

K.-J. Hutter, M. Borek und M. Remor

Biomonitoring der Betriebshefe in praxi mit fluoreszenzoptischen Methoden

VIII. Mitteilung: Über das zellzyklusabhängige Flockungsverhalten unter- und ober-gäriger Betriebshefen

Das Sedimentationsverhalten von untergärigen Betriebshefen ist bei der Bierherstellung von biotechnischem und wirtschaftlichem Interesse. Es beruht in den meisten Fällen auf empirischen Angaben und Beobachtungen der jeweiligen Produktionsleiter. Es gibt z.Z. keine endgültige wissenschaftliche Erklärung, warum einige untergärige Heferasen flockulieren, andere wiederum nicht, bzw. warum Hefen im Laufe verschiedener Führungen ihr Sedimentationsverhalten verändern. Mit Hilfe des Lektins Con A sollte festgestellt werden, ob Oberflächenrezeptoren auf den Zellmembranen der Bruch- oder Staubhefen lokalisiert sind, die präferenziell eine Bindung mit diesem Lektin eingehen, da bekannt ist, dass Con A spezifisch an α -D-Mannose und α -D-Glucose bindet.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeführung

(Deskriptoren: Hefe, Flusszytometrie, Flockulation, Lektin.

Descriptors: Yeast, flow cytometry, flocculation, lectins).

1 Einleitung

Das Sedimentationsverhalten von untergärigen Betriebshefen ist bei der Bierherstellung von biotechnischem und wirtschaftlichem Interesse.

Mit einer flockulierenden Hefe kann im Verlauf des Gärprozesses eine Vorklärung des Bieres erzielt werden. Dies wirkt sich vorteilhaft auf die Hefeernte aus, die ergiebiger ist und wirtschaftlich den Vorteil hat, dass man längere Filterstandzeiten erzielt, d.h. weniger häufig den Filter auspacken muß. Dadurch spart man Kosten für Kieselgur, Reinigungs- und Abwasser ein.

Für den Brauer ist eine Hefe wünschenswert, die neben einem zufrieden stellenden Flockulationsverhalten zusätzlich den Endvergärungsgrad erreicht (*Lense*, 1956; *de Clerck*, 1964)).

Das Sedimentationsverhalten beruht in den meisten Fällen auf empirischen Angaben und Beobachtungen der jeweiligen Produktionsleiter. Es gibt z.Z. keine endgültige wissenschaftliche Erklärung, warum einige untergärige Heferasen flockulieren, andere wiederum nicht, bzw. warum Hefen im Laufe verschiedener Führungen ihr Sedimentationsverhalten verändern.

Folgende Anschauungen über das Flockulationsverhalten der Betriebshefen sind bekannt:

- Es gibt zwei untergärige Heferasen, die als Staub- und Bruchhefen unterschieden werden. *Gilliland* (1957) macht bei den Staubhefen folgende Unterscheidung:
 - a) Sehr staubige Hefen – Anhäufung von etwa 10 Zellen, die sich im Bier vollständig in Schwebelage halten*.
 - b) Staubige Hefen – Anhäufung von etwa 1000 Zellen, die sich nach etwa 2/3 der Gärung bilden.
 - c) Flockige Hefen - Anhäufung von mehreren tausend Zellen, die sich gleichfalls nach etwa 2/3 der Gärung bilden.
 - d) Sehr flockige Hefen – Flocken von Anfang an, weil die Zellen bei der Vermehrung alle miteinander verbunden bleiben*.

*Die Hefen a) und d) sind in der Praxis nicht verwendbar.

- Die Flockulation ist reversibel, d.h. Hefestämme können die Eigenschaft zur Flockulation verlieren (verstauben). Diese Tatsache beruht ebenfalls auf empirischer Beobachtung.
- Die Flockulation ist abhängig von der Struktur der Zellwand. Während der Zellvermehrung und Gärung herrschen unterschiedliche physiologische Bedingungen. Das bedeutet, dass die Strukturen der Zellwand sich permanent ändern. Die Flockulation ist daher als ein dynamischer Prozess zu verstehen.

Burns (1937) hat erstmalig eine Methode („Flockigkeitsprobe“) zur Messung des Flockulationsverhaltens von Hefen ausgearbeitet. Diese wurde von *Helm* und *Thorne* (1955) modifiziert. Bei der Durchführung unserer Versuche wurde dieser modifizierte „Helm Test“ als konventioneller Parameter eingesetzt.

In der Vergangenheit beschäftigten sich eine Reihe von Publikationen mit der molekularbiologischen Differenzierung der Flockulation von Bierhefen (*Silbereisen* (1938), *Lense* (1956), *Windisch* und *Emeis* (1960), *Harris* und *Thompson* (1960), *de Clerck* (1964), *Griffin* und *MacWilliam* (1969), *Stewart* et al. (1974), *Pringle* und *Hartwell* (1981), *Kunze*, (1994), *Smart* et al. (1995), *Beckmann*, (1998), *Smart* (1999 a), *Smart* (1999 b)).

In unserer Versuchsdurchführung sollte die Flockulation von Hefepopulationen mit Hilfe von Lektinen nachgewiesen werden. Lektine sind zellagglutinierende Proteine, Glykoproteine und Polysaccharidreste, die vor allem aus Pflanzen gewonnen werden. Sie haben eine hohe Affinität für spezielle Zuckerreste auf Zellmembranen und bewirken, dass verschiedene Zelltypen wie Erythrocyten, Tumorzellen, Bakterien und auch Hefen agglutinieren bzw. präzipitieren. Lektine wirken darüber hinaus als Mitogene, d.h. diese exogenen Substanzen induzieren Zellteilungen. Sie fördern das Wachstum und die Differenzierung bestimmter Säugtierzellen, wie z.B. die Leukozyten (*Kraemer et al. (1973), Kaku und Shibuya (1996)*). Die bekanntesten Lektine sind Concanavalin A (Con A) und Phytohämagglutinin (PHA).

Mit Hilfe des Lektins Con A sollte festgestellt werden, ob Oberflächenrezeptoren auf den Zellmembranen der Bruch- oder Staubhefen lokalisiert sind, die präferenziell eine Bindung mit diesem Lektin eingehen. Es ist bekannt, dass Con A aus *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) spezifisch an α -D-Mannose und α -D-Glucose bindet.

2 Material und Methoden

2.1 Behandlung der Hefeproben

Die Hefen wurden zuvor in steriler Würze bis zu einer ausreichend hohen Zellzahl (10×10^6 Zellen/ml) hergeführt und im Labormaßstab angestellt. Alle 3 Stunden wurde je eine Hefeprobe zur Bestimmung des DNA-Gehaltes (Fixierung in 70%igem Ethanol), zur Markierung mit Con A-FITC (natives Zellmaterial) und für den Helm-Test mittels steriler Pipetten entnommen. Bei der Messung mit Con A-FITC-Markierung wurde zeitlich versetzt gefärbt, damit alle Proben die gleichen Bedingungen hatten.

2.2 Flusszytometrische Analyse mit dem PAS (Particle Analysing System)

Die Flusszytometrie ist eine spezifische Analysenmethode, die binnen kurzem quasi Online-Messungen verschiedenster Zellparameter, mit hoher statistischer Sicherheit durch Registrierung von circa 10 000 Zellen pro Sekunde, erlaubt. Im PAS sind

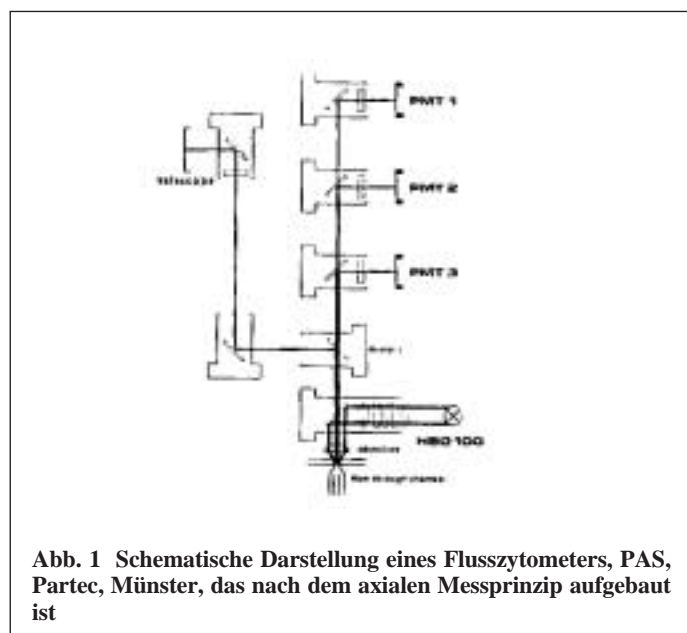


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Flusszytometers, PAS, Partec, Münster, das nach dem axialen Messprinzip aufgebaut ist

Excitations- und Emissionslicht parallel angeordnet (axiales Messprinzip, siehe Abb. 1).

Das PAS besitzt neben einem Laser noch zusätzlich eine Quecksilberhöchstdrucklampe (kurz HB0-Lampe) zur Anregung von UV-Licht (360 nm). HB0-Lampen zeichnen sich durch ein Linienspektrum aus. Dabei wird das Licht bestimmter Wellenlängen mit besonderer Helligkeit abgestrahlt, während die anderen Wellenlängen wesentlich schwächer ausfallen. Bevorzugt wird die Wellenlänge 360 nm (UV-Licht) zur Anregung des AT-spezifischen Fluorochroms DAPI eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet direkt an die AT-Regionen der DNA, ohne dass eine enzymatische Digestion mit RNase durchgeführt werden muss (*Dittrich und Göhde, 1969*).

2.3 Helm-Test (modifizierte Flockigkeitsprobe nach Helm und Thorne 1955)

Die zu untersuchende Hefe wird in Calciumsulfatlösung aufgeschlämmt, zentrifugiert, erneut in Calciumsulfatlösung resuspendiert und nochmals zentrifugiert.

In ein graduiertes, konisches Zentrifugenglas von 15 ml gibt man 10 ml des Natriumacetatpuffers und fügt 1 g der gewaschenen Hefe hinzu. Anschließend wird gut geschüttelt. Nun stellt man die Proben in ein 20 °C temperiertes Wasserbad.

Nach 20 Minuten wird nochmals geschüttelt und das Glas erneut für 10 Minuten in das Wasserbad gestellt. Das Volumen der abgesetzten Hefe wird nach 10 Minuten abgelesen.

2.4 Markierung der Zelloberfläche mittels Con A-FITC-Konjugat (nach Kaku und Shibuya, 1996)

Herstellung des Lektin-FITC-Konjugates

Anmerkung zur Herstellung: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist ein Färbereagens zum Anfärben von Zellproteinen. Um eine Verfälschung der Fluoreszenzsignale zu vermeiden, wurde nicht gebundenes FITC, vom Konjugat durch Säulenchromatographie (Füllmaterial Sephadex G 15) abgetrennt (*Kraemer et al.(1973)*).

- 2 mg Lektin (Serva, Heidelberg) wird in 1 ml Carbonat-Puffer pH 9,5 gelöst,
- 0,072 g Maltose p.a. zur Lektinlösung zugeben,
- 100 µl FITC-Lösung zugeben,
- nach Färbung (4 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur) wird die Suspension auf Sephadex G 15-Säule gegeben und im Dunkeln mit Carbonat-Puffer eluiert. Die erste gelbe Fraktion wird als Konjugat gewonnen.

Färbung der Hefen

- 1 ml der Hefesuspension in 9 ml PBS-Puffer waschen,
- 10 Min. bei 1000 U/min zentrifugieren und Überstand verworfen,
- Pellet in 1 ml PBS-Lösung resuspendieren,
- Zugabe von 20 µl Lektin-FITC-Konjugat,
- Messung nach mindestens 20 Minuten Einwirkung bei Raumtemperatur im Dunkeln,
- Kontrolle der Färbung im Fluoreszenzmikroskop ($\lambda = 488$ nm). Positive Zellen stellen sich mit einem kräftig grün fluoreszierenden Zellsaum dar (*Remor, 1998; Hutter, 1999*).

Tabelle 1 Helm-Tests verschiedener Hefen aus unterschiedlichen Brauereien

interne Probennummer	Anstellen	nach 3,5 Stunden	nach 24 Stunden
Nr.: 8	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: F	NS 0,1 Ü: F
Nr.: 9	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 11	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 12	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: trüb	NS 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 15	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: F	NS 0,2 Ü: F
Nr.: 28	NS < 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: F	NS 0,2 Ü: F
Nr.: 30	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 3	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: kleine F	NS > 0,1 Ü: F
Nr.: 4	NS < 0,1 Ü: trüb	NS ~ 0,1 Ü: kleine F	NS 0,2 Ü: schwache F
Nr.: 5	NS < 0,1 Ü: F	NS ~ 0,1 Ü: schwache F	NS 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 6	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS ~ 0,1 Ü: schwache F	NS 0,2 Ü: keine F
Nr.: 7	NS < 0,1 Ü: F	NS 0,1 Ü: schwache F	NS 0,1 Ü: F
Nr.: 10	NS 0,1 Ü: F	NS < 0,1 Ü: trüb	NS 0,4 Ü: trüb
Nr.: 13	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: trüb
Nr.: 2	NS 0,1 Ü: schwache F	NS 0,1 Ü: schwache F	NS > 0,1 Ü: F
Nr.: 16	kein NS Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS 0,2 Ü: schwache F
Nr.: 17	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS 0,1 Ü: schwache F
Nr.: 18	kein NS Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS 0,2 Ü: keine F
Nr.: 19	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS 0,1 Ü: F
Nr.: 20	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS < 0,1 Ü: schwache F	NS 0,4 Ü: trüb
Nr.: 27	kein NS Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: trüb	NS < 0,1 Ü: trüb

Legende zur Tab 1: Die Volumina der Bodensätze

NS = abgelesenes Niederschlagsvolumen (Bodensatzvolumen) in ml

Ü = Überstand

F = klare Phase (zukünftig als Front bezeichnet) ist im Überstand zu erkennen

trüb = der gesamte Überstand ist trüb, es ist keine klare Phase zu erkennen

schwache F = der Überstand ist noch getrübt

kleine Front = klare Front < 1 ml, jedoch deutlich ausgebildet

Das Sedimentationsverhalten der Hefeproben wurde nach Aufschütteln des Bodensatzes erneut nach 3 bzw. 4 Wochen Lagerung (Nachgärung) gemessen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Helm-Test verschiedener Betriebshefen unterschiedlicher Brauereien

Helm et al. (1955) haben beschrieben, dass man den Unterschied zwischen flockigen und staubigen Hefen durch einen Sedimentationstest feststellen kann. Bei diesem Test setzen sich die flockigen Hefen gleichmäßig ab, die überstehende Flüssigkeit bleibt fast klar. Staubige Hefen bilden dagegen zuerst einen Bodensatz auf dem Glasboden, der allmählich zunimmt und dann zu einer trüben, überstehenden Flüssigkeit führt.

Helms Beobachtungen konnten mit den verwendeten Hefestämmen in unserem Versuch nicht bestätigt werden. Die Sedimentation war in den meisten Tests eher mäßig und schleppend, so dass kein deutlicher Bodensatz nachzuweisen war (oft gerade nur 0,1 ml). Bei sogenannten flockigen Hefen bildete sich selten ein klarer Überstand (siehe Tab. 1). Erst als die Hefesuspensionen über einen längeren Zeitraum gelagert wurden und ein erneuter Helm-Test durchgeführt wurde, war in einigen Fällen eine bessere Sedimentation nachzuweisen (Tab. 2).

3.2 Flusszytometrische Untersuchungen nach Con A-FITC-Markierung

Die Abbildung 2 zeigt flusszytometrische Analysen von Staub- (2a) und Bruchhefe (2b) nach einer Markierung mit Con A-FITC. Die Häufigkeitsverteilungen der Abbildungen 2a und 2b waren bezüglich der Intensität ihres Fluoreszenzlichtsignals sehr verschieden.

Während die Bruchhefe ein schwaches Fluoreszenzlichtsignal lieferte, besaß die breite Häufigkeitsverteilung der Staubhefe ein sehr intensives Fluoreszenzlichtsignal. Das bedeutet, dass die Bruchhefe auf ihrer Zelloberfläche wenig anfärbbare Rezeptoren für Glukose besitzt, an die sich die Con A-FITC-Moleküle heften können. Die Oberflächenstruktur der Staubhefe ist so aufgebaut, dass viele Bindungsstellen für Glukose zur Verfügung stehen, an die sich die entsprechenden Con A-FITC-Moleküle binden können. Folglich fluoresziert die Staubhefe viel intensiver als die Bruchhefe (Hutter (1993), Hutter (2000)).

Tabelle 2 Volumina der Bodensätze nach 3 bis 4 Wochen Lagerung. Bodensatz nur aufgeschüttelt

interne Probennummer	abgelesene Volumina
Probe 2	NS 0,1
Probe 3	NS 0,1
Probe 4	NS 0,3
Probe 5	NS 0,1
Probe 6	NS 0,2
Probe 7	NS 0,1
Probe 8	NS 3,2
Probe 9	NS 0,1
Probe 10	NS 2,1
Probe 11	NS 0,1
Probe 12	NS < 0,1
Probe 13	NS 0,1
Probe 15	NS 2,7
Probe 16	NS 3,2
Probe 17	NS 3,5
Probe 18	NS 3,0
Probe 19	NS 3,0
Probe 20	NS 0,1
Probe 27	NS 2,2
Probe 28	NS 2,7
Probe 30	NS < 0,1

NS = Bodensatzvolumen/ml

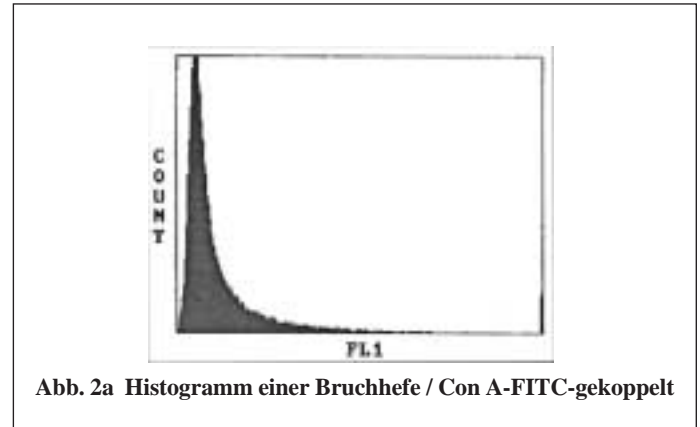


Abb. 2a Histogramm einer Bruchhefe / Con A-FITC-gekoppelt

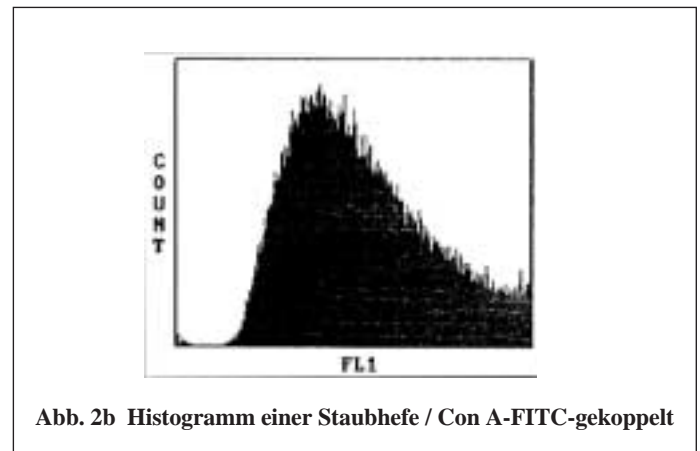


Abb. 2b Histogramm einer Staubhefe / Con A-FITC-gekoppelt

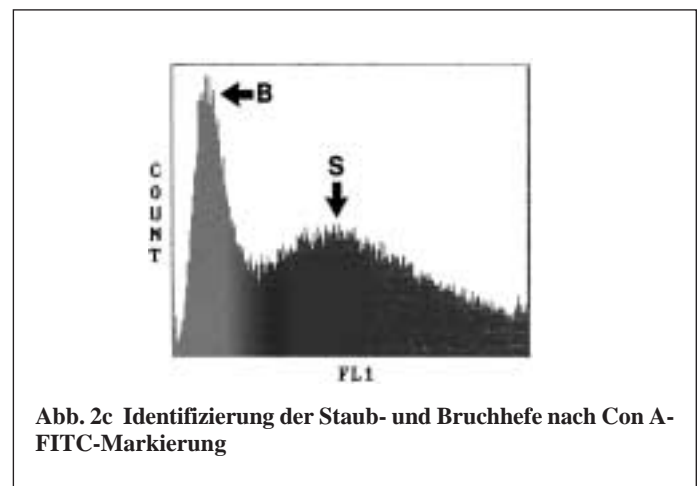


Abb. 2c Identifizierung der Staub- und Bruchhefe nach Con A-FITC-Markierung

Die Abbildung 2a zeigt das Histogramm einer Con A-FITC-gefärbten Bruchhefe. Das Fluoreszenzlichtsignal ist sehr schwach (die flusszytometrischen Analysen der Abbildung 2 wurden mit einem Profile der Fa. Coulter durchgeführt).

Die Abbildung 2b zeigt das Histogramm der Färbung einer Staubhefe der Eichbaum Brauereien AG. Das Fluoreszenzlichtsignal ist im Vergleich zur Bruchhefe äußerst intensiv.

Die Abbildung 2c demonstriert das Messergebnis der Bruch- bzw. Staubhefe in einem Zellgemisch aus beiden Hefenstämmen (Hutter (1999)).

Nach der Aussage von *de Clerck* (1960) erreichen Staubhefen früher den Endvergärungsgrad als die Bruchhefen. Diese Aussage steht mit der flusszytometrischen Analyse nach Markierung mit Con A-FITC im Einklang. Die untersuchte Staubhefe besaß offensichtlich sehr viele Glukose-Bindungsstellen auf ihrer Oberfläche, die viele Con A-FITC-Moleküle binden können. Daher konnte eine sehr starke Fluoreszenzlichtausbeute erzielt werden.

Die Bruchhefe hingegen erreichte nicht den Endvergärungsgrad. Sie hatte relativ wenig Glukose-Bindungsstellen auf ihrer Oberfläche. Daher konnte in diesem speziellen Fall nur eine geringe Markierung mit Con A-FITC erreicht werden. Dies war aus der sehr geringen Fluoreszenzlichtausbeute abzulesen.

Das exemplarisch gewonnene Ergebnis der fluoreszenzoptischen Staub- und Bruchhefe-Differenzierung wurde an weiteren 21 verschiedenen Bruch- und Staubhefestämmen, die aus verschie-

denen Braustätten stammten, mit dem Helm-Test und der fluoreszenzoptischen Con A-FITC-Methode überprüft und mit den Angaben der Betriebsleiter verglichen (Tab. 3).

In Tabelle 3 sind folgende Parameter aufgelistet:

- die Angaben der Produktionsleiter über ihre Hefestämme;
- die Maxima der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Hefen nach Con A-FITC-Behandlung (einmal zum Zeitpunkt des Anstellens, nach 3 Stunden und nach 24 Stunden Kultivierung);
- die Ergebnisse des Helm-Tests und
- die Beurteilung der Ergebnisse.

Tabelle 3 Flockulationsnachweis verschiedener Betriebshefen

Lfd.Nr.	Anstellen	nach 3 Stunden	nach 24 Stunden	Information	Vermutung	Übereinstimmung
2	+	+	+	keine	Bruchhefe	?
16	-	-	++	Bruchhefe	Bruchhefe	ja
17	-	-	+	Rh I	Bruchhefe	ja
4	-	+	++	keine	Bruchhefe	?
18	-	-	++	keine	Bruchhefe	?
20	-	-	++++	Rh II	Bruchhefe	ja
6	-	+	++	W 34/70 (UG)	Bruchhefe	nein
10	-	-	++++	Bruchhefe	Bruchhefe	ja
11	-	-	-	Staubhefe	Staubhefe	ja
28	-	-	++	Staubhefe	Staubhefe	ja
13	-	-	-	Staubhefe	Staubhefe	ja/nein
5	-	-	+	Rh III	Bruchhefe	ja/nein
7	-	-	+	W 214 (OG)	Bruchhefe	ja
8	-	-	+	Bruchhefe	Staubhefe	nein
9	-	-	-	Bruchhefe	Staubhefe	nein
15	-	-	++	Bruchhefe	Staubhefe	nein
30	-	-	-	Staubhefe	Staubhefe	ja
12	-	-	+	Staubhefe	Staubhefe	ja
19	-	-	+	keine	Staubhefe	?
27	-	-	-	W 34/70	Staubhefe	nein
3	-	-	+	Staubhefe	Staubhefe	ja
Ergebnis: 21 Hefestämmen; ja = 10; nein = 5; ja/nein = 2; ? = 4						

Die flusszytometrischen Analysen zeigten, dass die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Hefepopulationen sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensität besaßen, d.h. in den seltensten Fällen war eine Übereinstimmung der fluoreszenzoptischen Ergebnisse mit den Daten des Helm-Testes festzustellen.

Darüber hinaus stimmten die empirischen Angaben der Betriebsleiter weder mit den Ergebnissen des Helm-Testes noch mit den fluoreszenzoptischen Ergebnissen überein. So zeigten die Bruchhefen einmal relativ schwache, dann wieder sehr hohe Fluoreszenzlichtsignale ebenso wie die getesteten Staubhefen.

Dies führte zu folgenden Schlussfolgerungen:

- Die empirischen Angaben der Einsender waren grundsätzlich fraglich.
- Die Hefepopulationen hatten im Laufe der Führungen und Jahre ihre ursprünglich erworbene Spezifität zur Flockulation verloren.
- Die Oberflächenbindungsstellen ändern sich offensichtlich während der Proliferation. Da das Wachstum der Hefezellen ein dynamischer Prozess ist, unterliegt ihre Oberfläche wechselnden Bedingungen in den einzelnen Zellzyklusphasen.

Die Untersuchung von 21 verschiedenen Hefestämmen und ihre Fähigkeit Con A-FITC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche zu binden wurde in 3 verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht. Die Abbildung 3 zeigt fünf verschiedene Hefestämmen in drei verschiedenen Wachstumsphasen mit den Häufigkeitsverteilungen der jeweiligen Zellzyklusphase und der Con A-FITC-Fluores-

zenz. In Tabelle 4 sind die Veränderungen der Peak-Maxima der 21 Hefestämmen in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase und der Con A-FITC-Bindung in diesen Phasen aufgelistet.

Die Tabellen 3 und 4 geben die Daten der Hefestämmen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenahme (Anstellen, Zellvermehrung nach 3 Stunden, Gärphase nach 24 Stunden) wieder.

Wenn die Anfärbbarkeit der Zelloberfläche mit Con A-FITC abhängig ist von der Wachstumsphase in der sich die einzelne Zelle befindet, dann muss es Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von G₁-, S- und G₂+M-Phase Zellen geben. Es ist also entscheidend zu berücksichtigen, in welcher Wachstumsphase und unter welchen zellphysiologischen Bedingungen die Hefepopulation während der Zellvermehrung bzw. der Gärung untersucht wird.

In den verschiedenen Wachstumsphasen konnten wir bei allen Betriebshefen übereinstimmend nach 3 Stunden (also zum Zeitpunkt des Anschlebens) eine andere Fluoreszenzintensität der anfärbbaren Zelloberfläche als zu Beginn der Analysen (also dem Zeitpunkt der Inokulation) bzw. nach 24 Stunden (dies war der Zeitpunkt der beginnenden Gärung) analysieren. In der exponentiellen Wachstumsphase scheinen bei den Bruchhefen mehr Bindungsstellen für das Con A-FITC-Konjugat frei zu sein, als zum Zeitpunkt reduzierter Zellvermehrung, also nach 24 Stunden.

Nach 24 Stunden scheinen die Staubhefen mehr Bindungsstellen zu besitzen als die Bruchhefen. Offensichtlich differieren die Staub- und Bruchhefen nach Con A-FITC-Koppelung während ihres Zellzyklus bezüglich ihrer Bindungsstellen für Con A-FITC, und zwar individuell mehr oder weniger.

Probe	Probeninfo	Probennahme	DNA-Gehalt	ConA-FITC-Peak	Peakmax. ConA-FITC-	Helm-Test
2	keine Information	Anstellen			14,1	0,1 ml
		3 h nach Anstellen			37,7	0,1 ml
		24 h nach Anstellen			29,5	0,1 ml
3	Staubhefe	Anstellen			17,05	< 0,1 ml
		3 h nach Anstellen			13,7	< 0,1 ml
		24 h nach Anstellen			21,5	0,1 ml
4	keine Information	Anstellen			8,5	< 0,1 ml
		3 h nach Anstellen			32,3	0,1 ml
		24 h nach Anstellen			17,0	0,2
5	Rh-Hefe Brauerei III	Anstellen			10,0	< 0,1 ml
		3 h nach Anstellen			14,0	< 0,1 ml
		24 h nach Anstellen			20,2	0,1 ml

Abb. 3 Con A-FITC-Fluoreszenz in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase

Allerdings war auffallend, dass die Staubhefen in der Zellvermehrungsphase stärkere und in der Gärungsphase schwächere Fluoreszenzlichtsignale aufwiesen. Das deutet darauf hin, dass die Zellvermehrung mit einer schnellen Zuckerverwertung einhergeht, während in der Gärung eine schwächere Zuckerverwertung bei den Staubhefen festzustellen ist (siehe Tab. 3, 4 und 5).

Bereits 1960 stellten *Windisch* und *Emeis* (1960) fest, dass für die Vergärung der Maltotriose ein genetischer Faktor verantwortlich ist. Dieser ist auf ein oder zwei Genen der Hefezellen lokalisiert. *Harris* und *Thompson* (1960) führten dies auf einen adaptiven Zustand der Hefe zurück, d.h. die Hefezellen verlieren im Laufe der Zeit (Führungen) ihre Fähigkeit zur Maltotriosevergärung nicht, sondern ihre Zellwände werden für diesen Zucker mehr oder weniger durchlässig. Für letztere Beobachtung spricht die Tatsache, dass die Oberflächenrezeptoren für bestimmte Zucker während des Zellzyklus und in bestimmten Wachstumsphasen

(aerobe Zellvermehrung, anaerobe Gärung) unterschiedlich besetzt werden. Dies wiederum würde unsere Vermutung stützen, dass Bruch- und Staubhefestämme mehr oder weniger intensive Fluoreszenzintensität ihrer Zelloberfläche während der Vermehrung und des Wachstums in Abhängigkeit ihres Alters aufweisen und zu sehr heterogenen Resultaten führen.

Bruchhefen hingegen haben schwächere Fluoreszenzlichtsignale in ihrer Zellvermehrungsphase, dagegen stärkere Fluoreszenzlichtsignale in der Gärphase. Bruchhefen haben eine schleppende Zellvermehrung durch geringere Zuckeraufnahme, während in der Gärung, die noch zur Verfügung stehende Glukose von den Zellen intensiv aufgenommen wird (siehe Tab. 3, 4 und 5).

Die Veränderungen der Oberflächenstrukturen bei der Staub- bzw. der Bruchhefe während des Zellzyklus lassen sich folgendermaßen erklären. In der Zellvermehrungsphase signalisieren die

Tabelle 4 Veränderungen der Peakmaxima der 21 Hefestämme in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase und der Con A-FITC-Bindung

Peakmaxima des Con A-FITC-Peaks				
Probe	Probeninfo	Anstellen	+ 3 Stunden	+ 24 Stunden
2	keine Information	14,1	37,7	29,5
3	Staubhefe	17,05	13,7	21,5
4	keine Information	8,5	32,3	17,0
5	Rh-Hefe (Brauerei 3)	10,0	14,0	20,2
6	W34/70	15,2	19,3	18,0
7	W 214	~36	78,6	~70
8	Bruchhefe	16,6	---	16,3
9	Bruchhefe	21,9	---	24,4
10	Bruchhefe	19,4	21,8	8,0
11	Staubhefe	15,4	---	22,7
12	Staubhefe	20,1	---	26,2
13	Staubhefe	4,0	9,8	10,3
15	Bruchhefe	18,0	---	45,2
17	Rh-Hefe (Brauerei 1)	19	34,9	18,0
18	keine Information	20,1	22,1	6,0
19	keine Information	32,1	19,0	17,2
20	Rh-Hefe (Brauerei 2)	19,5	23,4	15,2
27	W 34/70	31,0	19,0	6,0
28	Staubhefe	13,0	---	39,5
30	Staubhefe	23,0	6,0	29,0

Oberflächenrezeptoren der Zelle, dass noch genügend verwertbare Kohlenhydrate in der Würze vorhanden sind, so dass die Zellvermehrung fortgesetzt werden kann. Nach 24 Stunden sieht die Nährsubstratzusammensetzung für die Population ungünstiger aus. Dies drückt sich durch eine geringer anfärbare Zelloberfläche aus. Dies könnte sowohl die Untersuchungen von *Windisch*

und *Emeis* (1960), als auch von *Harris* und *Thompson* erklären, dass die Zuckeraufnahme genetisch gesteuert wird, und zwar in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase und dem Alter der einzelnen Hefezelle. Diese Regulierung wird über Oberflächenrezeptoren ausgeführt und bewirkt eine stärkere bzw. schwächere Zellwanddurchlässigkeit für bestimmte Zucker. Das Ergebnis sind stärkere oder schwächere Fluoreszenzlichtimpulse, je nach Vorhandensein spezieller Zuckerreste auf der Membran der Hefezelle, die wiederum mit Con A-FITC-Molekülen eine Bindung eingehen und fluoreszieren.

Tabelle 5 Fluoreszenzoptische Differenzierung von Staub- und Bruchhefen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zellzyklusphase

Staubhefe:	besitzt sehr viele Bindungsstellen für Glucose auf der Zelloberfläche, schnelle Vergärung, der Endvergärungsgrad wird häufig erreicht; Normale Fluoreszenzintensitäten in der Anstellungsphase ; Geringe Fluoreszenzintensitäten in der Zellvermehrungsphase ; Relativ hohe Fluoreszenzintensitäten in der Gärungsphase .
Bruchhefe:	besitzt relativ wenig Bindungsstellen für Glucose auf der Zelloberfläche, langsame Vergärung, der Endvergärungsgrad wird häufig nicht erreicht; Normale Fluoreszenzintensitäten in der Anstellungsphase ; Hohe Fluoreszenzintensitäten in der Zellvermehrungsphase ; Relativ geringe Fluoreszenzintensitäten in der Gärungsphase .

Anhand der Vergleichsuntersuchungen mit der flusszytometrischen und der konventionellen Analyse konnte keine eindeutige Zuordnung getroffen werden, ob es sich bei den untersuchten Hefen um Bruch- oder Staubhefen handelt. Von den 21 Hefestämmen fanden wir zu 47% eine Übereinstimmung bei der flusszytometrischen, der konservativen Analytik und den empirischen Angaben, d.h. in 47% der Fälle konnte die Zuordnung Staub- oder Bruchhefe mit ja beantwortet werden. In 23% der Fälle gab es keine Übereinstimmung mit den empirischen Vermutungen, d.h. die Angabe über die eingesandte Hefe stimmte mit den fluoreszenzoptischen und den konventionellen Daten nicht überein. Bei 19% war das Ergebnis fraglich, weder die brauereinterne Angabe noch das flusszytometrische Ergebnis, bzw. der Helm-Test waren eindeutig oder die Angabe über das Flockulationsverhalten fehlte gänzlich. Bei 9% der Fälle konnte anhand der flusszytometrischen bzw. des konventionellen Helm-Testes sowohl eine Staub- als auch eine Bruchhefe diagnostiziert werden. Zu den vorliegenden Ergebnissen ist es daher unbedingt erforderlich, weitere Informationen (Herkunft, zellphysiologische Besonderheiten, Rhythmus der Führung, Rhythmus der Schrägagarkonservierung, Überprü-

Tabelle 6 Rh-Hefe aus verschiedenen Betrieben

Probe	Probeninfo	Peakmaxima des Con A-FITC-Peaks von Rh-Hefen		
		Anstellen	+ 3 Stunden	+ 3 Stunden
5	Rh-Hefe (Brauerei 1)	10,0	14,0	20,2
17	Rh-Hefe (Brauerei 2)	19,0	34,9	18,0
20	Rh-Hefe (Brauerei 3)	19,5	23,4	15,2

fung des Flockungs- und Sedimentationsverhaltens usw.) über die einzelnen Hefestämme zu erhalten bzw. abzufragen.

Eine zellzyklusabhängige Flockulation wird von Kathrine Smart (1999) beschrieben. In ihren Untersuchungen verwendet sie ausschließlich den modifizierten Helm-Test. Ihre Ergebnisse zeigen, dass das Flockulationsverhalten von Hefen in der exponentiellen und der stationären Phase unterschiedlich ist:

Exp. Wachstumsphase	Flockulation hoch
Stationäre Wachstumsphase	Flockulation niedrig
Ferner unterscheidet sie ein altersabhängiges Flockulationsverhalten bei Hefezellen:	
Junge Hefezellen	Flockulation mittel
Junge Mutterzellen	Flockulation hoch
Alte Mutterzellen	Flockulation niedrig

Die anfärbbare Zelloberfläche der verschiedenen Betriebshefepopulationen zeigte jeweils ein individuelles Profil. Am Beispiel von drei Rh-Stämmen (Probennummer 5, 17 und 20 in Tab. 3) aus unterschiedlichen Braustätten waren signifikante Unterschiede in der anfärbbaren Zelloberfläche nachzuweisen (Tab. 6).

Die Hefestämme mögen zwar aus der gleichen Bezugsquelle stammen, aufgrund der unterschiedlichen Gär- und Lager-, bzw. Konservierungsbedingungen, die in diesen Brauereien praktiziert werden, haben sich im Laufe der Jahre die zellphysiologischen Bedingungen drastisch verändert, d.h. Schrägagar-Kultivierung, Führung, Würzezusammensetzung, Gärtemperatur entsprachen nicht mehr den Bedingungen, die ursprünglich durchgeführt wurden.

Gegenüber dem Helm-Test Ergebnis zeigen diese Hefen ein schwaches positives Sedimentationsergebnis. In der Literatur wird der Rh-Stamm als Bruchhefe deklariert. In diesem Fall zeigt die Reihenuntersuchung ein übereinstimmendes Resultat.

Bei den Proliferationsuntersuchungen der (Tab. 1) wurden keine Untersuchungen über die Ruhephase (stationäre oder lag-Phase) der Kulturen geführt. Daher wurden die 21 verschiedenen Hefestämme über weitere 3 bis 4 Wochen ohne Würzezugabe, ohne Belüftung und bei Raumtemperatur gelagert, um dann erneut einem Helms Test sowie einer Zellzyklusanalyse und einer Con A-FITC-Färbung unterzogen zu werden.

Hier zeigt sich jedoch im Unterschied zu den Ergebnissen von Smart (1999), dass das Flockungsverhalten von Hefezellen aus der stationären Phase nicht niedrig, sondern teilweise extrem hoch ausfällt, was darauf zurückzuführen ist, daß die verschiedenen Hefestämme in unterschiedlichen Phasen ihres Zellzyklus eingelagert wurden (Tab. 2). Parallel zu diesen fluoreszenzoptischen

Histogrammen zeigen die Volumenmessungen beim Helm-Test ebenfalls hohe Werte. Die divergierenden Ergebnisse lassen sich nur dadurch erklären, dass die flusszytometrischen Analysen nur in Abhängigkeit zur jeweiligen Zellzyklusphase der Kultur und ihrer Altersstruktur zu werten sind (Ergebnisse teilweise nicht gezeigt).

4 Zusammenfassung

Mithilfe der fluoreszierenden Con A-FITC-Konjugate sollte festgestellt werden, ob eine Oberflächendifferenzierung von Staub- und Bruchhefe mit der flusszytometrischen Methode möglich ist. Da die Vergärungen der Betriebshefen in verschiedenen Braustätten und unter divergierenden Bedingungen (unterschiedliche Anstell- und Gärtemperaturen sowie Stammwürzegehalte) ablaufen, muss bei einer derartigen Differenzierung immer der zellphysiologische Zustand und die Zellzyklusphase, in der sich die Zellen befinden, berücksichtigt werden.

Das Flockungsvermögen einer Hefe ist somit abhängig von der Struktur der Zellwand, von der Häufigkeit der Führungen und vom Alter der Zellen in einer Population. Während der Zellvermehrung und der Gärung ändern sich die Strukturen auf der Zellwand. Die Flockulation muss daher als ein dynamischer Prozess angesehen werden, der fluoreszenzoptisch nicht durch eine „Einmal-Messung“ bestimmt werden kann.

Offensichtlich differieren die Staub- und Bruchhefen nach Con A-FITC-Koppelung während ihres Zellzyklus bezüglich ihrer Bindungsstellen, und zwar individuell stärker oder schwächer. Allerdings war auffallend, dass die Staubhefen in der Zellvermehrungsphase stärkere und in der Gärungsphase schwächere Fluoreszenzlichtsignale aufwiesen. Das deutet darauf hin, dass die Zellvermehrung mit einer schnellen Zuckerverwertung einhergeht, während in der Gärung eine schwächere Zuckerverwertung bei den Staubhefen festgestellt wurde.

Bruchhefen hingegen haben schwächere Fluoreszenzlichtsignale in ihrer Zellvermehrungsphase, dagegen stärkere in der Gärphase. Bruchhefen haben eine schleppendere Zellvermehrung. Dies drückt sich durch eine geringere Zuckeraufnahme in dieser Wachstumsphase aus. Ihre Zellen können aber während der Gärung, die noch zur Verfügung stehende Glukose intensiver verwerten.

Das Flockungsvermögen jedes Hefestammes ist reversibel. Im Laufe verschiedener Führungen mit veränderten physiologischen Bedingungen, im Laufe des Alterungsprozesses einer Population sowie im Laufe der Zellzyklusphasen ändert sich die Bereitschaft von Hefezellen zur Flockulation.

Die Flusszytometrie bietet hier die Möglichkeit, schnell Informationen zu liefern.

Danksagung

Wir danken der WiFö der deutschen Brauwirtschaft für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung des Forschungsvorhabens B 60. Den Betriebs- und Qualitätsleitern der verschiedenen Brauereien sei für die Bereitstellung der Hefeproben sehr herzlich gedankt.

5 Summary

Hutter, K.-J., Borek, M., and Remor, M.: Biomonitoring of brewery yeasts by fluorescent optical methods in practice – VIII. Communication: On the cell cycle-dependent flocculation behaviour of bottom and top-fermented brewery yeasts — *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 54, No 7/8, 165 – 173, 2001

BC 44 Yeast propagation

The sedimentation behaviour of bottom-fermented brewery yeasts is of biotechnical and economic interest when brewing beer. In the majority of cases this is based on empirical values and observations made by the respective production manager. At the present point in time there is no final scientific explanation as to why some bottom-fermented strains flocculate and others do not or why yeasts change their sedimentation behaviour in the course of different generations. This work was intended to determine using the lectin Con A whether surface receptors are localised on the cell membranes of flocculating or powdery yeast, respectively, which preferentially link with this lectin, because it is known that Con A specifically links with α -D-Mannose and α -D-Glucose.

Hutter, K.-J., Borek, M., et Remor, M.: Biomonitoring de la levure industrielle en pratique avec des méthodes de fluorescence optique – VIII^{ème} communication: sur le comportement de floculence dépendant des cycles cellulaires de levures industrielles hautes et basses — *Monatsschrift für Brauwissenschaft* 54, No 7/8, 165 – 173, 2001

BC 44 Culture pure de levure, propagation de levure

Le comportement sédimentaire de levures industrielles basses a un intérêt biotechnique et économique pour la fabrication de la bière. Celui-ci repose dans la majorité des cas sur des données empiriques et sur des observations du chef de production du moment. Actuellement il n'y a pas d'explications scientifiques absolues concernant la floculation et la non-floculation des certaines souches de fermentation basses ainsi que sur le comportement de sédimentation qui varie en fonction des générations. A l'aide de la lectine Con A on devait déterminer si les récepteurs de la surface étaient localisés sur les membranes cellulaires des levures floculentes ou poussiéreuses qui effectuent une liaison préférentielle avec cette lectine. Il est connu, que la Con A lie spécifiquement le α -D-mannose et le α -D-glucose.

6 Literatur

- Beckmann, M.: Das Flockungsverhalten der Hefe aus heutiger Sicht (Vortrag 17.4.1998), 5. Dresdner Brauertag der VLB und des Sächsischen Brauerbundes e.V., 1998.
- Burns, J.A.: *J. Inst. Brewing* **43**, 31, 1937.
- Dittrich, W., Göhde, W.: Impulszytometrie bei Einzelzellen in Suspensionen, *Z. Naturforschung* **24**, 360 – 361, 1969.
- De Clerck, J.: *Lehrbuch für Brauerei*, Bd. I, 2. Auflage VLB Berlin, E. Blaschke, Berlin, pp. 564, 1964.
- Gilliland, R.B.: *Wallerstein Lab. Comm.* **20**, 41, 1957.
- Griffin, S. R., und MacWilliam, J. C.: Variation of cell wall content in flocculent and non-flocculent yeast strains, *J. Inst. Brew.* **75**, 355 – 358, 1969.
- Harris, G., Thompson, C.C.: *J. Inst. Brewing* **66**, 293, 1960.
- Helm, E., Thorne, R.S.W.: *Technical Proc, MBAA*, S.3, 1955.
- Hutter, K.-J.: Flußzytometrische Analysen zur Gärfähigkeit verschiedener Hefen, *Brauwelt* **133**, 44/45, 2246 – 2253, 1993.
- Hutter, K.-J. (1999): Habilitationsschrift: Biomonitoring bei Gärprozessen mit Hilfe der Flußzytometrie und der automatisierten Bildanalyse, TU-Dresden
- Hutter, K.-J. (2000): Transparenz der Gärung und Kontrolle mit Hilfe der flußzytometrischen Analytik, *Brauwelt* **140**, 41, 1634 – 1641, 2000
- Kaku H., Shibuya N.: Use a Monomeric, Monovalent Lectin Derivatives for Flow Cytometric Analysis of Cell Surface Glycoconjugates In: *Methodes in Molecular Medicine*, Vol. 9, Lectin Methods and Protocols, (J. M. Rhodes and J. D. Milton, Humana Press Inc., Totowa, NJ, eds.), 1996.
- Kraemer, P.M., Tobey, R.A., van Dilla, M.A.: Flow microfluorimetric studies of lectin binding to mammalian cells, *J. Cell Physiol.* **81** 305 – 314, 1973.
- Kunze, W.: *Technologie Brauer und Mälzer*, 4. Auflage, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, 1994.
- Lense, K.: *Katechismus der Brauerei-Praxis*, 11. Aufl., Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1956.
- Pringle, J.R., Hartwell, L.H.: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance (eds.: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R.) Cold Spring Harbor Press, pp. 97 – 142, 1981.
- Remor, M.: Hefemanagement – Zellphysiologische Kontrolle der Betriebshefe mit flußzytometrischen Analysen, Diplomarbeit, Fachhochschule Mannheim, 1999.
- Silbereisen, K.: *Wochenschrift f. Brauerei* **55**, 153, 1938.
- Smart, K.A., Boulton, C.A., Hincliffe, E., Molzahn, S.J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53** (1), 33 – 38, 1995.
- Smart, K.A.: Yeast Physiology - a new era of opportunity, EBC Symp., Nutfield, Nov., 1999 a.
- Smart, K.A.: Aging in brewing yeast, *Brewers' Guardian*, February, 1999 b.
- Stewart, G. G., Russell, I., und Garrison, I. F.: Factors influencing the flocculation of brewer's yeast strains, *Proc. 4th. Intern. Symp. on Yeasts, Wien, Part I*, page 139, 1974.
- Windisch, S., Emeis, C.C.: *Monatsschrift f. Brauerei* **13**, 2, 1960.

(Manuskripteingang: 29. 3.2001)