

K.-J. Hutter

Flusszytometrische Prozesskontrolle untergäriger Bierhefen

Seit jeher spielt in der menschlichen Zivilisation die Spezies *Saccharomyces cerevisiae* sowohl im praktischen Leben als auch in der Wissenschaft eine bedeutende Rolle. In der Lebensmitteltechnologie wird dieser Organismus als Reinkultur bei der Bier-, Wein- und Brotherstellung eingesetzt. In der Wissenschaft verwendete man in den letzten 50 Jahren die Hefe, die zu den niederen Eukaryonten zählt, zu Grundlagenstudien, z.B. zur Aufklärung von Stoffwechselabläufen. Als Beispiel sei hier exemplarisch die Glykolyse angeführt. Neuerdings nehmen die Hefezellen in der Wissenschaft einen wichtigen Platz als Wirtszelle für die Fremdprotein-Expression ein.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeführung

(Deskriptoren: Hefe, Flusszytometrie, Prozesskontrolle, Hefephysiologie.

Descriptors: Yeast, flow cytometry, process control, yeast physiology).

1 Einsatz untergäriger Hefen in der Brauereitechnologie

Die *Saccharomyces*-Hefen sind einfach, schnell und kostengünstig zu kultivieren. Man kann problemlos sowohl Haplonten wie auch Polyplonten züchten. Diese Umstände haben die *Saccharomyces*-Hefen zu einem beliebten Organismus gemacht, der vielseitig in der Molekularbiologie und in der Grundlagenforschung einsetzbar ist. Es war daher eine Frage der Zeit, bis die Wissenschaft vor kurzem über die erfolgreiche Aufschlüsselung des Hefegenoms berichten konnte. Die Kenntnis über die genetische Zusammensetzung des Hefegenoms setzt die Brauereitechnologie in die Lage, kleinste genetische Variabilitäten während des Zellwachstums nachzuweisen. Starterkulturen könnten vor der Zeuggabe genetisch kontrolliert werden. Eine wichtige Maßnahme im Hinblick auf die biologische Betriebskontrolle und die Qualitätssicherung.

Genetisch besitzt die diploide Spezies *Saccharomyces cerevisiae* 32 Chromosomen. Dies gilt für die untergärige *Saccharomyces*-Hefe (Knippers et al., 1990). Bei der obergärigen *Saccharomyces*-Hefe findet man sowohl polyploide als auch aneuploide Stämme, d.h. obergärige *Saccharomyces*-Spezies können den doppelten oder mehrfachen Chromosomensatz als die diploiden Hefen besitzen, bzw. mit unterschiedlichen Modalzahlen im Genom ausgestattet sein.

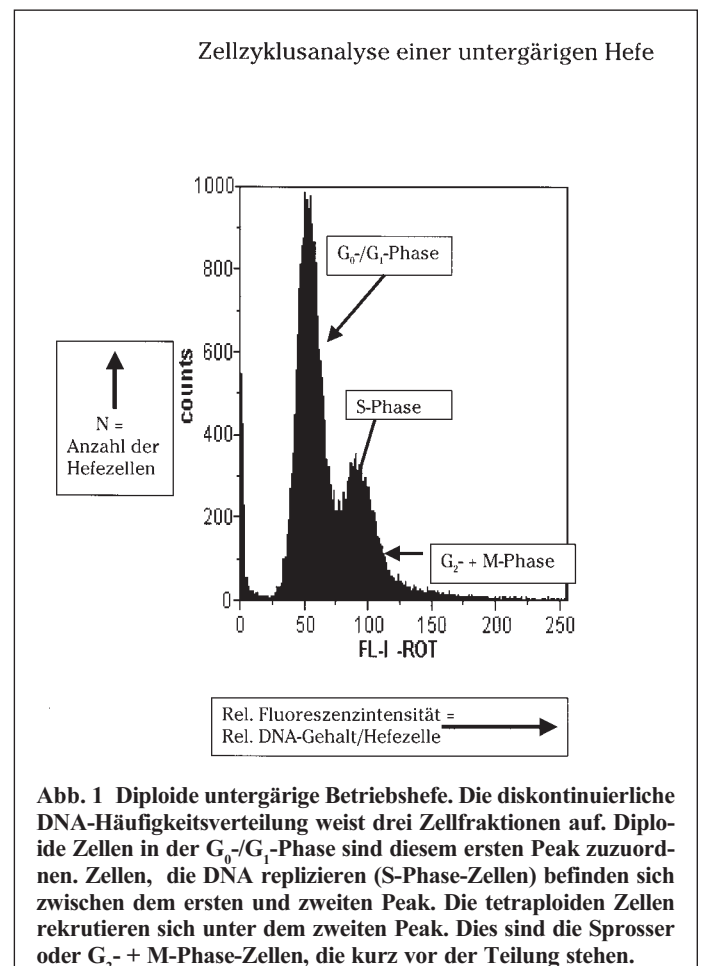
Untergärige Biere werden zur Herstellung von:

- Hellen,
- Pilsener,
- Export,
- Märzen,
- Fest-Bieren und einfachen Maiböcken verwendet.

2 Zellzyklusanalysen der untergärigen Betriebshefen während der Vermehrung und Gärung

Die untergärigen Hefen, die Objekt dieser Untersuchungen sind, wurden technologisch bekannt als man in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts begann, helle Biere – vor allem die stärker gehopften Biere des Pilsener Typs – zu brauen.

Es gibt einige wesentliche intrazelluläre Parameter, die auf die Physiologie der Hefen großen Einfluss haben. Dazu zählt der DNA-Gehalt pro Zelle.



Zellzyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

- A = Autolyse
- M = Mitose (Zellen in der Zellteilung)
- S = Synthese (Zellen während der Replikation)
- G₁ = gap 1 (Zellen vor der Replikation)
- G₂ = gap 2 (Zellen nach der Replikation)
- G₀ = quieszente Zellen
- G_{1mZ} = G₁-Mutterzellen
- G_{1sZ1} = große G₁-Sproßzelle
- G_{1sZ2} = kleine G₁-Sproßzelle

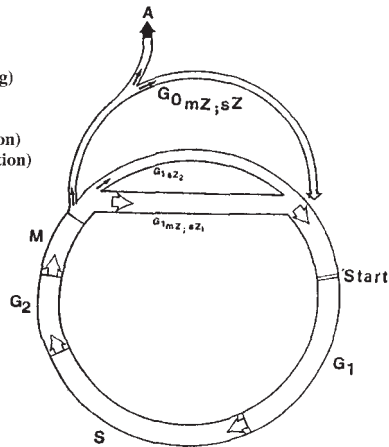


Abb. 2 Zellzyklus der untergärigen und obergärigen Bierhefen. Die Dauer des Zellzyklus ist bei den einzelnen Hefestämmen sehr unterschiedlich.

Bezüglich des DNA-Gehaltes zeichnen sich die Back- und Brauerhefen durch einige Besonderheiten in der Proliferation aus. Es erfolgt in der vegetativen Vermehrung eine asymmetrische Teilung durch Ausbildung einer zunächst kernlosen Knospe.

Der Beginn der Proliferation ist allerdings abhängig von der Größe der Hefezelle und der Zusammensetzung der Membran. Gekühlte Lagerhefe aus dem Hefetank befindet sich auf Grund ungünstiger Wachstumsverhältnisse in der Ruhephase des Zellzyklus. Diese Zellen in der G₀-Phase nehmen nicht am Zellzyklus teil. Es handelt sich zwar um vitale Hefezellen, aber sie sind in diesem Stadium nicht teilungs- bzw. vermehrungsfähig. Man bezeichnet diese Zellen auch als quieszente, schlafende oder pseudoseneszente Hefen (Darzynkiewicz et al., 1982). Solche Zellen können Tage und/oder Wochen in diesem Zustand überdauern, ohne abzusterben. Da die Proliferationsaktivität vollends zurückgeschraubt ist, sind G₀-Phase-Hefezellen auch nicht gäraktiv.

Im Schema der Abbildung 2 sind diese Zellen als Mutterzellen (= G_{0mZ}) bzw. Sproßzellen (= G_{0sZ}) bezeichnet.

Die G₁-Phase der Hefezellen gliedert sich in die G₁-Phase der Sproßzelle (G_{1sZ1}) und die G₁-Phase der Mutterzelle (G_{1mZ1}).

Die G₁-Phase nimmt von allen Wachstumsphasen die längste Zeit im Zellzyklus der *Saccharomyces*-Hefen in Anspruch. In der lag-Phase (Anschleibe- oder Ankommen-Phase) dauert die G₁-Phase bedeutend länger (Stunden) als z.B. in der exponentiellen Wachstumsphase (30 – 45 Minuten). Die Verweildauer der Mutter- und der Tochterzelle ist in der G₁-Phase unterschiedlich lang. Dies hängt von den Nährsubstrat- und Temperaturbedingungen ab. Sind diese günstig (wie etwa in der exponentiellen Wachstumsphase) kann die Mutterzelle sofort wieder in einen neuen Zellzyklus eintreten (G_{1mZ}). Bei ungünstigen Wachstumsbedingungen wird hingegen kein Zellzyklus initiiert. Die Hefezellen, sowohl Mutter- als auch Sproßzellen, scheren aus dem Zyklus aus und werden zur ruhenden bzw. quieszenten Zelle. In dieser Phase verharren sie so lange bis günstige Umweltbedingungen vorherrschen, oder aber die Zellen absterben; sie autolysieren (siehe im Schema = A).

Bei den Sproßzellen (G_{1sZ}) gibt es mehrere Möglichkeiten, sich im Zellzyklus zu bewegen:

- hat die Sproßzelle noch nicht die Größe der Mutterzelle erreicht, muss sie zunächst ein Größenwachstum durchführen (siehe im Schema = G_{1sZ2}) bevor sie einen Zellzyklus initiieren kann (Hutter und Schärfe, 1997);
- besitzt die Sproßzelle die Größe der Mutterzelle, kann sie sofort einen neuen Zellzyklus durchwandern (G_{1sZ}). In der exponentiellen Wachstumsphase herrschen sehr gute Voraussetzungen für das Zellwachstum und die Zellvermehrung. Unter diesen Umweltbedingungen gebären die Mutterzellen morphologisch große Sproßzellen. In der exponentiellen Wachstumsphase ist die G₁-Phase der proliferierenden Zellen relativ kurz, da sowohl Sproß- als auch Mutterzellen über den entsprechenden Gehalt an RNA, Proteinen und Enzymen verfügen, also diese Makromoleküle nicht erst synthetisieren müssen. Die morphologische Zusammensetzung der Größenklassen der G₁-Population ist viel einheitlicher als z.B. in der Anschleibe- oder während der Nachgärung und Reifung;
- herrschen ungünstige Umweltbedingungen treten die Sproßzellen ebenso wie die Mutterzellen in die quieszente Phase ein (G_{0sZ}), oder sterben ab (Autolyse = A).

Die G₁-Phase ist die Zellzyklusphase in der die Hefezelle intensiv gärt, d.h. in der G₁-Phase findet der Extraktabbau statt. Diese Wachstumsphase ist bei der Bierherstellung von Interesse. So sind denn zwei verschiedene G₁-Phasen zu unterscheiden. Die G₁-Phase bei der Zellvermehrung ist relativ kurz und gekennzeichnet durch geringen Extraktabbau während die G₁-Phase der Zellen in Gärung nach Beendigung der Zellvermehrung sehr viel länger dauert. In dieser Phase erfolgt jedoch der größte Teil des Extraktabbaus.

Während der Gärung hat die Hefezelle einen großen Stoffumsatz, um die nötigen Reduktionsäquivalente für die Synthese intrazellulärer Substanzen bereitzustellen. Dazu benötigt sie ein sehr differenziertes Angebot an Nährstoffen (Extrakt, Vitamine, Aminosäuren, Spurenelemente).

Die Alterung der Hefezelle muss ebenfalls bei der Zellzyklusbeurteilung einer Population berücksichtigt werden. *Saccharomycetaceae* können nur eine begrenzte Zahl an Sproßzellen setzen. Da nach jeder Geburt eine Sproßnarbe auf der Zellmembran gebildet wird (Smart, 1999), die in diesem Bereich die Zellwand

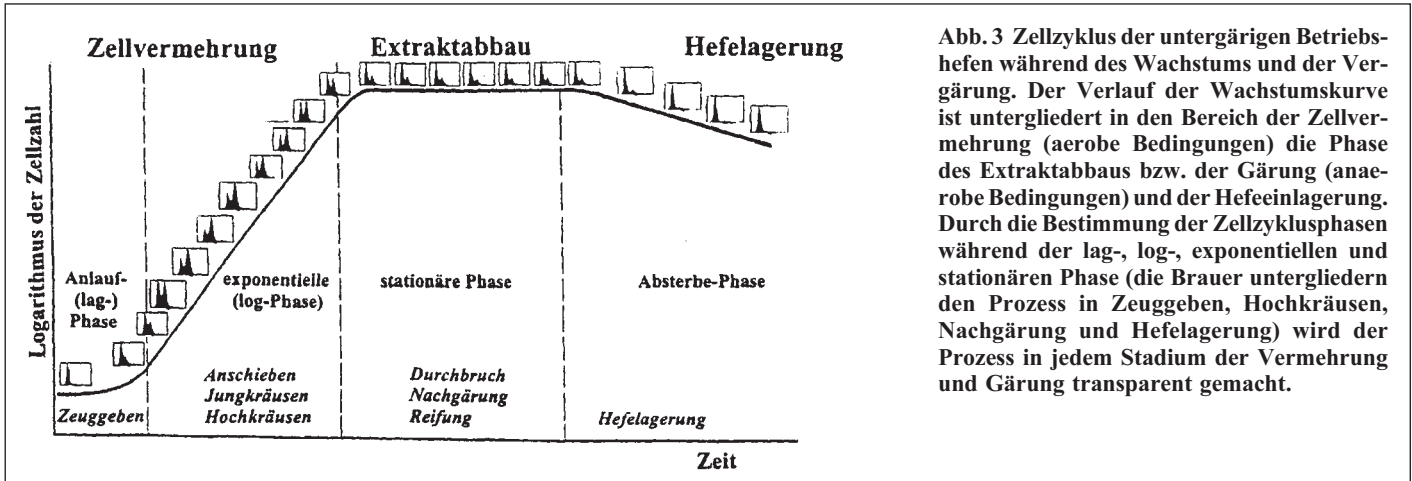


Abb. 3 Zellzyklus der untergärigen Betriebshefen während des Wachstums und der Vergärung. Der Verlauf der Wachstumskurve ist untergliedert in den Bereich der Zellvermehrung (aerobe Bedingungen) die Phase des Extraktabbaus bzw. der Gärung (anaerobe Bedingungen) und der Hefeeinlagerung. Durch die Bestimmung der Zellzyklusphasen während der lag-, log-, exponentiellen und stationären Phase (die Brauer untergliedern den Prozess in Zeuggeben, Hochkräusen, Nachgärung und Hefelagerung) wird der Prozess in jedem Stadium der Vermehrung und Gärung transparent gemacht.

undurchlässig für den Stoffaustausch macht, werden diese Zellen einen viel langsameren Zellzyklus absolvieren als die potenten, jungen Hefezellen mit optimaler Fluidität. Zu irgendeinem Zeitpunkt werden diese Zellen keinen Zellzyklus mehr initiieren und absterben (Autolyse = A).

Populationen, die aus Zellen zusammengesetzt sind mit derart differenzierten zellphysiologischen Zustandsformen, können optimal durch zytometrische Analysen charakterisiert und kontrolliert werden.

Hefezellen, die den „Start-Punkt“ des Zellzyklus überschritten haben, müssen die G_1 -Phase beenden und in die Synthese-Phase (S-Phase) eintreten (Slater et al., 1977; Hutter und Eipel, 1978). In der S-Phase wird die genetische Information repliziert. S-Phase-Zellen sind bestrebt, unter allen Umständen die DNA-Synthese und später die Mitose zu beenden. Diese Tatsache wirkt sich günstig auf den Brauprozess aus, da frisches Inokulationsgut aus vorangegangenen Führungen zunächst in Hefetanks vor erneuter Zeuggabe (Inokulation) gelagert wird. Das bedeutet, dass sich viele Zellen der Population in einer einheitlichen Wachstumsphase (G_0 -Phase) befinden. Es liegt somit eine Teilsynchronisation vor. Günstige Ausgangssituation also, um das Wachstum und die Gärung der Population durch physikalische Parameter zu beeinflussen und zu steuern. Logischerweise findet auch in der Synthese-Phase, die relativ kurz ist, wenig Extraktabbau statt, da die Zellen mit der Replikation der DNA beschäftigt sind.

Nach Beendigung der Replikation bereitet sich die Zelle in der G_2 -Phase auf die Zellteilung vor. Die G_2 -Phase ist gekennzeichnet durch die Orientierung des Zellkerns in Richtung zur Spornzelle. Die DNA-Knoten liegen in beiden Zellbereichen vor und sind durch fadenförmige DNA-Strukturen noch miteinander verbunden. Diese Zustandsform ähnelt dem der eukaryontischen Zellen in der Anaphase, wenn die Chromatiden zu den Spindelpolen transportiert werden. Danach schnüren sich die beiden Zellen voneinander ab. Es liegen zwei Zellen mit identischen DNA-Gehalten vor, die nun ihren eigenständigen, individuellen Zellzyklus durchwandern können. Das Schema der Abbildung 3 zeigt die einzelnen Wachstumsstadien einer untergärigen Hefe während des Produktionsprozesses

3 Die Flusszytometrie, ein Verfahren zur Kontrolle der Gärung und Reifung

Die Flusszytometrie ist ein Verfahren zur automatisierten Fluoreszenzmessung an suspendierten Zellen. Dieses Analyseverfahren

erlaubt u.a. die Messung intrazellulärer Makromoleküle (z.B. DNA-Gehalte von einzelnen Zellen) bis hinunter zu Absolutwerten von 10^{-16} g/Zelle (dies entspricht dem DNA-Gehalt von Hefen und beerpathogenen Bakterien) und einer Messgeschwindigkeit von 1000 – 10 000 einzelner Zellen pro Sekunde (High Speed Analysengeräte). Neben der differentiellen Zählung von Hefezellen (beispielsweise während des Herführens oder während des Anstellens) gibt die flusszytometrische Analytik Auskunft über das Monitoring der Wachstumseigenschaften, der genetischen Stabilität der Betriebshefe und des zellphysiologischen Zustandes während des Gärprozesses (siehe Abb. 1 und Abb. 3).

In Kombination mit den Funktionalitätsparametern können intrazelluläre Abläufe, wie Transport der Zucker in die Zelle und ihre glykolytische Spaltung ermittelt werden.

4 Unterschiedlicher Zellzyklusverlauf der Staub- und Bruchhefen

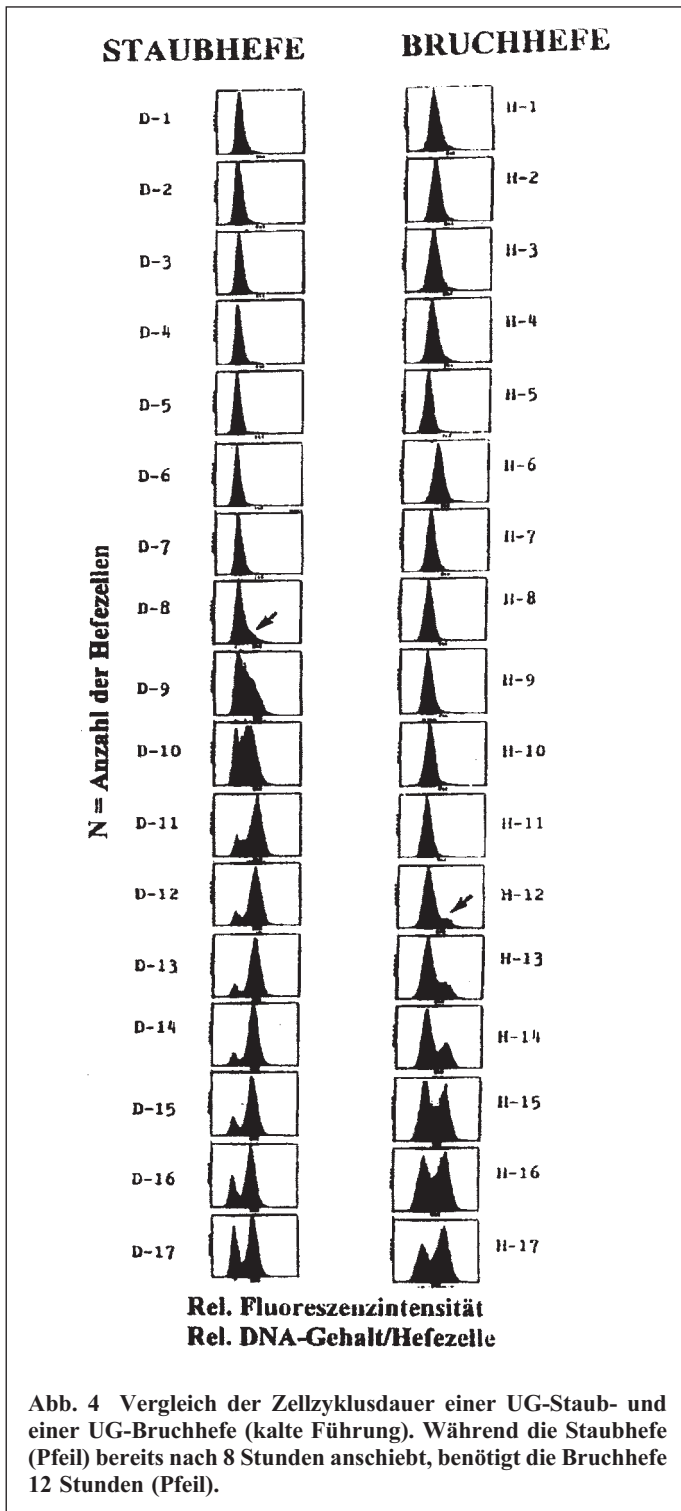
Bei den untergärigen Bierhefen gibt es zwei Heferassen, die als Staub- bzw. als Bruchhefe bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich in der Schnelligkeit des Wachstums und in ihrem Sedimentationsverhalten.

Staubhefen bilden im Verlauf des Gärprozesses keine großen Aggregate. Nach de Clerck (1956) besitzen die Staubhefen Aggregate nach 2/3 der Gärung in der Größenordnung von etwa 1000 Zellen, während Bruchhefen nach 2/3 der Gärung sehr große Aggregate von mehreren 1000 Zellen bilden.

Staubhefen schieben früh an (je nach Anstelltemperatur nach 6 bis 8 Stunden) und proliferieren sehr intensiv, während die Bruchhefen erst nach 12 bis 16 Stunden anschieben und eine entsprechend längere Proliferationsdauer aufweisen.

Das zweite wichtige Unterscheidungsmerkmal dieser Hefen ist das Sedimentations- oder Flockulationsverhalten. Bruchhefen haben auf Grund ihrer Aggregatbildung ein sehr gutes Sedimentationsverhalten, während die als einzelne Zellen suspendierten Staubhefen natürlicherweise schlechte Sedimentationseigenschaften besitzen.

Bei der Prozessbeobachtung untergäriger Bruch- und Staubhefen (kalte Führung, Abb. 4) konnte mit Hilfe der Zellzyklusanalytik der Anschibezeitpunkt, der Beginn und die Dauer der Zellvermehrung exakt bestimmt werden.



5 Gäraktivität und Gärgeschwindigkeit der untergärigen Hefe

Mit der flusszytometrischen Analytik steht dem Brauereitechnologen ein Verfahren zur Verfügung, das schnelle Aussagen über das Wachstumsverhalten einer mikrobiellen Population zulässt. Im speziellen Fall der Bierherstellung kann man nun die Dauer des Zellzyklusses einzelner Hefezellen bestimmen, z.B. wann die einzelnen Zellen einen Zellzyklus starten und wie lange die einzelnen Zellen der Population in der lag-Phase, der log-Phase oder der Nachgärung bzw. stationären Phase verbleiben. Durch diese zellkinetische Online Analyse kann man somit die Gärfähig-

keit bzw. die Gärgeschwindigkeit der Population ablesen.

Die Gärfähigkeit sagt generell etwas über die Vitalität einer Hefepopulation aus. Nur vitale Zellen sind in der Lage, zunächst Zellvermehrung (aerobes Wachstum) und dann Gärung (anaerobes Wachstum) durchzuführen. Die Gärfähigkeit ist demnach die Zeit, die eine Hefepopulation benötigt, nach einer aeroben Zellvermehrungsphase (logarithmische Wachstumsphase) und anschließender anaeroben Gärphase den zur Verfügung stehenden Extrakt der Würze in einer bestimmten Zeit zu verstoffwechseln.

Inaktive Hefezellen, die keinen Zellzyklus mehr initiieren, sind demzufolge nicht mehr vermehrungs- bzw. gärfähig.

Die Gärgeschwindigkeit einer Population ist daran abzulesen, in welcher Zeit die Hefezellen in der aeroben Zellvermehrungs- bzw. in der anaeroben Gärphase einen Zellzyklus durchwandern. Die Gärgeschwindigkeit variiert natürlich während des Gärprozesses und ist abhängig von den Umwelteinflüssen (Nährsubstrat, Temperatur, toxische Substanzen), der Hefeflasche, obergärig bzw. untergärig und der zellphysiologischen Funktionalität der einzelnen Hefezellen (Membranpermeabilität, Fluidität, intrazellulärer pH-Wert, quieszente Wachstumsphase etc.).

Bei den untergärigen Staub- und Bruchhefen macht sich die Gärgeschwindigkeit besonders zum Zeitpunkt des Anschiebens bemerkbar (Abb. 4). Bei gleichen Nährsubstrat- und Temperaturbedingungen beginnt die Staubhefe 4 Stunden früher mit dem Anschieben als die Bruchhefe.

Obergärige Hefen haben eine höhere Gärgeschwindigkeit als untergärige Betriebshefen. Im Allgemeinen verläuft die Gärgeschwindigkeit zunächst zögerlich zu Beginn des Anstellens (Ankommen oder lag-Wachstumsphase), sie ist in der Zellvermehrungsphase (Jung- und Hochkräusen oder log-Wachstumsphase) sehr schnell (ca. 30 – 45 Minuten), während sie in der Gär- und Nachgärphase (stationäre Wachstumsphase) sehr langsam, d.h. viele Stunden verläuft.

6 Problematik der Kontrolle der Drauflass- oder Kräusentechnik

Die Funktionalität der einzelnen Hefezellen, die Verwendung von Staub- oder Bruchhefe, die Anzahl der Führungen, die die Hefepopulation bereits absolviert hat, sowie die Drauflass- oder Kräusentechnik sind in den mittleren und größeren Produktionsstätten mit ZKG-Ausstattung von Betrieb zu Betrieb sehr unterschiedlich. Da jeder Betrieb die Befüllung der ZKG's auf Grund der Sudfolge und Ausschlagmenge anders vornehmen muss, kann die Befüllung bis zu 30 Stunden dauern. Es ist daher für jeden Betrieb von entscheidender Bedeutung, einen individuellen Rhythmus zu finden, der die Hefepopulation des Kräusenbieres über mehrere Stunden im Stadium der Zellvermehrung hält, um Kräusen in optimaler Wachstumsphase auf die frischen Sude draufzulassen. Die Kräusen sollten noch nicht in Gärung übergegangen sein, so dass garantiert werden kann, dass die Zellvermehrung auf 30 – 40 Mio Zellen pro ml oder mehr ansteigt. Diese Zellzahl ist jedoch immer abhängig von der Einsaatmenge funktioneller, d.h. vermehrungs- und gäraktiver Hefezellen, der Betriebsausstattung, der Sudfolge usw. Sobald die Population eine maximale Zellzahl erreicht hat, wird die Phase der exponentiellen Zellvermehrung durch Kontakthemmung der Hefen in der Population unterbrochen. Der Zellzyklus dauert ab jetzt viel länger, d.h. die Hefezellen benötigen insgesamt mehr Zeit, um die einzelnen Wachstumsphasen zu durchlaufen. Das wiederum bedeutet, dass die Hefezellen

Biomonitoring der untergärigen ZKG-Vergärung

Probe Probenahmezeit	DNA-Gehalt	Glykogen-Gehalt	Glykogen- Peakmaxima
Probe 1 t = 0 h			38
Probe 2 t = 1h nach Tank voll			38
Probe 3 t = 2 h			40
Probe 4 t = 3 h			42
Probe 5 t = 4 h			37
Probe 6 t = 5 h			40
Probe 7 t = 6 h			38
Probe 8 t = 7 h			44
Probe 9 t = 8 h			40
Probe 10 t = 9 h			44
Probe 11 t = 10 h			40
Probe 12 t = 11 h			45
Probe 13 t = 14 h			45
Probe 14 t = 17 h			40
Probe 15 t = 20 h			38
Probe 16 t = 23 h			40
Probe 17 t = 26 h			40
Probe 18 t = 29 h			42
Probe 19 t = 32 h			44
Probe 20 t = 35 h			42

Abb. 5 Bei diesem Prozess wurde im Eintankverfahren vergoren. Das Zeug wurde vorher 6 Stunden stimuliert, bis die Hefezellen in der sprossenden Phase waren. Danach wurde das Zeug im ZKG draufgelassen. Die Hefen führten ihre Proliferation ohne Unterbrechung weiter fort. Die Hochkräusen im ZKG dauerten 16 Stunden. Die Dauer der Niederkräusen betrug 8 Stunden. Ab der 24. Stunde ging die Population in Gärung über.

nun auch viel länger in der G_1 -Phase verharren. Da bekannt ist, dass Hefen besonders in dieser Zellzyklusphase Extrakt abbauen, schließt sich an die Phase der Zellvermehrung die Phase der Gärung an. Man sollte also versuchen die Population so zu stimulieren, dass die Zellvermehrungsphase (aerobe Vermehrung) einige Stunden nach dem Drauffassen abgeschlossen ist, so dass die Population reibungslos in die Gärphase (anaerobe Vermehrung) übergehen kann.

Die Unterbrechung der Produktion durch arbeitsfreie Wochenenden, durch Feiertage oder durch zwangsbedingte Reparaturarbeiten bedeutet, dass der Anstell-, Kräusen- und Drauffassrhythmus gestört wird. Danach treten beim Anstellen und Herführen Verzögerungen in der Zellvermehrung ein, die wiederum zu langsameren Vergärungen führen.

Hefen, die über einen längeren Zeitraum gelagert werden müssen, benötigen längere Adaptionszeiten, um wieder in die Phase der Zellvermehrung zu gelangen, wenn sie keine Würze-, Sauerstoff- und Temperaturstimulation während dieser Zeit erhalten. Diese Zeiten können überbrückt werden, indem man die Zellvermehrungsphase mit einfachen Mitteln aufrecht erhält und einen bestimmten Extraktgehalt der Würze nicht unterschreitet. Das bedeutet, dass die zellphysiologischen Bedingungen für die Betriebshefe kontinuierlich optimal gehalten werden (d.h. in der sprossenden Phase) und permanente Zellvermehrung erfolgt. Die gebildeten Stoffwechselprodukte wie Äthanol und CO_2 liegen in geringer Konzentration vor, so dass zellphysiologisch die Vermehrung der Hefepopulation nicht gestört wird.

7 Planung der Herführung, des Anstellens, des Drauffassens

7.1 Stimulation der Betriebshefe in einem Biotank

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten das Herführen, Anstellen und Drauffassen zu optimieren. Nachfolgend werden 4 Techniken beschrieben, um mit Hilfe der Flusszytometrie jeweils den richtigen Zeitpunkt dafür zu bestimmen.

Durch geeignete Stimulation der Betriebshefe sollte bei der Herführung und nach dem Drauffassen die Population in der exponentiellen Phase der Zellvermehrung gehalten werden, um mit stimulierten Zellen den Gärtank anzustellen. Die Stimulation sollte in einem Gefäß oder Tank mit genügend Steigraum durchgeführt werden. Das Verhältnis Satz zu Würze sollte 1 : 4 betragen.

Der Extraktgehalt von 9,5% darf bei dieser Stimulation (Herführung im Biotank) nicht unterschritten werden. Das bedeutet, dass die Würze bei 9,5% noch keine nachteilige Auswirkung bezüglich der Zellphysiologie der Hefezellen hat, da die Verstoffwechslung noch nicht zu weit fortgeschritten ist. Die Transparenz durch die Zellzyklusanalytik zeigt die günstigste Wachstumsphase für das Anstellen an. Dies ist die exponentielle Wachstumsphase. Es ist darauf zu achten, dass die Temperatur der Ausschlagwürze mit der Temperatur des draufzulassenden Zeugs übereinstimmt. Sie darf auf keinen Fall unterschritten werden, sonst kommt es zu Wachstumsverzögerungen.

7.2 Herführung des Zeugs aus dem Biotank

Zeug aus der Hefelagerung (nach Wochenenden, Feiertagen, Sudpausen usw.), das bei $3^\circ - 4^\circ C$ eingelagert war, sollte in einem Biotank 1 : 4 (1 Teil Hefe : 4 Teile Würze) mit Würze bei Anstelltemperatur unter Umpumpen und teilweiser Belüftung 6 – 8 Stunden stimuliert werden. Die Dauer der Stimulation ist abhängig von der Anstelltemperatur. Bei höheren Anstelltempe-

raturen ($12^\circ C$ und höher) kürzer stimulieren, bei kalter Führung ($8^\circ - 9^\circ C$) entsprechend länger stimulieren. Es ist zu betonen, dass das Mischungsverhältnis abhängig ist vom zellphysiologischen Zustand der Hefe, so dass die Anstelltemperatur und die Dauer der Stimulation mit Umpumpen und Belüftung immer an die Betriebsgegebenheiten angepasst und entsprechend variiert werden müssen.

Der Biotank sollte von der Größe so ausgelegt sein, dass durch die entstehende Schaumbildung ein Überlaufen vermieden wird. Für das o.a. Mischungsverhältnis würde bei 25 hl (5 hl Hefe in 20 hl Würze) ein Biotank mit 100 hl ausreichen.

Der Satz von 25 hl stimulierten Zeugs sollte mit einem ausgeschlagenen, frischen Sud, der auf die Temperatur des Jungbieres gekühlt wird, draufgelassen werden. Alle noch folgenden Sude werden ohne Zeug draufgelassen bis Tank voll, d.h. dass im Eintankverfahren vergoren wird. Die 25 hl stimulierten Zeugs sind ausreichend zur Vergärung von 3500 hl in einem 5000 hl ZKG. Es sei nochmals betont, dass das Mischungsverhältnis immer an die Funktionalität der Hefe und der jeweiligen Betriebsgröße angepasst sein muss.

Zur Optimierung und Kontrolle empfiehlt sich die flusszytometrische Zellzyklusanalyse. Die Probenahme sollte für eine derartige Kontrolle so erfolgen, dass

- Probenahme über die Dauer der Stimulation in stündlichen Abständen, um einen Hinweis zu bekommen, wie lange es dauert bis die Hefepopulation in der exponentiellen Wachstumsphase eingelaufen ist. Dies wäre dann der richtige Zeitpunkt der Zeuggabe.
- Probenahme nach jedem draufgelassenen, frischen Sud dient der Kontrolle, ob eine Retardierung in der Zellvermehrung eingetreten ist.
- schließlich ab Tank voll Probenahme über 15 Stunden, um festzustellen, wie lange die exponentielle Wachstumsphase andauert und wann die Population in Gärung übergeht. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Probenahme alle 12 Stunden ausreichend.

Nach dieser Bestandsaufnahme kann die Stimulationszeit und der Drauffassrhythmus des Betriebsgärprozesses aufgrund verschiedener Parameter (Belüftungsintervall, Umpumpen, Rühren, Temperatur (beim Anstellen bzw. beim Drauffassen), kürzere oder längere Stimulation, Mischungsverhältnis Hefe zu Würze, usw.) variiert und für nachfolgende Gärprozesse optimiert werden.

7.3 Kräusen aus laufenden ZKG's

Kräusen aus dem laufenden ZKG sollten in der G_2 -Phase des Hefezyklus (= dies ist die Phase der Zellvermehrung, bzw. log-Wachstumsphase) zum Anstellen eines frischen ZKG's gewonnen werden (dies sind Hefezellen aus den ersten Stunden nach Tank voll). Hierbei ist unbedingt zu beachten, dass keine unterschiedlichen Temperaturniveaus zwischen dem Zeug aus der laufenden Gärung und dem ausgeschlagenen Sud im ZKG auftreten. Bei dieser Kräusentechnik sollte während der Kräusengabe Luft über die Bierleitung zugeführt werden, so dass das Kräusenzeug in der aeroben Zellvermehrung fortfährt.

Die Kontrolle der Beprobung sollte so durchgeführt werden:

- die Betriebshefe im laufenden ZKG so lange flusszytometrisch durch Zellzyklusanalysen verfolgen, bis sich die Hefepopulation in der G_2 -Phase ihres Zellzyklusses befindet (s.a. 7.1).

- Probenahme nach jedem draufgelassenen, frischen Sud dient der Kontrolle, ob eine Retardierung in der Zellvermehrung eingetreten ist.
- schließlich ab Tank voll Probenahme über 15 Stunden, um festzustellen, wie lange die exponentielle Wachstumsphase andauert und wann die Population in Gärung übergeht. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Probenahme alle 12 Stunden ausreichend.

7.4 Kontinuierliches Herführen mit Zeug aus der Hefelagerung

Das kontinuierliche Herführen ist die schwierigste Technik. Gekühltes Zeug sollte wie unter Punkt 7.1 im Biotank stimuliert werden. Das Verhältnis Hefe zu Würze bleibt wie im bisher verwendeten Beispiel 1 : 4. Jedoch wird mit 10 hl Hefe und 40 hl Würze ein größeres Volumen eingesetzt und ein Biotank mit 200 hl benötigt.

Ist das Zeug in der G_2 -Phase, werden 25 hl zum Anstellen eines frischen ZKG's abgepumpt. Auf die restlichen im Biotank verbliebenen 25 hl Jungbier werden 25 hl Würze draufgelassen.

Aufgrund der exponentiellen Wachstumsphase, in der sich die verbliebene Teilmenge stimulierten Zeugs befindet, darf der Extraktgehalt nicht unter 9.5% absinken.

Bei diesem kontinuierlichen Herführen stimulierten Zeugs nimmt die Zellzahl stetig zu, so dass der Drauflassrhythmus frischer Würze zu abgepumptem Jungbier im Verlauf der Woche immer kürzer wird, d.h. man muss die zweite Teilmenge von 25 hl früher abpumpen oder mehr Würze drauflassen, damit Zellzahl und Ausdünnungseffekte sich die Waage halten können.

Die Probenahme sollte so erfolgen, dass jeweils vor der Entnahme und nach jedem Drauflassen eine Zellzyklusanalyse durchgeführt wird.

7.5 Kontinuierliches Weiterführen des Zeugs aus laufenden ZKG's

Das kontinuierliche Herführen bereits stimulierten Zeugs entspricht im wesentlichen den Voraussetzungen, die unter Punkt 7.3 beschrieben worden sind. Diese Variante ist nur von Interesse, wenn man die wöchentliche Anstelltechnik optimieren will.

Die Probenahme erfolgt wie in Punkt 7.3 beschrieben.

8 Zusammenfassung

Es gibt einige wichtige intrazelluläre Parameter, die auf das Wachstum und die Physiologie der Hefen großen Einfluss nehmen. Dazu zählt der DNA-Gehalt der Hefezellen. Durch die Zellzyklusanalysen konnte gezeigt werden, dass die ZKG-Vergärung transparent ist. Zu jedem Zeitpunkt des Prozessablaufes stehen dem Produktionsleiter Informationen über die aktuelle Wachstumsphase und der momentanen Funktionalität der Betriebshefe zur Verfügung. Die Herführung, die Zeuggabe, das Drauflassen wurden bisher empirisch durchgeführt. Das hatte zur Folge, dass die Gärung einmal besser und einmal schlechter verlief. Mit Hilfe einer geeigneten Stimulation kann die Hefe in die Wachstumsphase gebracht werden, in der sie im ZKG ohne zeitliche Verzögerung (z.B. Adaptionsphase) zügig ihre Zellvermehrung zu Ende bringen und mit der Gärung beginnen kann. Beispiele für die Planung der Herführung, des Anstellens und des Drauflassens werden aufgezeigt und diskutiert.

Danksagung

Ich danke Herrn Dipl.-Ing. L. Bugler, Henninger Brauerei, Frankfurt, für die Überlassung der Proben. Herrn Dr. G. Eiselt, Binding Brauerei, Frankfurt, danke ich für die konstruktiven Diskussionen bezüglich der Zellzyklusanalyse. Herrn Dr. B. Lindemann, Brauerei Herforder Pilsener, danke ich sehr herzlich für die Überlassung der Staub- und Bruchhefeproben.

Der WiFö des Deutschen Brauerbundes sei für die Unterstützung des Forschungsvorhabens B60 gedankt.

9 Summary

Hutter, K.-J.: Process control of bottom fermentable beer yeasts by flow cytometry — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, No. 1/2, 13 – 27, 2001

BC 44 Yeast propagation

Since the beginning of human civilisation the species *Saccharomyces cerevisiae* has played a considerable role both in practical life as well as in science. In food technology this organism is used as pure culture for the production of beer, wine and bread. In science the yeast, which belongs to the low eucaryotes, has been used for basic studies, for example, to clarify metabolism sequences, to example the glycolysis. Recently yeast cells have gained significance in science as host more for foreign protein expression.

Hutter, K.-J.: Contrôle de fabrication utilisant la cytométrie de flux pour les levures de fermentation basse — Monatsschrift für Brauwissenschaft 54, No 1/2, 13 – 27, 2001

BC 44 Culture pure de levure, propagation de levure

Depuis toujours l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a joué un rôle important dans la civilisation humaine, dans la vie pratique mais également dans la science. On utilise dans la technologie alimentaire cet organisme comme culture pure pour la production de la bière, du vin et du pain. Au cours des dernières 50 années, on a utilisé la levure, qui appartient aux eucaryotes inférieurs, pour la recherche fondamentale, par exemple pour la découverte du déroulement des métabolismes. L'exemple frappant est la glycolyse. Ces derniers temps les cellules de levures prennent une place importante dans la science en tant que cellule hôte pour l'expression de protéines étrangères.

10 Literatur

- de Clerck, J.: Lehrbuch der Brauerei, Bd. I, 2.Aufl., Versuchs- Lehranstalt für Brauerei, 1964.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Traganos, F., und Steinkamp, J.: Cell heterogeneity during the cell cycle, *J. Cell Physiol.* **113**, 465 – 474, 1982.
- Donhauser, S.: Charakterisierung von Hefearten und Stämmen, *Brauwelt* **135**, 2644 – 2650, 1995.
- Hutter, K.-J., und Eipel, H.E.: DNA determination of yeast by flow cytometry. *FEMS Microbiology Lett.* **3**, 35 – 38, 1978.
- Hutter, K.-J., Lindemann, B., und Hafner, M.: Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. II. Mitteilung: Transparenz der ZKG-Gärung, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **48**, 184 – 190, 1995.
- Hutter, K.-J., und Schärfe, J.: Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. VI. Mitteilung: Zellzahl- und Zellvolumenanalysen, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **50**, 1/2, 4 – 11, 1997.
- Knippers, R., Phillipsen, P., Schäfer, P., Fanning, E.: *Molekulare Genetik*, 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- Slater, M.L., Sharrow, S.O., und Gart, J.J.: Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* in populations growing at different stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 3850 – 3854, 1977.
- Smart, K.: Aging in brewing yeast. *Brewer's Guardian* **128**, 2, 1999.