

K.-J. Hutter, C. Kliem, F. Nitzsche und M. Wießler

Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren

IX. Mitteilung: Trehalose – Stressprotektant der *Saccharomyces*-Hefen

In der Praxis der Brauerei ist es u.a. von Bedeutung, in welchem Stadium ihres Zellzyklus die Hefe unter Stresssituationen Trehalose als Protektivum bildet. Es fehlt bisher an Nachweismethoden, die Trehalosekonzentration (möglichst on-line) zu bestimmen, um Modellierungen des Prozesses bzw. des Hefemanagements durchführen zu können. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, das Spektrum der physiologischen Analysen durch eine schnelle, direkte fluoreszenzoptische Detektion der Trehalose zu erweitern. Eine Temperaturerhöhung während exponentiell wachsender Hefezellen bewirkte eine sofortige Trehaloseakkumulation der Hefezellen, die parallel mit der HPLC- und der fluoreszenzoptischen Analyse nachgewiesen wurde.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeführung

(Desriptoren: Hefe, Flusszytometrie, Trehalose, Stressfaktoren).

Descriptors: Yeast, flow cytometry, trehalose, stress factors).

1 Problemstellung

Prozessstörungen stellen einen wesentlichen Kostenfaktor für die Brauwirtschaft dar. Die Möglichkeiten der konventionellen Gärungskontrolle sind hier an ihre Grenzen gelangt. In der Brauereitechnologie wird dies durchaus erkannt und mit dem Begriff Hefemanagement umschrieben. Dieser Begriff ruft aber die Assoziation hervor, dass bereits die effizientesten Verfahren zur Hefebehandlung eingesetzt werden, um Hefepopulationen zu führen. Dies ist nicht der Fall. In der Praxis gibt es z.Z. keine Verfahren, die die physiologischen Zustände einzelner Hefezellen berücksichtigen. Der physiologische Zustand der einzelnen Zelle ist aber Grundbedingung, um den Begriff des Hefemanagements zu rechtefertigen.

Ein geeignetes Biomonitoring zum besseren Verständnis des Hefeführens und des Produktionsablaufes, also dessen Kontrolle bzw. dessen Steuerung, wäre dringend erforderlich. Dies würde bedeuten, dass man die Hefe während der Zwischenlagerung über die Herführung bis zum abfüllreifen Bier mit neuen Verfahren aus der bildverarbeitenden Analytik (Fluoreszenzmikroskopie, Laserscanning-Mikroskopie), der Molekularbiologie (PCR, *in situ*-Hybridisierung, Gensondentechnik) und der elektronischen Zytometrie (Flusszytometrie, fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, Cell Analysing System) begleitend untersuchen muss. Dabei ist unerheblich, ob die Hefepopulation einmal oder mehrmals geführt wird.

Allein das Herführen, Umsetzen und Zeuggeben sollte bei optimalen Zellzyklusbedingungen erfolgen und muss daher permanent on-line analysiert werden. Daher ist es zur Optimierung des Hefemanagements notwendig, die für den jeweiligen Betrieb optimalen Bedingungen durch ein intensives Beobachten der physiologischen Zustände der Hefezellen herauszuarbeiten.

Autoren: Prof. Dr.-Ing. habil. K.-J. Hutter, Friedrichstaler Str. 2b, D-76676 Graben-Neudorf; Dr. C. Kliem und Prof. Dr. M. Wießler, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Molekulare Toxikologie (C0300), Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg; Dr. F. Nitzsche, König Brauerei GmbH, Friedrich-Ebert-Str. 255-263, D-47139 Duisburg

In vorangegangenen Publikationen wurde schwerpunktmäßig der physiologische Zustand der einzelnen Zelle während des Gärprozesses untersucht (Hutter *et al.*, 1995, 1996a, 1996b, Hutter und Müller, 1996) und brachte viele neue Erkenntnisse bezüglich des Wachstums, der Vermehrung und des physiologischen Zustandes der Hefezellen.

In der Brauereiliteratur wird in den letzten Jahren immer häufiger über Stressfaktoren bei Hefen der Gattung *Saccharomyces* während der Herführung, Proliferation, Lagerung und der anaeroben Gärung berichtet. Es ist daher von Bedeutung, in welchem Stadium ihres Zellzyklus die Hefe unter Stresssituationen Trehalose als Protektivum bildet. Es fehlt bisher an Nachweismethoden, die Trehalosekonzentration (möglichst on-line) zu bestimmen, um Modellierungen des Prozesses bzw. des Hefemanagements durchführen zu können.

Ziel dieser Untersuchungen war, das Spektrum der physiologischen Analysen durch eine schnelle, direkte fluoreszenzoptische Detektion der Trehalose zu erweitern.

2 Einleitung

Im 19. Jahrhundert wurde der Zucker Trehalose in Europa unter dem Begriff „Trehala Manna“ bekannt. Trehalose ist ein Disaccharid, das in nicht-reduziertem Zustand vorliegt. Es besitzt einen süßen Geschmack. Dieses Disaccharid wurde bisher in Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen, Insekten und anderen Vertebraten nachgewiesen. In Mikroorganismen, besonders in ihren Überdauerungsformen, den Sporen, findet man häufig eine Akkumulation der Trehalose.

In Wirbeltieren konnte α,α -Trehalose nicht gefunden werden (Schmutz, 1988).

Küenzi und Fiechter (1972) fanden eine Erhöhung der Trehalosekonzentration bei begrenztem Glucoseangebot während der kontinuierlichen Kultivierung.

Lillie und Pringle (1980) differenzierten dieses Ergebnis. Kurz vor der Erschöpfung der Glucose war zunächst eine Erhöhung des Glykogengehaltes und später nach Verbrauch der Glucose eine Trehaloseakkumulation festzustellen. Bei ungünstigen Wachstumsbedingungen, wenn die Glucose verbraucht ist, verstoffwechseln die Hefezellen zunächst das gespeicherte Glykogen. Anschließend wird laut Lillie und Pringle (1980) Trehalose mo-

bilisiert. Gleichzeitig sterben viele Hefezellen ab. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass der Trehalose eher eine Schutzfunktion zukommt als der Einlagerung eines zusätzlichen Reservestoffes, den die Zelle in ungünstiger Wachstumssituation mit Kohlenhydraten mobilisieren kann.

Das Vorhandensein von Trehalose in Hefezellen wurde daher in den frühen Untersuchungen als Reservestoff gewertet. Erst *Thevelein et al.* (1984) bezeichneten das Kohlenhydrat als Stressprotektant für das Cytosol der Hefezellen. Man hatte festgestellt, dass nach Hitzebehandlung bei 45°C eine Anhäufung von Trehalose nachzuweisen ist (*Hottiger et al.*, 1987). Bei nachfolgenden Hitzestresssituationen wurden die Zellen durch akkumulierte Trehalose in den Zellen geschützt. Bei diesem Temperaturstress musste im Nährmedium allerdings Glukose vorhanden sein.

Attfield (1987) betonte, dass Trehalose nicht nur als Protektant während eines Hitzestresses, sondern auch zum Schutz der Membran vor Austrocknung bzw. beim Einfrieren angereichert wird.

Neves et al. (1991) betrachteten Trehalose einmal als Reservestoff für den frühen Zeitpunkt der Reifung, z.B. bei *Neurospora crassa*, zum anderen als Protektant bei der Erhitzung, der Austrocknung und pH Verschiebungen. Darüber hinaus werteten sie die Trehaloseakkumulation als Schutz gegen die Inhibierung anderer Umweltstresssituationen wie Einwirkungen von organischen Lösungen, von Oxidantien und bei Schwermetallintoxikationen. Für Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* schließen sie aber Trehalose als Kohlenstoffquelle und Reservestoff aus, betonen aber die Schutzfunktion des Disaccharids bei Hitze- und anderer umweltbedingter Stressfaktoren. Das Phänomen des Schutzes durch Trehalose ist reversibel, da Trehalose schnell abgebaut wird, sobald die Zellen wieder unter zellphysiologischen Bedingungen wachsen können.

Slaughter und *Nomura* (1992) untersuchten die Speicherung von Kohlenhydraten und Reservestoffen unter verschiedenen extremen Wachstumsbedingungen an *Saccharomyces cerevisiae* und kamen zu dem Schluss, dass Glycogen- und Trehalosegehalte Hinweise auf die Viability geben.

In der Zellkulturtechnik ist seit einiger Zeit Trehalose im Gespräch als Kryoprotektivum anstatt DMSO eingesetzt zu werden (hier: Kryokonservierung von peripheren Blutstammzellen (PBSZ) bzw. Knochenmark (KM)). DMSO-freie Kryokonservierungsverfahren könnten daher zu geringerer Toxizität für den Patienten und für die konservierten Zellen führen.

Die nachfolgenden Untersuchungen beschäftigen sich daher mit vergleichenden Trehalose-Untersuchungen anhand der HPLC-Analytik und der Flusszytometrie an Hefezellen nach Hitzeeinwirkung.

3 Materialien und Methoden

3.1 Trehalose-Analytik mit der Dionex-Anlage

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Methode war die gleiche wie für die Flusszytometrische Analyse. Die Zellen wurden in 70%iger Äthanollösung fixiert und in dieser Suspension weiter verarbeitet. Die HPLC Analysen wurden insgesamt zweimal wiederholt.

Die Analyse der Proben erfolgte mit einer Dionex-Anlage, d.h. die Analyse von Kohlenhydraten wurde durch Ionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion durchgeführt. Bei diesem Prinzip werden die sauren Kohlenhydratmoleküle deprotoniert (Eluent ist z.B. NaOH), anschließend über eine

Ionenaustauschersäule chromatographiert und dann elektrochemisch (gepulste Amperometrie) detektiert.

Als Säule wurde eine CarboPac, PA 10,4 mm, verwendet. Eluent: Wasser/1M NaOH = 50/50 isochratisch; Aufgabemenge: 25 ml der jeweiligen Lösungen.

3.2 Flusszytometrische Trehalose-Analyse mit dem Lectin: ConA-FITC

Der Trehalosegehalt wurde mit einem Lektin-Fluorochrom-Konjugat, ConA FITC, nachgewiesen. Lektine sind pflanzliche Mito gene, die an bestimmte Rezeptoren der Hefezelloberfläche binden. ConA bindet präferenziell an Rezeptoren für Glukose und Mannose.

Fixation: Hefezellen wurden über Nacht in 3,7% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C fixiert. Vor der Färbung wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert.

Färbung: 1ml fixierter Hefezellen wurde in PBS-Lösung gewaschen und anschließend in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert.

Zu dieser Hefesuspension wird Con A-FITC pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert.

Färbung der Zellen:

Stock Solution: 1mg Con A-FITC in 1ml steriler PBS lösen.

Gebrauchslösung: 10 ml aus der Stock Solution pro ml Zellsuspension, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend im PAS bei 488 nm analysieren. Die Emission des Fluoresceins wurde bei 525 nm gemessen.

3.3 Färbung des DNA- und Glykogengehaltes

Die Zellzyklusanalyse wurde nach der Methode von *Hutter* und *Eipel* (1978) nach RNase Digestion und Färbung mit dem interkalierenden Fluorochrom Propidium Jodid durchgeführt.

Der Glykogengehalt wurde mit Acriflavin nach Säurehydrolyse entsprechend der Methode von *Hutter et al.* (1999) fluoreszenzoptisch bestimmt.

3.4 Flusszytometer

Für die fluoreszenzoptische Detektion wurde ein Flusszytometer der Fa. Partec GmbH, Münster, verwendet. Dieses System ist mit einer HBO 100 und einem Argon-Ionen Laser ausgerüstet.

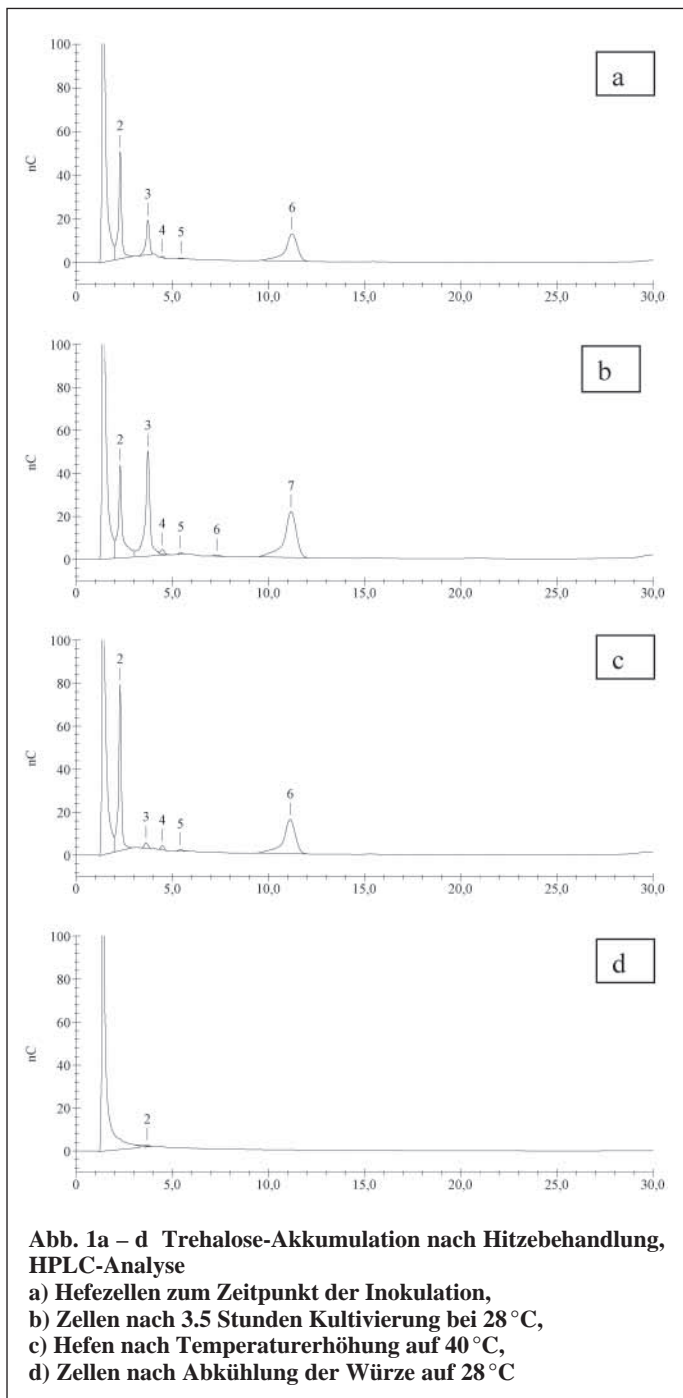
3.5 Versuchsablauf

Hefezellen waren bei 3°C gelagert worden. Diese Zellen stammten aus der 4. Führung und wurden in 28°C vorgewärmte sterile Würze inokuliert. Die Probenahme erfolgte kurz nach der Inokulation (a), nach 3,5 Stunden Kultivierung bei 28°C (b), kurz nach der Temperaturerhöhung auf 40°C (c) und schließlich nach der Abkühlung auf die ursprüngliche Wachstumstemperatur (d).

4 Ergebnisse

4.1 HPLC-Analyse des Trehalosegehaltes nach Temperaturerhöhung

Die Trehalose-Analytik der Hefeproben wurde mit einer Dionex-Anlage durchgeführt. Eine Zuordnung der Signale erfolgte bisher



nur für den Peak der Trehalose. Die Retentionszeit für Trehalose betrug ca. 2,2 Minuten. In der Abb. 1a – d war der Trehalose-Peak identisch mit der Bezeichnung 2. Nach der Inokulation (Abb. 1a) und kurz vor der Erwärmung der Population (Abb. 1b) auf 40 °C zeigte der Trehalose-Peak ein einheitliches Signal. Nach der Erwärmung auf 40 °C stieg die Peak-Höhe auf den doppelten Wert an. Eine Stunde nach der Erwärmung bei der Abkühlung der Suspension wieder auf 28 °C war keine Trehalose mehr nachzuweisen.

4.2 Fluoreszenzoptische Trehalosegehalts-Bestimmung nach Temperaturerhöhung

Nach Hitzebehandlung der Würze auf 40 °C kann sowohl mit der HPLC- als auch mit der fluoreszenzoptischen Analytik eine Trehaloseakkumulation nachgewiesen werden.

4.2.1 DNA-Gehalt pro Hefezelle

Da die Hefezellen aus der Hefelagerung bei 3 °C in 28 °C warme Würze inokuliert wurden, zeigte die Häufigkeitsverteilung der Abb. 2 in a) zunächst das typische Bild einer quieszenten Population. Die Zellen besitzen einheitlich niedrigen DNA-Gehalt (2n) einer untergärigen Hefepopulation.

Im Verlauf der Kultivierung gelangen immer mehr Zellen in die G₂- + M-Phase (Abb. 2 in b).

Zum Zeitpunkt der Temperaturerhöhung von 40 °C deutet bei der DNA-Gehalts-Bestimmung nichts darauf hin, dass der physiologische Zustand der Hefezellen sich verändert hat. Die intensive G₂- + M-Phase hält unvermindert in Abb. 2 in c) an.

Auch nach der Temperaturabsenkung findet man eine stark ausgeprägte exponentielle Wachstumsphase (Abb. 2 in d).

4.2.2 Glykogengehalt pro Hefezelle

Zum Zeitpunkt der Inokulation und der 3,5-stündigen Kultivierung bleibt die relative Fluoreszenzintensität des Glykogengehaltes konstant. Glykogen wird aber sofort eingelagert, sobald die Temperatur auf 40 °C erhöht wurde. Nach der Temperaturreduzierung durch Eiswürfel auf 28 °C bleibt der Glykogengehalt weiterhin erhöht.

4.2.3 Trehalosegehalt pro Hefezelle

In der Abb. 2 war der größte Teil der Zellen zum Zeitpunkt der Inokulation proliferationsinaktiv, d.h. die Trehalose in den Zellen war sicherlich bei der Kühlung des Jungbieres am Ende der Hauptgärung eingelagert worden. Da die Zellen in der 4. Führung bei 3 °C aufbewahrt wurden, bestand kein Anlass für die quieszenten Zellen, die Trehalose abzubauen. Bei 28 °C beginnen sich die Zellen in den 3,5 Stunden Kultivierung an die Nährsubstratbedingungen zu adaptieren. Da das Inokulat als dickbreiiger Satz gegeben wurde, befindet sich ein großer Teil der Zellen auch weiterhin in der proliferationsinaktiven Phase (viable but not culturable). Sobald die Temperatur in der Population auf 40 °C angehoben wurde, lagerten die proliferationsaktiven Zellen sofort Trehalose ein. Diese Akkumulation der Trehalose wurde aber ebenso schnell wieder rückgängig gemacht, nachdem die Zellen wieder bei Normaltemperatur kultiviert wurden.

4.2.4 Anzahl der Sprossnarben pro Hefezelle

Die Abb. 3a – d spiegeln die Altersstruktur der Hefezellen in der Population wieder. Das Alter einzelner Hefezellen korrespondiert mit der Anzahl fluoreszierender Sprossnarben.

Bei der Proliferation der Hefezellen werden auf der Zellwand nach jedem Zellzyklus, der mit der Geburt einer Sprosszelle endet, neue, zusätzliche Sprossnarben gebildet. Die Spross- und Geburtsnarben bestehen aus kraterähnlichen Chitin-Ringen, die nicht mehr elastisch genug sind, um in diesen Bereichen Zucker- und Gasaustausch zu gewährleisten. Je höher die Anzahl der Sprossnarben ist, desto geringer wird die verbleibende Zelloberfläche, durch die Gase und Zuckermoleküle transportiert werden können. (Streiblova und Beran, 1963). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor können präferenziell chitinhaltige Regionen auf der Hefezelloberfläche angefärbt werden (Hodgson et al., 1999).

In der Abb. 3a handelt es sich um quieszente Hefezellen, die eine geringe Fluoreszenzintensität besitzen.

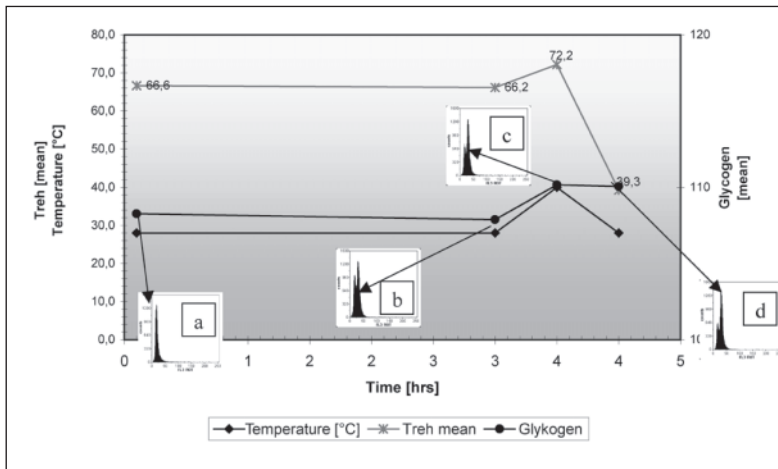


Abb. 2 Trehalose-Akkumulation nach Hitzebehandlung, fluoreszenzoptische Analyse.
Der Zellzyklus der Hefezellen:
 a) Zellen aus der Hefelagerung in der G_0 -/ G_1 -Phase, b)–c) Hefezellen in der exponentiellen G_2 -+M-Phase.
Der Trehalosegehalt (rel. Fluoreszenzintensität pro Hefezelle):
 a) 66.6 F.I.,
 b) 66.2 F.I.,
 c) 72.2 F.I.,
 d) 39.3 F.I.

	Sprossnarben Fluoreszenz	Peak Maximum	Mean of the Gaussian distribution	Kommentar
a)		3,1	44,21	Inokulation der Hefezellen aus der Lagerung in 28° C Würze
b)		4,4	52,83	Hefezellen wurden 3.5 Stunden bei 28° C kultiviert
c)		4,0	50,44	Erhöhung der Temperatur auf 40° C
d)		3,5	48,80	Reduzierung der Temperatur auf 28° C

Abb. 3 Trehalose-Akkumulation nach Hitzebehandlung, fluoreszenzoptische Analyse der Sprossnarbenzahl – Die Sprossnarben-Fluoreszenz von Hefezellen
 a) Zellen aus der Hefelagerung in der G_0 -/ G_1 -Phase, b) – c) Hefezellen in der exponentiellen G_2 -+M-Phase. Die relative Fluoreszenzintensität der Sprossnarben nimmt mit zunehmender Proliferation ab.
 Das bedeutet, dass in den exponentiellen Wachstumsphasen der Zellzyklus immer schneller abläuft und dadurch immer mehr juvenile Tochterzellen mit nur einer Geburtssprossnarbe gebildet werden.

Erst nachdem die Zellen nach 3.5 Stunden Kultivierung bei 28° C proliferationsaktiv geworden sind, zeigt sich, dass die sprossenden Zellen aufgrund ihrer Sprossnarben-Fluoreszenz relativ alt sind (Abb. 3b).

Die Hitzeeinwirkung führt dazu, dass sprossende Zellen „Notgeburten“ durchführen, so dass die Fluoreszenzintensität durch die erhöhte Zahl juveniler Tochterzellen abnimmt (Abb. 3c).

Dieser Effekt verstärkt sich (Abb. 3d) sobald die Zellen wieder bei normaler Wachstumstemperatur (28° C) kultiviert werden.

5 Diskussion

Eine Temperaturerhöhung während exponentiell wachsender Hefepopulation bewirkte eine sofortige Trehaloseakkumulation der Hefezellen, die parallel mit der HPLC- und der fluoreszenzoptischen Analyse nachgewiesen wurde. Die Aussage verschiedener Autoren konnte zumindest in dem Punkt bestätigt werden, dass *Saccharomyces*-Hefen bei Erhöhung der Temperatur auf 40°C einen Anstieg des Trehalosegehaltes innerhalb kürzester Zeit erfahren. Diese physiologische Veränderung einzelner Hefezellen während der kurzzeitigen Erhitzung kann mit der Zellzyklusanalyse nicht direkt erfasst werden. Offensichtlich handelt es sich um einen Schutzmechanismus der Zelle, der dieser Stresssituation durch die Bildung von Proteinen begegnet. In der Literatur werden diese Proteine auch als Heat Shock Proteins (HSP) bezeichnet. Die HSPs werden durch mehrere Gene aktiviert (Knippers, 1997).

Bei *Escherichia coli* werden 20 verschiedene Proteine synthetisiert, sobald die Wachstumstemperatur auf 45°C erhöht wird. Der starke Anstieg dieser Proteine wird aber sehr schnell wieder reduziert, wenn die Ausgangstemperatur von 30°C wieder erreicht wird. Solche Reaktionen finden nicht nur bei Temperaturerhöhungen, sondern auch bei Erhöhung des pH-Wertes, der Osmolarität, von UV-Strahlen, bei Ethanol-Zunahme und nach Schwermetallintoxikationen statt.

Der Hitzestress bewirkt nicht nur die Bildung von HSPs, sondern führt auch zu einer Retardierung des Zellzykluses (Knippers, 1997). In der Zellzyklusanalyse konnte diese Annahme in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden, da die Häufigkeitsverteilungen ein ausgeprägtes, exponentielles Wachstum zeigten. Allerdings ist zu vermuten, dass nach der Mitose, die Zellen zunächst in der G_1 -Phase verharren, bis die normale Wachstumstemperatur wieder eingestellt ist. Dies deutet durch die Untersuchungen der Altersstruktur mit Hilfe der Sprossnarben-Fluoreszenz hin. Sprossende Zellen beenden in Stresssituationen ihren Zellzyklus. In der Population liegen danach eine Vielzahl von jungen Hefezellen vor.

Die Stressantwort der Hefezellen auf Temperaturerhöhung bewirkt sicherlich eine Stabilisierung der Membran und eine Akkumulation von Glykogen und Trehalose. Während die Trehalose sofort nach Temperaturreduzierung wieder abgebaut wird, nimmt der Glykogenabbau offensichtlich längere Zeit in Anspruch.

Die vorliegenden Untersuchungen haben deutlich gezeigt, dass die Zellzyklusanalyse allein nicht ausreicht, um die physiologischen Veränderungen in einzelnen Hefezellen anzuzeigen. Die einzelne Zelle dieser niederen Eukaryonten unterliegen ähnlich den Säugetierzellen einem Schutzmechanismus gegen äußere Einflüsse bzw. Stresssituationen. Da im Brauprozess Situationen wie Temperaturerhöhung oder Kühlung des Bieres gesteuert werden, Veränderungen des pH-Wertes und Zunahme des Ethanolgehaltes aufgrund der Stoffwechselaktivität der Hefe erfolgen, kann dies natürlich zu einer permanenten Stressbelastung für die Hefezellen führen, d.h. da Gärung natürlicherweise Stress für die Hefezellen bedeutet, ist es wichtig beim Hefemanagement eine Minimierung zusätzlicher Stressbelastung zu erzielen oder die Stressbelastung so zu gestalten, dass eine Reproduzierbarkeit der Stressbelastung herrscht, um immer gleiche Bedingungen für eine erneute Führung zu gewährleisten. Sicherlich spielt hier die Altersstruktur eine wesentliche Rolle. Spekulativ werden junge, dynamische Zellen mit flexiblen Membranen sicherlich Stresssituationen ohne Beeinträchtigungen überstehen, während ältere Hefezellen mit starren Zellmembranen und geringerer Proliferationsaktivität eventuell keinen weiteren Zellzyklus starten, statt dessen die Apoptose bzw. den Zelltod durchführen.

Danksagung

Wir danken der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens B60b.

6 Summary / Résumé

Hutter, K.-J., Kliem, C. and Nitzsche, F.: Biomonitoring of process yeasts by fluorescence optical methods in practice. Part IX: Trehalose – Stress protectant of *Saccharomyces* strains — Monatsschrift für Brauwissenschaft 56, No. 5/6, 121 – 125, 2003

BC 44 Yeast propagation

In brewing practice it is of importance to know the particular stage of the cell cycle during which yeast generates trehalose under stress conditions as a protectant. Currently, there are no methods available (preferably on-line) to determine trehalose levels for process modelling and yeast propagation respectively. The aim of this investigation was to extend the physiological analysis spectra with a fast direct fluorescence optical detection for trehalose. A rise in temperature during the stage of exponential growth caused an immediate trehalose accumulation in the yeast cells, which has been detected by both HPLC and fluorescence optical analysis.

Hutter, K.-J., Kliem, C. et Nitzsche, F.: Biomonitoring des levures industrielles en pratique par procédé optique de fluorescence. IX^{ième} Communication: IX. Communication: Tréhalose – protecteur du stress de la levure *Saccharomyces*. — Monatsschrift für Brauwissenschaft 56, No. 5/6, 121 – 125, 2003

BC 44 Culture pure de levure, propagation de levure

Dans le procédé en brasserie, il est important d'analyser en ligne, de façon permanente, la propagation, le transfert et l'alluvionnage dans des conditions optimales du cycle cellulaire. Il est nécessaire d'optimiser le management des levures par des observations approfondies de l'état physiologique des cellules de levures dans les différentes brasseries et dans les meilleures conditions. Il est important de connaître dans quel stade du cycle cellulaire de la levure et des conditions de stress a lieu la formation du tréhalose comme agent protecteur. On manque de méthodes de détection pour déterminer en ligne la concentration du tréhalose pour modéliser le procédé c'est-à-dire le management de la levure. Le but de l'examen était d'étendre le spectre des

analyses physiologiques par une détection rapide et directe par fluorescence-optique du tréhalose. Une augmentation de la température pendant la croissance exponentielle des cellules de levures provoque une accumulation immédiate du tréhalose de cellules de levures. Celle-ci a été déterminée en parallèle par analyse HPLC par fluorescence-optique.

7 Literatur

1. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, L 269/17, 10. 10. 2001.
2. Attfield, P.V.: Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response, FEBS Lett. **225**, 1,2, 259 – 263 (1987).
3. Hodgson, J., Pinder, A., Catley, B.J., Deans, K.: Effect of cone cropping and serial repitch on the distribution of cell ages in brewing yeast. Technical Quarterly **36**, 175 – 177 (1999).
4. Hottiger, T., Boller, T., Wiemken, A.: Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts, FEBS Lett. **220**, 1, 113 – 115 (1987).
5. Hutter, K.-J., Herber, M., Lindemann, B.: Biomonitoring der Betriebshefen *in praxi* mit fluoreszenzoptischen Verfahren. I. Mitteilung: DNS-Gehalt und Zellzyklusanalysen verschiedener Betriebshefen, Brauwissenschaft **48** (5/6) 184 – 190 (1995).
6. Hutter, K.-J., Lindemann, B., Hafner, M.: Biomonitoring der Betriebshefen *in praxi* mit fluoreszenzoptischen Verfahren. II. Mitteilung: Transparenz der ZKG-Gärung. Brauwissenschaft **49** (3/4) 104 – 110 (1996).
7. Hutter, K.-J., Müller, S., Herber, M.: Biomonitoring der Betriebshefen *in praxi* mit fluoreszenzoptischen Verfahren. III. Mitteilung: Funktionalitätstests an Hefezellen, Brauwissenschaft **49** (5/6) 164 – 170 (1996).
8. Hutter, K.-J., Müller, S.: Biomonitoring der Betriebshefen *in praxi* mit fluoreszenzoptischen Verfahren. IV. Mitteilung: Zellzyklus und β -Hydroxysterolgehalt. Brauwissenschaft **49** (7/8) 234 – 239 (1996).
9. Hutter, K.-J., Eipel, H.E.: DNA determination of yeast by flow cytometry, FEMS Microbiol. Lett. **3**, 35 – 38 (1978).
10. Hutter, K.-J., Nitzsche, F.: Untersuchungen über die Alterung der Bierhefen mit Hilfe der flusszytometrischen Analyse, Brauwissenschaft, **56** (9/10) 196 – 199 (2002).
11. Hutter, K.-J., Remor, M., Klein, K.: Biomonitoring der Betriebshefen *in praxi* mit fluoreszenzoptischen Verfahren. VII. Mitteilung: Untersuchungen zur flusszytometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes der Betriebshefe, Brauwissenschaft **53** (5/6) 68 – 76 (2000).
12. Knippers, R.: Molekulare Genetik, Thieme Verlag, 7. Auflage, S. 102 – 104 (1997).
13. Küenzi, M.T., Fiechter, A.: Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation, Arch. Mikrobiol. **84**, 254 – 265 (1972).
14. Lillie, S. H., Pringle, J. R.: Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation, J. Bacteriol. **145** (3) 1384 – 1394 (1980).
15. Neves, M.J., Jorge, J.A., Francois, J.M., Terenzi, H.F.: Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*, FEBS Lett. **283**, 1, 19 – 22 (1991).
16. Schmutz, P.: Trehalose und Trehalase in Hefe, Dissertation ETH Zürich 8735 (1988).
17. Slaughter, J.C., Nomura, T.: Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability, Enzyme Microb. Technol. **14**, 64 – 67 (1992).
18. Streiblova, E., Beran, K.: Demonstration of yeast scars by fluorescence microscopy, Exptl. Cell Res. **30**, 603 (1963).
19. Thevelein, J. M., van Laere, A. J., Beullens, M., van Assche, J. A., Carlier, A. R.: Glucose-induced trehalase activation and trehalose mobilization during early germination of *Phycomyces blakesleeanus* spores, J. Gen. Microbiol. **129**, 719 – 726 (1983).

(Manuscripteingang 11. 04. 03)