

K.-J. Hutter, M. Remor und S. Müller

Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren

VII. Mitteilung: Untersuchungen zur flußzytometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes der Betriebshefe

Moderne, effiziente Prozeßkontrolle muß empirisches Wissen mit neuen, direkten elektronischen Zähl- und Fluoreszenzverfahren und molekularbiologischen Techniken koppeln, um umfassende Kenntnisse über die Wachstumskinetik und die entsprechenden zellphysiologischen Zustände der Starter- und Reinkulturen zu erhalten. Das Biomonitoring zur Überwachung von Gärprozessen wurde um einen weiteren Parameter, der fluoreszenzoptischen Bestimmung des Glykogengehaltes erweitert. Die Glykogengehalte der Hefe zeigten sowohl in den Laborvergärungen als auch in den Betriebsvergärungen einen oszillierenden Verlauf bei den normal verlaufenden Gärungen. Glykogen wird während der lag-Phase und beginnenden exponentiellen Phase eingebaut, danach in der intensiven Zellvermehrungsphase reduziert und in der stationären Phase wieder eingelagert. Neben dem Glykogengehalt wurde die jeweilige Zellzyklusphase und der Neutrallipidgehalt der Hefe untersucht. Die Bestimmung des Glykogengehaltes gibt u.a. Hinweise auf eine vorzeitige Seneszenz der Population. Zellen, die aufgrund nachteiliger Umweltbedingungen ihr Glykogen intrazellulär abgebaut haben, sind kaum mehr in der Lage, einen neuen Zellzyklus zu initiieren.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeherführung

(Descriptor, Hefe, Flußzytometrie, Glykogengehalt, Hefephysiologie).

Descriptors: Yeast, Flow cytometric analysis, glycogen content, yeast physiology).

1 Problemstellung

Prozeßstörungen, wie ein verzögerter Gärverlauf oder gar eine nicht vollständig ablaufende Gärung, treten häufig auf und können weder erklärt noch vorhergesagt werden. Diese Prozeßstörungen stellen einen wesentlichen Kostenfaktor gerade für die mittelständisch strukturierte Brauwirtschaft dar. Die Möglichkeiten der konventionellen Gärungskontrolle sind hier an ihre Grenzen gelangt. Beim heutigen Stand der Technik in der Brauindustrie reichen die Kontrollparameter (Temperatur, Diacetylgehalt, Extraktabnahme etc.) bei weitem nicht aus, einen Prozeß ausreichend zu beschreiben (Lense (1956); Narziß (1980); Annemüller (1981); Litzenburger (1993); Geiger (1993); Kunze (1994); Schmidt (1995); Koch (1998); Beckmann (1998); Kunerth (1998)). Dabei vermißt der Technologe, daß es keine Methoden zur funktionellen Zustandsbeschreibung der Betriebshefe gibt, die über die zellphysiologischen Veränderungen der Hefezellen während des Prozesses Auskunft geben.

Moderne, effiziente Prozeßkontrolle muß empirisches Wissen mit neuen, direkten elektronischen Zähl- und Fluoreszenzverfahren und molekularbiologischen Techniken koppeln, um umfassende Kenntnisse über die Wachstumskinetik und die entsprechenden zellphysiologischen Zustände der Starter- und Reinkulturen zu erhalten. Daher ist eine grundlegende Voraussetzung, um repro-

duzierbare biotechnische Prozeßabläufe zu gewährleisten, daß zu Beginn des Prozesses die genetische Herkunft, Reinheit und Stabilität des Hefestammes ermittelt bzw. überprüft wird. Dies kann mit so etablierten Verfahren wie der *in situ*-Hybridisierung, dem DNA-fingerprinting, der PCR-Technik sowie dem Einsatz von Oligonukleotidsonden gegen 16 rRNA oder 23 rRNA erzielt werden (Winnacker (1985); Donhauser et al. (1993); Kunze et al. (1993); Donhauser (1995); Stahl (1997); Kiehn (2000)).

Genetisch charakterisierte Betriebshefen müssen aber kontrolliert und überwacht werden. Der Einsatz fluoreszenzoptischer Verfahren zur Überwachung der Betriebshefe während des Gärprozesses wäre für die Prozeßregelung bzw. Prozeßmodellierung von größter Wichtigkeit (Hutter (1975); Müller (1991); Linz (1989); Schepfer (1991); Hutter (1992); Müller et al. (1992); Hutter (1993a) (1993b); Hutter et al. (1995); Lembenz (1996); Hutter et al. (1996); Müller et al. (1997); Zehnter (1997); Müller et al. (1997); Müller und Hutter (1999); Hutter (1999)).

Die ZKG-Vergärung wird transparent durch die Bestimmung des DNA-Gehaltes (Zellzyklusanalyse (Crissman and Tobey (1973); Darzynkiewicz et al. (1982)) und des Glykogen- sowie Neutrallipidgehaltes (physiologischer Status der Hefezellen).

2 Einleitung

Bei vielen Organismen werden unter bestimmten Wachstumsbedingungen intrazellulär Speicher- und Reservestoffe (Glykogen, Neutrallipide, Trehalose) eingelagert. Höhere Organismen schützen sich daher vor potentiellm Kohlenstoffmangel durch die Polymerisation überschüssiger Glukose, um sie in Form von Glukanen mit hoher molarer Masse zu speichern.

Das Disaccharid Trehalose wird von vielen Autoren als Streß-Protaktant während der Lagerung beschrieben. Trehalose spielt aber auch eine Rolle in der Initiation des Zellzyklus durch schnelle Bereitstellung einer Kohlenstoff- und Energiequelle (Silljé et al. 1999). Sobald die Vermehrungsaktivität der Hefe abnimmt, wird Trehalose eingelagert (Lillie und Pringle (1980), Smart (1999)).

Neutrallipide sind Reservestoffe, die in der Hefe hauptsächlich zu Beginn der Gärung gebildet werden. Einige Neutrallipide übernehmen gleichzeitig Schutzfunktionen. So bedeutet das Bereithalten eines Fettsäurepools bzw. veresteter Sterole in einer Streßsituation erhöhte Widerstandsfähigkeit der Zelle gegen Äthanol- und Zuckerkonzentrationen (Lillie und Pringle (1980)).

Das in Hefen gespeicherte Glykogen ist aus α -1,4 und α -1,6-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten aufgebaut und in der Struktur dem Amylopektin ähnlich (Gharton (1975); Mayer et al. (1977); Aebi et al. (1982); Ferey et al. (1986); Slaughter und Nomura (1992); Hayat (1993); Mochaba et al. (1994); Brodal und Gehrken (1996)).

Quain (1988) hat die Bedeutung des Glykogengehaltes für eine Sterolbiosynthese diskutiert. Der Glykogenabbau ist verbunden mit der Bereitstellung von Sterolen, deren Vorhandensein in der Membran sehr wichtig für die Überlebensfähigkeit der Hefen während der Gärung ist. Anderson und Tatchell (1996) haben eine wechselseitige Abhängigkeit des Glykogen- und Lipidstoffwechsels beschrieben. Zellen, die mehr Glykogen speichern, synthetisieren weniger Lipide und umgekehrt.

Glykogen ist nicht so energiereich wie die Neutrallipide. Die stark verzweigte Struktur des Glykogens hat aber eine physiologische Bedeutung. Sie ermöglicht den raschen Abbau des Glykogens durch die gleichzeitige Freisetzung der Glukose an den Enden aller Verzweigungen. Offensichtlich wird Glykogen schneller mobilisiert als Lipide. Hinzu kommt, daß die Fettsäure-Reste nicht anaerob metabolisiert werden können. Das würde bedeuten, daß die Betriebshefen in der Gärung und Nachgärung unter anaeroben Bedingungen keinen Fettverlust erleiden, wohl aber ein Glykogenabbau stattfindet.

Glykogen reichert sich bei Nährstoffzufuhr in der Hefezelle an und wird im Hungerzustand wieder abgebaut. Dies gilt vornehmlich für die Situation, daß die Population bei erhöhten Temperaturen und bei Sauerstoffzufuhr wächst und dann Glykogen veratmet. Danach synthetisiert die Hefe erneut Glykogen (Parrou et al. 1999). Ein hoher Glykogengehalt wird mit einer hohen Vitalität der Hefezellen assoziiert. Dies bedeutet aber nicht, daß hoher Glykogengehalt gleichzusetzen ist mit hoher Proliferationsaktivität.

Dem Mechanismus des Glykogenabbaus bzw. Glykogenaufbaus der Hefe kommt daher besondere Bedeutung zu, um Informationen über die Geschwindigkeiten mit denen die Glykogensynthese während der Proliferation abläuft und wie sie geregelt werden kann, zu erhalten.

3 Zielsetzung

Das Ziel dieses Beitrages war die Entwicklung einer Methode zum fluoreszenzoptischen Nachweis des Glykogengehaltes. Dieser Parameter sollte in das bereits in früheren Beiträgen in dieser Zeitschrift beschriebene Biomonitoring integriert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Hefeproben

Die Untersuchungen wurden an Laborvergärungen und an zylindronischen Vergärungen durchgeführt. Der Ausdruck „junge Hefe“, der in diesem Beitrag verwendet wird, bezeichnet hierbei eine frisch propagierte Hefe aus dem Hefetank, „alte Hefe“ steht für eine Hefe, die einige Wochen unter ungünstigen Wachstums-

bedingungen (kein Drauffassen von Würze, keine Belüftung, Lagerung bei Raumtemperatur) geführt wurde.

4.2 Fixierung der Hefezellen

Durch die alkoholische Fixierung wird der Transport großer Farbstoffmoleküle durch die Zellmembran gewährleistet. Bei diesem Vorgang wird den Hefezellen Wasser entzogen. Dadurch wird die Oberflächenstruktur der Zellen deformiert. Viele intrazelluläre Makromoleküle, wie die DNA, Nukleoproteine oder auch Glykogen bleiben bei der alkoholischen Fixierung aber erhalten.

Zur Bestimmung des DNA- und Glykogengehaltes wurde zur Fixierung 70%-iger Ethanol p.a. verwendet.

Die Probenahme im Betrieb erfolgte nach der Anleitung im ersten Beitrag der Biomonitoring-Reihe (Hutter et al. (1995)).

4.3 Flußzytometrische Analyse

Die Flußzytometrie ist eine biophysikalische Technik zur schnellen Messung von Zellen und ihren subzellulären Substanzen, die spezifisch angefärbt wurden und sich in Suspension befinden (van Dilla (1978)).

Die flußzytometrischen Messungen wurden mit einem PAS der Fa. Partec, Münster, durchgeführt (Dittrich und Göhde (1969)). In dieses Flußzytometer sind ein Argon-Ionen-Laser und eine Quecksilberhöchstdrucklampe integriert, so daß zwei Wellenlängen, einmal 360 nm mit der HBO-Lampe und zum anderen 488 nm mit dem Laser, zur Anregung zur Verfügung stehen. Das bedeutet, daß neben Propidium Jodid auch DAPI (Dann (1971)) zur DNA-Färbung eingesetzt werden kann. Darüber hinaus sind simultane Messungen (DNA : Proteine oder Glykogen : Neutrallipide) möglich.

4.4 Färbungen für die flußzytometrische Analyse

4.4.1 DNA-Färbung mit Propidium Jodid

Propidium Jodid gehört zur chemischen Stoffklasse der Phenanthridium Derivate. Es ist ein großes planares Molekül, das nicht durch die intakte Membran lebender Zellen transportiert werden kann.

Phenanthridium Derivate sind interkalierende Farbstoffe, die sich zwischen übereinanderliegende Basenpaare doppelsträngiger DNA anlagern. Die kleeblattstrukturartige, doppelsträngige t-RNA im Zytoplasma wird ebenfalls durch Anlagerung gefärbt. Da aber für eine Zellzyklusanalyse ausschließlich die Kern-DNA entscheidend ist, muß die störende RNA durch eine enzymatische RNase-Digestion eliminiert werden. Propidium Jodid hat mit 0.85 eine höhere Fluoreszenzlichtausbeute als andere Phenanthridium Derivate und wurde von Crissman und Tobey (1974) erstmalig zur DNA-Analytik eingesetzt. Bei 488 nm Anregung fluoresziert die gefärbte Kern-DNA bei 630 nm rot.

4.4.2 Glykogen-Färbung mit Acriflavin

1924 entdeckte Robert Feulgen ein Verfahren zur Anfärbung des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Zellen mit Fuchsin. Dabei wird der Gehalt an DNA mit fuchsin-schwefliger Säure stöchiometrisch angefärbt. Auf dieser Basis bestimmte Prenna (1976) den DNA-Gehalt von Säugetierzellen mit Acriflavin. Zum fluoreszenzoptischen Nachweis des DNA-Gehaltes von *S. cerevisiae* setzte Hutter (1975) erstmals Acriflavin ein.

Glykogen [mg / ml]]	Extinktion $\lambda = 540\text{nm}$
0	0
0,585	0,397
0,700	0,475
0,961	0,652
1,750	1,029
2,450	1,376
3,500	1,887

Die Excitation liegt bei 455 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 515 nm.

Bei den meisten konventionellen Methoden (z.B. den photometrischen Bestimmungen) werden die Hefezellen mechanisch aufgebrochen und das Glykogen aus der Zelle isoliert. In dieser Arbeit mußte zunächst an Hefesuspensionen ein Färbeverfahren erarbeitet werden, das durch Ethanolfixierung der Zellen und Anfärbung mit einer Acriflavinlösung eine quantitative Anfärbung des Glykogens unter Erhaltung der Zellintegrität gestattete, d. h. das Glykogen mußte in der Zelle verbleiben. Mit dieser Technik wurde der Glykogengehalt von Hefen in unterschiedlichem physiologischen Zustand bestimmt. Die spezifische Anfärbung mit Acriflavin erfolgte nach *Gharton et al. (1975)* und *Mayer et al. (1977)*. Acriflavin wird bei dieser Färbung kovalent an Glykogen gebunden.

4.4.3 Neutrallipid-Färbung mit Nilrot

Schon seit der Jahrhundertwende wird Nilblau zur Färbung von Lipiden eingesetzt. Das Oxidationsprodukt von Nilblau ist Nilrot. Nilrot färbt Neutrallipide in der Zelle und mit geringer Intensität auch Phospholipide der Zellmembran.

Chemisch ist Nilrot den Benzophenonen zuzuordnen. Der Färbe-mechanismus ist nicht vollständig geklärt; es scheint mehr eine Einlagerung in die Lipidtröpfchen zu erfolgen, als eine feste Bindung.

Das Anregungsmaximum von Nilrot liegt im Bereich von 530 nm (*Linz (1989); Scheper (1991); Müller (1991)*).

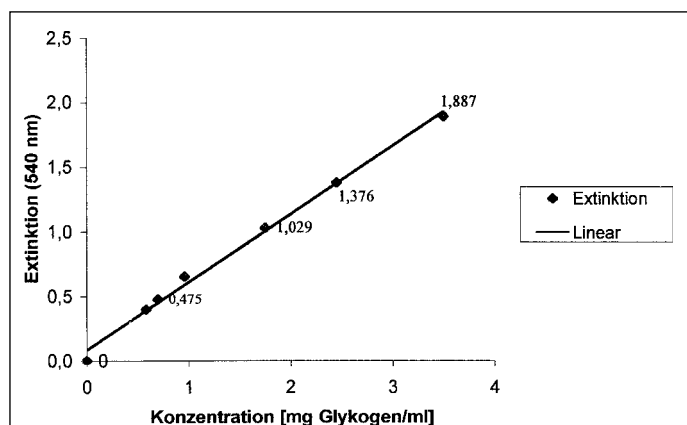


Abb. 1 Photometrische Bestimmung des Glykogengehaltes

4.5 Photometrische Glykogenbestimmung

Die konventionelle Glykogengehalt-Bestimmung wurde nach der Methode von *Aebi et al. (1982)* durchgeführt. Die Prozedur gliedert sich in den Zellaufschluß und eine anschließende Säurehydrolyse. Zunächst erfolgte ein Zellaufschluß mit Trichloressigsäure TCA im Mörser, danach die Desintegration des Glykogens und anschließend die Säurehydrolyse mit HCl. TCA fällt die Proteine und Nukleinsäuren, während Glykogen in Lösung bleibt und mit Ethanol präzipitiert wird.

Bei der photometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes wurde eine Eichreihe aus reinem Glykogen, das aus Schweineleber isoliert wurde, ermittelt. Diese Werte sind in unterschiedlichen Verdünnungen im Photometer (Extinktion bei $\lambda = 540\text{ nm}$ gegen Blindwert) gemessen worden und in der Tabelle 1 dargestellt.

Die Abbildung 1 zeigt die resultierende Regressionsgerade aus diesen Meßdaten. Die Meßwerte (Extinktionen) der jungen und die der alten Hefezellen wurden in die Kalibrationskurve eingefügt. Die Eichkurve der Abbildung 1 zeigt die Regressionsgrade ($r = 0.997$) der Mittelwerte aus jeweils 3 Meßergebnissen. Die optischen Dichten der jungen und der alten Hefe betragen 0.652 bzw. 0.397.

4.6 Vergleichende Bestimmungen des Glykogengehaltes mittels Photometrie und der Flußzytometrie

Im Vergleich zur flußzytometrischen war die photometrische Bestimmung deutlich zeit- und arbeitsintensiver (ca. 4fache Probenpräparationszeit). Darüber hinaus mußte sehr viel mehr Zellmaterial bei der photometrischen Bestimmung, nämlich 7 g, eingesetzt werden. Für eine flußzytometrische Analyse benötigt man $10^5 - 10^6$ Zellen pro ml.

5 Ergebnisse

Bei der fluoreszenzoptischen Glykogengehaltsbestimmung wurde immer das peak-Maximum der Häufigkeitsverteilung als Richtwert herangezogen. Das Fluoreszenzsignal der jungen Hefe war gegenüber dem Fluoreszenzsignal der alten Hefe fast doppelt so stark.

Die jungen Zellen hatten große Mengen an Glykogen eingelagert, während der Glykogengehalt der alten Hefezellen offensichtlich durch die lange Lagerung metabolisiert wurde und daher nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (Abb. 2).

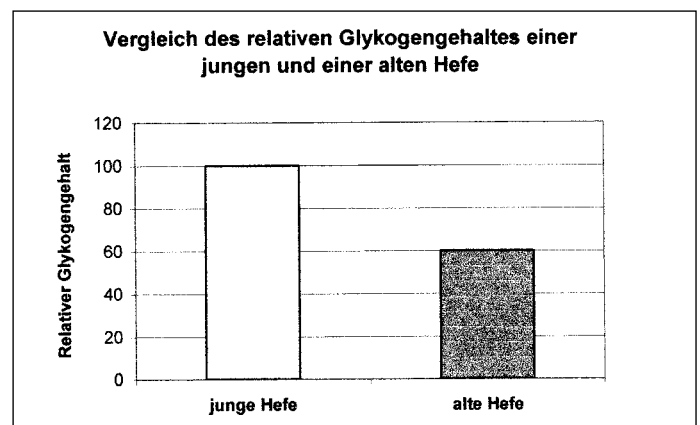


Abb. 2 Blockdiagramm der flußzytometrischen Glykogen-Bestimmung

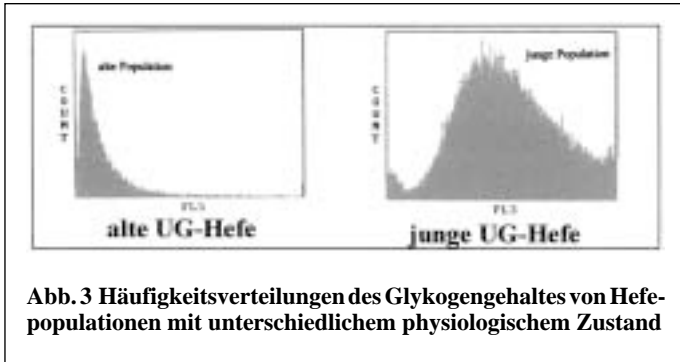


Abb. 3 Häufigkeitsverteilungen des Glykogengehaltes von Hefepopulationen mit unterschiedlichem physiologischem Zustand

Die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen dieser Glykogenbestimmung zweier Populationen in verschiedenem physiologischem Zustand sind in der Abbildung 3 dargestellt.

Die Abbildungen 4 a und 4 b zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen alter und junger Hefezellen. Die jungen Hefen fluoreszierten bei Blaulichtanregung in sehr kräftigem intensivem

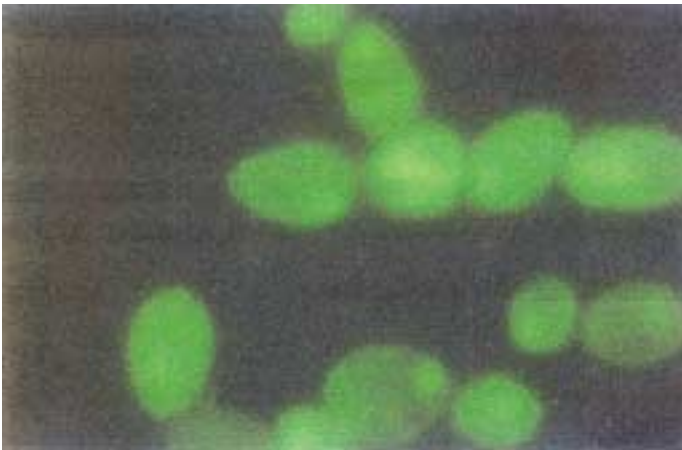


Abb. 4 a Glykogenfärbung einer alten Hefe ($\lambda = 488 \text{ nm}$)

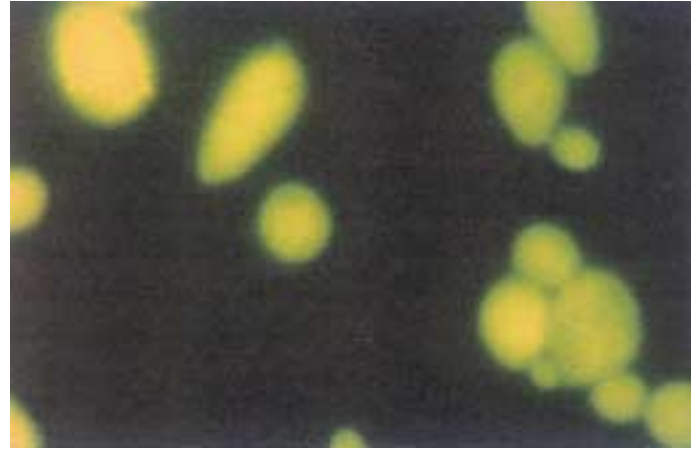


Abb. 4 b Glykogenfärbung einer jungen Hefe ($\lambda = 488 \text{ nm}$)

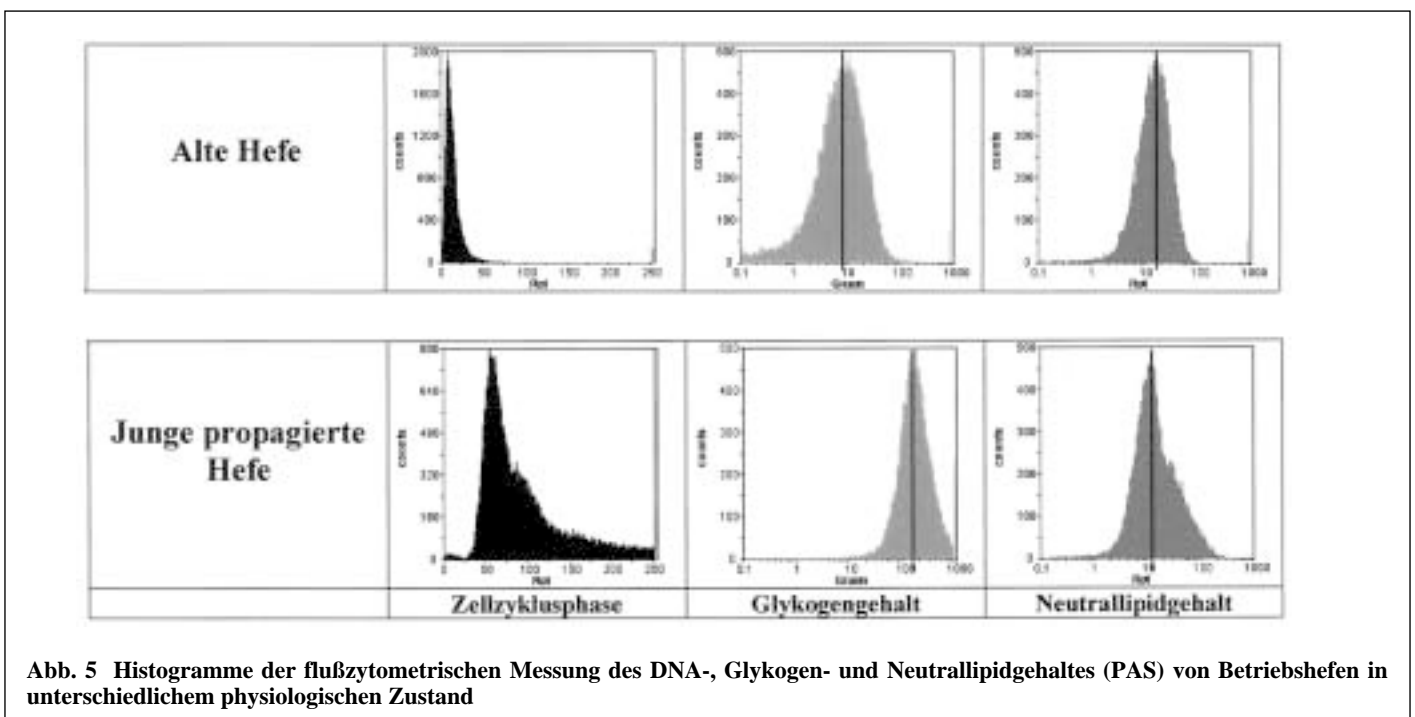


Abb. 5 Histogramme der flußzytometrischen Messung des DNA-, Glykogen- und Neutrallipidgehaltes (PAS) von Betriebshefen in unterschiedlichem physiologischem Zustand

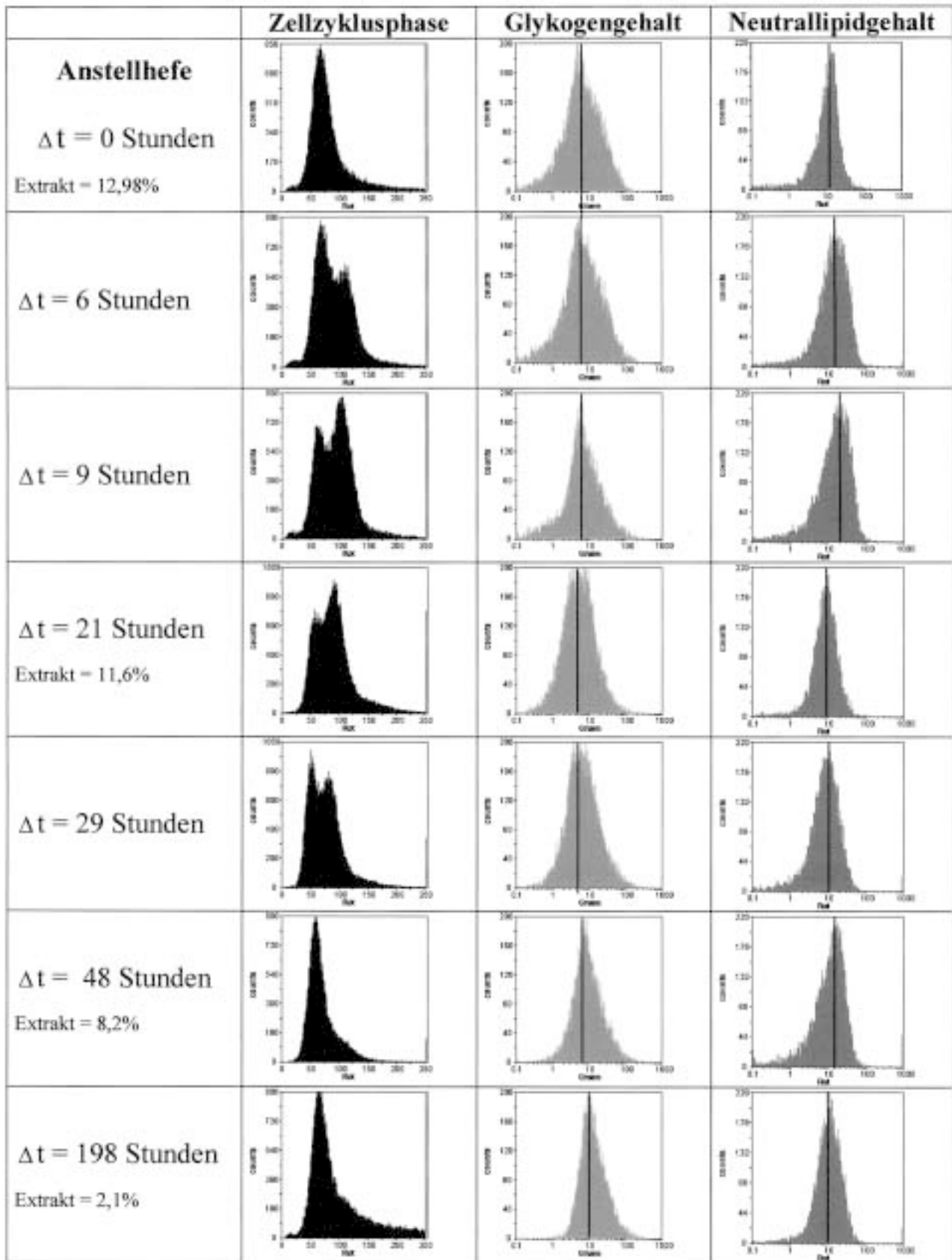


Abb. 6 Flußzytometrische Analysen des DNA-, Glykogen- und Neutrallipidgehaltes einer Betriebsvergärung

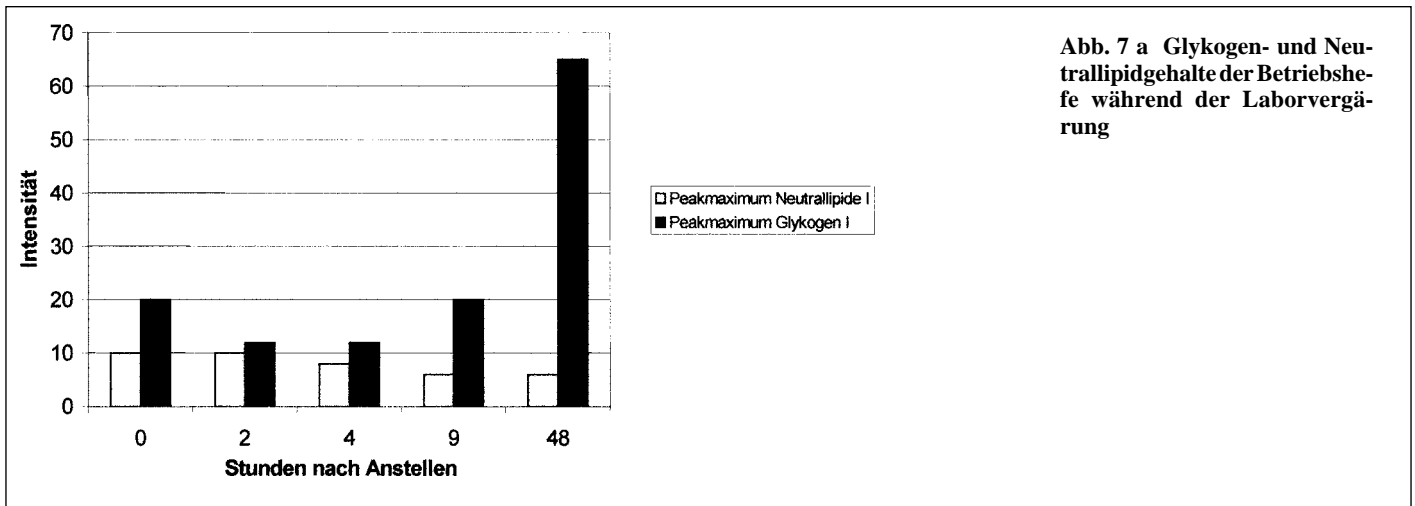


Abb. 7 a Glykogen- und Neutrallipidgehalte der Betriebshefe während der Laborvergärung

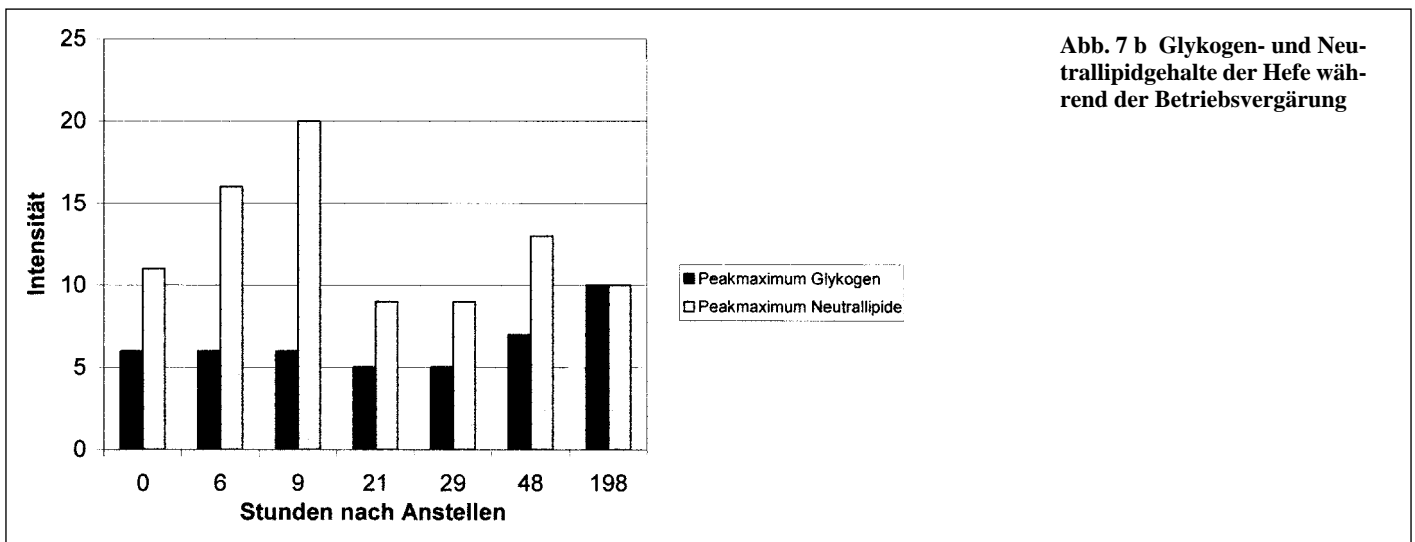


Abb. 7 b Glykogen- und Neutrallipidgehalte der Hefe während der Betriebsvergärung

Die Neutrallipidgehalte der alten und jungen Zellen zeigten keine großen Unterschiede.

Die jungen, stimulierten Hefezellen waren in der Anschiebephase. Neben vielen Zellen in G_1 befand sich eine kleine Fraktion in der S-Phase (Schulter am G_1 -peak). Diese Hefezellen haben begonnen, DNA zu replizieren. Entsprechend hoch war das Fluoreszenzsignal des Glykogengehaltes. Zu diesem Zeitpunkt speicherten die Zellen wieder Glykogen ein.

Die Überwachung des DNA-, Glykogen- und Neutrallipidgehaltes der Betriebshefe sind der Abbildung 6 zu entnehmen. Nach 6 Stunden zeigte die Population ein kräftiges Anschieben. Die Zellvermehrungsphase dauerte ca. 23 Stunden. Nach 48 Stunden setzte die Gärung ein und dauerte bis zur Filtration 198 Stunden.

Die Glykogengehalte schwankten nur leicht bei diesem optimalen Gärverlauf, d.h. Anstieg des Glykogens zu Beginn der exponentiellen Zellvermehrung, dann Reduzierung in der späten Zellvermehrungsphase. Schließlich wurde wieder Glykogen im Verlauf der Gärung eingebaut. Die Neutrallipide wurden sowohl in der Zellvermehrungsphase synthetisiert als auch zu Beginn der Gärung und wurden gegen Ende der Gärung wieder abgebaut.

Eine Gegenüberstellung der Glykogen- und Neutrallipidgehalte einer Labor- und einer Betriebsvergärung sind in den Abbildun-

gen 7 a und 7 b dargestellt. Die Säulendiagramme zeigen übereinstimmend sowohl in der Labor- als auch in der Betriebsvergärung einen oszillierenden Verlauf unter normalen zellphysiologischen Bedingungen.

6 Diskussion

Das Ziel jeder Brauerei ist es, ein Bier mit gleichbleibender Qualität zu produzieren. Dabei soll der Prozeß ohne Gärstörungen ablaufen. Dieses Ziel ist nur zu erreichen, wenn man den Gärprozeß mit effizienten Methoden kontrolliert.

Die Aufrechterhaltung gleichbleibender Qualität liegt einmal in der Behandlung der Betriebshefe während der Reinzucht, der Herführung, des Anstellens und des Draufflassens, zum anderen in der Analyse und Kontrolle des physiologischen Zustandes der geführten Hefen, die über den gesamten Prozeß stattfinden muß und drittens in der Auswahl geeigneter Rohstoffe. Die Überwachung des Gärprozesses mit den zur Verfügung stehenden konventionellen Parametern wie Temperaturmessung, Diacetylbestimmung, Extraktgehaltbestimmung etc. reichen aber nicht aus, einen ZKT zufriedenstellend zu kontrollieren.

Die Alternative wäre der Einsatz flußzytometrischer Analysen in Kombination mit konventionellen Methoden. Dies führt zu einer optimalen Prozeßüberwachung.

Neben den bereits etablierten Methoden (DNA-Zellzyklus: (Darynkiewicz (1982)), Esteraseaktivität: (Rotman und Papermaster (1966); Portno und Molzahn (1977)), Bestimmung der Neutrallipide: (Linz (1989); Scheper (1991); Müller (1991)) für ein Biomonitoring des Gärprozesses wurde nun eine weitere Methode etabliert, die es ermöglicht, anhand des Glykogengehaltes den Zustand der Betriebshefe noch aussagekräftiger zu beschreiben. Dazu wurde die herkömmliche Methode, Glykogen durch Feulgenhydrolyse in Säugetierzellen nachzuweisen, praxistauglich für Hefezellen weiterentwickelt. Der Glykogengehalt einzelner Zellen wurde flußzytometrisch nach spezifischer Anfärbung mit Acriflavin nach Gharton et al. (1975), modifiziert nach Mayer et al. (1977), analysiert. Mit konventionellen Methoden wird Glykogen vor allem als Mittelwertverteilung über eine gesamte Population bestimmt. Dazu existieren Methoden sowohl für die alkalilösliche Fraktion des Glykogens, welche erst nach Behandlung mit Lauge analytisch zugänglich wird (Wackerbauer et al. (1997)), als auch für die säurelösliche Fraktion des Glykogens (Slaughter und Nomura (1982)). Wir haben uns für die photometrische Methode nach Aebi et al. (1982) entschieden.

Die Probenpräparation der photometrischen Bestimmung war wesentlich aufwendiger als die einfache fluoreszenzoptische Analyse. Die photometrische Bestimmung einer alten und einer jungen Hefe ergab bei der alten Hefe circa die Hälfte des Glykogengehaltes der jungen Hefe. Dieses Ergebnis bestätigte die flußzytometrische Methode hinreichend, da bei dieser ebenfalls ein deutlicher Unterschied im Fluoreszenzsignal gemessen wurde.

Die flußzytometrische Analyse zeigte, daß sich die Hefezellen der alten Population zum Zeitpunkt der Probenahme bereits in der Autolyse befanden, sie hatten einen merklich geringeren DNA-Gehalt als bei den jungen Hefen festzustellen war. Die jungen Zellen befanden sich in der G_0 -/ G_1 - und S-Phase.

Im Vergleich hierzu hatte die alte Hefe einen wesentlich geringeren Glykogengehalt als die junge Hefe, auch der Neutrallipidgehalt war geringer. Nach der sehr langen Lagerungsphase bei Raumtemperatur und ohne Nährstoffzufuhr hatten die alten Hefen ihren Reservestoff (Glykogen) aufgezehrt, während die jungen Hefen, durch die kurze Lagerung im Stimuliertank, bei ausreichend vorhandenem Nährstoffangebot Glykogen einlagern konnten und dadurch entsprechend höhere Gehalte an diesen Reservestoffen besaßen.

Die Neutrallipid- und Glykogengehalte zeigten sowohl in den Laborvergärungen als auch in den Betriebsvergärungen einen oszillierenden Verlauf bei normal verlaufenden Gärprozessen. Während in der lag-Phase und beginnenden exponentiellen Phase der Zellvermehrung ein Glykogeneinbau zu verzeichnen war, wurde in der intensiven Zellvermehrungsphase Glykogen reduziert. In der stationären Phase wurde wieder Glykogen eingebaut.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß mit flußzytometrischen Parametern wie dem DNA-Gehalt, der Bestimmung der Esteraseaktivität, den Neutrallipiden und dem Glykogengehalt ein sensitives Biomonitoring des Gärprozesses durchführbar ist. ZKG-Vergärungen werden dadurch transparent, so daß quasi on line die Prozeßmodellierung durchgeführt und deren Steuerung zu jedem Zeitpunkt überprüft und optimiert werden kann.

7 Schlußfolgerungen

Das Hefemanagement der Betriebshefe sollte unbedingt durch flußzytometrische Analysen, die schnelle und klare Aussagen über den jeweiligen Wachstums- und physiologischen Zustand der Hefe ermöglichen, ergänzt werden. Dieses Biomonitoring der

Betriebshefe umfaßt Analysen des DNA-, Glykogen- und Neutrallipidgehaltes sowie die Bestimmung der Viability mit Hilfe des Esteraseaktivitäts-Nachweises. Folgende Aussagen sind möglich:

- Die Bestimmung des DNA-Gehaltes gibt über den gesamten Gärverlauf signifikant Auskunft über Gäraktivität und Gärgeschwindigkeit der Hefen. Der Produktionsleiter ist zu jedem Zeitpunkt des Prozeßablaufes über die Vermehrungsaktivität seiner Hefe informiert.
- Die Bestimmung der Esteraseaktivität zeigt an, wie das Verhältnis lebender zu toten Zellen in der Population ist.
- Die Bestimmung der Neutrallipide sagt etwas über die Überlebensfähigkeit der Hefen während der Gärung aus. Hohe Lipidgehalte während der Gärung und Lagerung verhindern u.a. die schnelle Autolyse der Zellen.
- Die Bestimmung des Glykogengehaltes gibt Hinweise auf die vorzeitige Alterung einer Population. Zellen, die aufgrund nachteiliger Umweltbedingungen ihr Glykogen intrazellulär abgebaut haben, sind kaum mehr in der Lage, einen neuen Zellzyklus zu starten.

Danksagung

Wir danken der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung des Forschungsprojektes B 60.

8 Summary

Hutter, K.-J., Remor, M., and Müller, S.: Biomonitoring in practice by optical fluorescence methods – VII. Notification: Studies on the flow cytometric determination of the glycogen content of brewery yeast — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No 5/6, 68 – 76, 2000

BC 44 Yeast propagation

Modern, efficient process control must link empirical knowledge with new, direct electronic counting and fluorescence procedures and molecular biological techniques to obtain extensive knowledge on the growth kinetics and the appropriate physiological states of the cells of the starter and pure cultures. Biomonitoring to monitor fermenting processes has been extended by a further parameter – the optical fluorescence determination of the glycogen content. The glycogen contents of yeast indicate an oscillating course in the case of normal fermentations in both laboratory and brewery fermentations. Glycogens can be incorporated during the lag phase and the beginning exponential phase. During the following intensive cell propagation phase they are metabolized and in the stationary phase are deposited again. The respective cell cycle phase and the neutral lipid content of the yeast are studied in additions glycogen content. The determination of the glycogen content provides, amongst other things, indication of a premature senescence of population. Cells which have decomposed their glycogen intracellularly due to detrimental environmental conditions are hardly in a position to initiate a new cell cycle.

Hutter, K.-J., Remor, M., et Müller, S.: Biomonitoring en pratique par des procédés de fluorescence optique – VII ème Communication: Examens de la détermination par cytométrie à flux de la teneur en glycogène de la levure industrielle — Monatsschrift für Brauwissenschaft 53, No. 5/6, 68 – 76, 2000

BC 44 Culture pure de levure, propagation de levure

Les contrôles de fabrication modernes et efficaces doivent être liés aux connaissances empiriques. Les nouvelles techniques comprennent des procédés électroniques de comptage et des fluorescence ainsi que des

procédés de la biologie moléculaire dans le but d'acquérir des connaissances sur la cinétique de croissance et l'état physiologique cellulaire correspondant des cultures pures et des cultures starter. Le biomonitoring, pour la surveillance du procédé de fermentation, a été augmenté d'un autre paramètre: la détermination de la teneur en glycogène par fluorescence optique. La teneur en glycogène de la levure montrait, aussi bien pour les fermentations en laboratoire que pour les fermentations industrielles, un déroulement par oscillation pour des fermentations normales. Le glycogène est intégré pendant la lag-phase et au début de la phase exponentielle. Par la suite le glycogène est réduit pendant la phase de multiplication cellulaire intensive et il est à nouveau stocké pendant la phase stationnaire. A côté de la teneur en glycogène on a examiné la phase correspondante des cycles cellulaires et la teneur en lipides neutres. La détermination de la teneur en glycogène fournit, entre autre, des informations sur la sénescence anticipée de la population levurienne. Les cellules qui ont dégradé leur glycogène intercellulaire par des conditions d'environnement défavorables, ne sont guère en mesure d'initier un nouveau cycle cellulaire.

9 Literatur

- Aebi, H. et. al.: Saure Hydrolyse von Glykogen, In: Einführung in die praktische Biochemie, 3. Aufl., Karger Verlag, Basel, 1982.
- Anderson, C.M., and Tatchell, K.: The role of glycogen in *Saccharomyces cerevisiae*, Molecular Biology of the Cell **7**, 1061, 1996.
- Annemüller, G.: Probleme der Hefetechnologie bei der Gärung und Reifung von Bier in zylindronischen Gärtanks, Lebensmittelindustrie **28**, 2, 549 – 555, 1981.
- Beckmann, M.: Das Flockungsverhalten der Hefe aus heutiger Sicht (Vortrag 17.4.1998), 6. Dresdner Brauertag der VLB und des Sächsischen Brauerbundes e.V., 1998.
- Brodal, B.P., and Gehrken, B.B.: Enzymatic microanalysis of glycogen, Scand. J. Lab. Invest. **46**, 193 – 195, 1996.
- Crissman H.A., and Tobey, R.A.: Cell cycle analysis in 20 minutes, Science **184**, 1297 – 1298, 1974.
- Dann, O., Bergen, G., Demant, E., und Volz, G.: Trypanocid Diamine des 2-Phenyl-Benzoforan, 2-Phenyl-Inden und Phenyl-Indols, Liebigs Ann. Chem. **749**, 68, 1971.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Traganos, F., and Steinkamp, J.: Cell heterogeneity during the cell cycle, J. cell Physiol. **113**, 465 – 474, 1982.
- Donhauser, S., Springer, R., und Vogeser, G.: Identifizierung und Klassifizierung von Brauereihefen durch Chromosomenanalyse mit der Pulsfeldgelelektrophorese, Monatsschrift für Brauwissenschaft **43**, 12, 392 – 400, 1990.
- Donhauser S.: Charakterisierung von Hefearten und Stämmen, Brauwelt **135**, 2644 – 2650, 1995.
- Dittrich, W., und Göhde, W.: Impulscytometrie bei Einzelzellen in Suspensionen, Z. Naturforschung **24**, 360 – 361, 1969.
- Ferey, L., Herlin, P., Marnay, J., Mandard, A.M., Catania, R., Lubet, P., Lande, R., and Bloyet, D.: Pararoseanilin or acriflavine-Schiffs - staining of epoxy embedded tissue after periodic acid oxidation in ethanol: A method suitable for morphometric and fluorometric analysis of glycogen, Stain Technology **61**, 107 – 110, 1986.
- Geiger, E.: Kontinuierliche Hefevermehrung, Brauwelt **133**, 646 – 649, 1993.
- Gharton, G., Olsson, I., and Dahlqvist, A.: Determination of the glycogen content in single neutrophil leucocytes using micromodel of leucocytes glycogen, J. Histochem. Cytochem. **23**, 59 – 64, 1975.
- Guerzoni, M. E., Gardini, F., and Sinigaglia, M.: Modulation of lipid composition of yeast in stress conditions, Yeast, **5** SI, 415 – 421, 1989.
- Hayat, M. A.: Staining of semithin resin sections, In: Stains and cytochemical methods; Plenum Press, New York and London, 55 – 69, 1993.
- Hutter, K.-J., Otto, F., und Emeis, C.-C.: Untersuchungen über die DNS-, RNS- und Proteinsynthese ausgewählter Mikroorganismenpopulationen mit Hilfe der Zytophotometrie und der Impulscytometrie, II. Mitteilung: DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Hefen der Gattung *Saccharomyces* während der vegetativen Vermehrung; Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **4**, 75 – 78, 1975.
- Hutter, K.-J.: Schnellbestimmungen zur Tot-Lebend-Analyse von Hefezellen, Brauwelt **132**, 252 – 262, 1992.
- Hutter, K.-J.: Flußzytometrische Analysen zur Gärfähigkeit verschiedener Hefen, Brauwelt **133**, 2246 – 2253, 1993.
- Hutter, K.-J.: Zellkinetische Analysen an Hefen und Bakterien mit Hilfe der Flußzytometrie, Monatsschrift für Brauwissenschaft **46**, 444 – 450, 1993.
- Hutter, K.-J., Herber, M., und Lindemann B.: Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren, II. Mitteilung: Transparenz der ZKG-Gärung, Monatsschrift für Brauwissenschaft **48**, 184 – 190, 1995.
- Hutter, K.-J., und Müller, S.: Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren, IV. Mitteilung: Zellzyklus und 3 β -Hydroxysterolgehalt, Monatsschrift für Brauwissenschaft **49**, 234 – 239, 1996.
- Hutter, K.-J.: Habilitationsschrift: Biomonitoring bei Gärprozessen mit flußzytometrischen und bildanalytischen Verfahren, Technische Universität Dresden, 1999.
- Kiehn, M.: Schnellnachweis von bierschädlichen Mikroorganismen mittels Consensus-PCR, 87. Brau- und maschinentechnische Arbeitstagung der VLB, 13. – 15. März 2000, Leipzig.
- Koch, P.: Hefemanagement durch Assimilationsverfahren (Vortrag 17.4.1998), 6. Dresdner Brauertag der VLB und des Sächsischen Brauerbundes e.V., 1998.
- Kunerth, S.: Modernes Hefemanagement. Maßnahmen zur Erhaltung von Vitalität und Gäraktivität (Vortrag 17.4.1998), 6. Dresdner Brauertag der VLB und des Sächsischen Brauerbundes e.V., 1998.
- Kunze, W.: Technologie Brauer und Mälzer, 4. Auflage, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin, 1994.
- Kunze, G., Kunze, I. Barner, A., and Schulz, R.: Classification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains by genetical and biochemical methods, Monatsschrift für Brauwissenschaft **46**, 132 – 136, 1993.
- Lembenz, B.: Biomonitoring von Betriebshefe „Fluoreszenzoptische Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes“, Diplomarbeit, Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung, 1996.
- Lense, K.: Katechismus der Brauerei-Praxis, 11. Aufl., Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1956.
- Lillie, S.H., and Pringle, J.R.: Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation, J. Bacteriol **143**, 1384 – 1394, 1980.
- Linz, F.: Durchflußzytometrie zur Prozeßbeobachtung in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover, Fak. Chem., 1989.
- Litzenburger, K.: Erfahrungen aus der Betriebsberatung, Brauwelt **133**, 659 – 668, 1993.
- Mayer, D., Stöhr, M., und Lange, L.: Quantitative Analysen von DNA, RNA, Protein und Glykogen in isolierten Rattenhepatocyten nach Auftrennung in Metizamid-Dichtegradienten, Cytobiologie **15**, 321 – 334, 1977.
- Mochaba, F., Torline, P., und Axcell, B.: A novel and rapid method for the determination of glycogen in pitching yeast, J. Am. Soc. Brew. Chem. **52**, 145 – 147, 1994.
- Müller, S.: Darstellung der Populationsdynamik von *Saccharomyces cerevisiae* anhand flußzytometrischer Messung des 3 β -Hydroxysterol- und DNS-Gehaltes, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1991.

Müller, S., und Hutter, K.-J.: Biomonitoring von Betriebshefen mit fluoreszenzoptischen Verfahren, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **52**, 40 – 48, 1999.

Müller, S., Hutter, K.-J., Bley, Th, Petzold, L., and Babel, W.: Dynamics of yeast cell states during proliferation and non proliferation periods in a brewing reactor monitored by multidimensional flow cytometry, *Bio-process Engin.* **17**, 287 – 293, 1997.

Müller, S., Lösche, A., and Bley, T.: Flow-cytometric investigation of sterol content and proliferation activity of yeast, *Acta Biotechnol.* **12**, 365 – 375, 1992.

Narziß, L.: *Abriß der Bierbrauerei*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 1980.

Quain, D.E: Studies on yeast physiology-impact on fermentation performance and product quality, *J. Inst. Brew. Sept./Oct.* **95**, 315 – 323, 1988.

Parrou, J.-L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B., and Francois, J.: Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **15**, 191 – 203, 1999.

Portno, A.D., and Molzahn, S.W.: New methods for the detection of viable microorganisms, *Brewer's Digest* 44-50 (1977)

Rotman, B., and Papermaster, B.W.: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 134 – 141, 1966.

Scheper, T.: *Bioanalytik: Messung des Zellzustandes und der Zellumgebung in Bioreaktoren*, Vieweg Verlag, Braunschweig, 1991.

Silljé, H.H.W., Paalman, J.W.G., ter Schure, E.G., Olsthoorn, S.Q.B., Verkleij, A.J., Boonstra, J., and Verrips, C.T.: Function of trehalose and

glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* **181**, 396 – 400, 1999.

Smart, K.: Aging in brewing yeast, *Brewer's Guardian* **128**, 2, 1999.

Schmidt, H.-J.: Modernes Hefemanagement, *Brauwelt* **135**, 14, 652 – 654, 1995.

Slaughter, J.C., and Nomura, T.: Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability, *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**, 64 – 67, 1992.

Stahl, U.: Molekulare Detektion und Identifikation von Mikroorganismen, In: *Brau- und maschinentechnische Arbeitstagung der VLB*, März 1997 Braunschweig, 1997.

Van Dilla, M. A.: Flow cytometry and sorting: principles, problems and prospects. In: *Pulse-Cytophotometrie, Part III*, 1 – 12; Herausgeg. von D. Lutz et al., European Press Ghent, 1978.

Wackerbauer, K., Tayama, T., und Kunerth, S.: Neuere Erkenntnisse des Einflusses der Hefelagerung auf die Gäraktivität und Vitalität von Hefen in nachfolgenden Gärungen, *Monatsschrift für Brauwissenschaft* **50**, 132 – 137, 1997.

Winnacker, E.-L.: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie*, Verlag Chemie, Weinheim, 153 – 157, 1985.

Zehnter, I.: *Flußzytometrische Kontrolle der Zellzyklen der untergärigen Betriebshefe bei Veränderung verschiedener Anstell- und Gärparameter*, Diplomarbeit, Fachhochschule Mannheim, Hochschule für Technik und Gestaltung, 1997.

(Manuskripteingang: 11. 4. 2000)



**FACHVERLAG HANS CARL
NÜRNBERG
FACHBUCHHANDLUNG**

Postfach 99 01 53 90268 Nürnberg
Fax: (0911) 9 52 85-61
E-Mail: fachbuch@hanscarl.com

Besuchen Sie unser gesamtes
Buchangebot im Internet: www.hanscarl.com

NEUERSCHEINUNG FARBATLAS UND HANDBUCH DER GETRÄNKEBIOLOGIE

**Teil 2: Fruchtsaft- und Limonaden-
betriebe, Wasser/ Betriebshygiene,
Milch- und Molkereiprodukte,
Begleitorganismen
Von Prof. Dr. Werner Back**

252 Seiten, 57 ganzseitige, zum Teil vierfarb. Tafeln,
zahlreiche Schemata u. Tabellen, Format 24,5 x 34
cm, Pappband m Schutz-umschlag. DM 278,-
Bestell-Nr. 760 Ex.

Teil 1 Kultivierung/Methoden Brauerei/ Winzerei
DM 248,- Bestell-Nr. 704Ex
(Preise zuzüglich Versandkosten.)

FAX-BESTELLUNG: 0911 / 9 52 85-61

Name Kunden-Nr.

Firma UsSt.-Id.-Nr.

Straße PLZ/Ort

Datum Stempel/Unterschrift