

Auferstehung der Lagerbier-Hefe *S. pastorianus* Franconia – TUM 35

AUSGEGLICHENES AROMAPROFIL | Untergärige Biere dominieren mit über 90 Prozent den weltweiten Biermarkt. Die hierfür verantwortliche untergärige Hefe *S. pastorianus* ist somit aus der Braubranche nicht mehr wegzudenken [1]. Obwohl einige beliebte und weit verbreitete Stämme zur Herstellung untergäriger Biere bereits umfassend charakterisiert wurden, wie z. B. der am häufigsten verwendete Stamm *S. pastorianus* Frisinga – TUM 34/70®, weiß man – wenn überhaupt – nur wenig über selten verwendete untergärige Hefestämme aus früheren Zeiten. So wird dem Bier, das mit Hilfe des historischen Stamms TUM 35 vergoren wurde, ein ausgesprochen mildes, ausgeglichenes Aromaprofil bei hohem Vergärungsgrad nachgesagt. Obwohl langjährige Stammsammlungen existieren, war TUM 35 nirgends hinterlegt und galt daher als verloren. Wie also war die Auferstehung dieses Stammes möglich?

DIE WICHTIGSTEN HEFESTÄMME für die Fermentation im Brauprozess gehören zum Genus *Saccharomyces* [2-4]. Dabei wird die untergärige Bierhefe *S. pastorianus* ausschließlich im Braubereich eingesetzt, sodass eine exklusive Domestizierung für diesen Industriezweig nicht ausgeschlossen

ist. Obwohl die genaue Herkunft untergäriger Hefe bisher noch unbekannt ist, kann die logische Annahme getroffen werden, dass sie in Zusammenhang mit der Entwicklung des untergärigen Bieres im 15. Jahrhundert in Bayern steht [5, 6].

Historie

Der Großteil der historischen Fakten dieses Artikels basiert auf Informationen und persönlichen Schriften von Prof. Ludwig Narziß. Infolge des Zweiten Weltkrieges (1939-1945) und der daraus resul-

tierenden Knappheit an Malz und Hopfen sahen sich deutsche Brauereien bis 1948 gezwungen, ein sogenanntes „Dünnbier“ mit einer maximalen Stammwürze von 1,7°P zu brauen. Zu der Zeit wurden in bayerischen Brauereien unterschiedliche Hefen zur Herstellung untergäriger Biere eingesetzt. Kurz nach dem Zweiten Weltkrieg etablierte sich in vielen Brauereien in Franken eine Hefe mit dem Namen „C“. Ihr Name lässt sich von der Stadt Coburg und der Brauerei Hofbrauhaus Coburg ableiten, aus der sie ursprünglich stammte. Allerdings ist nicht bekannt, woher die Brauerei diese Hefe bezog. Ab 1948 begann sich die deutsche Wirtschaft wieder zu erholen; so auch der Hopfen- und Malzmarkt, gefolgt von den Brauereien. Demnach konnten wieder Biere mit einer Stammwürze von 8°P gebraut werden. Prof. Ludwig Narziß zufolge hatten Biere, die zu der Zeit mit der Hefe Namens „C“ hergestellt wurden, ein mildes, ausgeglichenes Aroma mit feinen Hopfennoten. Braumeister Carl Hager vom Brauhaus Nürnberg ließ diese Hefe noch vor dem Jahr 1952 an der TU München mit dem Namen TUM 35 hinterlegen. Die Herkunft und der Weg, den der Hefestamm TUM 35 in Bayern zurücklegte, sind in Abbildung 1 aufgezeigt.

Autoren: Dr. Mathias Hutzler, TUM, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising; Prof. Ludwig Narziß, TUM Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Freising; Yvonne Methner, Dominique Stretz, Prof. Fritz Jacob, Dr. Maximilian Michel; alle TUM, Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, Freising

POF-TEST ERGEBNISSE DER UNTERSUCHTEN HEFESTÄMME ...

... *S. pastorianus* TUM 35, Frisinga – TUM 34/70 (Negativkontrolle) und LeoBavaricus – TUM 68 (Positivkontrolle)

Produkt/Ausgangsstoff	TUM 35	TUM 34/70	TUM 68
4-Vinylguajacol/Ferulasäure	-	-	+
4-Vinylphenol/Cumarsäure	-	-	+
4-Vinylstyrene/Zimtsäure	-	-	+

Tab. 1

Im Jahr 1952 führten ungünstige Wetterverhältnisse zu einer verfrühten Reife der Gerste, was in einem niedrigen Aminosäure- und löslichen Proteingehalt im daraus prozessierten Malz resultierte. Zudem ergaben Analysen des Endvergärungsgrads der daraus hergestellten Würzen einen Wert von maximal 76 Prozent. Dieser Ausnahmezustand hatte einen weitreichenden starken Einfluss auf die damals verwendeten untergärigen Hefen, da diese während der Gärung nicht flokkulierten, sondern länger in Schwebe blieben als gewöhnlich. Obwohl sich dieses Phänomen auch bei anderen Hefestämmen bemerkbar machte, löste TUM 35 die größten Schwierigkeiten während der Produktion aus. Zwar wurde der gewünschte Endvergärungsgrad erreicht, allerdings war es trotz verstärkter Kühlung kaum möglich, genügend Hefe für weitere Gärungen abzuziehen. Im darauffolgenden Jahr führten starke Regenfälle erneut zu einer schlechten Gerstenernte, sodass die Hefen nun umgekehrt reagierten: Sie flockten zu früh aus, was heutzutage als PYF (premature yeast flocculation) bezeichnet wird. Auch in diesem Fall gehörte TUM 35 zu den Stämmen mit den schlechtesten Fermentationseigenschaften, sodass sie von den Brauereien nicht länger verwendet wurde. Stattdessen kam nun TUM 44 zum Einsatz, die sich zwar robuster gegenüber Rohmaterialschwankungen erwies, jedoch sensorisch keineswegs mit dem milden, ausgewogenen Aromaprofil des aus der TUM 35 gebrauten Bieres mithalten konnte. Seither war TUM 35, auch „C“ genannt, von der Bildfläche verschwunden. Hingegen führten die schlechteren sensorischen Eigenschaften von TUM 44 zum Beginn der Erfolgsgeschichte von TUM 34, die bis heute mit dem Stamm *S. pastorianus* Frisinga – TUM 34/70 anhält. Letztere ist eine der erfolgreichsten Hefen hinsichtlich Endvergärungsgrad und Bierreifung. Die Menge der gebildeten Gärungsnebenprodukte liegt innerhalb der gewünschten Grenzen und der sensorische Eindruck des mit dieser Hefe hergestellten Bieres wird als sehr rein beschrieben. Doch ehe *S. pastorianus* Frisinga – TUM 34/70 im Anschluss an die Dissertation und Publikation von Prof. Ludwig Narziß seinen Siegesfeldzug startete, war TUM 35 bis ins Jahr 1952 eine der am weitesten verbreiteten Hefen in Franken, bevor sie verloren ging.

Lediglich im Jahr 2002 im Rahmen des 1. Weihenstephaner Hefeseminars tauchte

Abb. 1
Herkunft und Wege der Hefestämmen TUM 34 und TUM 35 dargestellt auf einer Bayern-Landkarte (erstellt über www.d-maps.com)

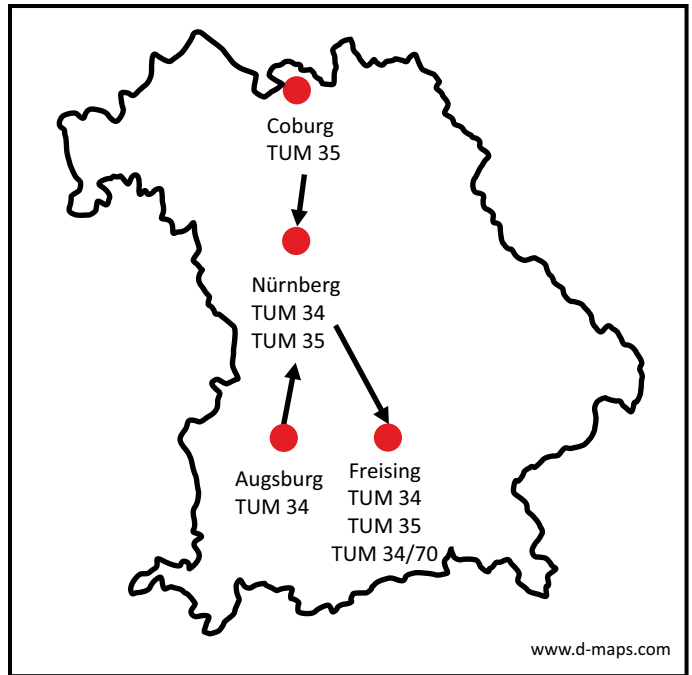


Abb. 2
Ausschnitt aus der Dokumentation der Herkunft von den historischen Hefestämmen TUM 35 und TUM 34/70

Stamm	Auftraggeber bzw. Herkunft	Ursprung	Vergärung
7		Rosenbr.-Pößneck	
26		Lütschena	mittel
34 Rz70	Staatsbr. Wästephan	Nürnberg, Stamm Reif	hoch
34 Rz78	Staatsbr. W'stephan	Nürnberg, Stamm Reif	hoch
35		Nürnberg, Stamm Coburg	

der Stamm TUM 35 kurzzeitig in einer Hefestudie auf. In dieser präsentierte Dr. Diethard Wagner verschiedene technologische und sensorische Auswertungsparameter der Flokkulation, bei der *S. pastorianus* Frisinga – TUM 34/70 auf Platz 1, TUM 35 auf Platz 16 landete [7]. TUM 35 wurde in dieser Studie aktiv genutzt, allerdings anschließend weder aktiv verkauft noch beworben, sodass sie erneut – sowohl für wissenschaftliche Zwecke als auch für die Industrie – in Vergessenheit geriet. Zudem wurde auch zu diesem Zeitpunkt keine aktive oder Kryokultur bei –80 °C im Forschungszentrum Weihenstephan hinterlegt.

■ Auferstehung von TUM 35

Wie also kam es zu der Auferstehung von TUM 35? Am Forschungszentrum Weihenstephan wurden 2018 in einem Lagerraum

in einer vergessenen Box ca. 20 nummerierte HPLC-Gläschen unbekanntes Alters gefunden, die verschiedene gefriergetrocknete Hefen auf Milchpulver beinhalteten. Die Hefestämmen befanden sich in der Box in derselben Anordnung und Nummerierung wie auf dem Auszug der historischen Liste in Abbildung 2 dargestellt.

Demnach konnte die Annahme getroffen werden, dass es sich bei dem HPLC-Fläschchen mit der Nummer 35 tatsächlich um den historischen Hefestamm TUM 35 handelte. Dieser wurde, wie in Abbildung 3 aufgezeigt, reaktiviert.

Für die Reaktivierung wurde das versiegelte HPLC-Gläschen mit der Nr. 35 aseptisch geöffnet, das Pellet in 50 ml sterile, flüssige Würze überführt und das Kölbchen mit einem sterilen Baumwollstopfen verschlossen. Das Würzekölbchen wurde bei 27 °C für

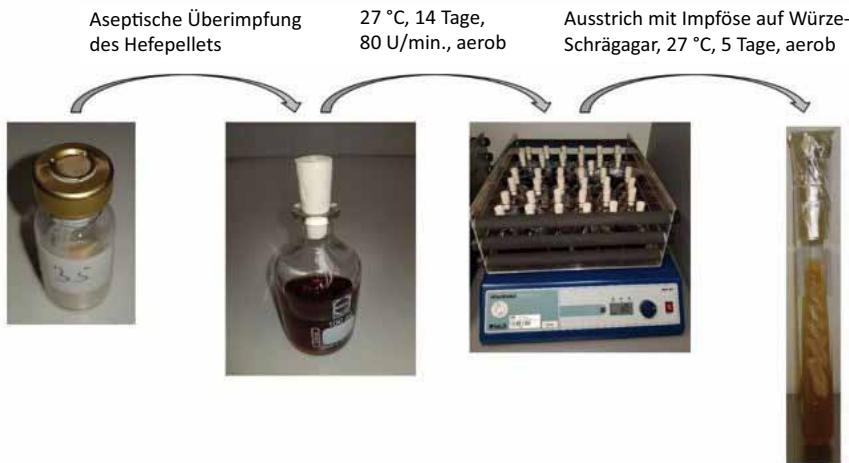


Abb. 3 Reaktivierung der gefriergetrockneten *S. pastorianus* TUM 35 Kultur aerob auf Schüttler in steriler Würze und mit anschließendem Ausstrich auf Würze-Schrägagar

14 Tage unter aeroben Konditionen auf einem Schüttler bei 80 U/min geschüttelt und anschließend auf einem Würze-Schrägagar ausgestrichen, welcher bei 27 °C für fünf Tage aerob inkubiert wurde.

Im Anschluss an die Reaktivierung wurde mittels genetischer Analyse in Form einer quantitativen PCR (qPCR) mit spezifischen DNA-Markerregionen für *S. pastorianus* bestätigt, dass es sich tatsächlich um den besagten Hefestamm handelte. Überdies zeigte eine PCR-Kapillarelektrophorese große Ähnlichkeiten zwischen TUM 35 und Frisinga–TUM 34/70, wobei auch feine Unterschiede im DNA-Fingerabdruck deutlich wurden.

Brauversuche

Im nächsten Schritt wurden Brauversuche mit TUM 35 durchgeführt. Für die Gärversuche wurde industrielle Heißwürze (31 Bittereinheiten, Stammwürze 12,2 °P) des Biertyps Weihenstephaner Original (ein bayerisches Helles mit 21 Bittereinheiten, Hopfen: Hallertauer Perle) eingesetzt und in 30-l-Fermentationstanks der Versuchsbrauerei am Forschungszentrum Weihenstephan (BLQ) überführt. Nachdem die Würze nach dem Abkühlen die entsprechende Anstelltemperatur erreicht hatte, wurde TUM 35 mit 15 x 10⁶ Zellen/ml Anstellzellzahl eingimpft.

Die Gärung dauerte 13 Tage bei 11 °C. Dabei zeigte TUM 35 gute Fermentationseigenschaften bei einem Restextraktgehalt von 1,6 °P sowie einem Endvergärungsgrad von 87,4 Prozent nach neun Tagen. Da es bei einem stabilen Restextraktgehalt von 1,6 °P blieb, war nach insgesamt

13 Fermentationstagen das Runterkühlen auf 1 °C möglich mit einer anschließenden Lagerzeit von 14 Tagen. Die Diacetyl-Reduktion und gleichzeitig auch die Reifung waren nach Tag 13 abgeschlossen.

Das Fermentationsprofil der Hauptgärung von TUM 35 ist in Abbildung 4 zu sehen und vergleichbar mit den Resultaten anderer Studien, die untergärige Hefen einsetzen [8-11].

Analytische Methoden

Nach 14 Tagen Lagerung konnte das fertige Bier analysiert werden. Dabei standen physikalische und chemische Eigenschaften wie Ethanol, pH, spezifische Dichte, Vergärungsgrad und die Konzentration der Gärungsnebenprodukte wie Diacetyl, 2,3-Pentandion, Acetaldehyd und Acetoin

im Mittelpunkt der Analysen. Alle Ergebnisse zeigten typische Werte für ein untergäriges Vollbier mit einer Stammwürze von ca. 12 °P, die auf ein Bier mit reinem Geschmack und Aromaprofil hinweisen.

Zusätzlich wurde der sogenannte POF-Test (Phenolic off-flavour test) durchgeführt, dessen Ergebnisse in Tabelle 1 (siehe S. 1162) aufgeführt sind. In Weißbieren sind phenolische Aromen durchaus erwünscht, die beispielsweise von der Positivkontrolle *S. cerevisiae* LeoBavaricus–TUM 68 gebildet werden. In einem untergärigen Bier hingegen würde ein positiver Befund Fehleraromen kennzeichnen, sodass *S. pastorianus* Frisinga–TUM 34/70 als Negativkontrolle einbezogen wurde [12, 13].

Für den Test wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Hefezellisolate von Würze-Schrägagar entnommen und auf YM-Agar Platten ausgestrichen, die jeweils eine der folgenden Zusätze enthielten: Ferulasäure, Cumarsäure und Zimtsäure. Nach drei Tagen Inkubation bei 24 °C konnten drei Platten pro Hefe mit den unterschiedlichen Zusätzen durch sensorische Analyse ausgewertet werden. Bei einem POF-positiven Test wird die Ferulasäure zu 4-Vinylgua-jacol (4-VG, nelkenartig), Cumarsäure zu 4-Vinylphenol (4-VP, medizinisch) und Zimtsäure zu 4-Vinylstyrene (4-VS, styroporartig) umgewandelt [14]. Da keine der drei phenolischen Aromen im Rahmen des POF-Tests mit TUM 35 auftraten, handelt es sich hierbei um eine POF-negative Hefe.

Im Rahmen der sensorischen Auswertung wurde das mit TUM 35 hergestellte Bier von zehn geschulten und erfahrenen Ver-

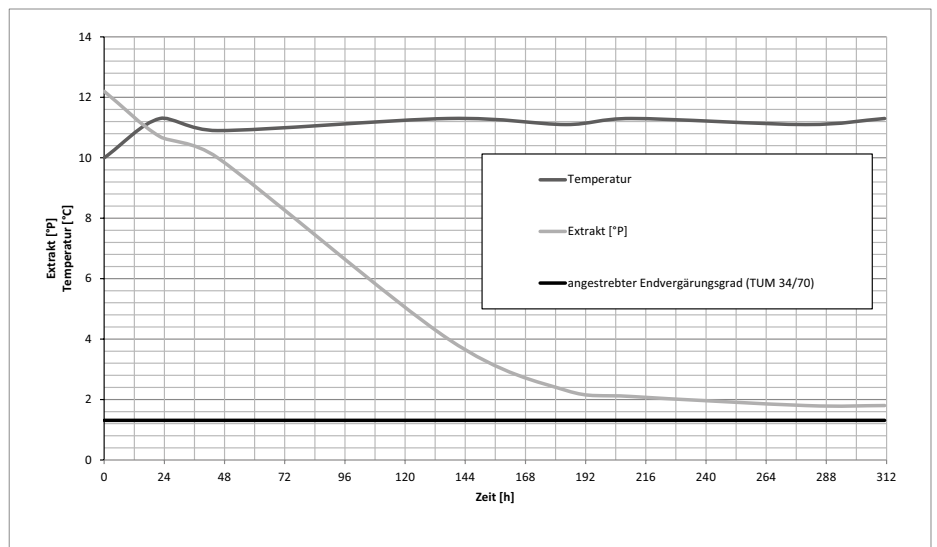


Abb. 4 Fermentationsprofil der untergärigen Hefe *S. pastorianus* TUM 35 bei einer Stammwürze von 12,2 °P und einer Hauptgärungstemperatur von 11 °C

kostern nach DLG-Schema bewertet. Auf einer Skala von 1-5 Punkten (1 niedrigste, 5 höchste Punktzahl, DLG Verkostungsschema) wurden Geruch, Geschmack, Qualität der Bittere, Mundgefühl und Karbonisierung des Bieres bewertet. Für jedes Qualitätsmerkmal wurde der Mittelwert aus den vergebenen Punkten der Verkoster gebildet. Die Ergebnisse wurden mit dem Durchschnitt aus 480 analysierten untergärigen Bieren verglichen, die von demselben Sensorikpanel im Laufe des Jahres 2018 verkostet wurden. Geruch, Geschmack und Qualität der Bittere des mit TUM 35 fermentierten Bieres fielen mit 4,4 im Vergleich zu 4,2 Punkten überdurchschnittlich gut aus, während Mundgefühl und Karbonisierung mit dem sehr guten Durchschnitt von 4,5 Punkten gleichauf lagen. Überdies folgte eine beschreibende sensorische Bewertung, die den Geruch des Bieres als rein, angenehm, frisch-hefig und sortentypisch bezeichnete. Auch geschmacklich überzeugte das Bier mit seinem angenehm frisch-hefigen, sortentypischen, ausgeglichen milden und vollmundigen Charakter sowie seiner leichten Bittere. Schwefelaromen, wie sie oftmals in untergärigen Bieren vorkommen, wurden weder im Geruch noch im Geschmack wahrgenommen.

■ Zusammenfassung

Die Herkunft des Hefestammes *Saccharomyces pastorianus* – TUM 35 konnte über Nürnberg bis hin nach Coburg in Franken zurückverfolgt werden. Nach dem Zweiten Weltkrieg war sie eine dominierende und häufig verwendete Brauhefe, deren Einsatz aufgrund ihrer nachlassenden Fermentationsleistung bei schlechten Malzqualitäten zurückging. Entsprechend wurde sie durch robustere Hefestämme ersetzt, bis sie schließlich vollständig aus dem industriellen Umfeld verschwand. Im Jahr 2018 konnte ein gefriergetrockneter Stamm reaktiviert und mittels spezifischer qPCR-Analyse bestätigt werden, dass es sich bei TUM 35 um einen Stamm der Spezies *S. pastorianus* handelt. Der DNA-Fingerabdruck bestätigte ebenfalls die große Ähnlichkeit zum des im Detail charakterisierten Hefestammes

S. pastorianus Frisinga – TUM 34/70. Lediglich kleine Unterschiede waren erkennbar. Überdies konnte mittels POF-Test gezeigt werden, dass TUM 35 keine phenolischen Aromen während der Gärung erzeugte und die Analysen der Gärungsnebenprodukte sowie der weiteren Hauptmerkmale des Bieres vergleichbar zu einem standardisierten untergärigen Vollbier waren. Sensorisch überzeugte das mit TUM 35 vergorene Bier mit einer überdurchschnittlich guten Bewertung im Vergleich zu 480 verkosteten untergärigen Vollbieren aus der Datenbank des BLQ, was die beschreibende sensorische Analyse unterstrich. Aus dieser ging hervor, dass TUM 35 für ein außerordentlich neutrales, mildes und harmonisches Bier mit dem typischen Hellen Vollbier-Aromaprofil verantwortlich ist. Diese Studie ist ein erster Entwurf der Reaktivierung und Charakterisierung alter, historischer untergäriger Hefestämme. Aufgrund ihrer Herkunft ist TUM 35 nun unter dem Markennamen „Franconia – TUM 35®“ im Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität hinterlegt und kann für weitere wissenschaftliche Studien oder industrielle Anwendungen angefragt werden. ■

■ Literatur

1. Riese, J. C.; Eßlinger H. M.: „World beer market“, Handbook of Brewing Processes, Technology, Markets, Eßlinger, H. M. (Hg.), 2009.
2. Hutzler, M., et al.: „Yeast identification and characterization“, Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste, Hill, A. (Hg.), Elsevier Science, Burlington, 2015.
3. Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T.: The yeasts, a taxonomic study, 5. Aufl. Elsevier, 2011.
4. Vaughan-Martini A.; Martini, A.: „*Saccharomyces Meyen ex Rees*“, in The yeasts, a taxonomic study, Kurtzman, C. P.; Fell, J. W. (Hg.), 2011.
5. Meußdoerffer, E.: „A Comprehensive History of Beer Brewing“, Handbook of brewing: Processes, technology, markets, Eßlinger, H. M. (Hg.), Wiley-VCH-Verl., Weinheim, 2009.
6. Meußdoerffer, E.; Zarnkow, M.: Das Bier: Eine Geschichte von Hopfen und Malz, 2. Aufl., Verlag C. H. Beck, München, 2016.
7. Wagner, D.: Einfluss des Hefestammes auf die Bierqualität, Freising-Weihenstephan, 2002.
8. Müller-Auffermann, K.; Caldera, A.; Jacob, F.; Hutzler, M.: „Characterization of different bottom fermenting *Saccharomyces pastorianus* brewing yeast strains“, BrewingScience, Jg. 68, 3-4, 2015, S. 46-57.
9. Meier-Dörnberg, T.; Hutzler, M.; Michel, M.; Methner, F.-J.; Jacob, F.: „The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Pastorianus* strains for brewing“, Fermentation, Jg. 3, Nr. 3, 2017, S. 41.
10. Donhauser, S.; Wagner D.; Gordon, D.: „Hefestämme und Bierqualität“, BRAUWELT Nr. 38, 1987, S. 1654-1664.
11. Donhauser S.; Wagner, D.; Guggeis, H.: „Hefestämme und Bierqualität“, BRAUWELT Nr. 29, 1987, S. 1273-1280.
12. Hutzler, M.: „Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen“, Dissertation, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, Freising, 2009.
13. Hutzler, M.: „Getränkerelevante Hefen – Identifizierung und Differenzierung: Wie können Hefen praxisrelevant unterschieden werden, und wie können Identifizierungsergebnisse technologisch bewertet werden?“, Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 2009 u.d.T. Hutzler, M.: Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen, Südwestdt. Verl. für Hochschulschriften, 2010.
14. Thurston, P.: „The phenolic off-flavor test: A method for confirming the presence of wild yeasts“, Journal of the Institute of Brewing Nr. 92, 1986, S. 9-10, 1986.