiedener Parameter sowie einer Akzeptanzverkostung. Die drei Parameter „Würze ähnlich“, „Fruchtig“, „Floral“ wurden den Verkostern vorgegeben und mussten von 0-8 (0=geringe Wahrnehmung, 8= sehr starke Wahrnehmung) bewertet werden. Weiterhin wurde die Akzeptanz mit 1-5, wobei 1 eine hohe Akzeptanz und 5 keine Akzeptanz darstellte, bewertet. T9 stellte sich auf Grund hoher Werte bei „Fruchtig“ (8) und „Floral“ (7) und sehr geringen Werten bei „würzeähnlich“ (1) als favorisierter Stamm heraus. T13 zeigte trotz geringer Vergärung geringe „würzeähnliche“ Aromen. Die Fruchtigkeit von T17 wurde mit 6 Punkten, die von T13 mit 5 Punkten bewertet. Bei allen anderen Stämmen überwogen die „würzeähnlichen“ Aromen und es konnte nur eine geringe Akzeptanz der Biere festgestellt werden.

Fazit

Mit den Schritten des Programmes ist es möglich, eine Selektion vorzunehmen, um einen Hefestamm zu finden, der für die Fermentation von Würze zu Bier geeignet scheint [7]. Nach dem Durchlaufen des Programmes muss eine Optimierung der Bierherstellung mit dem entsprechenden Hefestamm anhand der Fermentationsparameter Anstellzellzahl, Würze, pH-Wert, Fermentationstemperatur sowie Länge und Temperatur bei der Reifung und Lagerung vorgenommen werden. ■

Literatur

1. Statistisches Bundesamt: „Absatz von Bier“. Abgerufen von: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/FinanzenSteuern/Steuern/Verbrauchssteuer/AbsatzBier2140921151024.pdf?__blob=publicationFile.

2. Pires, E. J.; Teixeira, J. A.; Brányik, T.; Vicente, A. A.: „Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast“. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 5: S. 1937-1949.

3. Lodolo, E. J.; Kock, Johan L. F.; Axcell, B. C.; Brooks, M.: „The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing“. *FEMS Yeast Res.* 2008, 7: S. 1018-1036.

4. Verstrepen, K. J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J.-P.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Pretorius, I. S.; Delvaux, F. R.: „Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer“. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 2: S. 110-118.

5. Tornai-Lehoczki, J.; Dlačny, D.: „Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques“. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 1-2: S. 37-45.

6. Healy, M.; Huong, J.; Bittner, T.; Lising, M.; Frye, S.; Raza, S.; Schrock, R.; Manry, J.; Renwick, A.; Nieto, R.; Woods, C.; Versalovic, J.; Lupski, J. R.: „Microbial

VERWENDETE HEFESTÄMME

Spezies	Synonym	Herkunft	Flokkulation
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T6	Wein, Sorghum	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T9	Brandy	Sehr staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T10	Unbekannt	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T11	Bier	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T13	Weißbier	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T15	Käse Sole	Bruchhefe
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T17	WYSC	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T18	CBS	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T19	DSM	Leicht staubig
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	T20	CBS	Leicht staubig

DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen. Braunschweig
 CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. Niederlande
 WYSC/G = Weihenstephan Culture Collection of Yeast and Mould Strains, glycerol-stock. TU München. Freising

Tab. 1

DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR“. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 1: S. 199-207.

7. Michel, M.; Kopecká, J.; Meier-Dörner, T.; Zarnkow, M.; Jacob, F.; Hutzler, M.: „Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model“. *Yeast* 2016, DOI: 10.1002/yea.3146.

8. Hazelwood, L. A.; Walsh, M. C.; Pronk, J. T.; Daran, J.-M.: „Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso-alpha-acids“. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 1: S. 318-328.

9. Thurston, P.: „The phenolic off-flavor test – A method for confirming the presence of wild yeasts“. *Journal of the Institute of Brewing*, 1986, 92: S. 9-10.

10. Azzolini, M.; Fedrizzi, B.; Tosi, E.; Finato, E.; Vagnoli, P.; Scrinzi, C.; Zapparoli, G.: „Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine“. *Eur Food Res Technol.* 2012, 2: S. 303-313.

11. Gabriel, P.; Dienstbier, M.; Matoulková, D.; Kosa, K.; Sigler, K.: „Optimised Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice“. *Journal of the Institute of Brewing*, 2008, 3: S. 270-276.