

K.-J. Hutter und F. Nitzsche

Untersuchungen über die Alterung der Bierhefen mit Hilfe der flusszytometrischen Analyse

In den letzten Jahren wird der Hefe bzw. dem Biomonitoring der Hefe eine immer stärkere Bedeutung beigemessen. Neben den bereits bestehenden Möglichkeiten der Charakterisierung der Population durch Zellzyklusanalysen, der Bestimmung des Glykogengehaltes und anderer intrazellulärer Makromoleküle in einzelnen Hefezellen trägt auch die Bestimmung der Sprossnarbenfluoreszenz dazu bei, das Zeug zu beurteilen.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeführung

(Deskriptoren: Flusszytometrie, Sprossnarbenfluoreszenz, Hefealterung

Descriptors: Flow cytometry, budscar fluorescence, ageing of yeast cells).

Einleitung

Der zellphysiologische Zustand der Betriebshefe während des Gärprozesses von der Reinkultur über die Herführung, der Zellvermehrung, der Gärung bis zur Hefelagerung muss in einem hochtechnisierten Prozess wie der Bierherstellung kontrollierbar sein und schnell und direkt erfolgen. Gärstörungen während des Prozesses verlängern Prozessabläufe oder führen zu Standzeiten während der Filtration. Eine wichtige Rolle bei der Prozessüberwachung spielt die Alterungsstruktur der Hefe, denn nur eine vitale Population mit einer positiven Altersstruktur garantiert einen störungsfreien Ablauf der Gärung. Hinsichtlich des Begriffes der Alterung bei Organ- und Gewebezellen höherer Eukaryonten findet sich folgende Definition für das Altern: „Bei der Alterung treten psychische und physische Veränderungsprozesse der Rückbildungsphase ein“ (Pschrymbel, 1994). Berücksichtigt man nur die physischen Veränderungen, so treten Folgen wie die Erschlaffung der Haut, Abnahme der Leistungsfähigkeit aller Organe und Organsysteme, reduzierte Regenerationsfähigkeit usw. auf. Bei niederen Eukaryonten wie den Bierhefen gibt es ähnliche Veränderungen auf der Zelloberfläche (Smart, 1999). Es ist ferner bekannt, dass die Leistungsfähigkeit älterer, häufig gesprosser Hefezellen bezüglich ihrer Proliferation und Gäraktivität sehr eingeschränkt ist. Im Brauerjargon werden solche zellphysiologischen Zustände häufig als Gärstörung umschrieben. Smart verweist zusätzlich auf eine mangelhafte Regenerationsfähigkeit alter, gestresster Hefepopulationen.

Verschiedene Autoren haben versucht, das Alter der Hefezellen in biotechnischen Prozessen anhand der Anzahl der Sprossnarben

auf der Zelloberfläche nachzuweisen (Streiblova und Beran, 1963; Beran et al., 1966; Pringle, 1991; Smart, 1999; Hodgson et al., 1999; Reis, 2001).

Zielsetzung

Ziel unserer Untersuchungen war eine fluoreszenzoptische Diskriminierung junger und alter Zellen anhand der Sprossnarbenfluoreszenz vorzunehmen. Es wurden sowohl Untersuchungen an Laborkulturen als auch an verschiedenen Gelägerhefen verschiedener Brauereien analysiert.

Ergebnisse

Zellwand der Hefezellen

Die Zellwand der Bierhefe ist aus drei Schichten aufgebaut. Die äußere Hülle, das sogenannte Hefegummi, besteht aus Mannanproteinen und Chitinen. Chitin ist an den Sprossnarben in höherer Konzentration zu finden als an den übrigen Stellen der Zellwand. Es schließt sich eine mittlere Schicht aus β -1,3-Glucan (Hefezellulose) an. Eine innere Schicht aus Protein-Glucan bildet den Abschluss. Weitere Bestandteile der Zellwand sind Proteine (ca. 7% des Trockengewichtes der Zellwand, hauptsächlich Enzyme) und Lipide. Solch ein komplexer Zellwandaufbau muss eine gute Fluidität besitzen, um den Gasaustausch und die Nährsubstanzaufnahme gewährleisten zu können. Bei der Proliferation der Hefezellen werden aber 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 haben diese Untersuchungen bereits 1963 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Primulin durchgeführt.

Färbung der Sprossnarben

Es gibt Fluoreszenzfarbstoffe, die präferenziell chitinhaltige Regionen anfärben. Wir haben insgesamt drei Fluorochrome bzw. Fluoreszenzkonjugate mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und

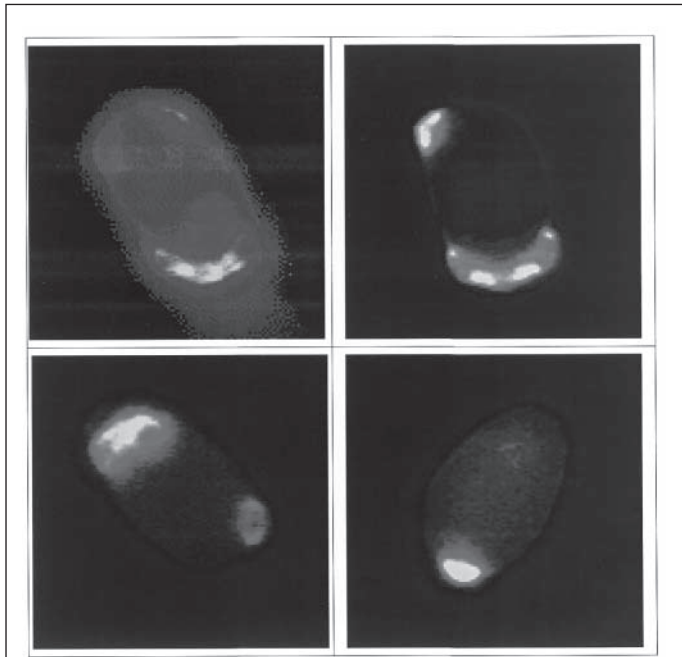


Abb. 1 Sprossnarben auf der Zelloberfläche von *Saccharomyces cerevisiae* zeigen eine intensive weiß-bläuliche Fluoreszenz nach *Calcofluor*-Färbung.

Sprossnarben-Fluoreszenz untergäriger Hefezellen

Färbung: Calcofluor
 Flusszytometer: PAS
 Lichtquelle: HBO 100
 Wellenlänge: 360 nm

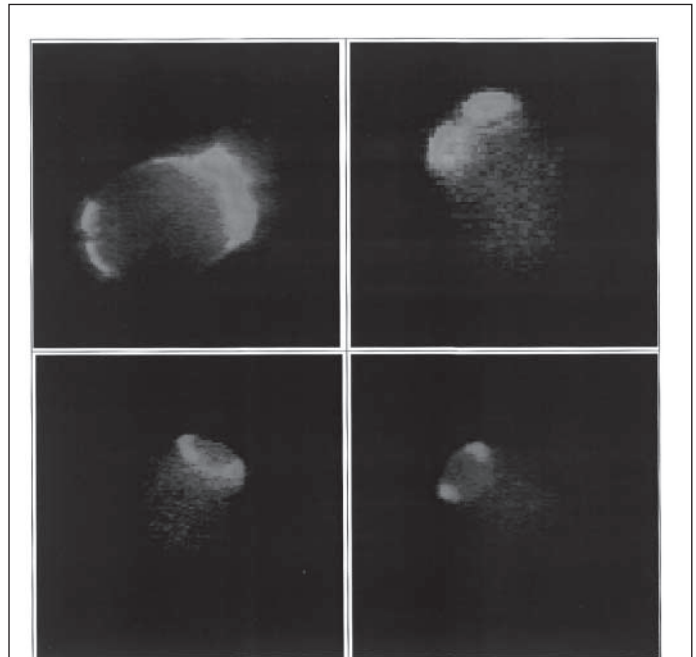


Abb. 2 Mit Hilfe eines Lektin-konjugierten-Fluorochroms (*WGA-FITC*) können die Sprossnarben sichtbar gemacht werden. Grünfluoreszenz nach 488 nm Anregung.

Sprossnarben-Fluoreszenz untergäriger Hefezellen

Färbung: WGA-FITC
 Flusszytometer: PAS
 Lichtquelle: Argon-Ionen-Laser
 Wellenlänge: 488 nm

der Flusszytometrie untersucht. Die Flusszytometrie und darüber hinaus die automatisierte Bildanalyse, sind erprobte Verfahren, um Zellen, deren Zellkompartimente bzw. fluoreszierende Zelloberflächen anhand ihrer Fluoreszenzlichtsignale zu detektieren und zu differenzieren:

1. Das saure *Primulin* ist ein Thiazolderivat, das leuchtend gelblich grün nach Anregung bei 488 nm fluoresziert. *Primulin* (Fa. Sigma Chemical GmbH, D-82041 Deisenhofen, P 7522) wurde in einer Konzentration von 0,5% in PBS-Puffer, pH 7,2, gelöst (stock solution). 20 µl wurde zu 1 ml Hefesuspension pipettiert und nach 30 Minuten Inkubation mikroskopisch analysiert.
2. *Fluorescent Brightener 28* (= *Calcofluor*), ist ein basischer Farbstoff, der als optischer Aufheller in der Waschmittelindustrie eingesetzt wird und Cellulose und Chitin anfärbt und nach 360 nm Anregung hellbläulich fluoresziert (Abb. 1). *Calcofluor* (Fa. Sigma Chemicals GmbH, D-82041 Deisenhofen, F 6259) wurde in einer Konzentration von 0,01% in PBS eingesetzt. 20 µl dieser Färbelösung wurden zu 1 ml Zellsuspension in PBS pipettiert.
3. *WGA-FITC* ist ein Lektin, das aus Weizen isoliert und mit einem Protein-spezifischen Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat konjugiert wurde. Die Spross- und Geburtsnarben fluoreszieren nach Zugabe *WGA-FITC* (Fa. Sigma Chemicals GmbH, L 4895) bei einer Anregung von 488 nm grün. Konzentration: 1 mg *WGA-FITC*/1 ml PBS-Puffer, pH 7,2 (Abb. 2). 20 µl dieser Färbelösung wurden zu 1 ml Zellsuspension in PBS pipettiert.

Die Behandlung der Hefezellen

Hefezellen wurden in Isopropanol über Nacht fixiert. Die Fixierungslösung wurde abzentrifugiert und zweimal mit PBS-Lösung gewaschen. Anschließend in 1 ml PBS resuspendiert.

Die Vorbehandlung der Hefezellen war für alle drei Färbungen gleich, d.h. nach der Fixation und den Waschschritten wurde die entsprechende stock solution der Zellsuspension zupipettiert. Durch die Fixation wurde gewährleistet, dass Zellen gesammelt und bis zur Färbung über Tage und Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden können.

Analyse der Sprossnarbenhäufigkeit

Die Theorie des Alterungsnachweises einer Betriebshefe beruht auf der Tatsache, dass mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen chitinreiche Regionen auf der Zelloberfläche, wie etwa die Geburts- und Sprossnarben, angefärbt und die entsprechenden Emissionen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden können (*Beran et al., 1966*).

Junge Hefezellen mit nur einer Geburtsnarbe bzw. wenigen Sprossnarben müssen demnach schwache Fluoreszenzsignale aufweisen, während alte Zellen ein stärkeres Fluoreszenzlichtsignal aufgrund ihrer hohen Anzahl von Sprossnarben produzieren. Dieses Phänomen haben wir mit der Flusszytometrie analysiert.

Calcofluor ist ein Fluorochrom, das bei 360 nm angeregt wird. Das Flusszytometer der Fa. Partec GmbH, Münster, verfügt über eine Quecksilberhöchstdrucklampe mit der eine Anregung im UV Bereich durchgeführt werden kann.

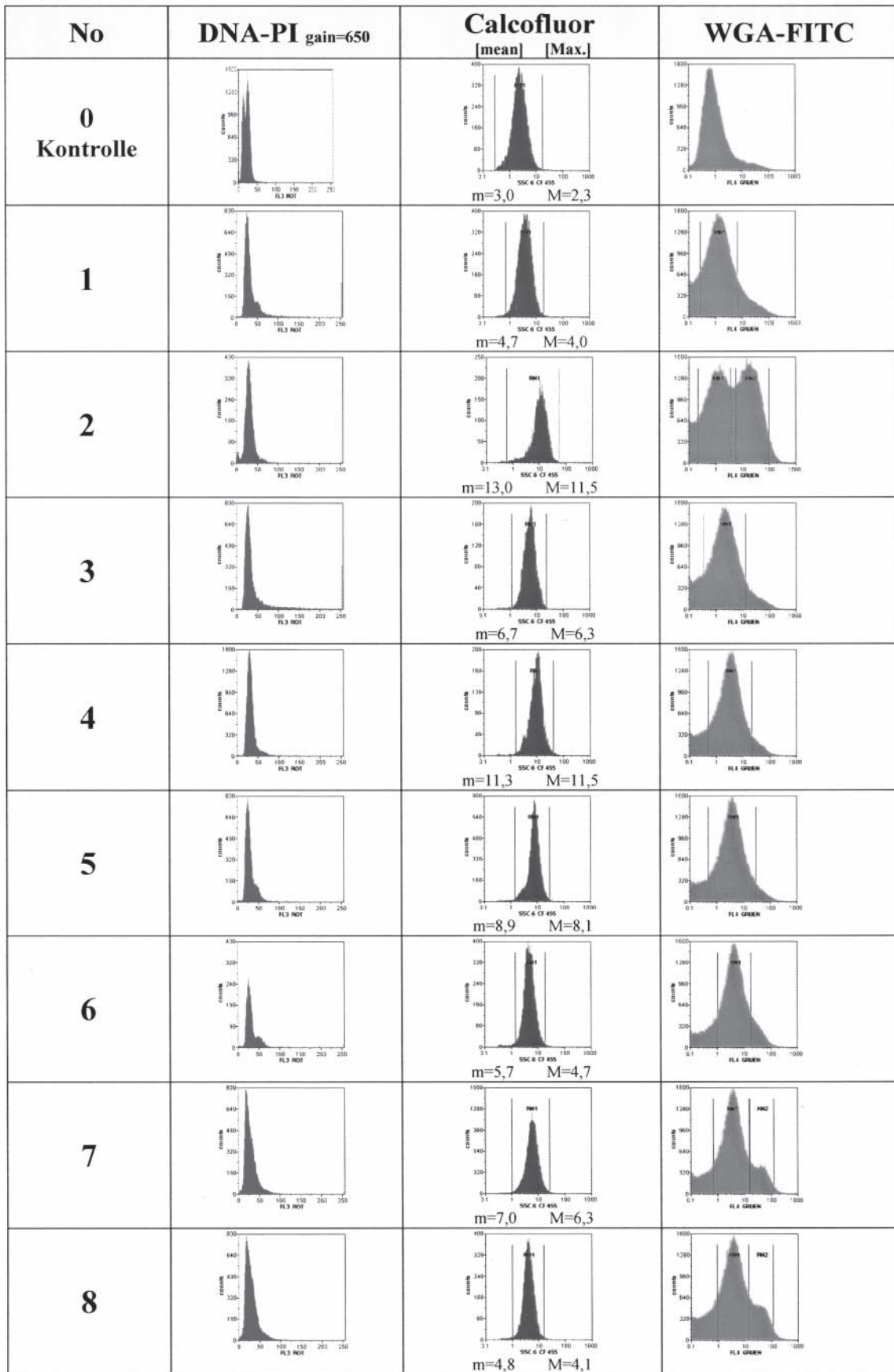


Abb. 3 Flusszytometrische Analyse des Zellzyklus und der Sprossnarbenfluoreszenz (360 nm Anregung nach Calcofluor-Fluorochromierung bzw 488 nm nach WGA-FITC-Fluorochromierung).

Zellzyklusanalysen und Sprossnarbenfluoreszenz an verschiedenen Gelägerhefen

Die Abbildung 3 gibt Aufschluss über die Zellzyklusphase in der die Zellen sich zum Zeitpunkt der Probenahme befanden. Parallel dazu wurde flusszytometrisch die Sprossnarbenfluoreszenz mit *Calcofluor* und *WGA-FITC* bestimmt. Diese Parallelbestimmungen wurden möglich, da das Zellmaterial in Isopropanol fixiert worden war.

Die Zellen der Gelägerhefen befanden sich alle in der G_0 -/ G_1 -Phase. Typisch für Häufigkeitsverteilungen von Populationen zum Ende der anaeroben Wachstumsphase ist die eingipfelige Verteilung von singulären Zellen (siehe linke Kolumne). In dieser Phase sind die zellphysiologischen Bedingungen für die Hefezellen mangelhaft, so dass keine nennenswerte Proliferation mehr festzustellen ist. Im Gegensatz hierzu die Kontrolle (erste Häufigkeitsverteilung Nr. 0) mit starker Proliferation, gekennzeichnet durch die ausgeprägte G_2 -+ M-Phase.

Die Sprossnarbenfluoreszenz verhält sich konträr zur Zellzyklusphase, d.h. Zellen haben in starken Proliferationsphasen, wie in der sprossenden oder exponentiellen Wachstumsphase, ein relativ geringes Fluoreszenzlichtsignal. Die Erklärung ist, dass während der Zellvermehrung ein überwiegender Anteil junger Sprosszellen in der Population vorliegt. Die Anzahl junger Zellen in der Population steigt in der exponentiellen Wachstumsphase an, da die Zellen einen sehr kurzen Zellzyklus durchwandern und eine hohe Anzahl von Tochterzellen produzieren. Diese jungen Zellen besitzen eine oder wenige Sprossnarben, so dass nur ein schwaches Fluoreszenzlichtsignal nachzuweisen ist. Die Gelägerhefen, die nach Beendigung der Gärung abgezogen werden, haben hingegen ein relativ starkes Fluoreszenzlichtsignal. Diese Zellen haben während des biotechnischen Prozesses mehrfach gesprosst, so dass die Anreicherung chitinhaltiger Sprossnarben auf ihrer Zelloberfläche deshalb zu einem stärkeren Fluoreszenzlichtsignal führte.

Diskussion

Das Problem der Alterung ist mit einer derart einfachen Analyse alleine nicht zu lösen, da sich nicht nur die Zellen, die häufig gesprosst haben, in der Proliferation und in der Gärung langsamer verhalten und zu Gärstörungen führen, sondern auch Zellen, die vielleicht nur ein- bis zweimal gesprosst haben aufgrund von Stressfaktoren ihr Wachstum und ihre Vermehrung einstellen können. Daher sind zusätzliche zellphysiologische Untersuchungen, die sich auf den Glykogengehalt (*Hutter et al*, 1999) während der Lebenszeit einer Zelle beziehen, unbedingt erforderlich. Der Tatbestand der Sprossnarbenfluoreszenz ist zunächst als ein Indiz für einen normal verlaufenden Prozess zu bewerten. Gelagerte Hefezellen zu Beginn der Inokulation haben demnach ein stärkeres Fluoreszenzlichtsignal als Zellen einer Population in der exponentiellen, sprossenden Wachstumsphase. Nach Abschluss der Gärung, wenn die Zellen mehrere Zellzyklen durchlaufen haben, nimmt die Fluoreszenz wieder zu.

Unter den drei verschiedenen Fluorochromen erwies sich die *Calcofluor*-Färbung als sehr effektiv. Neben der einfachen Zellpräparation entstehen relativ geringe Kosten. *Primulin*-gefärbte Sprossnarben zeigten eine zu schwache Fluoreszenzintensität, die bei 488 nm kaum nachzuweisen war.

Der Nachweis der Sprossnarbenfluoreszenz kann bezüglich der Überprüfung der Altersstruktur eine Rolle beim Herführen und Anstellen des Zeugs spielen.

Danksagung

Der Wifö der Deutschen Brauwirtschaft sei für die Unterstützung des Fortsetzungsantrages B60 sehr herzlich gedankt.

Summary

Hutter, K.-J., and Nitzsche, F.: Determinations of yeast ageing by flowcytometric analysis — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No 9/10, 196 – 199, 2002

BC 44 Yeast propagation, yeast management

In recent years, the biomonitoring of yeast has been gaining more and more significance. Besides already existing possibilities of characterising the population using cell cycle analysis, the determination of the glycogen level and other intracellular macromolecules in single yeast cells also determining the bud scar fluorescence helps in evaluating the pitching yeast.

Hutter, K.-J., et Nitzsche, F.: Examens du vieillissement de la levure de bière à l'aide de l'analyse par cytométrie de flux — Monatsschrift für Brauwissenschaft 55, No. 9/10, 196 – 199, 2002

BC 44 Culture pure de levure, propagation de levure

Au cours des dernières années on attache de plus en plus d'importance à la levure et au biomonitoring de la levure. Le levain peut être examiné par des méthodes existantes telles que la caractérisation de la population par l'analyse du cycle cellulaire, la détermination de la teneur en glycogène et d'autre macromolécules intracellulaires dans les cellules de levures individuelles mais également par la détermination par fluorescence des cicatrices de bourgeonnement.

Literatur

1. Beran, K, Malek, I., Streiblova, E., Lieblova, J.: The distribution of the relative age of cells in yeast populations, In: *Microbial Physiology and Continuous Culture*, Ed.: Powell et al., Her Majesty's Office, London 57 – 67, 1966.
2. 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.
3. Pringle, J.R.: *Methods in Enzymology*, 194, 732 – 735, 1971.
4. Smart, K.: Ageing in brewing yeast, *Brewer's Guardian* **128**, 19–24, 1999.
5. Streiblova, E., Beran, K.: Demonstration of yeast scars by fluorescence microscopy, *Exptl Cell res.* 30, 603, 1963.
6. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*: 257. Neu bearbeitete Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York 1994.
7. Reis, B.: Praxis-Semesterbericht „Flusszytometrische Kontrolle der Alterung von Hefezellen“, Fachhochschule Mannheim, Mai 2001.
8. Hutter, K.-J., Remor, M., Klein, K., Lange, C.: Überwachung, Optimierung und Regelung des Gärprozesses durch ein geeignetes Biomonitoring, EBC Congress, Cannes 1999, 735 – 742, 1999.

(Manuskripteingang: 17. 5. 2002)

Von dem Artikel existiert auch eine Onlineversion unter www.brauwissenschaft.de mit Farbabbildungen