

Spezialhefen für alkoholfreie und alkoholarme Biere

HEFEBIODIVERSITÄT | In der Corona-Krise nutzen einige Brauereien freie Kapazitäten zur Produktentwicklung. Neuartige Maltose-negative Hefen aus dem Projekt „Hefejagd“ des Forschungszentrums Weihenstephan sind hierbei der Ausgangspunkt für mehr Hefebiodiversität. Dieser Beitrag betrachtet die bewährte Herstellung eines alkoholfreien Bieres mittels *Saccharomyces ludwigii* und untersucht dann den Einsatz der Hefestämme *Cyberlindnera misumaiensis*, *Cyberlindnera saturnus* sowie *Kluyveromyces marxianus* und ihre Eigenheiten.

ALKOHOLFREIE BIERE (AFB) und alkoholarme Biere erzielten in den letzten Jahren immer mehr Zuwächse. Alkohol wird aus gesundheitlicher und gesellschaftlicher Sicht immer kritischer gesehen und auch so diskutiert. Generell steigen das Interesse und der Absatz an alkoholfreien und -armen Bieren. Brauereien sehen hier für sich die Chance, eine bisher wenig besetzte Nische – z. T. auch regional – zu erobern.

Es gibt unterschiedliche Herstellungsweisen für AFB, wie Entalkoholisierung, gestoppte Gärung, Kälte-Kontakt-Verfahren, Arbeiten mit sehr niedrigen Stammwürzen oder Gärung mit Maltose-negativen Hefen. Es existieren auch Mischverfahren, wobei häufig das Verschneiden zweier Biere unterschiedlicher Herstellungsweisen zum Einsatz kommt. Die Maltose-negativen Hefen werden in diesem Artikel näher beleuchtet, da hier Dr. Mathias Hutzler und sein Team am Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität (BLQ) der TU München für die Brauereien mehrere neuartige Maltose-negative Hefen zugänglich gemacht haben, die über die letzten Jahre intensiv getestet wurden. Bevor jedoch auf die neuen Hefestämme eingegangen

Autoren: Dr. Mathias Hutzler, Yvonne Methner, Prof. Fritz Jacob, alle Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität, TU München, Freising

wird, soll zunächst auf das Verfahren der alkoholfreien Bierherstellung mittels *Saccharomyces ludwigii* TUM SL17 eingegangen werden. Diese Hefe wird schon sehr lange zur Herstellung alkoholfreier und -armer Biere eingesetzt, und dieses Verfahren dient als eine Art Blaupause für die Anwendung anderer Maltose-negativer Hefen.

Saccharomyces ludwigii TUM SL17

Die Herstellung von alkoholarmem Bier mit *Saccharomyces ludwigii* wird schon 1933 in einem Patent von Haehn und Glaubitz beschrieben [1]. In neuerer Zeit folgen ein Patent von Kunz und Methner 2009 [2] und wissenschaftliche Arbeiten von Autorengruppen um Meier-Dörnberg (2014) [3], De Francesco (2015) [4], Pahl (2016) [5], Parise (2017) [6], Gutiérrez (2018) [7], Callejo (2019) [8] und Vašík (2020) [9], welche alle die Herstellung von Bier mittels *Saccharomyces ludwigii* untersuchen. Man kann also mit Fug und Recht behaupten, dass *Saccharomyces ludwigii* die am besten untersuchte Nicht-*Saccharomyces*-Hefe zur Herstellung alkoholfreier und -armer Biere ist. Das Forschungszentrum Weihenstephan BLQ hat das Herstellungsverfahren für verschiedene Biertypen untersucht und modifiziert; diese Verfahren wurden schon häufiger auf Kongressen, Seminaren und

in Fachbeiträgen vorgestellt. Abbildung 1 beschreibt stichpunktartig die Zusammenfassung eines solches Verfahrens, wie es am Forschungszentrum Weihenstephan BLQ angewendet wird.

Die Technologie gemäß Abbildung 1 zur Herstellung von alkoholfreiem Bier mittels *Saccharomyces ludwigii* kann als Vorlage bzw. Ausgangstechnologie zur Herstellung von alkoholfreien Bieren mit den neuartigen Maltose-negativen Hefen gesehen werden. All diese Hefen haben die Eigenschaft, dass sie den Hauptmalzzucker Maltose und Zucker mit mehr Glucose-Einheiten nicht verwerten. Es resultieren daraus Biere mit niedrigen Alkoholkonzentrationen, insbesondere wenn die Stammwürze niedrig gewählt wird. Natürlich lässt sich das Verfahrensprotokoll gemäß unterschiedlicher Zielsetzungen (z.B. Aroma, Harmonie mit anderen Rohstoffen, Vollmundigkeit, schlanker Körper, sehr niedriger Alkoholgehalt, Gärungsnebenproduktspektrum, leichte Rezenz, starke Rezenz, dezente Bittere, betonte Bittere etc.) anpassen und abstimmen. Im Folgenden werden nun drei der neuartigen Maltose-negativen Hefen und ihre Charakteristika vorgestellt. Weitergehende Erkenntnisse werden im aktuellen AIF/Wifoe-Forschungsvorhaben „Aromahefen“ generiert und zeitnah in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht.

Spezialhefen für alkoholfreies Bier

Im Rahmen eines Screenings vieler unterschiedlicher Nicht-*Saccharomyces*-Hefen am Forschungszentrum Weihenstephan BLQ zeigten einige Hefen vielversprechende Eigenschaften zur Herstellung alkoholfreier Biere. Dabei konnten die potentiell geeigneten Hefen weder Maltose noch Maltotriose verstoffwechseln, während sie eine ausreichende Toleranz gegenüber iso- α -Säuren von bis zu 100 ppm, β -Säuren von bis zu 200 ppm sowie einer Mischung beider Säuren zeigten. Anschließende Geruchstests ergaben, dass unter anderem die Hefen *Cyberlindnera misumaiensis* TUM 238, *Cyber-*

TUM – BLQ**Technologie alkoholfreies Bier****mittels *Saccharomyces ludwigii* TUM SL17**

- Hexosen ca. 7 % der Kohlenhydrate und Saccharose ca. 4 % der Kohlenhydrate in Bierwürze
- Saccharose liegt bereits im Malz in dieser Konzentration vor
- Hexosen liegen zum Teil im Malz vor, z. T. werden sie während des Maischprozesses bei Temperaturen von ca. 55 °C (Enzymoptimum in Würze) gebildet
- Höhere Einmaischtemperaturen von z. B. 65 °C reduzieren die Bildung der Hexosen → Steuerung des Alkoholgehaltes möglich
- Hefereinzucht → analog zu ober- und untergärrigen Bierhefen (ca. 20 °C) → Propagation in einem Verhältnis von 1 : 5 (Volumen Hefesuspension : Volumen Bierwürze) bis erforderliches Hefevolumen vorliegt → jeweils 3 Tage propagieren
- Zielvolumen mit 0,5 l Hefesuspension pro hl anstellen (oder ca. 5-10 Mio. Zellen pro ml)
- 5 Tage Hauptgärung bei 15-20 °C (je nach Biertyp und Zielsetzung)
- 2 Tage Reifung bei 15-20 °C (Abbau von Diacetyl und 2-Acetolactat)
- Abkühlen auf 1 °C, halten für 2 Tage, Filtration und ggf. EK-Filtration
- Ggf. auf 0,5 % CO₂ aufkarbonisieren (kann entfallen bei Spunden zu Beginn der Hauptgärung auf ca. 3 bar)
- Falls keine EK-Filtration → thermische Stabilisierung obligatorisch (KZE, Pasteurisation)

**Anmerkungen:**

- Fermentation kann semi-kontinuierlich gestaltet werden, d. h. 25 % des Jungbieres nach Hauptgärung verweilen im Tank und werden mit 75 % frischer Würze aufgefüllt
- Einsetzung biologischer Würzesäuerung kann mikrobiologische Stabilität des Produktes stärken → Senkung des pH-Wertes unter 4,5

Abb. 1 Technologie zur Herstellung von alkoholfreiem Bier mittels *Saccharomyces ludwigii* TUM SL17

lindnera saturnus TUM 247 sowie *Kluyveromyces marxianus* TUM 653 positive, fruchtige Aromaeigenschaften aufwiesen [10]. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden die drei Hefestämme für die Herstellung alkoholfreier Biere getestet. Lichtmikroskopische Aufnahmen dieser drei Hefen sind in Abbildung 2 zu sehen.

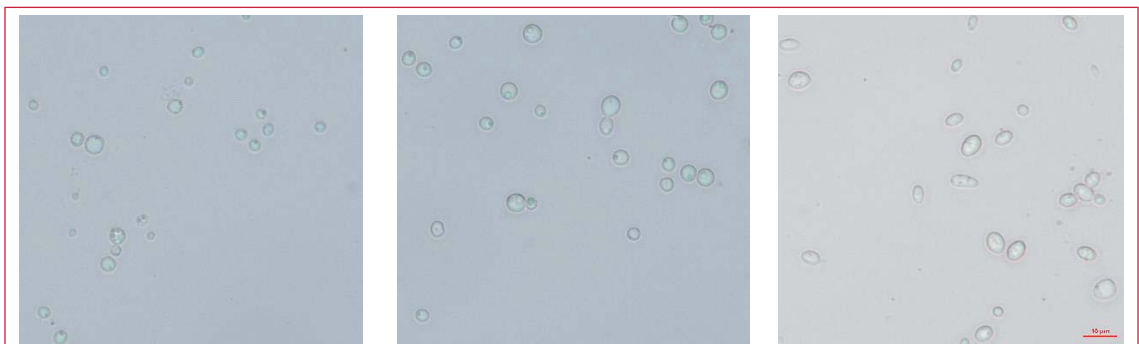
Saccharomyces ludwigii TUM SL17 kam als bekannte Referenzhefe zur Herstellung alkoholfreier Biere zum Einsatz. Um einen möglichen Einfluss von Hopfenaromen auszuschließen, wurde für die Kleingärversuche ungehopfter Malzextrakt (Weyermann®, Bamberg) eingesetzt, der auf 7 °P verdünnt wurde. Nach der Propagation wurden in Dreifachbestimmungen Kleingärversuche mit 1,8 Litern in 2-l-Schott-Flaschen mit rund 15×10^6 Zellen/ml angestellt und mit Glasgäaraufsätzen verschlossen. Nach einer drucklosen Gärung über sechs Tage bei einer Temperatur von 20 °C wurden die Ansätze gespundet und auf 3 °C gekühlt. Die Analyse von Stammwürze, scheinbarer Ver-

gärungsgrad, Alkoholgehalt und pH-Wert erfolgte nach weiteren drei Tagen.

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass sowohl die drei Versuchsbiere als auch das Referenzbier bei einer Stammwürze von 7 °P und einer Fermentationsdauer von sechs Tagen bei 20 °C einen maximalen Alkoholgehalt von 0,5 Vol.-% aufweisen, sodass die Hefen aus technologischer Sicht durchweg zur Produktion alkoholfreier Biere tauglich sind. Die drei Versuchshefen weisen sogar lediglich Alkoholgehalte von 0,3–0,4 Vol.-% auf, was Spielraum für ein potentiell Anheben der Stammwürze gibt. Dies würde nicht nur die Vollmundigkeit des Bieres erhöhen, sondern könnte ebenfalls zu einer Intensivierung der Aromen im Bier beitragen. Auffällig ist, dass

die pH-Werte der fertigen Biere zwischen 4,6 und 4,9 liegen. Somit wäre eine Sauergutgabe zu Beginn des Fermentationsprozesses hilfreich, um den pH-Wert zu optimieren (Ziel-pH 4,5 oder niedriger).

Um die Aromaeigenschaften der alkoholfreien Biere herauszufinden, wurde eine Profilierung mithilfe einer deskriptiven Verkostung durch zehn DLG-zertifizierte Panellisten vorgenommen. Die von den Verkostern genannten Geruchs- und Geschmacksattribute wurden in der Auswertung zusammengefasst, die am häufigsten genannten Begriffe priorisiert und kategorisiert. Die Aromaprofile in Abbildung 3 stellen die Attribute prozentual nach Nennung der Verkoster dar.

**Abb. 2 V.li.: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Hefestämme *Cyberlindnera misumaiensis* TUM 238, *Cyberlindnera saturnus* TUM 247 sowie *Kluyveromyces marxianus* TUM 653**

ANALYSEN-MITTELWERTE DER BIERE, DIE MIT DEN HEFEN TUM SL17, TUM 238, TUM 247 UND TUM 653 VERGOREN WURDEN

Hefestamm	TUM SL17	TUM 238	TUM 247	TUM 653
Stammwürze (Gew.-%)	7,0	7,0	7,0	6,9
Vergärungsgrad (%)	14,0	8,9	10,0	10,5
Alkoholgehalt (Vol.-%)	0,5	0,3	0,4	0,4
pH-Wert	4,9	4,6	4,8	4,6

Tab. 1

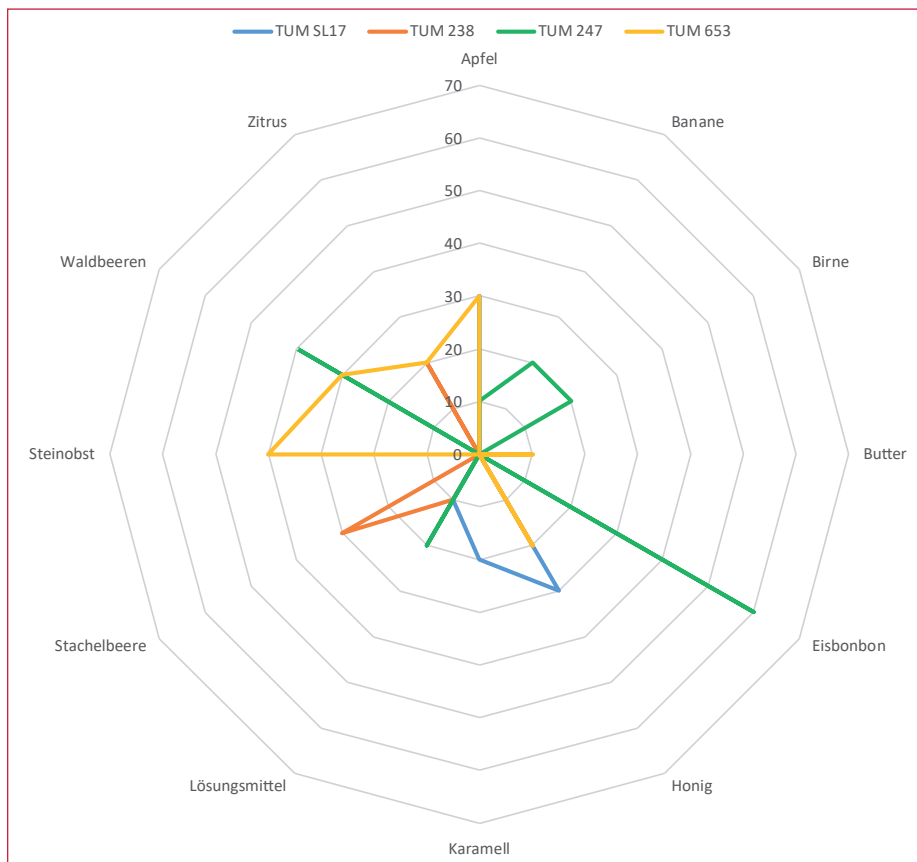


Abb. 3 Aromaprofile der mit TUM SL17, TUM 238, TUM 247 sowie TUM 653 fermentierten alkoholfreien Biere; Stammwürze jeweils 7 °P, Gärtemperatur 20 °C (n = 10)

SENSORISCHE AUSWERTUNG NACH DLG-VERKOSTUNGSSHEMA*

Probenbezeichnungen	DLG-Gesamtnote
Alkoholfreies Bier TUM SL17	4,2
Alkoholfreies Bier TUM 238	4,1
Alkoholfreies Bier TUM 247	4,5
Alkoholfreies Bier TUM 653	4,4

* unter Vernachlässigung der Merkmale Rezenz sowie Qualität der Bittere

Tab. 2

Anhand der Aromaprofile wird deutlich, dass sich die vier alkoholfreien Biere durch sensorische Vielfalt auszeichnen. Während das mit *Cyberlindnera misumaiensis* TUM 238 hergestellte Bier hauptsächlich an Stachelbeere erinnerte, wies das Bier mit *Cyberlindnera saturnus* TUM 247 ein ausgeprägtes Aroma von Eisbonbon auf, welches durch die Aromen Waldbeere, Birne und Banane abgerundet wurde. Auch ein lösungsmittelartiges Aroma wurde von 20 Prozent der Verkoster wahrgenommen. Der Hefestamm *Kluyveromyces marxianus* TUM 653 erzeugte Aromen, die im fertigen Bier an Apfel, Waldbeeren, Steinobst und Honig erinnerten. Zwar konnten die Aromasubstanzen Honig und Apfel auch im Referenzbier, das mit *Saccharomyces ludwigii* TUM SL17 fermentiert wurde, wiedergefunden werden, allerdings wurden diese durch eine Karamellnote ergänzt. Somit überzeugten die alkoholfreien Biere durch ihre fruchtige Vielfalt.

Neben den Aromaprofilierungen fanden auch Verkostungen nach DLG-Schema statt. Aufgrund der drucklosen Gärung und der ungehopften Würzebasis wurden Rezenz und Qualität der Bittere im Rahmen der Bewertung vernachlässigt. Beurteilt wurden Geruch, Reinheit des Geschmacks und Vollmundigkeit. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Vor allem die alkoholfreien Biere, die mit *K. marxianus* TUM 653 und *C. saturnus* TUM 247 hergestellt wurden, erhielten mit DLG-Gesamtnoten von 4,4 sowie 4,5 im direkten Vergleich sehr gute Bewertungen. Obwohl das TUM 247-Bier im Rahmen der Aromaprofilierung von 20 Prozent der Verkoster als lösungsmittelartig beschrieben wurde, fällt dies nicht als Fehl aroma ins Gewicht. Auch die leicht süßlich-buttrige Note des TUM 653-Bieres steht dem alkoholfreien Bier und hinterlässt keinen negativen Aromaeindruck. Mit einer DLG-Gesamtnote von 4,1 schnitt jedoch auch das alkoholfreie Bier hergestellt mit TUM 238 gut ab und unterschied sich kaum von der DLG-Gesamtnote 4,2 des Referenzbieres (TUM SL17).

Was bringt die Zukunft?

Kurz gesagt, ist das Spektrum zur Herstellung von alkoholfreien Bieren mittels Maltose-negativen Hefen quasi unbegrenzt. Die meisten Hefearten in der Natur sind Maltose-negativ, da Maltose ein relativ seltener Zucker in der Natur ist. Zudem liefern die meisten Hefearten, die Bierwürze fer-

mentieren, akzeptable bis sehr ansprechende Aromaprofile. Das Forschungszentrum WeihenstephanBLQ hat in dieser Arbeit nur drei neuartige Kandidaten ausgewählt, mit denen schon erfolgreich alkoholfreie Biere hergestellt wurden. Einzelne von ihnen laufen bereits in der industriellen Praxis.

Das Charmante an dieser Technologie ist, dass sie sich nicht nur auf alkoholfreie Biere anwenden lässt, sondern sich ebenfalls zur Herstellung von alkoholfreien malzbasierten Getränken eignet. Die resultierenden Biere lassen sich ebenso zu einer Art Bier-Cuvée verschneiden, um Aromaeindrücke zu vermischen oder zu betonen; erfolgreiche Mischgärungen wurden auch schon durchgeführt. Aktuell sind zwei neuartige Hefen ins Programm aufgenommen worden, die POF-(phenolic-off flavor) positiv sind, d. h. die das Weizenbier-typische 4-Vinylguajakol produzieren und somit für alkoholfreie Weizenbiere hervorragend eingesetzt werden können.

Wir werden sehen, was die Zukunft in den Brauereien bringt; fest steht jedoch, dass die Natur noch eine unbegrenzte Auswahl an Hefen bereithält. Es ist zudem anzumerken, dass vor der Erfindung der Hefereinzucht durch Emil Christian Hansen und Paul Lindner solche „Fremdhefen“ schon immer in der Mischpopulation zum Bieraroma und zum „Hausgeschmack“ beitragen. Zunächst schilderten Lindner und Delbrück nach Erfindung der Hefereinzucht die Biere als „leer und neutral“ [11, 12, 13]. Es fehlte das „Beiwerk“. Nun ist die Zeit wieder da, um kontrolliert und mit Wissen „Hefe-Beiwerk“ den Brauereien zur Verfügung zu stellen und um einen kontrollierten Hausgeschmack zu erzeugen. Dies gilt sowohl für den alkoholfreien als auch für den alkoholhaltigen Biersektor. ■

■ Literatur

1. Haehn, H.; Glaubitz, M.: Beer manufacture. USA patent application, 1933.
2. Kunz, T.; Methner, E.-J.: Verfahren zur Herstellung eines Getränkes. German patent application EP2382303A1, 2009.
3. Meier-Dörnberg, T.; Schneiderbanger, H.; Jacob, E.; Hutzler, M.: „Alcohol-free wheat beer with maltose negative yeast strain *Saccharomyces ludwigii*“; Poster Nr. P.3.5., 3rd Young Scientists Symposium Brewing & Distilling, Gent (Belgien), 2014; verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/307992436_Alcohol-Free_Wheat_Beer_with_Maltose_Negative_Yeast_Strain_Saccharomyces_ludwigii
4. De Francesco, G.; Turchetti, B.; Sileoni, V.; Marconi, O.; Perretti, G.: „Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer“, J. Inst. Brew., 121 (2015), S. 113–121.
5. Pahl, R.: „Modern production of alcohol free beers for varying breweries and beer styles“; 12th Trends in Brewing, Gent (Belgien), 3.–7.4.2016.
6. Parise, A.; Kovaleva, E. G.; Glukhareva, T. V.; Shatunova, S. A.: „Biotechnological production of non-traditional beer“; AIP Conference Proceedings 1886, 020098 (2017) <https://doi.org/10.1063/1.5002995>
7. Gutiérrez, A.; Boekhout, T.; Gojkovic, Z.; Katz, M.: „Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages“; J. Inst. Brew., 124 (2018), S. 389–402.
8. Callejo, M. J.; García Nava, J. J.; Alba, R.; Escott, C.; Loira, I.; González, M. C.; Morata A.: „Wort fermentation and beer conditioning with selected non-*Saccharomyces* yeasts in craft beers“; J European Food Research Technology, 245 (2019), S. 1229–1238.
9. Vašítek, P.; Šmogrovi ová, D.; Kafková, V.; Sulo, P.; Furdíková, K.; Špánik, I.: „Production and characterisation of non-alcoholic beer using special yeast“; Kvasny Prumysl, 66 (5), 2020, S. 336–344; <https://doi.org/10.18832/kp2019.66.336>
10. Methner, Y.; Hutzler, M.; Matoulková, D.; Jacob, E.; Michel, M.: „Screening for the Brewing Ability of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts“; Fermentation, 5 (4), 2019, S. 101; DOI: 10.3390/fermentation5040101
11. Meußdoerffer, E.: „A Comprehensive History of Beer Brewing“; in: Eßlinger, H. M. (ed.), Handbook of Brewing Processes, Technology, Markets; Wiley-VCH Weinheim, 2009.
12. Meußdoerffer, E.; Zarnkow, M.: Das Bier, Eine Geschichte von Hopfen und Malz; C. H. Beck, München, 2016.
13. Teich, M.: Bier, Wissenschaft und Wirtschaft in Deutschland 1800–1914. Ein Beitrag zur deutschen Industrialisierungsgeschichte; Böhlau, Wien, 2000.