

## 1. Einleitung und Begriffsbestimmungen

In den Brauereibetrieben ist zu den technologisch erforderlichen Zeiten die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Anstellhefe, die den Qualitätsanforderungen für die Herstellung eines den Marktanforderungen entsprechenden Bieres entspricht, zu gewährleisten, eine entscheidende Voraussetzung für die Wirtschaftlichkeit und die Qualitätssicherheit des Bierherstellungsprozesses.

Um die in den letzten Jahrzehnten enorm gestiegenen Anforderungen an die Bierqualität zu erfüllen, insbesondere an die biologische, kolloidale, sensorische und die Schaumhaltbarkeit sowie an die Reinheit des Geruches und Geschmackes und besonders an die Geschmacksstabilität auch noch am Ende einer Haltbarkeitsgewährleistung von 6...12 Monaten, ist auch eine Veränderung des betrieblichen Hefemanagements erforderlich. Es werden höchste Anforderungen an die Qualität der Betriebshefe, insbesondere an die biologische Reinheit und den physiologischen Zustand jedes zum Anstellen verwendeten Hefesatzes gestellt, die weit über den Anforderungen der früheren Jahrzehnte liegen (siehe Kapitel 2). Im Gegensatz zur bisherigen Verfahrensweise stieg der Mengenbedarf an einer solchen Satzhefe mit den Qualitätsmerkmalen reiner, frisch geführter Reinzuchthefer an, da aus Sicherheitsgründen die Wiederverwendung der normalen Erntehefen sehr stark eingeschränkt wurde.

Der physiologische Zustand des verwendeten Hefesatzes wird mit den Begriffen „Lebensfähigkeit“ („viability“) und „Hefevitalität“ („vitality“) beschrieben.

Unter „viability“ versteht man in erster Linie den mit verschiedenen Analyseverfahren erfassbaren prozentualen Anteil an lebenden Zellen einer Hefeprobe.

Der Begriff „vitality“ charakterisiert die mit sehr unterschiedlichen Analysemethoden quantifizierbaren Stoffwechselaktivitäten der Hefeprobe (z. B. die Gärgeschwindigkeiten, das Säurebildungsvermögen, metabolische Aktivitäten, den ATP-Gehalt, den Gehalt an intrazellulären Reservestoffen) und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Stresszuständen.

Unter dem Begriff „Hefemanagement“ (Synonym „Hefewirtschaft“) fasst man in der Brauerei sämtliche Prozesse und Handlungen zusammen, die den Umgang mit der Betriebshefe betreffen. Sie beginnen mit der Stammauswahl und mit der Stammpflege im Labormaßstab und enden mit der Bierrückgewinnung aus der Überschusshefe und deren anschließender Entsorgung. Einen allgemeinen Überblick über die einzelnen Positionen des Hefemanagements in der Brauerei gibt Abbildung 1.

Die dominierenden Bestandteile eines Hefemanagements sind die Reinzucht des Hefestammes und die Propagation eines Hefesatzes.

Die „Reinzucht eines Hefestammes“ beginnt mit der Isolierung einer Einzellkultur, der schrittweisen, sterilen Vermehrung eines Hefestammes im Labor im Volumenbereich zwischen 5 mL und 20 mL, dann bis auf 50 L ansteigend. Die Überführung der niederen Stufe in die nächst höhere sollte im Verhältnis von 1 : 3 erfolgen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass sich die Hefe bei der Überführung in die nächst höhere Stufe in der logarithmischen Wachstumsphase befindet und verbleibt. In der Regel schließt sich der Isolierung eines neuen Klons seine Prüfung auf Gär- und Flockungseigenschaften, sowie die Bewertung des mit diesem neuen Stamm erzeugten Bieres an. Die weitere Vermehrung des ausgewählten Hefestammes erfolgt unter „sterilen Bedingungen“ im technischen Maßstab meist zweistufig in speziellen Hefereinzuchtanlagen, die im Volumenbereich zwischen 50...1000 L arbeiten. In kleineren und mittleren Betriebs-

größen kann der so vermehrte Hefestamm direkt als Hefesatz zum Anstellen einer betrieblichen Würzecharge verwendet werden.

Der in der Hefereinzuchtanlage vermehrte, kontaminationsfreie Hefestamm wird in Großbetrieben anschließend in einer Anlage für die „Hefepropagation“ schnell und unter technisch keimfreien Bedingungen so vermehrt, dass damit auch die anzustellende Würzelosgröße einer Großbrauerei (Sud, zylindrokonischer Tank) mit einer ausreichenden Hefekonzentration angestellt werden kann.

Eine für den großtechnischen Betrieb mit normalen Gärtanks oder modernen Gärgefäßen abgewandelte Hefepropagation ist das „Anstellen mit Kräusen“, d.h. der Vermehrung der Anstellhefe in der logarithmischen Wachstumsphase. Eine mit Reinzuchthefer angestellte Würzecharge wird im Hochkräusenstadium mit Hefekonzentrationen zwischen  $30 \dots 60 \cdot 10^6$  Zellen/mL mit frisch propagierter Anstellwürze so „verdünnt“, dass die Hefekonzentration im Bereich zwischen  $>10 \dots <30 \cdot 10^6$  Zellen/mL liegt. Je nach vorhandener Behältergeometrie wird die frische Anstellwürze einmal oder mehrmals „draufgelassen“ oder die Kräusen werden auf die neu anzustellenden Gärtanks entsprechend verteilt.

Die für eine Anstellwürzecharge benötigte und eingesetzte Hefemenge wird als „Hefesatz“ bezeichnet.

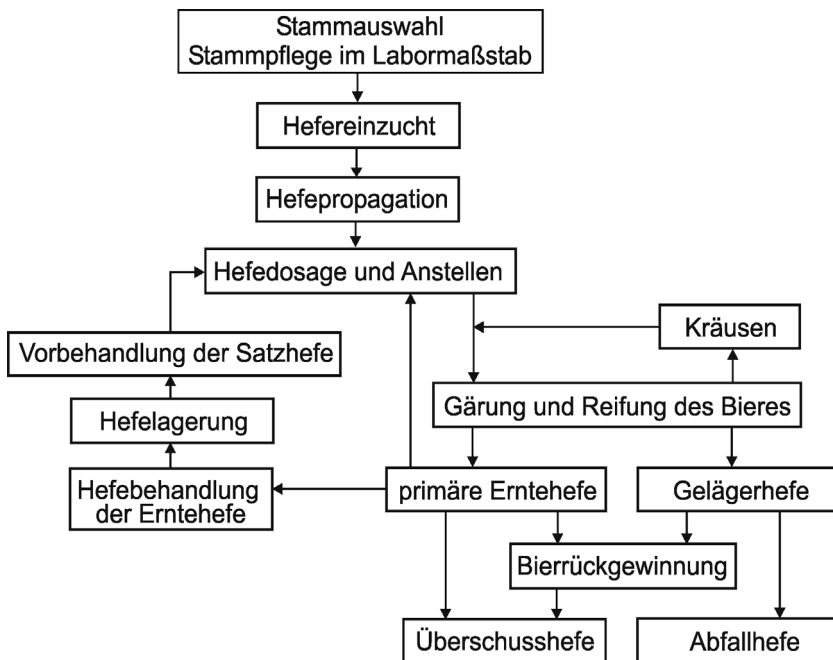


Abbildung 1 Positionen des Hefemanagements im Bierherstellungsprozess

Die in der Brauerei eingesetzten ober- und untergärigen Bierhefen gehören als Kulturhefestämme zur großen Gattung *Saccharomyces* (siehe Abbildung 2). Einen Kurzüberblick über die Systematik fasst Tabelle 1 zusammen. Die Namensveränderungen im Verlauf des letzten Jahrhunderts sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Bezeichnung „untergärige“ und „obergärige“ Hefe beruht auf dem Verhalten dieser Hefen am Ende der Hauptgärung in einem offenen Gärbottich. Obergärige Hefen bilden größere, feste Sprossverbände, die durch ihre große Oberfläche bedingt, durch

die aufsteigenden CO<sub>2</sub>-Blasen an die Oberfläche des gärenden Bieres getragen werden. Sie bilden den so genannten Hefetrieb, deshalb „obergärig“. Sie werden in diesen offenen Bottichen auch ober-schichtig geerntet. Die untergärigen Bierhefen besitzen im gärenden Substrat meist nur eine Sprosszelle, von der sich die Mutterzelle bald trennt. Am Ende der Hauptgärung lagern sich die meisten untergärigen Hefen zu Agglomeraten zusammen und sinken auf Grund ihrer Masse auf den Boden des Gärgefäßes, deshalb „untergärig“. Sie werden im offenen Gärbottich erst nach dem Schlauchen des Jungbieres in das Lagergefäß geerntet.

In hohen zylindrokönischen Gärtanks werden die obergärigen Sprossverbände durch die große Turbulenz im Gärtank auch zerstört, so dass die Einzelhefen auch als Agglomerate zum Boden sinken und aus dem ZKT wie untergärige Hefen geerntet werden können.

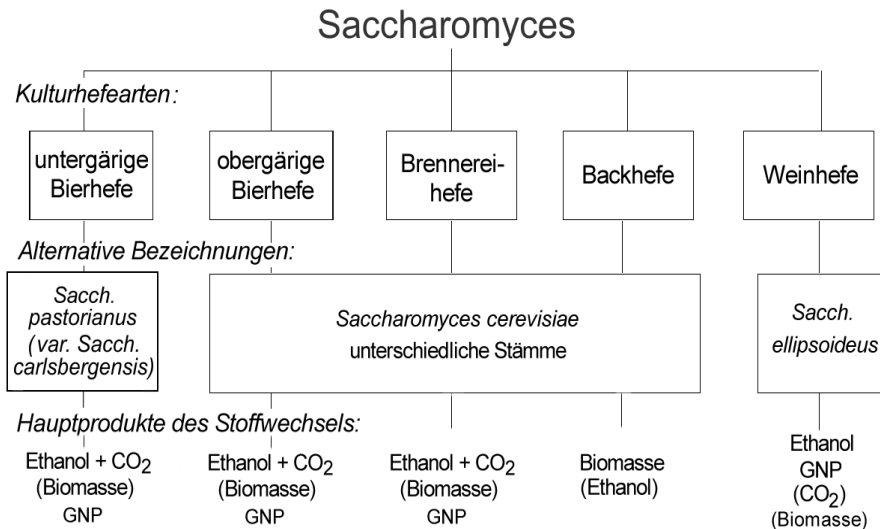


Abbildung 2 Die Kulturhefen der Gärungs- und Getränkeindustrie (GNP = Gärungsnebenprodukte)

Tabelle 1 Die Kulturhefen der Gärungs- und Getränkeindustrie, zugehörig zu *Saccharomyces cerevisiae*

Begriff	lat. Begriff	
Reich	<i>Regnum</i>	Pflanzenreich
Abteilung	<i>Divisio</i>	<i>Fungi; Eumycota</i> = echte Pilze
Klasse	<i>Classis</i>	<i>Ascomycetes</i> (Schlauchpilze)
Ordnung	<i>Ordo</i>	<i>Endomycetales</i>
Familie	<i>Familia</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>
Gattung	<i>Genus</i>	<i>Saccharomyces</i> (Zuckerpilze, Sprosspilze,
Art *)	<i>Species</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

\*) auf eine weitere Untergliederung der Art in Heferasen und Hefestämme wird verzichtet

Tabelle 2 Unterschiede zwischen ober- und untergäriger Brauereihefe

Qualitätskriterium	Untergärige Brauereihefe	Obergärige Brauereihefe
Größe, Form u. Zellinhalte der Einzelzelle unter dem Mikroskop	keine Unterschiede	
Bildung von Sprossverbänden im Gärsubstrat u. Agglutinationsvermögen	lockere, nur wenige Zellen umfassende Sprossverbände; weniger starkes Agglutinationsvermögen	bildet am Ende der Gärung Sprossverbände von 8 bis 10 Zellen; kein Agglutinationsvermögen
Verhalten am Ende der Hauptgärung im offenen Gärbottich	ballt sich zusammen und setzt sich im Normalfall, mehr oder weniger stark ausgeprägt, am Boden ab	steigt im Normalfall nach oben (CO <sub>2</sub> -Auftrieb) und scheidet sich in der Gärdecke (Hefedecke) aus
Temperaturempfindlichkeit	Ver mehrt sich und gärt auch bei niederen Temperaturen (5...10 °C) noch sehr gut	empfindlich gegenüber Gärtemperaturen unter 10 °C, gärt im Normalfall im Temperaturbereich von $\vartheta = 12...25$ °C, sedimentiert bei niedrigen Temperaturen
Maximale Wachstumstemperatur [3]	$\vartheta_{\max} = 31,6...34,0$ °C	$\vartheta_{\max} = 37,5...39,8$ °C
Optimale Wachstumstemperatur [3]	$\vartheta_{\text{opt}} = 26,8...30,4$ °C	$\vartheta_{\text{opt}} = 30...35$ °C
Bildung von Gärungsnebenprodukten	untergärige Biere sind im Normalfall deutlich weniger fruchtig u. aromatisch im Bukett	deutlich höhere Nebenproduktbildung bei höheren Alkoholen, einigen Estern, flüchtigen Phenolen u. Schwefelverbindungen
Sporenbildungsvermögen	besitzt nur ein geringes Sporenbildungsvermögen, erfolgt erst nach 72 h nach Ausbringung auf den Gipsblock	sporulationsfreudiger, höherer Anteil sporenbildender Zellen, bereits nach 48 h feststellbar
Raffinoseverwertung	vollkommene Raffinoseverwertung, besitzt sowohl das Enzym $\beta$ -h-Fruktosidase (Invertase) als auch das Enzym $\alpha$ -Galactosidase (Melibiase)	besitzt nicht das Enzym $\alpha$ -Galactosidase, verwertet Raffinose nur zu einem Drittel, kann Melibiose nicht verwerten
Atmungsaktivität in Glucose (0,3 %) limitierten Medien	sehr schwache Atmungsaktivität	größere Atmungsaktivität
SO <sub>2</sub> -Bildung	bildet mehr S-Verbindungen; SO <sub>2</sub> > 4 mg/L	bildet weniger S-Verbindungen, SO <sub>2</sub> < 2 mg/L
Weitere Differenzierungsmöglichkeiten	ober- und untergärige Hefestämme lassen sich weiterhin durch genetische, elektro phoretische, immunologische u. enzymatische Methoden differenzieren	

### 1.1 Probleme der Systematik

Alle Kulturhefen der Gärungs- und Getränkeindustrie gehören nach der jetzigen Systematik und genetischen Untersuchungen der Gattung *Saccharomyces* an. Die Brauereitechnologen hatten lange die untergärige Brauereihefe als eigene Art geführt und darauf hingewiesen, dass sich die obergärigen von den untergärigen Brauereihefestämmen sehr deutlich unterscheiden. Die Unterscheidung der Hefen in untergärige und obergärige erfolgt auf Grund ihrer unterschiedlichen physiologischen, morphologischen und gärungstechnologischen Unterschiede, wie der Vergleich in Tabelle 2 zeigt.

Die Einteilung der untergärigen Brauereihefe als eigene Art *Saccharomyces carlsbergensis* wird durch neuere Untersuchungen von J. Hansen und anderen gestützt [4], [5], [6]. Sie haben durch Homologieuntersuchungen am Genom der untergärigen Bierhefen festgestellt, dass dieser Mikroorganismus wahrscheinlich aus der Verschmelzung der zwei verschiedenen Hefearten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces monacensis* entstanden ist.

Eine andere Forschungsgruppe definierte auf Grund ihrer PCR-Analysen die untergärigen Brauereihefen als Hybriden der Hefearten *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces bayanus* / *Saccharomyces pastorianus* (einen Überblick gibt [7]).

Die untergärige Bierhefe scheint in jedem Fall eine Arthybride und nicht mit *Saccharomyces cerevisiae* identisch zu sein.

In der Brauerei werden die untergärige Bierherstellung und die untergärigen Hefen sowie die obergärige Bierherstellung und die obergärigen Hefen bei einem Gemischtbetrieb sehr streng räumlich, technologisch und verfahrenstechnisch getrennt. Zu den untergärigen Bieren gehören u.a. die Export- und Pilsener-Biere, Märzen- und Bockbiere, zu den obergärigen das Altbier, das Kölsch, die Weizen- oder Weißbiere.

Folgende Bezeichnungen waren ausgehend von den grundlegenden Arbeiten von E. Chr. Hansen [8], (siehe auch Kapitel 2) im zwanzigsten Jahrhundert für die untergärige Brauereihefe gültig (Tabelle 3):

Tabelle 3 Veränderungen der Bezeichnungen für untergärige Brauereihefe

Name	Jahr	Bezeichnung
Meyen (ref. d. [9])	1836	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Hansen [10]	1908	<i>Sacch. carlsbergensis</i>
Kudrjawzew [11]	1960	<i>Sacch. uvarum</i>
Lodder [12]	1970	<i>Sacch. uvarum</i>
Barnett, Payne u. Yarrow [13]	1983	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Pedersen [14]	1988	<i>Sacch. carlsbergensis</i>

Die untergärige Bierhefe, in der englisch-sprachlichen Fachliteratur als „Lagerhefe/-Lagerbierhefe“ bezeichnet, ist in ihrer Vielfalt der in der Brauindustrie verwendeten Stämme eine Hybride von *Saccharomyces cerevisiae* und anderen *Saccharomyces*-Arten mit ähnlichem Aromaprofil (wie z. B. *Sacch. pastorianus*, *Sacch. uvarum*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. eubayanus* u.a.).

Es wurde in neuerer Literatur [15] die Hefe *Saccharomyces eubayanus* aus Patagonien beschrieben, die mit ihrem Erbgut unseren untergärigen Hefen das Gärvermögen bei kühleren Temperaturen ( $\vartheta = 8...15\text{ °C}$ ) verliehen hat.

Weiterhin besitzen die untergärigen Lagerbierhefen das FSY 1-Gen, das den Fructosetransport in die Hefezelle kodiert und in obergärigen Ale-Hefen nicht nachgewiesen wurde (l. c. [16]).

Auf Grund der genetischen Verwandtschaft wird die untergärige Brauereihefe/ Lagerbierhefe jetzt als *Saccharomyces pastorianus* (oft mit dem klärenden Zusatz var. *Sacch. carlsbergensis*) definiert.

Die Herkunft der Bezeichnungen für die untergärige Brauereihefe sind folgenden Wortstämmen entlehnt:

- cerevisiae* ⇒ cerevisia ⇒ cerves(i)a, cervesa (keltisch) = Bier
- uvurum* ⇒ uva (lateinisch) = Traube (von *Beijerinck* 1898 aus Fruchtsaft isoliert)
- carlsbergensis* ⇒ bezieht sich auf die Carlsberg-Brauerei Kopenhagen

## 1.2 Heferasen und -stämme

Zu einer Kulturheferasse gehören die zahlreichen Kulturhefestämme der Industriezweige der Gärungs- und Getränkeindustrie bzw. für einzelne spezielle Produkte.

Dabei kann der Kulturhefestamm eines Zweiges oder für ein bestimmtes Produkt gleichzeitig ein gefürchteter Kontaminant für einen anderen gärungstechnologischen Zweig bzw. für ein anderes Gärungsprodukt darstellen.

Die Herausbildung der unterschiedlichen Kulturhefestämme erfolgte bis zum neunzehnten Jahrhundert durch natürliche Selektion. Am Ende des 19. Jahrhunderts war es das Verdienst von Emil Christian Hansen, die methodischen Grundlagen für die Züchtung eines Hefestammes aus einer einzigen Zelle geschaffen zu haben, die die Voraussetzungen für eine gezielte Selektion einschließlich der Hefereinzüchtung wurden (s.a. Kapitel 2).

Im zwanzigsten Jahrhundert wurden durch wissenschaftliche Selektionen, durch Kreuzung und Mutation neue Hochleistungshefestämme gezüchtet. Dabei gab es für die Hefestammauswahl, je nach dem Verwendungszweck und den technologischen Anforderungen des jeweiligen Anwenders, unter anderem folgende Zielstellungen für einen Hefestamm wie:

- Hoch- oder niedrigvergärend (Maltotrioseverwertung);
- Mehr Gär- oder mehr Wuchshefe;
- Staub- oder Bruchhefe;
- Verringerung der Temperaturempfindlichkeit;
- Erhöhung der Ethanoltoleranz (wichtig für die Ethanol- und Weinindustrie und Starkbierproduktion);
- Raffinoseverwertung (wichtig für die Rohrzuckermelasseverarbeitung);
- Erhöhung der Osmotoleranz (wichtig für Backhefe in zuckerreichen Teigen).

Nach der Komplettssequenzierung des Hefegenoms Ende des zwanzigsten Jahrhunderts (siehe auch Kapitel 4.4.2) wurden die ersten Hefestämme durch die genetischen Veränderungen des Erbgutes außerhalb der Hefezelle und unter anderem durch das Einschleusen hefefremder Gensequenzen in die Hefezelle mit völlig neuen Eigenschaften gezüchtet.

Diese so genannten *genmanipulierten* Hefestämme (GMO) werden bis jetzt auf Grund der noch immer vermuteten Risiken in der deutschen Brauindustrie *nicht* eingesetzt.