

S. Müller und K.-J. Hutter

# Prozeßoptimierung von Reinzucht- und Anstellverfahren mittels Flußzytometrie in sächsischen Brauereien

Eine qualitativ hochwertige Brauhefe zeichnet sich sowohl durch hohe Vermehrungsaktivität in der Reinzucht und beim Anstellen (starke Replikation = hoher Anteil sprossender Zellen, die sich in der  $G_2$ -Phase des Zellzyklus befinden) als auch durch hohe Gärkraft während der Gärung (hoher Anteil von Hefezellen, die sich in der  $G_1$ -Phase des Zellzyklus befinden) aus. Diese Eigenschaften der Hefe können durch optimale Nutzung des technischen Equipments der jeweiligen Brauerei und durch Veränderung der Prozeßführung (z.B. der Sudfolge, der Draußlaßintervalle, der Ausschlagmenge) induziert und stabilisiert werden. Die Kenntnis der physiologischen Parameter ermöglicht die Ausarbeitung von Steuerungsstrategien, die zu einer Optimierung des Brauprozesses führen.

BC 44 Hefereinzucht, Hefeführung

(Descriptor: Hefe, Flußzytometrie, Vermehrungsaktivität, Gärkraft, Biomonitoring, Prozeßoptimierung, Reinzuchtverfahren, Anstellverfahren.

Descriptors: Yeast, flow cytometry, proliferative activity, fermentative activity, biomonitoring, process optimization, propagation, cultivation during fermentation).

## 1 Einleitung

In den Brauereien wird ein schnellerer technologischer Durchlauf in der Bierproduktion angestrebt, um auf Saisonspitzen besser reagieren zu können. Gleichzeitig wird jedoch Wert auf lange Kaltlagerungszeiten gelegt, die von wesentlicher Bedeutung für die Qualität des Bieres sind. Neben dem Einsatz von Rohstoffen in erforderlicher Qualität und einem ausgereiften technischen Equipment ist dazu eine Prozeßoptimierung notwendig, die sich vor allem an den Eigenschaften der Hefen orientiert. Die Art der Prozeßführung beeinflusst die Physiologie der Hefen, wodurch sich ihre Leistungsparameter ändern.

Eine hochwertige Brauhefe zeichnet sich durch hohe Vermehrungsaktivität in der Reinzucht und beim Anstellen sowie durch hohe Gärkraft bei niedriger Gärnebenproduktbildung während der Gärung aus. Weiterhin ist eine Hefe mit hoher Survivalkapazität in der Lagerung erwünscht, um Autolyse zu vermeiden. Die Kenntnis dieser Eigenschaften qualifiziert zu einer Optimierung des Brauprozesses, indem die jeweils gewünschten Leistungsparameter der Betriebshefe während der Vermehrung, während der Gärung und während der Lagerung in brauereieigenen realisierbaren Zeiträumen bewußt maximiert werden.

Die Bewertung der Hefe ist unter Verwendung konventioneller, indirekter Methoden (z.B. den Bestimmungen des Extraktge-

haltes, Diacetylgehaltes, pH-Wertes,  $CO_2$ -Gehaltes oder der Temperatur) unzulänglich, da sie keine Aussagen über den zellphysiologischen Zustand der Hefe liefern. Mit Hilfe fluoreszenzoptischer Verfahren können die physiologischen Eigenschaften der Hefezellen in kürzester Zeit ermittelt werden. Derartige Kenntnisse sind unbedingte Voraussetzung zur Erreichung der angestrebten Konstanz des Brauprozesses. Störungen beim Verlauf der Herführung, des Anstellens, des Draußlassens und der Gärung, deren Ursache in einer veränderten Physiologie der Hefen zu suchen wäre, können mit der flußzytometrischen Analytik weitgehend ausgeschlossen werden. Die Brauereien sind technisch sehr unterschiedlich ausgerüstet, so daß ungleiche Bedingungen bezüglich Sudfolge, Ausschlagmenge, Größe der ZKG oder etwa der Anstelltemperatur der Betriebshefe herrschen. Aus diesem Grund kann keine allgemein und für alle gleichermaßen gültige Konzeption entwickelt werden, d.h. jede Brauerei muß ein eigenes Optimierungskonzept erarbeiten.

Zustandsermittlungen können nur mit fluoreszenzoptischen Analysemethoden durchgeführt werden, die einzelne Zellen in ihren Eigenschaften beschreiben. Dazu gehört neben der Mikroskopie die Flußzytometrie, die den Vorteil hat, Tausende von Zellen in nur wenigen Sekunden charakterisieren zu können. Dabei werden über fluoreszenzoptische Markierungsmethoden intrazelluläre Makromoleküle spezifisch nachgewiesen, deren Vorhandensein bzw. Menge bestimmt und daraus Rückschlüsse auf den Zustand der soeben untersuchten Hefezelle gezogen. Da diese Meßsysteme teilweise quasi-on-line anwendbar sind, kann über die Änderung technologischer Parameter wie z.B. Würzegabe, Draußlaßrhythmus oder Belüftung direkt und sofort Einfluß auf den physiologischen Zustand der Brauhefe genommen werden.

Die Vermehrungsaktivität der Hefen wird über den Zellzyklus gemessen, d.h. es werden diejenigen Zellen ermittelt, die DNS replizieren, also Hefezellen, die eine Tochterzelle gebildet haben. Je höher der Anteil sprossender Zellen in der Betriebshefepopulation ist, desto höher ist die Vermehrungsaktivität der gesamten Population (hohe Vermehrungsaktivität = hoher Anteil von  $G_2$ -Phase-Zellen in der Population). Ein hoher  $\beta$ -Hydroxysterolgehalt in den Membranen der Hefen unter-

stützt diese Entwicklung (Müller, 1992).

Dagegen zeichnet sich eine gärraktive Population (hohe Gäraktivität = hoher Anteil von  $G_1$ -Phase-Zellen) durch minimale bzw. gar keine Vermehrungsaktivität aus. In dieser Phase sollten die Hefen in der Lage sein, neben der Synthese des Ethanol auch noch intrazelluläre Speicherstoffe, wie z.B. Neutrallipide oder Glykogen zu synthetisieren, um in der darauffolgenden Lagerung über genügend Energiereserven für ein Überleben zu verfügen.

Ziel der im folgenden vorgestellten Untersuchungen war es, eine Prozeßoptimierung, d.h. eine Verkürzung des eigentlichen Gärprozesses ohne Einschränkung der bisherigen Qualität zu erreichen. Die flußzytometrischen DNS-Analysen konzentrierten sich dabei auf Hefen aus der Reinzucht, der Herführung, des Anstellens und des Draufflassens. Eigenschaften und „Verhaltensmuster“ des jeweiligen brauereieigenen Hefestammes unter den vorgegebenen Prozeßführungsbedingungen wurden auf diese Weise bekannt und beeinflussbar.

Folgende technologische Parameter können nach physiologischer Zustandsermittlung der Betriebshefe optimiert werden:

- Zeitabstand der Intervalle in der Befüllung der Gärtanks mit den einzelnen Suden;
- Ausschlagmenge der Würze;
- Sauerstoffangebot bei der Herführung und während der Belüftung der Anstellwürze;
- Beginn und Dauer der Gärung;
- Wiederverwendbarkeit der Kernhefe zur erneuten Führung.

Auf mögliche Fehlerquellen bisher genutzter Labortechnik wird hingewiesen, Vorschläge zur Prozeßoptimierung werden präsentiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Hefestämme und Probenahme

Für die Untersuchungen wurden Betriebshefen aus 6 sächsischen Brauereien eingesetzt. Die Probenahme wurde in vorangegangenen Mitteilungen ausführlich beschrieben (Hutter et al., 1996).

### 2.2 Fixierung der Hefestämme

Die gezogene Probe aus den Gärtanks wurde bei 5000 U/min abzentrifugiert und in 70%igem eiskalten Ethanol resuspendiert. Die resultierende Zellzahl sollte  $3 \times 10^8$  Zellen/ml nicht überschreiten. Unter diesen Bedingungen war die Probe in gekühltem Zustand mindestens 3 Monate haltbar.

### 2.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Um die Reproduzierbarkeit der Markierungen intrazellulärer Metabolite und eine stöchiometrische Färbung zu gewährleisten, wurde mittels Coulter Counter jede zu untersuchende Probe auf eine Zellzahl von  $10^7$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.4 Fluorochromierung der DNS

Die Ethanol-fixierten Zellen wurden mit NaCl/Phosphatpuffer (Stock A: 1,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml; Stock B: 1,4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100 ml; 84,1 ml Stock A, 15,9 ml Stock B und 8,5 g NaCl wurden mit bidestilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l vereinigt und der pH-Wert mit Stock

A oder B auf 7,2 korrigiert) gewaschen und auf  $10^7$  Zellen/ml NaCl/Phosphatpuffer eingestellt. Diese Suspension wurde mit 10  $\mu\text{l}$  einer 4,8  $\mu\text{M}$  DAPI-Lösung (4'-Diimidino-2-phenylindol) versetzt. Die Bindung dieses Farbstoffes erfolgt spezifisch an A-T reiche Regionen der DNS und ist sehr stabil. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte zwischen 300 und 400 nm, seine Fluoreszenz wurde zwischen 460 und 580 nm gemessen. Bereits nach dreiminütiger Applikation der Farbstofflösung war die Färbung stöchiometrisch und blieb innerhalb der nächsten 3 Stunden stabil.

### 2.5 Fluorochromierung der $3\beta$ -Hydroxysterole

Die Fluorochromierung der  $3\beta$ -Hydroxysterole erfolgte nach der Methode von Müller (1992).

### 2.6 Flußzytometrische Analyse

Die Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines Laboraufbaus, in den ein kommerzielles Durchflußzytometer (PAS III, Fa. Partec) integriert worden ist. Auf diese Weise standen Lichtquellen verschiedener Wellenlängen zur simultanen Anregung der fluoreszenzmarkierten Zellinhaltsstoffe zur Verfügung. Dadurch waren mehrparametrische Fluoreszenzanalysen möglich (Müller et al., 1997). In den hier gezeigten Messungen wurden eine Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100) als Anregungslichtquelle im UV-Bereich unter Verwendung der Filterkonfiguration TK460/IF453 sowie ein Argon-Ionen-Laser mit der Anregungswellenlänge von 488 nm und unter Verwendung der Filterkonfiguration TK500/EM520 eingesetzt. Die genaue Kontrolle der zeitlichen Impulsfolgen erfolgte mit Hilfe eines Oszilloscopes. Das Gerät ist mittels DNA-Check (Epics Alignment Fluorospheres) geeicht worden.

Die Histogramme wurden mit den Programmen WinList und IsoContour bearbeitet und ausgewertet.

### 2.7 Mikroskopische Analyse

Der Zustand der Proben und die Qualität der Fluoreszenzmarkierung wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Olympus research microscope BHS) kontrolliert. Die markierten Zellinhaltsstoffe wurden über eine Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100) angeregt, wobei blaue Fluoreszenz über einen UG1-Filter und grüne und rote Fluoreszenz jeweils über BP 495 und BP 545 detektiert wurden.

### 2.8 Konventionelle Prozeßanalytik

Der Extraktgehalt wurde über einen Analysehalbautomaten mittels Chempro-Analyse bestimmt. Temperatur, Druck und pH-Wert wurden unter Verwendung der üblichen Labor- und Prozeßdatenerfassung gemessen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Nachweis der Vermehrungsaktivität durch DNS-Analysen

Der Anteil vermehrungsaktiver Hefezellen der jeweiligen Betriebshefestämme wurde mit Hilfe der Flußzytometrie durch DNS Analyse ermittelt (Abb. 1 a und 1 b). Das Ergebnis dieser Analyse wird in Form einer Häufigkeitsverteilung dargestellt. Diese beinhaltet Zellen, die sich in der  $G_1$ -, der S- und der  $G_2$ - oder M-

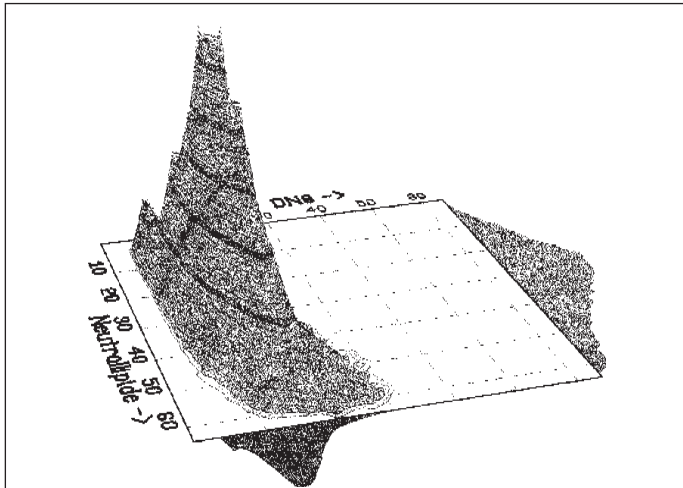


Abb. 1 a 3D-Plot einer Hefeprobe aus der Gärung. Die Zellen dieser Population befinden sich in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus. Sie weisen einen hohen Anteil an Neutrallipiden auf.

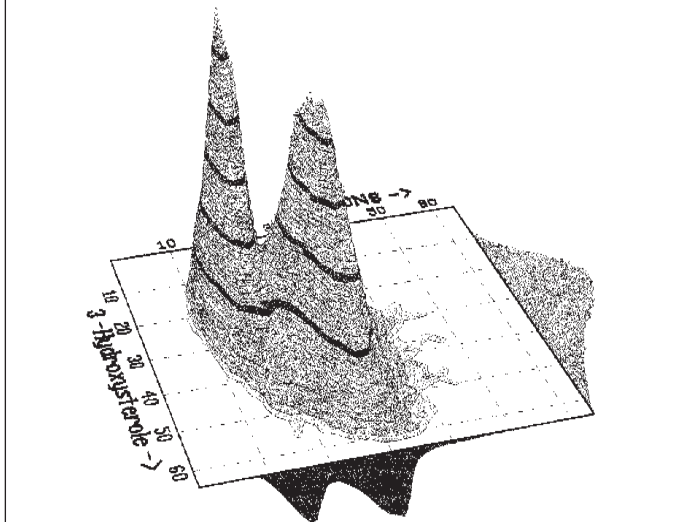


Abb. 1 b 3D-Plot einer Hefeprobe aus der Reinzucht. Diese Population verfügt über einen hohen Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus (43%) und einen hohen 3β-Hydroxysterolgehalt.

Phase des Zellzyklus befinden. Zellen mit vollständigem Genom gehören zur G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus. In der S-Phase befinden sich diejenigen Zellen, die DNS replizieren. Anschließend liegen die Zellen mit doppeltem Chromosomensatz vor (G<sub>2</sub>-Phase) und leiten erst mit beginnender Mitose eine Zellteilung ein. Zellen, die sich in der G<sub>2</sub>- und M-Phase befinden, sind im Histogramm nicht unterscheidbar, da sie über einen identischen DNS-Gehalt verfügen.

Wird in einer Population ein hoher Anteil an Zellen mit 2 Chromosomensätzen detektiert, so besitzt diese eine hohe proliferative Aktivität (Abb. 1 b). Diese Tatsache wird in den folgenden Untersuchungen genutzt, um die Vermehrungsaktivität von Produktionskulturen aus den verschiedenen sächsischen Brauereien bestimmen zu können.

### 3.2 Gegenüberstellung der konventionellen und der flußzytometri-

schen Prozeßführung

Die Abbildung 2 a gibt einen Überblick über einen vollständigen Prozeßablauf von der Reinzucht bis zur Lagerung. Es ist ein typisches Gärdiagramm, das mit Hilfe konventioneller Daten erstellt wurde.

In Abbildung 2 b ist die entsprechende Vermehrungsaktivität der Betriebshefe während dieses Prozesses mit Hilfe der flußzytometrischen Analytik dargestellt. Die Vermehrungsaktivität wurde quasi-on-line (3 min, siehe Materialien und Methoden) vermessen. Das Ziel der Herführung der Reinzucht ist die Produktion von Zellmasse, daher müssen die Hefezellen in diesem Abschnitt des Prozesses über eine hohe Vermehrungsaktivität verfügen (Abb. 2 b, siehe 0 – 48 h).

Der biotechnische Prozeß der Gärung bei der Bierherstellung ist an zwei wichtige Voraussetzungen, die die Zellphysiologie der Betriebshefen betreffen, geknüpft.

- Erzielung einer hohen Vermehrungsrate des inokulierten Zeugs und dadurch
- Anreicherung vieler junger Hefezellen in der Population.

Das Erreichen einer hohen Vermehrungsrate ist für den Erfolg einer sich anschließenden Gärung entscheidend. Ist gegen Ende des Anstellens bzw. Ankommens und des Draufflassens bis Tank voll (49 – 132 h) eine genügend hohe Zellzahl erreicht, d.h. die Zellvermehrung in diesem Prozeß abgeschlossen, kann die Betriebshefe vergären.

Die Anreicherung mit jungen Zellen verstärkt zunächst die Gärkraft einer Population und bedeutet, daß zum Ende der Gärung die Hefe in der Lage ist, höhere Mengen an Reservestoffen zu bilden und zu speichern (Müller et al., 1997). Solche Zellen können längere Lagerzeiten unbeschadet, ohne zu autolytisieren, überstehen und sind bei einer erneuten Führung wesentlich schneller vermehrungsaktiv als überalterte Zellen. Daraus ist zu folgern, daß die Betriebshefekultur während des Anstellens, Ankommens und Draufflassens bis Tank voll mindestens eine, im Idealfall zwei Verdopplungen erreichen muß. Unter den genannten Bedingungen ist es unerheblich, ob eine Population aus der Reinzucht hergeführt wurde oder aus einer Kernhefe mit mehreren Führungen zum Einsatz kam.

Während der Gärung muß der Anteil der Zellen, die über mehr als den einfachen Chromosomensatz verfügen, nahezu Null sein, d.h. alle Zellen sollten sich in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus befinden. Nur diese Zellen sind in der Lage, gäraktiv zu sein. Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase stehen für den Gärprozeß nicht zur Verfügung und vermindern also die Gärkraft der Population. Des weiteren bilden Zellen, die sich nicht im Zellzyklus befinden, Speicherstoffe (Glykogen und Neutrallipide) und Streßmetabolite (Trehalose), die als Energiereserve und Survivalmetabolite Lagerfähigkeit und damit die Qualität der Kernhefe wesentlich potenzieren (Slaughter und Nomura, 1992; Wackerbauer et al., 1996; Hutter und Müller, 1996).

### 3.3 Praxisrelevante Beispiele zur Vermehrungsaktivität in der Reinzucht

Die Zellvermehrung bei der Herführung von Hefezellen aus der Reinzucht wird an zwei verschiedenen Beispielen in den Abbildungen 3 und 4 demonstriert. Beide Herführungen unterscheiden sich einmal in der Art der Prozeßführung, zum anderen in der Ausbeute an sprossenden Hefen (G<sub>2</sub>-Phase-Zellen).

Im Verfahren A (Abb. 3) wurde die Betriebshefe in vier Tagen von 1 hl auf 60 hl hergeführt. Ungefähr alle 24 Stunden wurde ein

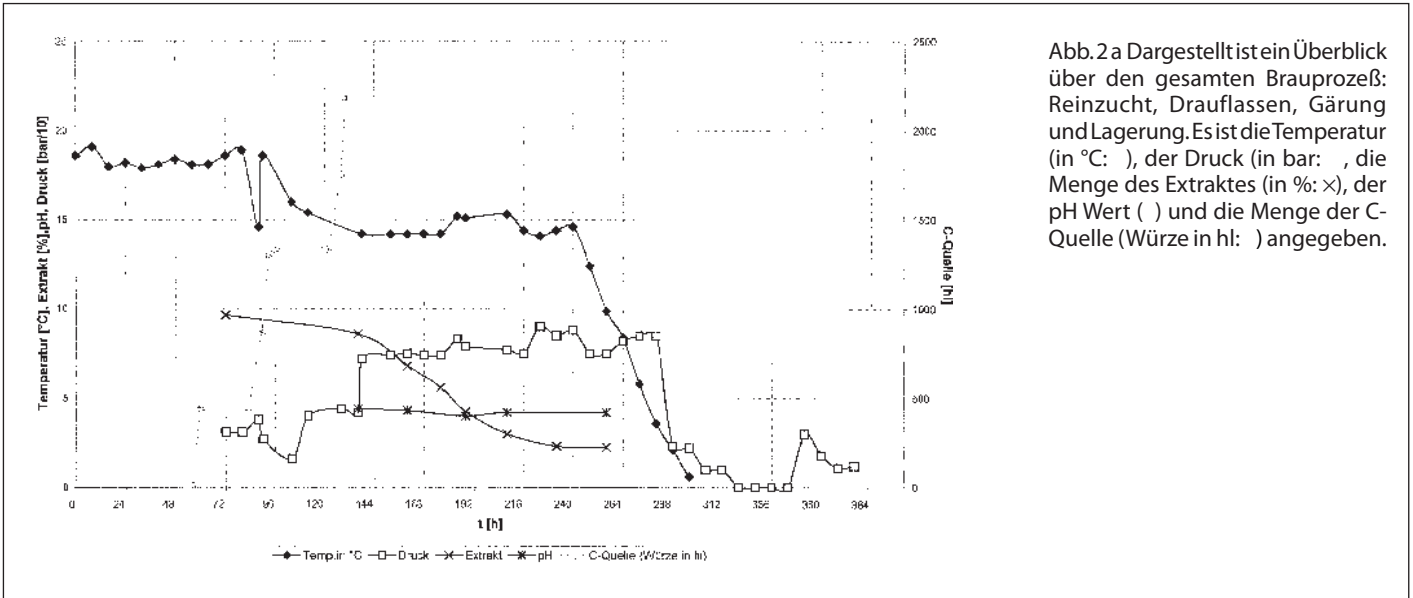


Abb. 2a Dargestellt ist ein Überblick über den gesamten Brauprozess: Reinzucht, Drauflassen, Gärung und Lagerung. Es ist die Temperatur (in °C), der Druck (in bar), die Menge des Extraktes (in %), der pH Wert ( ) und die Menge der C-Quelle (Würze in hl) angegeben.

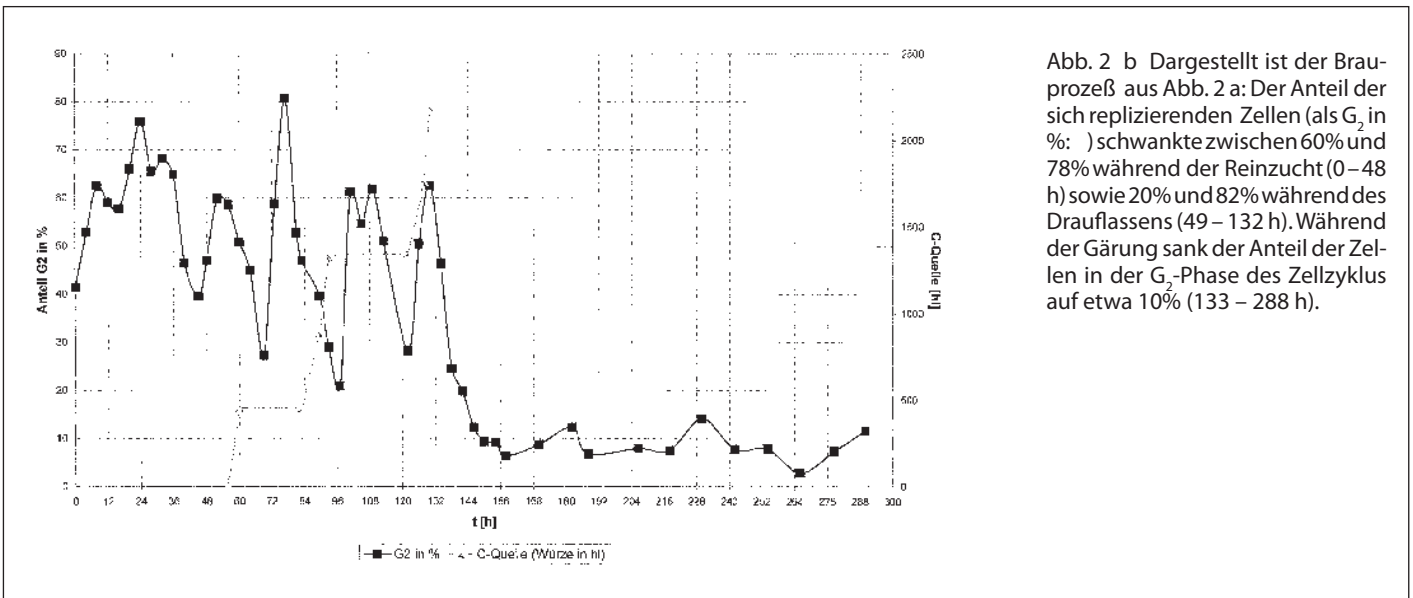


Abb. 2 b Dargestellt ist der Brauprozess aus Abb. 2 a: Der Anteil der sich replizierenden Zellen (als G<sub>2</sub> in %) schwankte zwischen 60% und 78% während der Reinzucht (0–48 h) sowie 20% und 82% während des Drauflassens (49–132 h). Während der Gärung sank der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus auf etwa 10% (133–288 h).

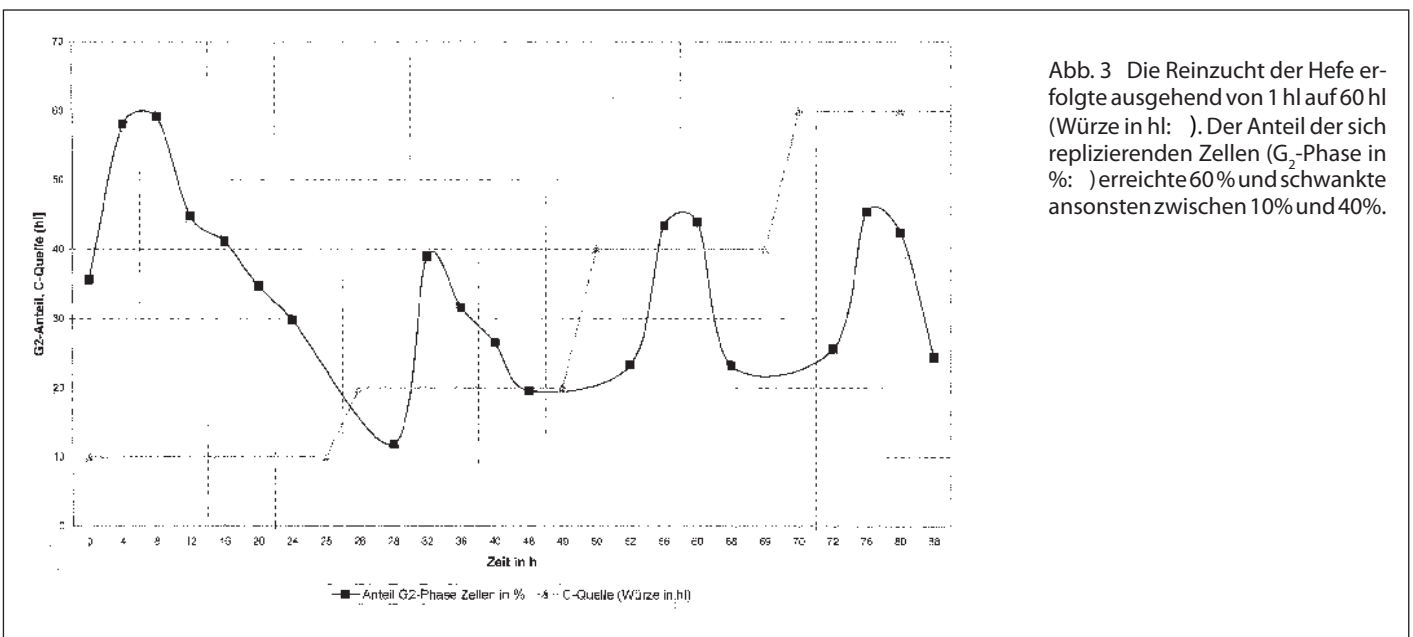
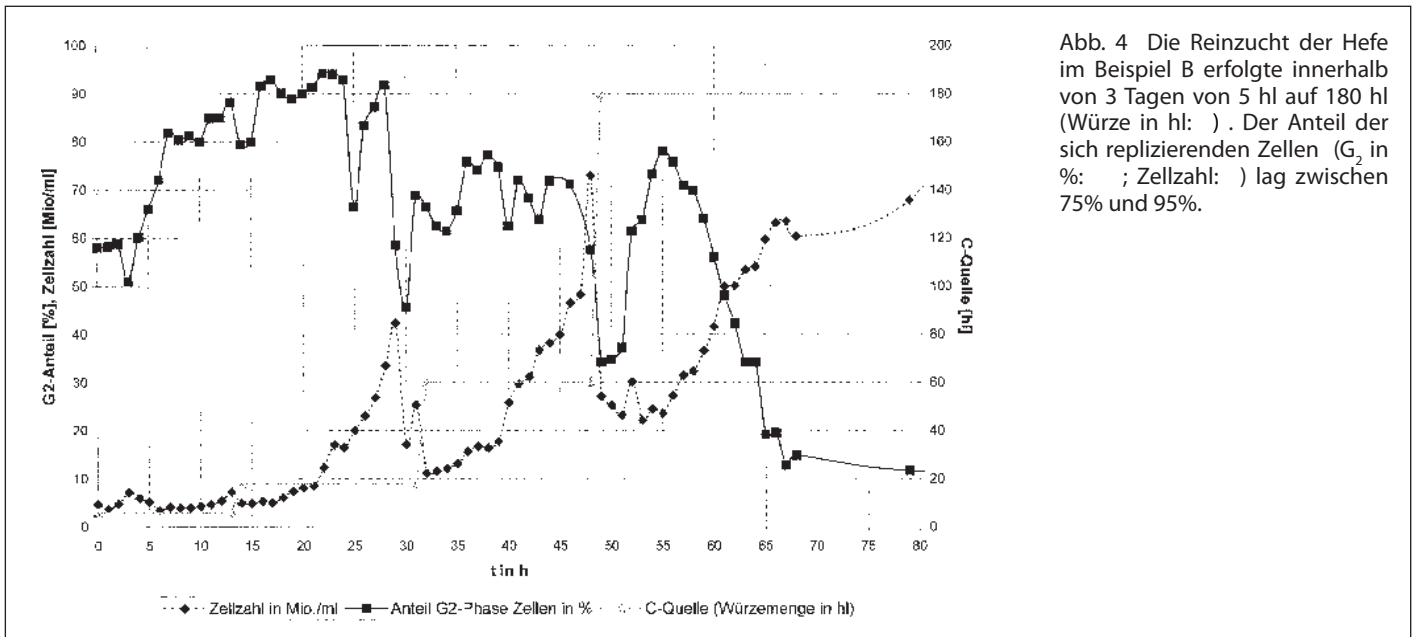


Abb. 3 Die Reinzucht der Hefe erfolgte ausgehend von 1 hl auf 60 hl (Würze in hl). Der Anteil der sich replizierenden Zellen (G<sub>2</sub>-Phase in %) erreichte 60% und schwankte ansonsten zwischen 10% und 40%.



Sud draufgelassen. Die Generationszeit der Hefe betrug unter den vorgegebenen Bedingungen etwa 16 Stunden. Der Anteil der Zellen in der  $G_2$ -Phase des Zellzyklus erreichte einmal 60%, schwankte ansonsten zwischen 10 und 40%. Die Vermehrungsaktivität der Hefen ließ nach, ehe die nächste Würzegabe erfolgte.

Im zweiten Beispiel B (Abb. 4) wurde der Betriebshefestamm von ca. 5 hl auf 120 hl innerhalb von 3 Tagen hergeführt. Auch hier erfolgte die Zugabe frischer Würze alle 24 h. Die Generationszeit dieser Hefe betrug in diesem Prozeß 9 Stunden. Im Gegensatz zur vorherigen Herführung war hier eine resultierende Vermehrungsaktivität von 75 bis 95% zu verzeichnen. Dieser Prozeß verlief insgesamt gesehen optimal.

In bisher allen untersuchten Verfahren war zu beobachten, daß jedes Drauflassen eine Erhöhung der Zellteilung induziert. Dies ist einmal auf den  $O_2$ -Eintrag beim Drauflassen eines frischen Sudes, zum anderen auf die damit verbundene Durchmischung des Tankinhaltes zurückzuführen. Die Zellen reagieren auf das Sauerstoff- und Nährstoffangebot, indem sie sich zu teilen beginnen und erneut einen Zellzyklus initiieren.

Im zweiten Beispiel (Abb. 4) wurde die Zellzahl nach dem Impedanz-Verfahren bestimmt. Es ist unverkennbar, daß, entsprechend dem Prinzip des Zellzyklus, genau zu den Zeiten, in denen die Zellen über die geringste Vermehrungsaktivität verfügten, der stärkste Anstieg in der Zellzahl zu verzeichnen war. Diese Tatsache kann zu falschen, jedoch zumindest zu zu späten Rückschlüssen auf die wirkliche Vermehrungsaktivität der Produktionskultur führen. Der Vorteil der fluoreszenzoptischen Methode ist jedoch, daß man 24 Stunden früher eine Aussage über die Vermehrungsaktivität erhält, ehe eine solche Aktivität über den Anstieg der Zellzahl sichtbar gemacht werden kann.

Eine Prozeßoptimierung im ersten Beispiel ist nur dann zu erwarten, wenn die Würzegabe den physiologischen Zustandsbedingungen der Betriebskultur angepaßt wird. Neben einer Korrektur des Drauflassens, scheint eine zusätzliche Fehlerquelle die mangelnde Sauerstoffzufuhr zu sein. Diese Annahme muß in weiteren Prozeßführungen überprüft werden.

3.4 Kontrolle der Vermehrungsaktivität beim Anstellen unter praxisrelevanten Bedingungen

Bei der üblichen Zeuggabe im ZKG werden zwischen 10 und 25 Mio. Zellen/ml angestellt. Sehr oft geben Brauereien, die auf der sicheren Seite stehen wollen, Zeug in einer Konzentration von 50 Mio. Zellen/ml und mehr. Diese hohen Zellzahlen zu Beginn des Anstellens verhindern eine ausreichende Juvenalisierung der Produktionskultur, da die Vermehrungsaktivität durch eine zu geringe Sauerstoffverfügbarkeit eingeschränkt wird. Die Folge ist, daß die neue Führung über eine niedrige Gärkraft verfügt und zudem die Gefahr besteht, daß ein großer Teil der Hefezellen während des Prozesses autolytisch.

Das folgende Beispiel (Abb. 5) repräsentiert einen optimal geführten Drauflaßrhythmus im zylindrokönischen Tank. Das Zeug stammte aus einer 3. Führung und setzte sich aus Kernhefe zusammen, die nicht gelagert wurde. Alle 3 Stunden wurde ausgeschlagen. Insgesamt wurden 6 Sude a 200 hl zur Befüllung des ZKG draufgelassen. Die Verdopplungszeit dieses Produktionsstammes betrug unter diesen Voraussetzungen 7 Stunden. Die Gesamtdauer des Drauflassens lag bei nur 25 Stunden. 3 % der Hefen befanden sich zu Beginn des Drauflaßverfahrens in der  $G_2$ -Phase des Zellzyklus. Zwei abgeschlossene Verdopplungen wurden erreicht, die realisierte Hefekonzentration betrug 65 Mio. Zellen/ml. Dieses Anstellverfahren verlief aus zwei Gründen optimal:

- Es dauerte nur 5 Stunden bis die Betriebshefe anschoß (Initiierung des Zellzyklus) und
- es wurde eine sehr hohe Vermehrungsaktivität von 80% erreicht.

Die Beispiele der Abbildungen 6 und 7 verdeutlichen, inwieweit die physiologischen Eigenschaften der Hefen Einfluß auf den Erfolg des Anstellverfahrens haben können. In beiden Beispielen erfolgte die Befüllung von 300 hl auf 1200 hl, wobei einmal mit 600 hl und anschließend mit 300 hl im Abstand von 4 h angestellt worden ist.

Der Unterschied bei beiden Verfahren bestand im Zustand der Hefen zu Beginn des Anstellens. Im Beispiel der Abbildung 6 wurde eine Population verwendet, die zu 45% aus  $G_2$ -Phase Zellen bestand, im Beispiel der Abbildung 7 lag der Anteil der  $G_2$ -Zellen nur bei 10%. Obwohl die Vermehrungsaktivität der Zellen zu Beginn des ersten Verfahrens (Abb. 6) sehr gut

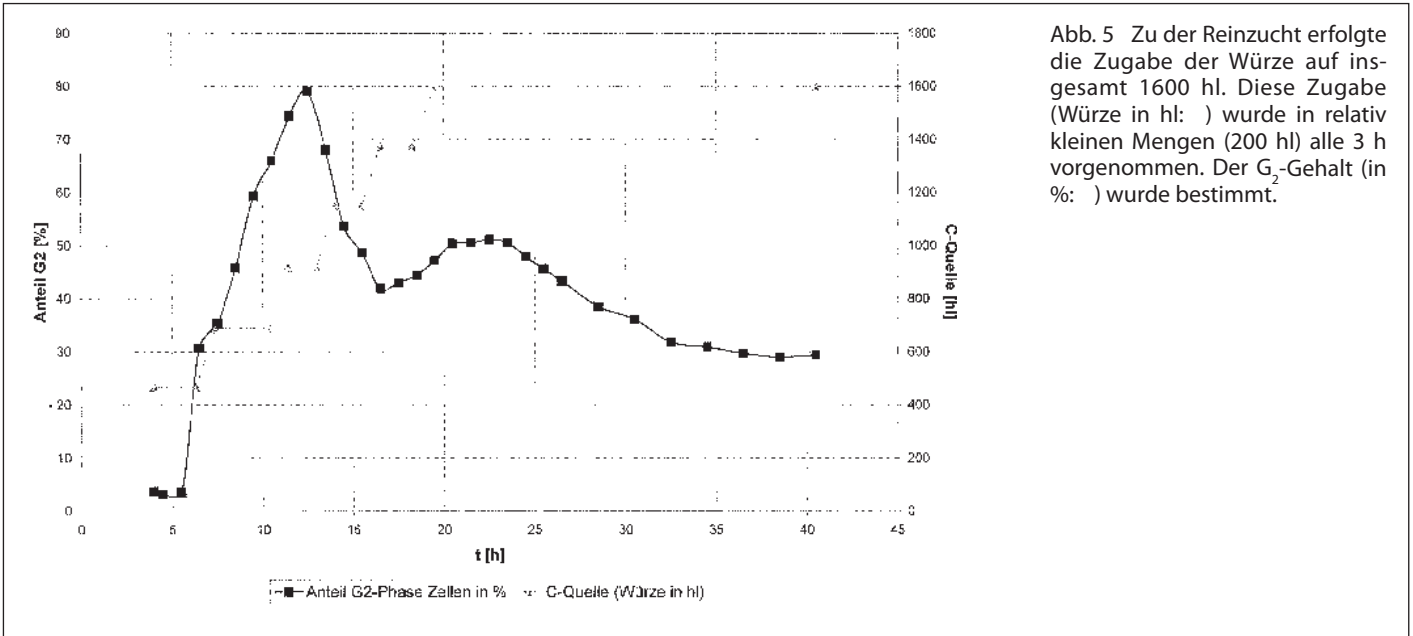


Abb. 5 Zu der Reinzucht erfolgte die Zugabe der Würze auf insgesamt 1600 hl. Diese Zugabe (Würze in hl: ) wurde in relativ kleinen Mengen (200 hl) alle 3 h vorgenommen. Der G<sub>2</sub>-Gehalt (in %: ) wurde bestimmt.

war, fand durch die große Würzmenge im Verhältnis zur vorhandenen Würze/Zellmenge eine Substrathemmung statt. Wie bereits für die Beispiele in Abbildung 3 und 4 diskutiert wurde, teilen sich unter solche Bedingungen die Zellen, der G<sub>2</sub>-Anteil vermindert sich gegen Null. Im Unterschied zu den Beispielen in Abbildung 3 und 4 verbleiben hier die Zellen nach der Teilung in der G<sub>1</sub>-Phase.

Wie schon zu Abbildung 4 diskutiert wurde, geht ferner aus der Abbildung 6 hervor, daß allein der Parameter Zellzahl (wie es in vielen Brauereien praktiziert wird) zur Einschätzung der Vermehrungsaktivität der Zellen nicht ausreicht. Würde man in dem gezeigten Beispiel ausschließlich die Zellzahl berücksichtigen, käme man zu der Annahme, daß eine Erhöhung der Vermehrungsaktivität der Hefen vorläge. Tatsache ist aber, daß die Population auf Grund der Substrathemmung zumeist aus

G<sub>1</sub>-Phase-Zellen besteht.

Für diesen Prozeß wurde folgendes Optimierungskonzept (Abb. 7) vorgeschlagen: das Verfahren wurde mit dem gleichen Betriebshefestamm angestellt, der jedoch diesmal über einen hohen Anteil von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus verfügte. Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus benötigen keine zusätzliche Anstiebszeit für eine zwingend einsetzende Zellteilung unter den gezeigten Prozeßbedingungen. Sie sind auf Grund der zu diesem Zeitpunkt hohen Sauerstoffverfügbarkeit befähigt, den Zellzyklus zu initiieren, so daß bereits innerhalb einer Stunde nach der Würzegabe Vermehrungsaktivität einsetzte und auf diese Weise eine Verdopplung erzielt werden konnte. Zellen aus der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus (Abb. 6) benötigen den in der Würze vorhandenen Sauerstoff zur Zellteilung und sind im Anschluß einem O<sub>2</sub>-Mangel ausgesetzt, so daß eine Induktion des Zell-

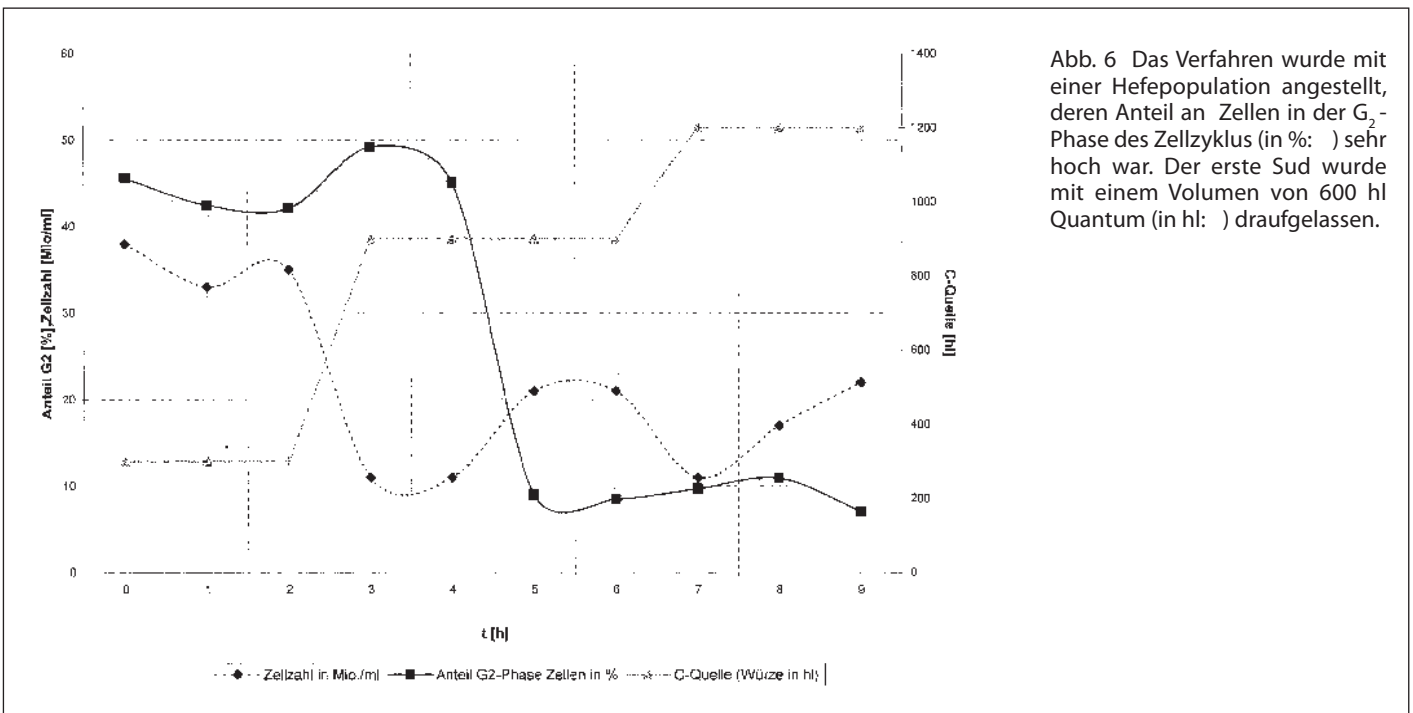


Abb. 6 Das Verfahren wurde mit einer Hefepopulation angestellt, deren Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus (in %: ) sehr hoch war. Der erste Sud wurde mit einem Volumen von 600 hl Quantum (in hl: ) draufgelassen.

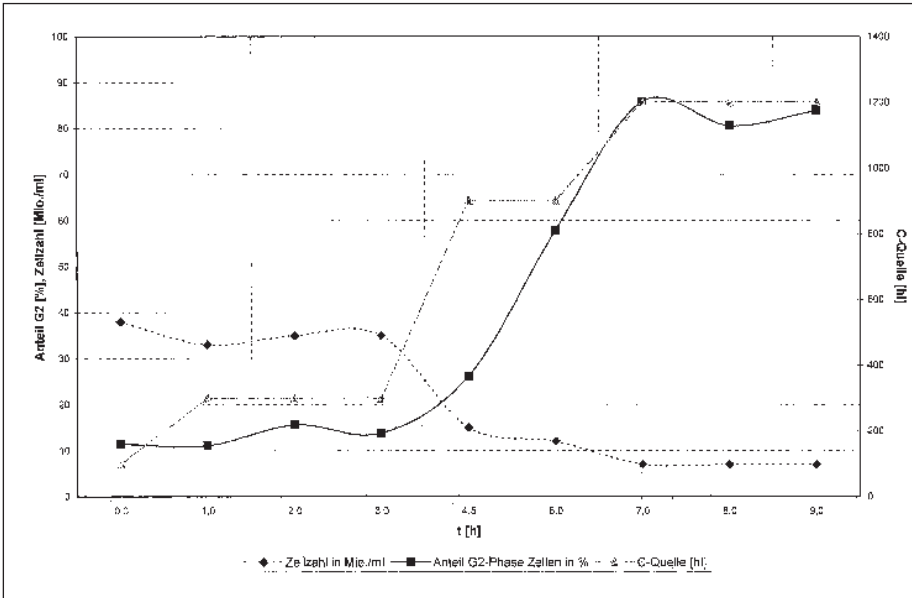


Abb. 7 Die Befüllung erfolgte wie in Abb. 6 (in hl: ). Die Zunahme der Vermehrungsaktivität ist (in %: ) gezeigt.

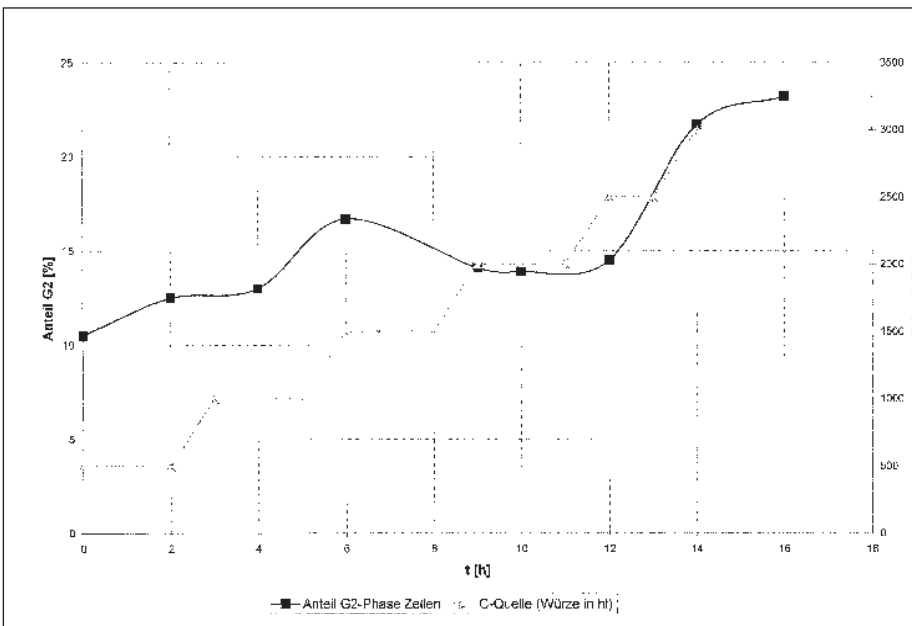


Abb. 8 Die Zugabe der Würze (in hl: ▲) erfolgte alle 3 h. Zum Zeitpunkt des Anstellens betrug der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus 11% (in %: ■), nach Abschluß des Drauflassens lediglich 24%.

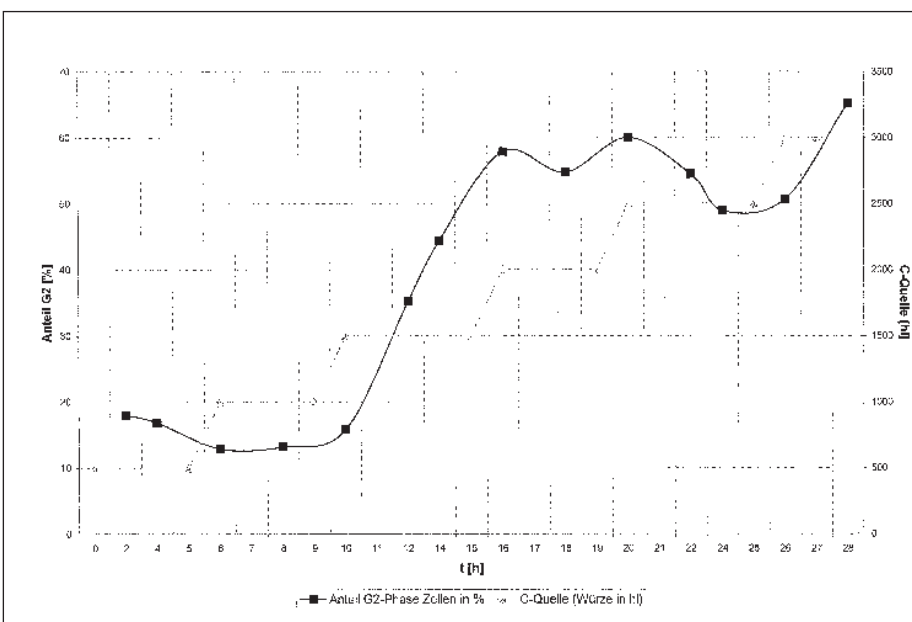


Abb. 9 Die Zugabe des Sudes (in hl: ▲) erfolgte etwa alle 6 h. Zum Zeitpunkt des Anstellens betrug der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus 17% (in %: ■), nach Abschluß des Drauflassens 66%.

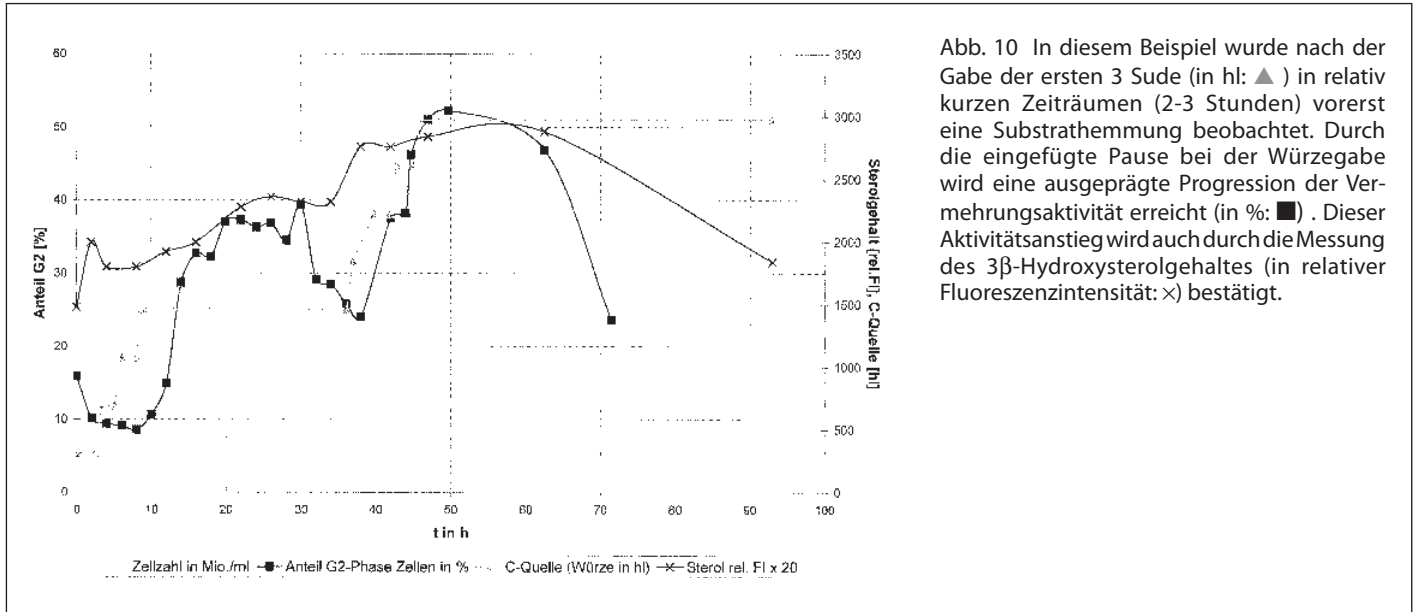


Abb. 10 In diesem Beispiel wurde nach der Gabe der ersten 3 Sude (in hl:  $\blacktriangle$ ) in relativ kurzen Zeiträumen (2-3 Stunden) vorerst eine Substrathemmung beobachtet. Durch die eingefügte Pause bei der Würzegabe wird eine ausgeprägte Progression der Vermehrungsaktivität erreicht (in %:  $\blacksquare$ ). Dieser Aktivitätsanstieg wird auch durch die Messung des  $3\beta$ -Hydroxysterolgehaltes (in relativer Fluoreszenzintensität:  $\times$ ) bestätigt.

zyklus eingeschränkt war und die Kultur zur Gärung übergang.

Neben dem aktuellen physiologischen Zustand der Hefe ( $G_1$ - oder  $G_2$ -Phase) ist es für den Ablauf des Prozesses wichtig, in welchen zeitlichen Abständen die Würzegaben erfolgen. Im Prozeß der Abbildung 8 kam es durch zu große (500 hl) und in zu kurzen Zeitabständen (alle 3 h) zugegebene Würze zu einer Substrathemmung. Es konnte keine Verdopplung detektiert werden.

Es wurde empfohlen, die Pausen zwischen dem Drauffassen zu verlängern (Abb. 9). Der Zeitraum wurde deshalb verdoppelt. Diese Maßnahme wirkte sich positiv auf die Vermehrungsaktivität der Hefezellen aus und führte zur Verdopplung der Population. Gleichzeitig wurde eine ausreichende Juvenalisierung der Betriebshefekultur erreicht, so daß die Voraussetzung für eine ausreichende Gäraktivität in einer späteren Führung geschaffen wurde.

### 3.5 Physiologischer Zustand der Betriebshefe nach Anstellen aus der Hefelagerung

Gärtanks werden zumeist mit Kernhefen, seltener mit einer Reinzucht, angestellt. In dem folgenden Beispiel (Abb. 10) wurde die Hefe 5 Tage bei  $0^\circ\text{C}$  unter Wasser zwischengelagert. Diese Vorgehensweise beeinträchtigt in hohem Maße die physiologische Aktivität der Hefe, wird dennoch oft in der Praxis, z.B. bei Sudpausen, angewandt.

Auffällig ist die insgesamt verminderte Zellzyklusaktivität einer eingelagerten Betriebshefe im Vergleich zu den oben genannten optimierten Verfahren. Die Vermehrungsaktivität eingelagerter Hefe kann durch eine Verlängerung einer Pause zwischen dem Drauffassen induziert und aktiviert werden. Im Anschluß an diese Maßnahme verdoppelten sich die Zellen ein zweites Mal. Diese Ergebnisse wurden durch das zusätzliche Monitoring des  $3\beta$ -Hydroxysterolgehaltes gesichert (Abb. 10). Ein hoher  $3\beta$ -Hydroxysterolgehalt steht für eine vermehrungsaktive Kultur (Müller et al., 1992). Durch diese Art der Prozeßführung wurde trotz der langen Zwischenlagerung eine überraschend hohe Juvenalisierung der Produktionskultur erreicht.

Der zellphysiologische Zustand der Betriebshefe wird mit herkömmlichen indirekten Verfahren unzureichend kontrolliert. Wir sind neue Wege gegangen, die zylindrokönische Gärung transparent zu machen. Unter praxisrelevanten Bedingungen wurde in verschiedenen sächsischen Brauereien die flußzytometrische Analytik eingesetzt, um Reinzucht- und Anstellverfahren zunächst zu kontrollieren und anschließend zu optimieren.

Folgende Erkenntnisse wurden aus den vorgestellten Untersuchungen gewonnen:

- Würzegaben in kurzen Intervallen und in geringer Ausschlagmenge ermöglichen eine hohe Vermehrungsaktivität. Das Anstellen des Drauffaßprozesses mit Zellen aus der  $G_1$ -Phase bewirkt eine schnelle Initiierung des Zellzyklus unter den gezeigten Kultivierungsbedingungen.
- Beim Drauffassen der Würze in großen Ausschlagmengen und in kurzen Abständen setzt eine Hemmung der Vermehrungsaktivität ein.
- Beim Drauffassen der Würze in großen Ausschlagmengen ist es ratsam, die Intervalle zwischen den Würzegaben zu verlängern.
- Die Zellzahlen geben keine aktuelle physiologische Zustandsbeschreibung einer Population an. Mit dem herkömmlichen Impedanz-Meßprinzip sind Aussagen zu Vermehrungsaktivitäten nur in Abhängigkeit der Generationszeiten der Hefezellen möglich. Unter Verwendung der Flußzytometrie sind Aussagen vor Ort schon nach wenigen Minuten (quasi-online) möglich.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der Flußzytometrie – auch bei unterschiedlichster Technologie und betrieblicher Ausstattung der jeweiligen Brauerei – eine individuelle Prozeßkontrolle bzw. Prozeßoptimierung und -regelung durchgeführt werden kann.

Danksagung

Für die Unterstützung dieser Untersuchungen und die kon-

struktiven Anregungen bei der Diskussion der Meßergebnisse bedanken wir uns sehr herzlich bei den Brauereien: Freiberger Brauhaus AG, Krostitzer Brauerei GmbH, Sternquell- Brauerei GmbH Plauen, Radeberger Exportbierbrauerei, Reudnitzer Brauerei GmbH und die Wernesgrüner Brauerei AG.

5 Summary

Müller, S., and Hutter, K.-J.: Process optimisation of pure culture and pitching method by means of flow cytometry in Saxony breweries — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, Nr. 3/4, 40 – 48, 1999

BC 44 yeast propagation

A high quality brewing yeast is outstanding both for its high propagation activity in the pure culture and when pitching (strong application = higher share of budding cells which are found in the G<sub>2</sub> phase of the cell cycle) and its fermentative power during fermentation (high share of yeast cells which are found in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle). These yeast properties can be induced and stabilised by optimal utilisation of the technical equipment of the respective brewery and by altering the process path (for example, brewing sequence, doubling interval, wort quantity). Knowledge of physiological parameters makes it possible to draw up control strategies which lead to brewing process optimisation.

Müller, S., et Hutter, K.-J.: Optimisation d'un procédé de culture pure de levure et d'entonnement par cytométrie à flux dans les brasseries de Saxe — Monatsschrift für Brauwissenschaft 52, Nr. 3/4, 40 – 48, 1999

BC 44 Culture pure de levure, Propagation de levure

Une levure de qualité élevée s'illustre par une activité de multiplication élevée pendant la propagation et à l'entonnement (forte répllication = taux élevé de cellules en bourgeonnement qui se trouvent en phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire) et également par un pouvoir fermentaire élevé pendant la fermentation (taux élevé de cellules de levure qui se trouvent en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire). Ces propriétés de la levure peuvent être induites et stabilisées par une exploitation optimale des équipements techniques de chaque brasserie ou par un changement de la

conduite du procédé (par ex. succession de brassins, temps d'intervalle du Darauffassen, quantité de moût fin cuisson). La connaissance des paramètres physiologiques permet l'établissement de stratégies de conduite qui aboutit à une optimisation du procédé de fabrication.

6 Literatur

Hutter, K.-J., Müller, S., und Herber, M.: „Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren, II. Mitteilung: Funktionalitätstests an Hefezellen“, Monatsschrift für Brauwissenschaft 49, 164 – 170, 1996.

Hutter, K.J., und Müller, S.: „Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren, IV. Mitteilung: Zellzyklus und 3β-Hydroxysterolgehalt“, Monatsschrift für Brauwissenschaft 49, 234 – 239, 1996.

Müller, S.: Darstellung der Populationsdynamik von *Saccharomyces cerevisiae* anhand durchflußzytometrischer Messung des 3β-Hydroxysterol- und DNS-Gehaltes, Diss. an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1992.

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

Müller, S., Hutter, K.-J., Bley, T., Petzold, L., und Babel, W.: „Dynamics of yeast cell states during proliferation and non-proliferation periods in a brewing reactor monitored by multidimensional flow cytometry“, Bioprocess Engineering 17, 287 – 293, 1997.

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

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.

(Manuskripteingang: 14. 12. 1998)