

Erhöhung der Zelldichte während der Propagation von Bierhefe



vorgelegt von
Dipl.-Ing.
Claudia Weigert

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
– Dr.-Ing. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Lothar Kroh
Gutachter:	Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner
Gutachter:	Prof. Dr. Peter Neubauer
Gutachter:	Prof. Dr.-Ing. Bernd Lindemann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12. Januar 2010

Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr.-Ing. Frank-Jürgen Methner, möchte ich an erster Stelle danken. Er hat mir alle Freiheiten gelassen, bei Problemen und Fragen war er jederzeit für mich da. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Neubauer für die Übernahme des Korreferats und die sehr guten und hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr.-Ing. Bernd Lindemann für die spontane und unproblematische Bereitschaft, als Gutachter zu fungieren.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Dr.-Ing. Frank Emde der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG für die einjährige Bereitstellung des Propagators, mit dem ich viele gute Versuchsdaten gewinnen konnte. Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, Förderung IW061204. Für die gute Projektzusammenarbeit danke ich Herrn Dr.-Ing. Jürgen Schöber und Herrn Dr. Axel Fleischer von der fermtec GmbH. Frau Dr. Ute Römisch danke ich für die Einführung in die statistische Versuchsplanung.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen ehemaligen Kollegen des Fachgebietes Bioverfahrenstechnik, insbesondere Prof. Dr.-Ing. Peter Götz, dem ich meinen Einstieg in die Wissenschaft verdanke, sowie Dirk Itzek, der immer für alles eine Lösung hat. Die gute Zeit in der Ackerstraße ermöglichten außerdem Dr. Bunke, Stefan Junne, Judith Maczek, Julia Glazyrina und Margitta Seidenstücker.

Bei meinen Kollegen des Fachgebietes Brauwesen bedanke ich mich ganz herzlich. Der Arbeitsalltag war immer abwechslungsreich und angenehm. An dieser Stelle möchte ich Frau Christiane Drechsler hervorheben, die für mich die scheinbar nie enden wollenden FAN-Proben gemessen hat.

Mein spezieller Dank gilt meinen Diplomanden Fabian Steffler, Eileen Nebel und Bastian Pfeiffer sowie meiner Praktikantin Stefanie Fröhlich mit Nora, durch deren Mitarbeit und Engagement dieses Projekt realisiert werden konnte.

Insbesondere bedanke ich mich bei Georg Kristan, Christian Müller, Heiko Woest, Stefan Reimann und Wiebke Hense für die sehr guten und außergewöhnlichen zwischenmenschlichen Beziehungen während meiner Zeit in der Seestraße.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Promotionsmitstreiterin Frau Dr.-Ing. Kerris Klug. Neben Tat stand sie vor allem mit viel Rat beiseite und war immer da, wenn es erforderlich war. Die vielen lustigen Stunden sind ebenso nicht vergessen.

Für das wertvolle Leben außerhalb der Uni bedanke ich mich bei Isabel, Steffi, Svenja, Wolfgang, Philip, Britta und Lisa!

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und immer an ein erfolgreiches Ende geglaubt haben.

*„Die Ausbeutung des Menschen erreicht eine neue Qualität“
Tocotronic*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Symbole und Abkürzungen	XIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Nährstoffbedarf der Hefe	4
2.1.1 Bierwürze als Nährmedium	4
2.1.2 Nährstoffbilanzierung	8
2.2 Nährstofferhöhung nach Deutschem Reinheitsgebot	8
2.2.1 Rohstoffe und prozesstechnische Steuerung	9
2.2.2 Nebenprodukte des Brauprozesses	12
2.3 Assimilation von Nährstoffen und deren Regulation	14
2.3.1 Stickstoff	15
2.3.2 Zink	21
2.3.3 Pantothensäure	24
2.4 Regulation des Stoffwechsels bei Stress	27
2.4.1 Hitzeschock	27
2.4.2 Osmotischer Schock	28
2.4.3 Ethanolstress	32
2.5 Hefevitalität und Methoden zur Bestimmung	34

3	Material und Methoden	39
3.1	Propagationssysteme	39
3.1.1	Propagatoren	39
3.1.2	Bierhefen und Nährmedien	41
3.2	Analysen	43
3.2.1	Bestimmung der Zelldichte	43
3.2.2	Chemisch-technische und mikrobiologische Ana- lysen	45
3.2.3	Bestimmung der Vitalität	46
3.3	Statistische Versuchsplanung	50
3.4	Extraktion von Nährstoffen aus Malzwurzelkeimen	51
3.5	Versuche zur Steigerung der Zelldichte	54
3.5.1	Dosage von Nährstoffen zur Würze	54
3.5.2	Nährstoffversuche mit synthetischem Medium	55
3.6	Versuche zur Vitalität	56
3.6.1	Differenzierung der drei Wachstumsphasen	57
3.6.2	Stress während der stationären Phase	57
3.6.3	Stress während der exponentiellen Phase	58
4	Untersuchungen zur Nährstoffextraktion aus Malzwurzelkei- men	59
4.1	Zusammenfassung	59
4.2	Einleitung	60
4.3	Ergebnisse	61
4.3.1	Extraktionsmittel und Zerkleinerungsgrad	61
4.3.2	Rohstoffqualität und Extraktionstechnik	64
4.3.3	Zeitlicher Verlauf der FAN-Extraktion	66
4.4	Diskussion	69
5	Propagationsversuche zur Steigerung der Zelldichte	77
5.1	Zusammenfassung	77
5.2	Einleitung	78
5.3	Ergebnisse	79
5.3.1	Nährstoffversuche mit synthetischem Medium	79
5.3.2	Dosage von synthetischen Nährstoffen zur Würze	83
5.3.3	Dosage des Malzwurzelkeim-Extrakts zur Würze	89
5.4	Diskussion	95
5.4.1	Nährstoffversuche mit synthetischem Medium	95

5.4.2	Dosage von Nährstoffen zur Würze	97
5.4.3	Dosage des Malzwurzelkeim-Extrakts zur Würze	102
6	Untersuchungen zum intrazellulären pH-Wert	107
6.1	Zusammenfassung	107
6.2	Einleitung	108
6.3	Ergebnisse	111
6.3.1	Methodenkorrelation	111
6.3.2	Stress während der exponentiellen Phase	117
6.4	Diskussion	120
6.4.1	Methodenkorrelation	120
6.4.2	Stress während der exponentiellen Phase	126
	Literaturverzeichnis	133
	Veröffentlichungen	145
	Anhang	147
A	Chemikalien	147
B	Weitere Analysen	149
C	Propagatoren	149
D	FAN-Extraktion aus Malzwurzelkeimen	150
E	Propagationsversuche	151
F	Vitalitätsversuche	154

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt. Erstens die Steigerung der Zelldichte während der Propagation nach Deutschem Reinheitsgebot und zweitens die Einführung einer genauen und schnellen Messmethode des intrazellulären pH-Wertes (ICP) einer Hefezelle zur Bestimmung ihrer Vitalität.

Bierwürze enthält im Allgemeinen alle für das Hefewachstum essentiellen Nährstoffe in ausreichender Konzentration, mit Ausnahme von Stickstoff, Zink und Pantothensäure. Zur Maximierung der Hefezelldichte wurde zuerst geklärt, dass Stickstoff und Zink signifikante Einflussgrößen des Hefewachstums sind und dass eine Wechselwirkung zwischen ihnen besteht. Pantothensäure hingegen ist nicht signifikant. Malzwurzelkeime, als Bestandteile der Gerste, dürfen nach Deutschem Reinheitsgebot zur Erhöhung des Nährstoffgehaltes der Bierwürze verwendet werden. Ein aus Malzwurzelkeimen hergestellter Extrakt erhöhte den assimilierbaren Stickstoffgehalt des Mediums von 177 mg/L auf 472 mg/L und erzielte damit eine Zelldichte von 198 Mio./mL, was einer Anhebung um 50 % entsprach. Malzwurzelkeime in hohen Konzentrationen von bis zu 100 g/L stellen eine geeignete Möglichkeit zur Erhöhung der Zelldichte nach Deutschem Reinheitsgebot dar.

Die Beurteilung der Hefevitalität erfolgte mittels Zytometrie. Sie ermöglichte durch die Messung einzelner Zellen die Darstellung einer ICP-Verteilungskurve und damit von Heterogenitäten einer Population. Die Photometrie kann nur einen ICP-Mittelwert einer Hefepopulation erfassen. Eine existierende fluoreszenzphotometrische Methode wurde erfolgreich auf ein Zytometer übertragen, indem während der Propagation drei charakteristische Wachstumsphasen signifikant differenziert und Subpopulationen aufgedeckt wurden. In Stressversuchen wurden Unterschiede in den Verteilungskurven im Vergleich zu Standardbedingungen sichtbar. Die Zytometrie ermöglicht eine spezifischere Aussage als die Photometrie bei gleicher Probenvorbereitungs- und Messzeit und ist somit für die Routineanalyse geeignet.

Abstract

This thesis had two goals, first, the increase of cell density during propagation according to German Purity Law and second, the introduction of a precise and short intracellular pH (ICP) method for determining *Saccharomyces cerevisiae* vitality.

Brewer's wort contains generally all essential nutrients as adequate supply required for yeast growth except for nitrogen, zinc and pantothenic acid. Before maximizing cell density, it was primarily determined that nitrogen and zinc are significant influencing factors on yeast growth with interaction effect. However, pantothenic acid was not significant. Malt rootlets as constituent parts of barley may be added to wort in order to raise concentrations of nutrients according to German Purity Law. An extract made of malt rootlets elevated the amount of assimilable nitrogen in wort from 177 mg/L up to 472 mg/L and gained a cell density of 198 Million/mL, meaning an increase of yield of 50 %. Malt rootlets in high concentrations up to 100 g/L are an appropriate action for increasing cell density according to German Purity Law.

The evaluation of yeast vitality was accomplished via cytometry. In contrast to fluorescence photometric measurements, which show only average ICP values of a population, flow cytometry allows the presentation of an ICP distribution and so heterogeneity of populations.

By examining six repeated propagations with three separate growth phases (lag, exponential, stationary), an ICP method previously established for photometry was transferred successfully to flow cytometry. During the propagation of brewer's yeast, three different growth phases were significantly distinguished by flow cytometry and sub-populations identified. During stress experiments, differences in distributions were observed compared to standard conditions. In contrast to photometry, flow cytometry increases information about the yeast population's vitality via a short measurement, which is suitable for routine analysis.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufnahme und Transport von Zink	23
2.2	Syntheseweg von Coenzym A	26
2.3	Glycerin-Metabolismus	30
3.1	Propagator 1 der Firma BioEngineering AG	42
3.2	Propagators 2 der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG	42
3.3	Vollständiger Versuchsplan mit drei Einflussfaktoren	52
4.1	Extraktion von FAN, Zink und Pantothensäure aus MWK - Zerkleinerungsgrad und Extraktionsmittel	63
4.2	Extraktion von FAN, Zink und Pantothensäure aus MWK - Quelle und Extraktionstechnik	65
4.3	Verlauf der FAN-Extraktion	67
5.1	Zelldichte während der Propagation von Rh in einem syn- thetischen Medium	81
5.2	Beobachtete Randmittelwerte für die Einflussgrößen FAN, Zink und Pantothensäure	82
5.3	Zelldichte während der Propagation von W34/70 mit Zink und Pantothensäure als Zusatz zur Würze	84
5.4	Zelldichte und FAN während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze	86
5.5	Scheinbarer Extrakt während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze	87
5.6	Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze	88
5.7	Zelldichte und FAN während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Malzwurzelkeim-Extrakt als Zusatz zur Würze	90

5.8	Scheinbarer Extrakt während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Malzwurzelkeim-Extrakt als Zusatz zur Würze	91
5.9	Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Malzwurzelkeim-Extrakt als Zusatz zur Würze	93
5.10	Erreichte Zelldichte nach 26 h als Funktion des FAN	94
6.1	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von 5,6-Carboxyfluorescein (CF) bei verschiedenen pH-Werten	109
6.2	Spaltungsmechanismus von CFDA in der Hefezelle	110
6.3	Kalibrierkurve des Zytometers für die Messung des intrazellulären pH-Wertes	112
6.4	ICP-Verteilungskurven für drei unterschiedliche Wachstumsphasen der Standardpropagation	114
6.5	Korrelation der intrazellulären pH-Werte von Photometer und Zytometer	115
6.6	ICP-Verteilungskurven einer in der stationären Phase gestressten Hefe	116
6.7	ICP-Verteilungskurven einer in der exponentiellen Phase gestressten Hefe	119
E.1	FAN während der Propagation von W34/70 mit Zink und Pantothensäure als Zusatz zur Würze	151
E.2	Scheinbarer Extrakt während der Propagation von W34/70 mit Zink und Pantothensäure als Zusatz zur Würze	152
E.3	Verlauf der Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 mit Zink und Pantothensäure als Zusatz zur Würze	153
F.4	Verlauf der Zelldichte von W34/70 für die Vitalitätsversuche	154
F.5	Verlauf der Zelldichte von W34/70 bei Stressversuchen . . .	155
F.6	Verlauf des scheinbaren Extrakts bei Stressversuchen	156
F.7	Verlauf des FAN bei Stressversuchen	157
F.8	Verlauf der Ethanolkonzentration bei Stressversuchen	158

Tabellenverzeichnis

2.1	Durchschnittliche Konzentrationen einer 12%igen Würze . . .	5
2.2	Bilanzierung des Nährstoffbedarfs	9
2.3	Durchschnittliche Zusammensetzung von Malzwurzelkeimen	14
2.4	Reihenfolge der Assimilierung von Aminosäuren	20
3.1	Synthetisches Nährmedium mit bierwürzeähnliche Konzen- trationen	44
3.2	Planmatrix eines vollfaktoriellen Versuchsplans mit drei Ein- flussfaktoren	51
3.3	Planmatrix der Nährstoffversuche mit synthetischem Medium	56
5.1	Varianzanalyse für Propagationen mit synthetischem Nähr- medium	82
6.1	Photometrisch gemessene intrazelluläre pH-Werte für drei unterschiedliche Wachstumsphasen	112
6.2	Vergleich der intrazellulären pH-Werte gemessen mit Photo- meter und Zytometer	114
A.3	Eingesetzte Chemikalien	148
C.4	Verwendete Online-Sensoren des Propagators 1 (BioEnginee- ring AG, L1523	149
D.5	Zeitlicher Verlauf FAN-Extraktion aus Malzwurzelkeimen . .	150

Symbole und Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	ANalysis Of VAriance
Agp1	Asparagin Glutamin Permease, niedrigaffine Permease für breites Substratangebot
ATP	Adenosintriphosphat
A_w	activity of water (Wasseraktivität)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
CNM	central nitrogen metabolism
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
FAN	Freier α -Aminostickstoff
FEN	Fenpropimorph resistance protein
FG	Freiheitsgrad
F-Wert	Prüfwert des F-Tests, Prüfung zweier Varianzen
gap	generelle Aminosäurenpermease
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GDA	Glutaminase
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
GS	Glutamin-Synthetase
HOG	High Osmolarity Glycerol

HSP	Heat-Shock-Protein
HTS	Hefetrockensubstanz
ICP	intrazellulärer pH-Wert
k	Einflussgröße
MAP	Mitogen Activated Protein
MQ	Mittlere Quadrate
n	Anzahl an Proben / Experimenten
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCR	nitrogen catabolite repression
p	Wahrscheinlichkeit (p = probability)
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
r ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute
put	Prolinpermease
SICP	short intracellular pH (Methode)
Stabw	Standardabweichung
SNARF	SemiNaphthoRhodaFluor
STRE	stress responsive elements
SQ	Summe der quadratischen Abweichungen
THF	Tetrahydrofolsäure
TM	Trademark
Vol %	Volumenprozent
vvm	Volumenstrom Gas pro Flüssigkeitsmenge
w _i	Anzahl an Ereignissen (Zellen) mit Index i
x _i	pH-Verhältnis mit Index i

1 Einleitung und Zielsetzung

Unter Hefepropagation wird in der Brauereitechnologie die Vermehrung von Hefe verstanden und wird in der Literatur häufig als Hefe-reinzucht und Hefeherführung bezeichnet. Ziel der Propagation ist es, in kurzer Zeit eine ausreichende Hefemenge zum Vergären der Würze zu Bier bereitzustellen und gleichzeitig eine Hefequalität zu erzeugen, die zu einer zügigen Gärung sowie zu einem qualitativ und sensorisch guten Bier führt.

Nach dem vom bayerischen Herzog Wilhelm IV. am 23. April 1516 erlassenen Reinheitsgebot für Bier darf dieses nur aus den Bestandteilen Hopfen, vermälzter Gerste und Wasser gebraut werden. Aus ihnen wird das zu vergärende Substrat, die Bierwürze, hergestellt und stellt das Nährmedium der Hefe dar. Sie wird für Gärung und Propagation eingesetzt. Die Bierwürze ist ein Komplexmedium, welches im Allgemeinen alle notwendigen Nährstoffe für die Bierhefe enthält. Für eine optimale Vermehrung sind einige dieser Nährstoffe jedoch nicht in ausreichender Konzentration vorhanden ([Annemüller et al. 2008](#)). Der Biomasseertrag bzw. die maximal erreichbare Zelldichte ist eingeschränkt und u. a. aufgrund von Nährstoffmangel limitiert. Die Autoren vermuten diesen Mangel in erster Linie in fehlendem assimilierbaren Stickstoff, Zink und Pantothensäure.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung zweier Aspekte während der Hefepropagation. Ein Gesichtspunkt ist die Untersuchung des Einflusses von Nährstoffen auf die Zelldichte, um die Ausbeute der Hefe nach Deutschem Reinheitsgebot maximieren zu können. Der zweite Gesichtspunkt ist die Beurteilung einer Hefepopulation über ihre Vitalität, gemessen als intrazellulärer pH-Wert.

Die Maximierung der Hefezelldichte soll gemäß den Richtlinien des Deutschen Reinheitsgebotes erfolgen. Hierzu wird zuerst geklärt, wel-

cher der drei Mangelnährstoffe das Hefewachstum am meisten limitiert. Dies wird anhand eines synthetischen Mediums realisiert, welches die exakte Einstellung von Nährstoffkonzentrationen ermöglicht. Die gewonnenen Ergebnisse sollen auf ein würzebasiertes System übertragen werden, da das Hauptziel die Optimierung nach Deutschem Reinheitsgebot ist und daher mit Würze als Nährmedium der Hefe. Darauf basierend soll ein Extrakt aus Malzwurzelkeimen hergestellt werden, der einer Würze zudosiert wird. Malzwurzelkeime sind ein Nebenprodukt des Mälzungsprozesses. Als Teil des Brauprozesses dürfen Malzwurzelkeime als Additiv für den zusätzlichen Nährstoffeintrag der Würze zugesetzt werden, ohne das Reinheitsgebot zu verletzen. Ein daraus hergestellter Extrakt soll die Zelldichte während Propagationen erhöhen.

Eine Beurteilung des physiologischen Zustandes einer Hefepopulation erfolgt als zweites Hauptthema in dieser Arbeit. Die Qualität der Hefe wirkt sich entscheidend auf den Geschmack und die Haltbarkeit des Bieres aus (Back et al. 1998). Die Vitalität kann über die Erfassung des intrazellulären pH-Wertes einer Hefezelle ausgedrückt werden. Der intrazelluläre pH-Wert ist ein Maß für die Aktivität einer lebenden Zelle, dessen Regulation für die Aufrechterhaltung zellulärer Stoffwechselvorgänge essentiell ist. Die Wirkung vieler Enzyme ist stark pH-Wert-abhängig. Eine fluoreszenzbasierte Methode zur Erfassung des intrazellulären pH-Wertes mittels Photometrie soll auf Zytometrie übertragen werden. Im Gegensatz zur Photometrie, die nur einen Mittelwert des intrazellulären pH-Wertes einer Hefepopulation darstellen kann, erlaubt die Zytometrie über die Messung einzelner Zellen eine detaillierte Darstellung der Population. Mit der zytometrischen Methode sollen Homogenitäten bzw. Heterogenitäten des intrazellulären pH-Wertes innerhalb einer Population aufgezeigt werden.

2 Stand des Wissens

Die Bierhefe der Art *Saccharomyces cerevisiae* ist eine einzellige Hefe und gehört zu den Eukaryonten. Sie ist innerhalb des Reiches der Pilze (Fungi) in der Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota) eingeordnet. Hefen vermehren sich vorwiegend asexuell durch Knospung, wobei die Zellteilung asymmetrisch erfolgt und das Zytoskelett polarisiert wird. *Saccharomyces cerevisiae* umfasst mehrere Kulturhefearten, wie die Bierhefe, die Brennereihefe, die Backhefe und die Weinhefe. Die Verwendung dieser Kulturhefen gestaltet sich allein in der Getränke-technologie sehr unterschiedlich. Bierhefe unterteilt sich in untergärig und obergärig und es lassen sich morphologische, physiologische und gärungstechnologische Unterschiede aufzeigen.

Für eine optimale Vermehrung benötigt die Bierhefe Sauerstoff, um den aeroben Stoffwechselweg des Glucoseabbaus einschlagen zu können, einen bestimmten Temperaturbereich sowie ein ausreichendes Nährstoffangebot. Die Begriffe untergärig und obergärig sind durch das Verhalten am Ende der Fermentation geprägt. Untergärige Hefe setzt sich am Boden des Gärtanks ab, während obergärige auf der Oberfläche des Jungbieres schwimmt. Obergärige Hefe bildet Sprossverbände und erfährt durch das produzierte CO₂ einen Auftrieb. Untergärige Hefe gärt und vermehrt sich generell bei tieferen Temperaturen als obergärige und bindet deshalb mehr ungesättigte Fettsäuren in die Zellmembran ein. Für untergärige Hefen wird ein Temperaturoptimum zwischen 20-25 °C (Schmidt 1993) bzw. 26,8-30,4 °C (Annemüller et al. 2008) angegeben, für obergärige liegt die optimale Wachstumstemperatur zwischen 30-35 °C (Annemüller et al. 2008). Die Bildung von Sprossverbänden und Gärungsnebenprodukten ist bei der untergärigen Hefe weniger stark ausgeprägt. Sie kann Raffinose vollkommen verwerten, hingegen obergärige nur zu einem Drittel. Die Atmungsaktivität einer untergärigen Hefe ist sehr viel schwächer und das Sporenbildungsvermögen ist geringer, die SO₂-Bildung dagegen höher, um nur einige Differenzierungsmöglichkeiten zu nennen (Annemüller et al. 2008).

2.1 Nährstoffbedarf der Hefe

Für die Zellvermehrung von *Saccharomyces cerevisiae* sind bei aeroben Bedingungen eine assimilierbare organische Kohlenstoff- und Energiequelle, eine assimilierbare Stickstoffverbindung (z. B. Aminosäuren), essentielle Mineralstoffe (Phosphat, Kalium, etc.), Spurenelemente (Eisen, Mangan, Zink, etc.), die Vitamine Biotin, Pantothensäure und der Wachstumsfaktor m-Inosit notwendig. Bei anaeroben Bedingungen sind für die Hefe weiterhin Ergosterin und mindestens eine ungesättigte Fettsäure essentiell (Annemüller et al. 2008).

2.1.1 Bierwürze als Nährmedium

Die Bierwürze stellt das zu vergärende Substrat für die Hefe dar. Die durchschnittliche Zusammensetzung einer Vollbierwürze ist in Tabelle 2.1 aufgelistet. Je nach gewünschter Geschmacksrichtung werden unterschiedliche Malze eingesetzt und verschiedenartig gemischt. Die Bierwürze ist ein wässriger Extrakt des geschroteten Malzes und beinhaltet im Allgemeinen alle für die Hefevermehrung notwendigen Nährstoffe. Hauptbestandteile der Würze sind vergärbare Mono-, Di- und Trisaccharide. Als vergärbare und oxidativ assimilierbare Zucker kommen für *Saccharomyces cerevisiae* in erster Linie Glucose, Fructose, Saccharose, Maltose und Maltotriose in Betracht, wobei Maltose in der Bierwürze den größten Anteil bildet. Die Gesamtzuckerkonzentration einer 12%igen Würze für ein helles Vollbier liegt durchschnittlich bei 88 g/L. Als assimilierbare Stickstoffquelle stehen der Bierhefe in der Würze in erster Linie Aminosäuren und kleine Peptidmoleküle (Di- und Tripeptide) sowie Ammoniumionen zur Verfügung (Lekkas et al. 2005). Der für die Hefe verfügbare Stickstoff wird in der Brauereitechnologie unter dem Begriff FAN definiert und steht für freien α -Aminostickstoff. Der pH-Wert liegt üblicherweise zwischen 5,6 und 5,8. Weitere Komponenten, die beim Maischen in Lösung gehen, sind Dextrine und bestimmte Eiweißstoffe wie Albumine (Kunze 2007).

Herstellung des Malzes. Die Hauptschritte des Mälzungsprozesses sind das Weichen und Keimen der Gerste sowie das anschließende Darren des Grünmalzes. Der Zweck des Mälzens ist die Aktivierung

Tabelle 2.1: Durchschnittliche Konzentrationen an assimilierbaren Zuckern, Mineralstoffen und Spurenelementen in einer 12%igen Würze nach (Annemüller et al. 2008) und (Kunze 2007)

Nährstoffe	Ø Konzentration
Maltose	57,5 g/L
Maltotriose	15,5 g/L
Saccharose	4,5 g/L
Glucose und Fructose	10,5 g/L
FAN	200 mg/L
Phosphat P_2O_5	859 mg/L
Kalium	550 mg/L
Schwefel	90 mg/L
Magnesium	100 mg/L
Calcium	35 mg/L
Natrium	30 mg/L
Zink	0,15 mg/L
Eisen	0,10 mg/L
Mangan	0,13 mg/L
Kupfer	0,10 mg/L
Biotin	6,5 μ g/L
Pantothensäure	0,25/0,5 mg/L
Inosit	40 mg/L

und Neubildung von Enzymen, der teilweise Abbau von Inhaltsstoffen der Gerste sowie der Abbau unerwünschter Substanzen wie zum Beispiel der Zellwand. Als Produkt entsteht ein lagerfähiges Malz.

Beim Weichen wird die Gerste gewässert, sodass Wasser bis zum Korninneren gelangen kann. Mit Belüftung der eingeweichten Gerste setzen die Atmung und die Aktivierung zelleigener Enzymsysteme ein. Ab einem Weichgrad von 30 % werden Stoffwechselvorgänge in Gang gesetzt und die Keimung der Gerste beginnt. Helle Malze haben bei

einem Weichgrad von 42-44 % eine Keimdauer von 55-120 h, dunkle Malze mit einem Wassergehalt von 44-46 % eine Dauer von 90-110 h. Die Weich- und Keimtemperaturen betragen 10-15 °C. Das Weichwasser enthält neben Gerb- und Bitterstoffen, Anthocyanogenen, Kieselsäure und Spelzeneiweiß auch Verunreinigungen.

Die Keimanlage besteht aus Embryo, Blattkeim und Wurzelkeim. Für die Ausbildung von Blatt- und Malzwurzelkeim werden die im Endosperm lokalisierten Reservestoffe verwendet. Im Mehlkörper liegen diese Stoffe in hochmolekularer Form innerhalb einer Zellstruktur vor und werden durch die gebildeten Enzyme in niedermolekulare transportable Stoffe abgebaut. Der Stärkegehalt sinkt dabei von 63 auf 58 %. Die Aktivierung von Enzymen, welche beim Maischen zum Einsatz kommen, ist der wichtigste Vorgang des Mälzens. Einige Enzyme werden neu gebildet, wie die α -Amylase, andere wie die β -Amylase liegen bereits in größerer Menge vor. Weitere wichtige Enzymgruppen sind hierbei Glucanasen, Proteasen, Peptidasen, Phosphatasen und Lipasen. Der Zuckergehalt steigt von 2 auf 9 % in der keimenden Gerste, 38 bis 42 % der Eiweiße werden in lösliche niedermolekulare Stickstoffverbindungen abgebaut und der Fettgehalt in der Gerste sinkt. Ein Teil der Eiweiße wird in die Malzwurzelkeime transportiert. Es bildet sich das Grünmalz.

Das Darren des Grünmalzes unterbricht den Keimvorgang durch schrittweisen Wasserentzug, indem es mit warmer Luft durchströmt wird. Der Großteil des Wassers wird beim Schwelken bei ca. 50 °C ausgetrieben. Liegen noch 10-12 % Wassergehalt im Grünmalz vor, kann die Temperatur weiter erhöht werden. Durch das Abdarren bei Temperaturen über 80 °C wird der Wassergehalt anschließend auf unter 5 % gesenkt. Die Abdarrtemperatur wird 3-5 h gehalten. Beim Darren werden die Enzyme inaktiviert, die Abbauvorgänge unterbrochen und Farb- und Aromastoffe gebildet.

Die Nachbehandlung des Malzes unterteilt sich in Abkühlen und Putzen. Das Putzen entfernt die Malzwurzelkeime, die aufgrund des hohen Eiweißgehaltes das wichtigste Nebenprodukt der Mälzerei sind. Nach Abschlagen der Keimlinge ist der Eiweißgehalt ca. 0,3 % geringer gegenüber der Gerste. Der Gesamtverlust durch Entfernen der Malzwurzelkeime beträgt ca. 4 % der Malztrockensubstanz.

Herstellung der Würze. Der erste Schritt der Würzeherstellung ist das Schrotten des Malzes. Nachdem das Malz zerkleinert ist, wird es in ein Maischegefäß überführt und mit Wasser versetzt. Beim Maischen werden die Inhaltsstoffe des Malzes in Lösung gebracht. Die Enzyme des Malzes wandeln die unlöslichen Bestandteile in lösliche Extraktstoffe um. Im Maischbottich wird ein Temperaturprogramm mit verschiedenen Rasten durchlaufen. Bei der Zytolyse (40-65 °C) wird die Zellwand abgebaut. Bei Temperaturen über 60 °C wird matrixgebundenes β -Glucan in lösliches hochmolekulares β -Glucan überführt. Unterhalb von 60 °C wird dieses in niedermolekulares β -Glucan umgesetzt. Die Proteolyse, die zwischen 45 und 50 °C stattfindet, erzeugt aus Proteinen und Peptiden freie Aminosäuren. Während der Amylolyse (35-75 °C) wird Stärke über drei Stufen abgebaut: Verkleisterung, Verflüssigung, Verzuckerung. Weitere Abbau- und Lösungsvorgänge betreffen organisch gebundene Phosphate, Freisetzung von Zink, Gerbstoffe, Anthocyanogene und Umwandlung von Lipiden zu Glycerin und Fettsäuren (Back 2005).

Nach Beendigung des Maischprogramms wird das Fest-Flüssig-Gemisch abgeläutert. Das Abläutern ist ein Filtrationsvorgang, um die Feststoffe, die Treber, von der wässrigen Lösung der Extraktstoffe zu trennen. Dies kann entweder über einen Läuterbottich mit Treber bestehend aus Spelzen als Tiefenfilter oder einem Maischefilter erfolgen. Der Hauptguss der Maische, der aus den Trebern abläuft, wird als Vorderwürze bezeichnet. Die verbleibenden Treber werden angeschwänzt, das heißt, restlicher Extrakt wird mit heißem Wasser aus den Trebern herausgelöst. Diese verdünnte Würze wird Nachguss genannt. Die letzte am stärksten verdünnte Würze heißt Glattwasser.

Die Pfannevollwürze, bestehend aus Vorderwürze und Nachgüssen, wird in die Würzepfanne, ein Würzekochsystem, geleitet und zum Kochen gebracht. Die Hopfengabe erfolgt während des Kochens, bei dem die α -Säuren des Hopfens isomerisieren. Unerwünschte Aromastoffe dampfen aus, Eiweiß-Gerbstoff-Verbindungen werden ausgeschieden. Enzyme denaturieren, Farb- und Aromastoffe sowie Reduktone bilden sich und der pH-Wert sinkt. Der gewünschte Stammwürzegehalt wird durch Verdampfung von Wasser eingestellt. Ist der Kochprozess abgeschlossen, wird die Ausschlagwürze ausgeschlagen und zur Entfernung

des Heißtrubs, hauptsächlich aus einem Protein-Polyphenolkomplex bestehend, in einen Whirlpool oder Separator überführt.

Ein nachgeschalteter Plattenwärmeübertrager realisiert die Kühlung der Würze, damit sie zum Anstellen mit Hefe richtig temperiert ist. Das optionale Klären der Würze zur Kühltrubentfernung kann über Kieselgurfilter, Flotation oder Separatoren durchgeführt werden.

2.1.2 Nährstoffbilanzierung

Werden die Nährstoffkonzentrationen einer durchschnittlich zusammengesetzten Bierwürze betrachtet, so stellt sich die Frage, ob diese Mengen für ein optimales Hefewachstum mit maximaler Ausbeute hinreichend sind. Annemüller *et al.* (2008) vergleichen in Tabelle 2.2 die Konzentrationen der Inhaltsstoffe einer Vollbierwürze mit der Nährstoffversorgung einer Backhefe. Bei Einsatz von 100 kg Saccharose und einem Backhefezuwachs von 8,1 kg als Hefetrockensubstanz (HTS) errechneten sie den Überschuss und das Defizit an Nährstoffen in der Würze. Nach dieser Tabelle liegen der assimilierbare Stickstoff in Form von FAN, die Metalle Zink, Eisen und das Vitamin Pantothensäure defizitär vor. Eisenmangel kann teilweise durch einen Überschuss an Manganionen ausgeglichen werden (Annemüller *et al.* 2008), weshalb von den Metallen im weiteren Verlauf nur Zink betrachtet wird.

2.2 Nährstofferhöhung nach Deutschem Reinheitsgebot

Die Einstellung der Nährstoffkonzentrationen in der Bierwürze ist nach Deutschem Reinheitsgebot über die Malzeigenschaften und die Maischarbeit gegeben und nur in einem gewissen Rahmen variierbar. Eine Aufstockung der Nährstoffkonzentrationen durch Additive während des Brauprozesses ist möglich, wenn Nebenprodukte verwendet werden. Der Fokus liegt auf der Erhöhung der Nährstoffe FAN und Zink.

Tabelle 2.2: Bilanzierung des Nährstoffbedarfs in einer 12%igen Würze nach (Annemüller et al. 2008)

Essentielle Nährstoffe	Erforderlich für den Backhefe-zuwachs von 8,1 kg HTS	Nährstoff-äquivalente ($\emptyset$) von 12,8 hL Würze	Überschuss (+) bzw. Defizit (-) in der Würze	Defizit der Würze mit 100 kg Zucker für maximale HTS-Bildung
Saccharose	~ 100 kg	~ 100 kg	Referenzwert	
FAN	750 g	256 g	-	ca. -66 %
Phosphat P_2O_5	300 g	1100 g	+	
Kalium	150 g	704 g	+	
Schwefel	82 g	115 g	+	
Magnesium	15 g	128 g	+	
Calcium	15 g	44,8 g	+	
Natrium	7,5 g	38,4 g	+	
Zink	1,5 g	0,192 g	-	ca. -87 %
Eisen	0,75 g	0,128 g	-	ca. -83 %
Mangan	0,15 g	0,166 g	+	
Kupfer	0,06 g	0,128 g	+	
Biotin	3 mg	8,32 mg	+	
Pantothensäure	1215 mg	320/640 mg	-	ca. -74/-50%
Inosit	16,2 g	51,2 g	+	

HTS = Hefetrockensubstanz

2.2.1 Rohstoffe und prozesstechnische Steuerung

Der Rohstoff Gerste und die Mälzung. Die Rohstoffqualität der Gerste hat einen großen Einfluss auf die spätere Ausbeute an Nährstoffen. Der Zinkgehalt der Gerste (McLaren et al. 1999, Donhauser & Wagner 1986, Jacobsen et al. 1981) muss beachtet werden sowie der Eiweißgehalt, der üblicherweise zwischen 10,0 und 11,5 % liegt. Auch der Gehalt an Pantothensäure ist wichtig, wird jedoch in der Praxis

nicht analysiert. Über die Mälzung der Gerste kann der Nährstoffgehalt gesteuert werden. Beim Mälzen gehen die Inhaltsstoffe „in Lösung“. Dieser Ausdruck wird benutzt, um die Umwandlung von hochmolekularen in niedermolekulare Stoffe zu beschreiben. Liegt ein gut gelöstes Malz vor, hat es eine gut gelöste Fraktion an Gesamtstickstoff. Dieser Eiweißlösungsgrad wird mit der Kolbachzahl erfasst. Ist die Gesamtmenge an gelöstem Stickstoff höher, ist auch der Anteil an Aminosäuren größer und resultiert somit in einem entsprechend hohen FAN (Donhauser 1981).

Die Herstellung eines Sauermalzes ermöglicht die Erniedrigung des pH-Wertes einer Würze. Normal gekeimtes Grünmalz wird mit biologischer Milchsäure befeuchtet und abgedarrt. Die Milchsäure konzentriert sich zu 2 bis 4 % im Malz. Bis zu 10 % Anteil an Sauermalz an der Schüttung sind üblich. Eine Senkung des pH-Wertes führt zu Änderungen des Nährstoffgehaltes in der Würze und wird im Folgenden näher erklärt (Kunze 2007).

Steuerung des Brauprozesses. Der Brauprozess hat mehrere Stellen, an denen die Nährstoffzusammensetzung der Würze beeinflusst werden kann. In erster Linie ist das Maischen zu nennen, bei dem eine Protease-Rast und eine pH-Wert-Senkung große Auswirkungen auf die Nährstoffkonzentrationen hervorrufen können.

In der Eiweißrast zwischen 45 und 50 °C kann der FAN in der Würze stark erhöht werden, da dort die Peptidasen ihr Temperaturoptimum haben. Bei einem gut gelösten Malz wird die Proteolyse üblicherweise übersprungen, denn gleichzeitig werden viele höhermolekulare Proteine abgebaut, die die Schaumbildung positiv beeinflussen. Über die Konzentration der Maische kann der Aminosäuregehalt erhöht werden. In hoch konzentrierten Maischen werden mehr Aminosäuren gebildet als in niedrig konzentrierten (Donhauser 1981).

Die Senkung des pH-Werts der Maische wird über zwei Parameter gesteuert, durch Zugabe von Sauermalz mit einem pH-Wert von 3,4 bis 3,5 oder durch eine biologische Säuerung (Donhauser 1981). Die Aktivität der Enzyme ist bei erniedrigtem Würze-pH von 5,1 bis 5,2 höher. Peptidasen arbeiten besser und Zink löst sich besser im sauren

Millieu. Lowe *et al.* erhöhten den FAN um 19 % durch eine biologische Säuerung. Bei Verwendung einer 9%igen Stammwürze mit pH 5,9 wurde der FAN durch die Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 5,4 von 153 mg/L auf 182 mg/L angehoben (Lowe *et al.* 2005). Durch ein spezielles Maischprogramm wurde eine sehr hohe FAN-Konzentration von bis zu 270 mg/L in einer 12%igen Würze erreicht. Auf eine niedrige Einmaischtemperatur von 37 °C und einer Rast von 60 min inklusive Einmaischdauer folgte eine lange Aufheizphase von 60 min auf 63 °C, wobei der Temperaturbereich zwischen 45-55 °C 40 min lang gehalten wurde. Die Schaumhaltbarkeit des mit dieser Würze hergestellten Bieres war mit 220 s nach der NIBEM, einer Methode zur Schaumbestimmung, jedoch sehr viel schlechter (Cvengroschová *et al.* 2003). Der Schaum eines untergärigen Bieres ist nach dieser Methode mit über 300 s als sehr gut und mit weniger als 220 s als schlecht definiert (Miedaner 2002).

Die Löslichkeit des Zinks hängt vom pH-Wert ab. Bei neutralem pH zwischen 6 und 7,5 ist Zink kaum löslich, zwischen pH 7,5 und 11 unlöslich und im sauren Bereich ab pH 6 stark löslich (Schwedt 1996). In der Würze sind Aminosäuren und bestimmte Gruppen von Polyphenolen starke Metall-Chelatoren (Lie *et al.* 1975). Ihre Bindungskapazität ist jedoch aufgrund der Konkurrenz zwischen Wasserstoffionen und Metallionen stark pH-abhängig; durch niedrige pH-Werte wird die Verfügbarkeit der Zinkionen erhöht. Zink bindet in der Würze hauptsächlich an Protein-Phenol-Komplexe, die in Form von Heißtrub ausgeschieden werden (Donhauser 1981, Daveloose 1987). Untersuchungen von Kreder zufolge assimiliert die Hefe sowohl Würzezink als auch Trubgebundenes Zink, wodurch die Fermentation stimuliert wird. Ein mit Kühltrub gefüllter Dialysebeutel wurde in eine Würze mit Zinkmangel von 0,02 mg/L gegeben, wodurch sich der Zinkgehalt nach 7 Tagen auf 0,18 mg/L erhöhte. Bei der Zugabe des Dialysebeutels während einer Fermentation verwertete die Hefe 84 % des Trubzinks. Klare Würzen erwiesen sich als nachteilig. Ein Aufschluss der Hefe ergab, dass sich über 90 % des Zinks in der Hefe befanden und nicht im Trub oder Überstand (Kreder 1999). Nach einer vierstündigen Kontaktzeit von Trub mit Würze gingen bei Kühbeck *et al.* 0,14 mg/L Zink in die Würze über (Kühbeck *et al.* 2006).

Daveloose gibt an, dass der Zinkgehalt während des Maischens ausgehend von 1,35 mg/L um 65 % sinkt. Durch die Nachgüsse und das Läutern fiel der Zinkgehalt um weitere 71 % auf einen durchschnittlichen Wert von 0,11 mg/L Zink. Nach Kochende lag ein Gehalt von ca. 0,07 mg/L vor (Daveloose 1987). Donhauser und Wagner zeigten, dass die Einmaischtemperatur Einfluss auf den Zinkgehalt hat. Niedrige Temperaturen begünstigen den Zinkgehalt. So führte eine Temperaturerhöhung von 45 °C auf 65 °C bei einem 5-Tage-Malz bei einer Rastdauer von 30 min zu einer Reduktion von 0,20 mg/L auf 0,02 mg/L Zink und wurde mit einer Bindung an Liganden begründet. Sie zeigten weiterhin, dass die Verwendung zinkreichen Wassers den Eintrag in die Würze erhöht, jedoch geht nur ein Bruchteil des Wasserzinks in die Würze über (Donhauser & Wagner 1986).

2.2.2 Nebenprodukte des Brauprozesses

Während des Mälzungs- und Brauprozesses fallen diverse Nebenprodukte an. Nach Deutschem Reinheitsgebot sind diese als Additive für die Nährstoffhöhung möglich. Methner nennt als denkbare Zusätze Treberpresssaft, Hefeextrakt der betriebseigenen Kultur oder Malzwurzelkeime (Methner 1999). Vorstellbar ist außerdem der Einsatz von Weichwasser der Malzherstellung, Glattwasser und Trub. Glattwasser kann beim Einmaischen verwendet werden, wodurch sich eine Verzögerung der Verzuckerung und dunklere Würzen ergeben. Nachteile im Geschmack zeigen sich als breite und metallische Bittere. Der FAN konnte durch einen 33%igen Anteil an Glattwasser beim Maischen nicht erhöht werden (Narziß 1982). Rusz und Meyer-Pittroff geben für den Rohproteingehalt im Trub 17,4 % bei der Herstellung eines Pilseners an (Rusz & Meyer-Pittroff 2003). Der bei der vorhergehenden Würzeherstellung abgetrennte Trub könnte beispielsweise beim Einmaischen hinzugegeben werden. Es ist vorstellbar, dass über den enzymatischen Abbau der Peptide eine Erhöhung des FAN in der nachfolgenden Würze erfolgt. Die Anhebung des Zinkgehaltes einer Würze ist durch Trub möglich, an den Zink nur locker gebunden ist (Kreder 1999, Kühbeck et al. 2006). In getrocknetem Treber befinden sich 65,2 % Aminosäuren des Rohproteins, Pantothensäure wird mit 8,5 mg/L angegeben (Priest & Stewart 2006).

Hefe. Die Hefe kann durch Überschusshefe in Form von Hefeextrakt bereitgestellt werden. Narziß gab 57,3 g Abfallhefe pro kg Malz zur Maische und erhöhte den FAN in der Würze um 18 % von 199 mg/L auf 234 mg/L. Die Gärung war folglich schneller. Geschmackliche Nachteile waren dadurch beim Bier nicht festzustellen, die Schaumhaltbarkeit wurde sogar erhöht (Narziß 1979). In Vorversuchen von Kieninger wurde 55,5 g Presshefe pro kg Malz im Kongressmaischverfahren zugesetzt und resultierte ebenfalls in einer 18%igen FAN-Erhöhung von 255 mg/L auf 302 mg/L (Kieninger 1978).

McLaren *et al.* schlagen die Zugabe einer „Zinkhefe“ vor, eine mit Zink angereicherte Hefe. Ausgehend von 0,2 mg/L Zink in der Würze wurde durch die Zugabe der „Zinkhefe“ eine Endkonzentration von 0,46 mg/L Zink erreicht und die Gärzeit um 41 % verkürzt. Der Alkoholgehalt stieg auf 5,26 Vol % im Vergleich zum Referenzsud mit 4,74 Vol %. Die produzierten Biere schnitten durch die Gabe der Zinkhefe in der Verkostung besser ab (McLaren *et al.* 1999).

Malzwurzelkeime. Nach Kunze setzt sich der Malzwurzelkeim (MWK) eines Pilsener Malzes durchschnittlich aus 8,8 % Wasser, 30,0 % Eiweiß, 2,0 % Fett, 6,0 % Asche, 8,6 % Rohfaser sowie 44,6 % stickstofffreien Extraktstoffen zusammen (Kunze 2007). Methner gibt in Tabelle 2.3 Analysenwerte für Vitamine, Zink und Aminosäuren an.

Die alleinige Zugabe von gemahlenen Malzwurzelkeimen resultierte bei Methners Versuchen, im Gegensatz zu Treberpresssaft und Hefeextrakt, in einer merklichen Erhöhung der Zellzahlausbeute. Er erreichte bei einer Zugabe von 0,5 g Malzwurzelkeimen pro Liter Würze eine Steigerung der Hefeausbeute von 54 % und bei einer Konzentration von 1 g Malzwurzelkeimen pro Liter Medium eine Erhöhung um 73 % bei Propagationsversuchen. Die erreichbare Zelldichte stieg, ausgehend von 130 Mio. Zellen/mL, bei sonst gleichen Prozessbedingungen auf 200 Mio./mL bzw. 225 Mio./mL an. Methner vermutet die Ursache in einer besseren Versorgung der Hefe mit Wuchsstoffen, Zink, Spurenelementen und ungesättigten Fettsäuren. Bei Zugabe von 1 g MWK/L Würze würde der Zinkgehalt um 0,15 mg/L, der Gehalt an Aminosäuren um 338 mg/L und die Konzentration der Pantothersäure um 96 µg/L steigen (Methner 1999).

Tabelle 2.3: Durchschnittliche Zusammensetzung von Malzwurzelkeimen (MWK) nach (Methner 1999)

Inhaltsstoff	Konzentration mg/100 g MWK
Zink	15
Thiamin	0,33
Riboflavin	0,86
Pyridoxin	3,7
Niacinamid	9,6
Pantothensäure	9,6
Aminosäuren gesamt	33800

2.3 Assimilation von Nährstoffen und deren Regulation

Die Energiequelle der Hefe besteht aus assimilierbaren organischen Kohlenstoffquellen, die über Permeasen aufgenommen werden. Die Energiequellen werden in der Zelle zu Glucose umgewandelt und in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, welches während der Atmung in den Citratzyklus eingeschleust wird. Bei anaeroben Bedingungen wird das Pyruvat zu Kohlendioxid und Ethanol umgewandelt und wird als Gärung bezeichnet. Der aerobe Energiegewinn durch oxidative Phosphorylierung liegt bei maximal 38 ATP und der anaerobe bei 2 ATP pro Molekül Glucose.

Der oxidative Abbau ist hinsichtlich ATP-Gewinn gegenüber der Gärung effizienter. Aus diesem Grund wird die Hefe bei Anreicherung der Würze mit Sauerstoff einen Teil der Glucose veratmen. Die Gärungsaktivität ist in Anwesenheit von Sauerstoff eingeschränkt (*Pasteur-Effekt*). Bei gleicher Leistung benötigt die Hefe demnach bei der Gärung mehr assimilierbare Zucker als bei Atmung.

Der höchste Energiegewinn der Hefe liegt bei reinem Atmungsstoffwechsel vor. Dieser kann jedoch nur stattfinden, wenn die Zuckerkonzentration unterhalb 0,1 g/L ist (Annemüller et al. 2008). Der *Crabtree-Effekt* beschreibt, dass bei höherer Zuckerkonzentration selbst bei ausreichender Sauerstoffkonzentration die reine Atmung gehemmt ist und eine „aerobe Gärung“ einsetzt; Atmung und Gärung laufen parallel.

Ethanol wird von Beginn an gebildet und vermindert die Biomasseproduktion. Bis heute ist der Mechanismus des *Crabtree*-Effektes noch nicht eindeutig geklärt (Vemuri et al. 2007). Im ersten Fall wird von einer limitierten Kapazität der Atmungskette ausgegangen (Sonnleitner & Käppeli 1986). Im zweiten Fall liegt eine Katabolitrepression vor, wodurch eine hohe Glucosekonzentration Gene reprimiert, die für den Atmungsstoffwechsel benötigt werden (Aon & Cortassa 1998, Gancedo 1998). Die Cytochromoxidase wird u. a. in der Atmungskette gehemmt und inhibiert die Oxidation des Wasserstoffs zu Wasser (Annemüller et al. 2008). Die dritte Hypothese geht von einer Überproduktion des Pyruvats aus und unterschiedlichen Kinetiken für Pyruvat-Enzyme der Atmung und Gärung (van Hoek et al. 1998). Ausgehend vom Pyruvat katalysiert die Pyruvatdecarboxylase die Bildung von Acetaldehyd (Gärung) und die Pyruvatdehydrogenase die Bildung von Acetyl-CoA (Atmung). Das Substrat Pyruvat hemmt allosterisch die Pyruvatdecarboxylase, die eine wesentlich höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit als die Pyruvatdehydrogenase hat. Bis zu einer bestimmten intrazellulären Pyruvatkonzentration läuft vorzugsweise der oxidative Weg, danach setzt die Gärung mit ein.

Die Produktion von Bäckerhefe unterliegt bei der Medienzusammensetzung keinen Regularien; die reine Atmung ist durch die Fed-Batch-Prozessführung realisierbar. Alle notwendigen Nährstoffe, außer den Kohlenhydraten, werden im Fermenter vorgelegt und die Energiequelle wird in entsprechender Konzentration zudosiert. Mit Bierwürze ist diese Prozessführung nicht möglich.

In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Aufnahme von Nährstoffen über in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptoren reguliert. Membransensoren rezipieren Signale über die Konzentration von Nährstoffen im extrazellulären Raum. Die Information beschreibt die Verfügbarkeit zum Beispiel von Aminosäuren, Ammonium oder Glucose (Forsberg & Ljungdahl 2001).

2.3.1 Stickstoff

Für die Proteinbiosynthese, vor allem für die Synthese von Enzymen und Vitaminen, muss die Hefe Stickstoff assimilieren. Von der Hefe verwertbare Stickstoffverbindungen sind anorganische Ionen (NH_4^+ /

$\text{NH}_3/\text{NO}_3^-$), organische Proteinhydrolysate, Einzelamino-säuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, etc.), Amide (Asparagin, Glutamin) und organische Verbindungen wie Harnstoff, Purine, Pyrimidine, niedere Peptide (Annemüller et al. 2008). Assimilierbare Stickstoffquellen der Würze werden als FAN zusammengefasst. Auch nach einer gut verlaufenden Propagation oder Fermentation befinden sich noch detektierbare Mengen an FAN im Medium, bei denen es sich normalerweise um nicht verwertbare Bestandteile handelt (Annemüller et al. 2008, Lekkas et al. 2007). Zur Erfassung des FAN wird die Ninhydrin-Methode angewendet, welche Aminosäuren, Ammoniak und endständige α -Amino-Gruppen der Peptide und Proteine erfasst, Prolin wird teilweise mitbetimmt (Miedaner 2002).

Für den Zellaufbau können die meisten Aminosäuren nicht direkt genutzt werden. Stickstoffquellen müssen erst abgebaut und in Glutamat und Glutamin umgewandelt werden. Die beiden Aminosäuren Glutamat und Glutamin bilden den zentralen Stickstoff-Metabolismus (*central nitrogen metabolism*, CNM), aus denen alle stickstoffhaltigen Komponenten der Zelle hergestellt werden können. Zwei Schlüsselenzyme greifen hier, zum einen die Glutamin-Synthetase (GS) und zum anderen die Glutamat-Synthase (GOGAT). Aus Ammonium und α -Ketoglutarat metabolisiert die NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (NADPH-GDH) Glutamat. Die Glutamin-Synthetase (GS) wandelt Glutamat und Ammonium unter Verbrauch von einem ATP in Glutamin. In Anwesenheit von Glutamin ist die Synthese von Glutamat über die NADH-abhängige Glutamat-Synthase (GOGAT), über die Glutaminase (GDA) und über die NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (NADPH-GDH) möglich. Der oxidative Abbau von Glutamat zu α -Ketoglutarat und Ammonium wird durch die NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (NAD-GDH) katalysiert (ter Schure et al. 2000, Magasanik 2003).

Die Assimilation der Stickstoffverbindungen erfolgt über generelle und spezifische Transportproteine, auch Permeasen genannt, die über Substratspezifität und Transportkapazitäten definiert werden. Für die Aufnahme von Ammonium sind die drei Permeasen Mep1p, Mep2p und Mep3p bekannt, die bei geringen Ammoniumkonzentrationen exprimiert werden (Marini et al. 1997). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt

einen Regulationsmechanismus für die Aufnahme von Stickstoffquellen, die Stickstoff-Katabolitrepression (*nitrogen catabolite repression*, NCR) (ter Schure et al. 2000). Nicht alle Stickstoffquellen unterstützen das Wachstum gleich gut. In Abhängigkeit davon, wie schnell die Zelle auf ihnen wachsen kann, unterscheidet der Mechanismus zwischen gut und schlecht verwertbaren Stickstoffquellen.

Liegen gut verwertbare Stickstoffquellen wie Glutamin, Asparagin, Ammonium vor, werden bestimmte Gene, die bei der Verarbeitung schlecht verwertbarer Stickstoffverbindungen wie Prolin und Harnstoff beteiligt sind, reprimiert sowie die zugehörigen Permeasen inaktiviert und abgebaut. Dadurch wird die Aufnahme der schlecht verwertbaren Stickstoffquellen verhindert. Wächst die Hefe auf ausschließlich schlechten Stickstoffquellen, können sie wieder exprimiert werden. Werden gut verwertbare Stickstoffquellen einem Medium mit schlecht verwertbaren Stickstoffquellen zugegeben, so werden die generelle Aminosäurepermease Gap1, die hochaffine Prolinpermease Put4 sowie die niedrigaffine Permease Agp1 für breites Substratangebot auf transkriptioneller und posttranslatiionaler Ebene herunterreguliert (Forsberg & Ljungdahl 2001).

Zum Beispiel wird Prolin in die Zellen über die Permease Gap1 (Jauniaux & Grenson 1990) und Put4 (Jauniaux et al. 1987) transportiert. Intrazelluläres Prolin aktiviert den Transkriptionsfaktor Put3p und wird aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien weitergeleitet. Dort wird es über drei Schritte zu Glutamat abgebaut, wovon zwei Schritte enzymatisch sind und einer nicht-enzymatisch. Put3p induziert die Expression der Gene Put1 und Put2, die die beiden Prolin abbauenden Enzyme kodieren. Soll Wachstum auf Prolin erfolgen, muss Put3p aktiv sein. Die Synthese von Prolin auf umgekehrtem Weg erfolgt über Enzyme, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Die Inaktivierung benötigter Permeasen läuft über eine Dephosphorylierung (ter Schure et al. 2000, Forsberg & Ljungdahl 2001).

Es wird davon ausgegangen, dass in Abhängigkeit der vorliegenden Stickstoffquellen eine Art Sortierung der Permeasen stattfindet. Die Aktivität der Enzyme wird über die Art und Konzentration der Stickstoffquelle geregelt. Für das Angebot an extrazellulärem Stickstoff existieren zwei Sensoren, der Aminosäuren-Sensorkomplex SPS und der Ammonium-Sensor Mep2p. SPS besteht aus mindestens Ssy1p, Ptr3p

und Ssy5p (Klasson *et al.* 1999, Forsberg & Ljungdahl 2001, Liu *et al.* 2008). Die Assimilation von Aminosäuren läuft entsprechend der Expression und Repression der Permeasen sequentiell. Verschiedene Autoren ordnen diese Reihenfolge für Bierhefen unterschiedlich ein (Tabelle 2.4). Die Gruppierung ist stammabhängig. Nach Annemüller *et al.* wird Prolin von der Hefe nicht verwertet (Annemüller *et al.* 2008), während von Jones und Pierce eindeutig ein Abbau von Prolin beschrieben wird (Jones & Pierce 1969). Bei Rautio *et al.* ist die Expression des Gens Put1 gegen Ende einer Very-High-Gravity-Fermentation erhöht, wahrscheinlich als Antwort auf Stickstoffmangel (Rautio *et al.* 2007).

Aminosäuren befinden sich im Mitochondrium, in der Vakuole und im Zytosol. Im Zytosol sind es hauptsächlich Aminosäuren wie Asparat und Glutamat, in der Vakuole vor allem basische Aminosäuren. Aminosäuren werden aus dem vakuolären Pool innerhalb von Minuten mobilisiert, wenn Zellen aus einem aminosäurehaltigen Medium entfernt werden (Forsberg & Ljungdahl 2001). Weiterhin werden hydrolytische Enzyme in der Vakuole gespeichert. In der Hefe gibt es über 40 Proteasen. Brauereitechnologisch relevant ist die Proteinase A, welche unter Stress in das Bier ausgeschieden wird und für die Verminderung der Schaumstabilität verantwortlich ist (Annemüller *et al.* 2008). Im Gärungsstoffwechsel entstehen über den Ehrlich-Mechanismus aus Würze-Aminosäuren höhere Alkohole durch Desaminierung. Die gebildeten α -Ketosäuren werden zu Aldehyden decarboxyliert, welche im nächsten Schritt zu höheren Alkoholen reduziert werden. Aus diesen Gärungsnebenprodukten können wiederum Diketone, Ester und organische Säuren entstehen.

Lekkas *et al.* vergärten 15%ige Würze mit Zusätzen von L-Lysin und L-Methionin. Die Kontrollfermentation erreichte eine maximale Zelldichte von 90 Mio./mL und dauerte 96 h. Die Zugabe von Methionin reduzierte das Hefewachstum auf 70 Mio./mL und verlängerte die Fermentationsdauer auf 103 h. Lysin hingegen stimulierte das Wachstum, die Fermentation ist mit nur 48 h deutlich schneller und die Zelldichte stieg auf 130 Mio./mL (Lekkas *et al.* 2005). In späteren Versuchen zeigten sie, dass die Proteinaseaktivität der Hefe dann am höchsten ist, wenn neuer Bedarf an Stickstoff herrscht. Sie vermuten, dass extrazelluläre, proteolytische Enzyme große, in der Würze enthaltene Peptide in kleinere spalten (Lekkas *et al.* 2007).

Cruz *et al.* gaben dem Fermentationsmedium die Stickstoffquellen Ammoniumsulfat, freie Aminosäuren und Pepton zu. Unabhängig von der Stickstoffquelle wurde ein Diauxie-Shift beobachtet, wenn geringe Zuckerkonzentrationen vorlagen. Bei hoher Zuckerkonzentration war dies nicht der Fall und Wachstum sowie Ethanolbildung hingen von der Stickstoffquelle ab. Ammoniumsalze induzierten immer schlechte Fermentationsleistungen. Pepton konnte generell die Leistung der Hefe bezüglich Ethanol und Biomasse verbessern und die Viabilität blieb erhalten. Freie Aminosäuren zeigten ebenfalls ein gutes Verhalten hinsichtlich Biomasse und Ethanol (Cruz *et al.* 2002).

Tabelle 2.4: Reihenfolge der Assimilierung von Aminosäuren; nach Autoren stammabhängig in die Gruppen A-D eingeordnet. Aminosäuren aus Gruppe A am besten verwertbar, aus D am schlechtesten.

	(Jones & Pierce 1969)	(Palmqvist & Åyräpää 1969)	(Ramos-Jeunehomme et al. 1979)	(Perpète et al. 2005)
A			Arginin	
	Asparagin	Asparagin	Asparagin	Asparagin
	Asparaginsäure		Asparaginsäure	
	Gutamin	Gutamin	Gutamin	Gutamin
	Gutaminsäure		Gutaminsäure	
	Lysin		Lysin	Lysin
				Methionin
	Serin	Serin	Serin	Serin
	Threonin	Threonin	Threonin	Threonin
B		Arginin		Arginin
		Asparaginsäure		
		Gutaminsäure		
	Histidin		Histidin	
	Isoleucin	Isoleucin	Isoleucin	Isoleucin
	Leucin	Leucin	Leucin	Leucin
		Lysin		
	Methionin	Methionin	Methionin	
				Phenylalanin
				Tryptophan
				Tyrosin
	Valin		Valin	Valin
	Alanin	Alanin	Alanin	Alanin
	Glycin	Glycin	Glycin	Glycin
		Histidin		
C	Phenylalanin	Phenylalanin	Phenylalanin	
		Prolin		
	Tryptophan	Tryptophan	Tryptophan	
	Tyrosin	Tyrosin	Tyrosin	
		Valin		
D	Prolin		Prolin	Prolin

2.3.2 Zink

Zink ist als Zn^{2+} im Metabolismus der Hefe an mehreren Stellen von Bedeutung. Die Analyse des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt, dass nahezu 3 % aller Hefeproteine potentielle Zink-Bindungsdomänen haben, also über 150 von 6000 Genen (Eide 1998). In Zinkenzymen ist Zink an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt und bildet O-, N- oder S-Liganden über die Aminosäuren Histidin, Glutamin, Asparagin und Cystein. Zink ist als katalytische Komponente üblicherweise mit drei Aminosäuren und einem Wassermolekül koordiniert. Als strukturelle Komponente ist Zink tetraedrisch mit vier Aminosäuren verbunden, entweder Cystein oder Histidin (Parkin 2000, Auld 2009).

Diese Metalloenzyme sind am Abbau sowie am Aufbau von Biomolekülen beteiligt. Ein bekanntes Zink-Enzym ist die alkalische Phosphatase, die Phosphat-Diester spaltet. Die Carboanhydrase katalysiert die reversible Reaktion von Kohlendioxid mit Wasser zu Hydrogencarbonat. Die Phospholipase spaltet Phospholipide in Fettsäuren und weitere lipophile Stoffe. Die Carboxypeptidase beschleunigt die hydrolytische Spaltungen von Peptidbindungen vom C-terminalen Ende ausgehend. Die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) katalysiert die reversible Reaktion von Alkoholen zum entsprechenden Aldehyd. Die Ethanolbildung bei der Gärung von *Saccharomyces cerevisiae* findet ausgehend vom Acetaldehyd in Anwesenheit von NADH/H^+ über die ADH statt, sowie der rückläufige NAD-abhängige Abbau des Ethanols zu Acetaldehyd. In *Saccharomyces cerevisiae* hat ADH vier Untereinheiten. Je Untereinheit liegen ein katalytisches und ein strukturelles Zink-Zentrum vor. Bei der ADH ist Zn^{2+} als katalytische Komponente über eine koordinative Bindung mit zwei Cysteinen und einem Histidin sowie Wasser verknüpft und als strukturelle Komponente mit vier Schwefelatomen des Cysteins verbunden (Auld 2009).

Zink bildet das Zentrum von Zinkfinger-Motiven, deren Zinkfinger-Domäne DNA-bindend oder RNA-bindend ist. In der Domäne sind entweder zwei Cysteinyl- und zwei Histidylreste oder vier Cysteinylreste mit Zink koordinativ gebunden. Die Polypeptidkette bildet eine schleifenförmige Struktur und heisst Zinkfinger. Als Transkriptionsfaktoren beeinflussen sie bei der Genexpression entscheidend das Wachs-

tum der Hefe. Zink ist am Aufbau der RNA-Polymerase beteiligt, welche die RNA-Synthese katalysiert. Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Msn2p/Msn4p werden für die stressinduzierte Aktivierung der *stress responsive elements* (STREs) benötigt (Martínez-Pastor et al. 1996). Mig1p ist beispielsweise ein Zinkfingermotiv, dessen Aktivität durch Glucose reguliert wird und das an Promotoren von einer Vielzahl glucosereprimierter Gene bindet (Gancedo 1998).

Die Aufnahme von Zink ist auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene geregelt und findet in Abhängigkeit der intrazellulären Zinkkonzentration statt (Eide 1998). Abbildung 2.1 veranschaulicht die Transportwege von Zink in *Saccharomyces cerevisiae*.

In *Saccharomyces cerevisiae* ist die Synthese von Phospholipiden, die als Hauptbestandteil der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran fungieren, durch Zink geregelt. Bei Zinkmangel ändert sich das Verhältnis der Phospholipide und führt zu einer 66%igen Reduzierung von Phosphatidylethanolamin und einer 29%igen Zunahme von Phosphatidylinositol; die Membranstabilität wird negativ beeinflusst (Iwanyshyn et al. 2004, O'Dell 2000, Carman & Han 2007). Zink interagiert mit den polaren Gruppen der Phospholipide, speziell mit den negativ geladenen Phosphatgruppen und bildet stabile Komplexe mit den Kopfgruppen (Binder et al. 2001). Zink stabilisiert die Membran, indem es an die Thiolgruppe von Komponenten der Plasmamembran bindet. Die Ausbildung einer Disulfid-Bindung mit Zink schützt die Plasmamembran vor oxidativen Schäden. An die potentiellen Bindungsstellen lagern sich bei Zinkmangel redoxaktive Metalle wie Eisen und Kupfer an, die die Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen katalysieren können und Lipid-Oxidation fördern (Zagoa & Oteiza 2001).

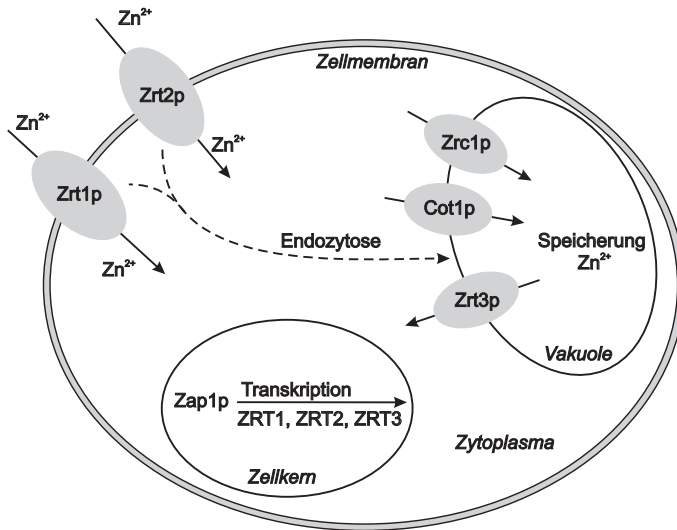


Abbildung 2.1: Aufnahme und Transport von Zink in Abhängigkeit der intrazellulären Zinkkonzentration. Der Transport von Zink in die Zelle von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt über zwei Plasmamembranproteine, dem hochaffinen Zinktransporter Zrt1p und dem niedrigaffinen Zinktransporter Zrt2p. Zink wird nach Passieren der Membran an Metalloproteine gebunden oder in Organellen wie beispielsweise Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum transportiert. In Zink-gesättigten Zellen wird es von Zrc1p und Cot1p zur Speicherung in die Vakuole transportiert. In der Vakuolenmembran ist ein weiterer Zinktransporter Zrt3p lokalisiert. Die Regulation der drei Zinktransporter Zrt1p, Zrt2p und Zrt3p erfolgt durch den Transkriptionsfaktor Zap1p, der bei Zink-gesättigten Zellen reprimiert ist. Liegen geringe intrazelluläre Zinkkonzentrationen vor, werden die Transporter induziert. Der vakuoläre Zinktransporter Zrt3p kontrolliert die zytoplasmatische Zinkkonzentration durch ein Ausströmen von Zink aus der Vakuole. Zrt1p wird ebenfalls induziert, um den extrazellulären Einfluss zu stimulieren. Liegt eine sehr hohe extrazelluläre Zinkkonzentration vor, werden die Membranproteine Zrt1p und Zrt2p auf posttranslatiоnaler Ebene nach Endozytose in den Vakuolen abgebaut und damit die Zelle vor Toxizität geschützt (Eide 1998, MacDiarmid et al. 2000, Ho et al. 2002, Eide 2009).

Zink beeinflusst positiv den Hefestoffwechsel bei Gärung und Propagation; bei hohen Zinkwerten im Medium wird zum Beispiel das Nebenprodukt Diacetyl durch Zink-enhaltende Enzyme der Hefe schneller abgebaut (McLaren *et al.* 1999). Nach Donhauser gilt als Untergrenze für eine störungsfrei Gärung 0,12 mg/L Zink. Wird dieser Wert nicht erreicht, verarmt die Hefe an Zink und zeigt bei weiteren Führungen, d. h. Gärvorgängen, immer schlechtere Leistungen (Donhauser 1981, Wagner *et al.* 1983). McLaren *et al.* gehen davon aus, dass Zink aufgrund der Würze-Komplexität nicht immer ganz verfügbar ist und sich damit keine Toxizität durch zu hohe Zinkkonzentrationen auf die Hefe ergibt. Sie geben weiterhin an, dass ein Unterschied darin besteht, ob Zinkchlorid oder Zinksulfat als Zinkquelle eingesetzt wird. Diesbezüglich werden jedoch keine Quellen angegeben oder eigene Versuche angeführt (McLaren *et al.* 1999).

2.3.3 Pantothensäure

Pantothensäure bzw. das Salz Pantothenat wird auch als Vitamin B₅ bezeichnet. Es setzt sich aus β -Alanin und Pantoinsäure zusammen und ist Bestandteil des Coenzym A (Abbildung 2.2). Der erste Schritt der Synthese von Coenzym A ist die Phosphorylierung von Pantothenat. Nach Kopplung mit Cystein und CTP entsteht über zwei weitere Schritte Coenzym A (Abbildung 2.2). In dieser Form wirkt es am gesamten Intermediärstoffwechsel mit, indem es Acylgruppen überträgt. Coenzym A (CoA) aktiviert Alkansäuren und deren Derivate, indem eine energiereiche Thioesterbindung ausgebildet wird. Das Acetyl-CoA, die aktivierte Essigsäure, ist an zahlreichen Stellen des Metabolismus beteiligt. Ein wichtiger Schritt ist beispielsweise die Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA im Citratzyklus (Webb *et al.* 2004). Ein Mangel an Pantothenat führt bei *Saccharomyces cerevisiae* zu einem Rückgang der Atmungsaktivität, wohingegen die Gärung wenig betroffen ist (Annemüller *et al.* 2008). β -Alanin macht einen Teil des Moleküls aus und kann so ein Defizit an Pantothensäure ausgleichen und das Hefewachstum auf pantothensäurefreiem Medium unterstützen (Stolz & Sauer 1999).

Saccharomyces cerevisiae ist nicht in der Lage, Pantothersäure *de novo* zu synthetisieren. Die Aufnahme erfolgt über in der Plasmamembran lokalisierte Vitamintransporter. Fen2p ist ein hochaffiner H⁺-Pantothenat-Symporter, der Pantothersäure mit hoher Geschwindigkeit in die Zelle einschleusen kann. Fen2p gehört zur Familie der Allantoat-Permeasen. Das Gen Fen2 wird bei hoher extrazellulärer Konzentration exprimiert. Die Aufnahme der Vorstufe β -Alanin hingegen ist unabhängig von Fen2p und erfolgt vorzugsweise über die generelle Aminosäurenpermease Gap1 (Stolz & Sauer 1999).

Im anaeroben Satzbetrieb mit 50 g/L Glucose als Energiequelle zeigten Taherzadeh *et al.*, dass *Saccharomyces cerevisiae* bei einer Reduzierung der Pantothersäure von 60 auf 30 $\mu\text{g/L}$ die Glucoseaufnahme um 50 % reduziert; die Biomasse war um 10 % geringer und die Zellgröße verringerte sich. Wurde der Pantothersäuremangel weiter verstärkt (16 $\mu\text{g/L}$), verzehrte die Hefe nicht mehr die gesamte verfügbare Glucose. Ein Defizit des Vitamins erhöhte die Bildung von Acetat und Pyruvat. Wurde die Chemikalie Acetat (1,6 g/L) bei gleichzeitigem Pantothersäuremangel (30 $\mu\text{g/L}$) zu Beginn der Fermentation dem Medium hinzugegeben, stiegen Ethanol- und Biomassebildung und die Nettobildung von Acetat blieb aus (Taherzadeh *et al.* 1996). Ein Pantothersäuremangel erhöhte die Produktion höherer Alkohole wie Iso-Butanol, Isoamylalkohol, Propanol (Gutierrez 1993). Wang *et al.* untersuchten unter Verwendung von zwei *Saccharomyces*-Weinhefen den Einfluss auf flüchtige Komponenten während der Gärung und gleichzeitig defizitärer Pantothersäure. Die Schwefelwasserstoffbildung nahm in Medien mit einer Erhöhung des FAN-Gehaltes zu, wenn eine niedrige Pantothersäurekonzentration vorlag. Beide Stämme erzielten bei hoher FAN-Konzentration von 250 mg/L und niedriger Pantothersäurekonzentration von 10 $\mu\text{g/L}$ das schlechteste Wachstum gemessen als koloniebildende Einheiten (Wang *et al.* 2003).

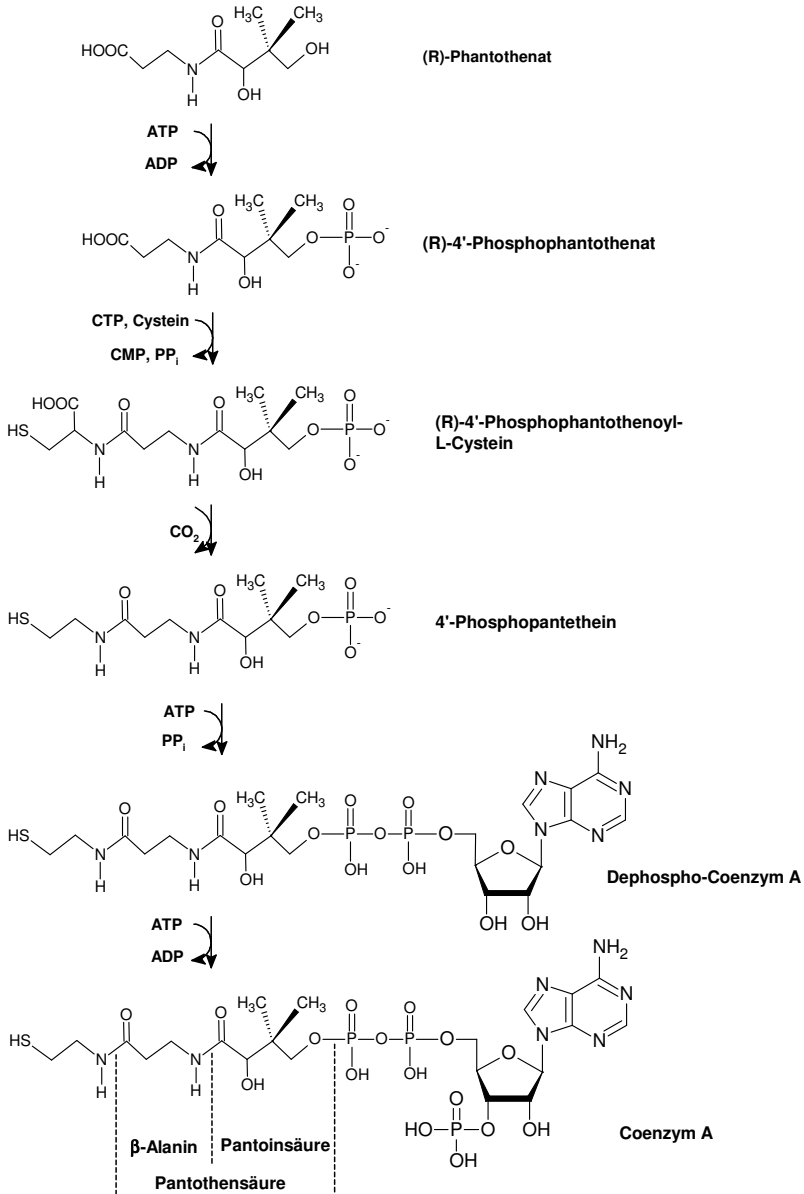


Abbildung 2.2: Syntheseweg von Coenzym A nach (Michal 1999). Die Bestandteile Pantoinsäure und β-Alanin bilden zusammen die Pantothensäure innerhalb des Coenzym A.

2.4 Regulation des Stoffwechsels bei Stress

Stressinduzierte Gene haben in ihrem Promotorbereich sogenannte *stress responsive elements* (STREs). Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine und wechselwirken mit der Promotorsequenz. Msn2p/Msn4p sind Transkriptionsfaktoren, die an STREs binden. Msn2p/Msn4p scheinen eine generelle Stressantwort zu bieten, denn die Zielgene werden bei Hitzestress, osmotischem Schock als auch oxidativem Stress und Nährstoffmangel induziert (Martínez-Pastor et al. 1996). Auch die Beteiligung bei hydrostatischem Druck ist bekannt (Domitrovic et al. 2006). Bei Stress werden Msn2p/Msn4p phosphoryliert und zum Nucleus transportiert. Der Ras-cAMP-Weg wird bei diesen Vorgängen induziert und der schnelle Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase A (Rep et al. 2000). Je nach Stressart werden unterschiedliche Gene exprimiert.

2.4.1 Hitzeschock

Ein Hitzeschock induziert die Expression von sogenannten Hitze-Schock-Proteinen (*heat shock protein*, HSP), die oft als Chaperone fungieren. Chaperone sind Hilfsproteine, sie reduzieren zelluläre Fehlfaltungen von neu synthetisierten Proteinen und erhalten die Molekülstrukturen bei Hitzeeinwirkung aufrecht. Diese Funktion schützt die Zelle vor Schäden (Trotter et al. 2001, Ferguson et al. 2005). Eine Klasse der Chaperone ist die Hsp70-Familie, die ATP-abhängig an der Faltung von Polypeptidketten beteiligt ist. Sie bestehen aus einer ATPase-Domäne und einer Substratbindungsdomäne. Das Trennen und Binden der Substrate erfolgt unter ATP-Hydrolyse und ADP/ATP-Austausch. Die Chaperone Hsp100 sind in der Lage, Aggregate aufzuheben und fehlgefaltete Proteine zu entfalten. Sie sind an der Rückfaltung von denaturierten Proteinen beteiligt (Ben-Zvi & Goloubinoff 2001).

In Eukaryonten sind *heat shock elements* (HSE) vorhanden, eine DNA-Sequenz, an denen ein Transkriptionsfaktor, der *heat shock factor* (HSF), bindet. Nach Hitzeschock wird der HSF über eine Kinase phosphoryliert und induziert nach Bindung an die entsprechende DNA-

Sequenz die Transkription der zugehörigen Hitze-Schock-Gene. In *Saccharomyces cerevisiae* werden 52 Proteine induziert, wenn die Temperatur von 25 °C auf 38 °C erhöht wird. Die Hälfte dieser Proteine wird durch den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor Hsf1p aktiviert und die andere Hälfte durch die Transkriptionsfaktoren Msn2p und/oder Msn4p. Drei dieser 52 Proteine werden unabhängig von den beiden genannten Transkriptionsfaktoren induziert (Boy-Marcotte et al. 1999).

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Temperaturerhöhung die Proliferation in der G₁-Phase des Zellzyklus anhält (Trotter et al. 2001, Rowley et al. 1993). Die G₁-Phase ist die postmitotische Phase oder Präsynthesephase; dort werden Proteine und RNA synthetisiert und die Zelle wächst. Dieser Stopp in der G₁-Phase ist reversibel und nach Stressreduzierung läuft der Zellzyklus bei sublethalen Temperaturen weiter.

Ein bekannter Vorgang bei Hitzestress ist die Akkumulation von Trehalose, ein Disaccharid aus Glucose (Attfield 1987). Die Rolle von Trehalose ist protektiv. Die thermische Stabilität von Proteinen und Enzymen steht in direktem Zusammenhang mit Trehalose. Die Bildung von Proteinaggregaten wird bei Hitzeeinwirkung reduziert (Hottiger et al. 1994). Dieser Zucker wird als bester Stabilisator für Makromoleküle beschrieben (Sola-Penna & Meyer-Fernandes 1998). Trehalose hilft dem Chaperon Hsp104 bei der Rückfaltung von hitzegeschädigten Proteinen (Simola et al. 2000). Der Abbau der Trehalose erfolgt mit der neutralen Trehalase Nth1p, deren Expression auch bei anderen Stressarten stattfindet (Zähringer et al. 1997).

2.4.2 Osmotischer Schock

Für das Wachstum benötigen Zellen einen konstanten Gehalt an Zellwasser und eine konstante Wasseraktivität, um intrazelluläre biochemische Reaktionen aufrecht zu erhalten. Die Wasseraktivität (A_w -Wert) ist der Quotient aus dem Wasserdampfdruck der Zelle und reinem Wasser. Sie beschreibt das in einer Zelle frei verfügbare Wasser, bei dessen Mangel Wachstumsvorgänge stagnieren. Ein stabiler Zellturgor ist für metabolische Vorgänge essentiell und wird von der Vakuole realisiert.

Während hypo- oder hyperosmotischer Veränderungen in der Umgebung braucht die Hefe deshalb effiziente Regulationsmechanismen. Ist das die Zelle umgebende Milieu hypoosmotisch, dann ist der osmotische Wert im Organismus höher als in diesem Milieu und Wasser diffundiert in die Zelle. Liegt eine hyperosmotische Umgebung vor, ist der osmotische Wert im Organismus niedriger als im Medium. Der Zellinnendruck sinkt, indem Wasser aus dem Zytosol herausströmt und so die Zelle schrumpft. Die Konzentration der intrazellulär gelösten Substanzen, wie Biomoleküle und Ionen, steigt an.

Die Produktion eines kompatiblen Soluts ist ein Adaptionsmechanismus (Osmoadaption) und wird auf der Ebene der Genexpression reguliert. Die Expression von 10 % aller Gene steigt um das Dreifache nach einem hyperosmotischen Schock an (Rep et al. 2000). Bei *Saccharomyces cerevisiae* ist das wichtigste compatible Solut Glycerin. Trehalose, eine weitere Ausgleichssubstanz, wird im Verhältnis zu den Glycerinkonzentrationen nur zu 20 % gebildet (André et al. 1991). Trehalose und Glykogen werden unter hyperosmotischen Bedingungen gebildet, akkumulieren aber nicht und sind nicht für das Wachstum notwendig. Die Gene für deren Synthese sowie für deren Abbau werden stark exprimiert; dieser Vorgänge werden als *futile cycles* bezeichnet (Silljé et al. 1999, Rep et al. 2000). Zwei Transmembranproteine, die Sensoren Sho1p und Sln1p, werden bei osmotischer Änderung aktiviert und generieren entsprechende Signale (Maeda et al. 1994, Maeda et al. 1995). Diese zwei Sensoren stehen am Anfang des *High Osmolarity Glycerol*-(HOG)-Weges und starten die Produktion von Glycerin. Der HOG-Weg gehört zur Gruppe der MAP-(Mitogen Activated Protein)-Kinase-Kaskaden und ist ein dreistufiger Signaltransduktionsweg, bei dem das Protein Hog1p eine MAP-Kinase darstellt. Glycerin akkumuliert im Zytoplasma, indem der plasmamembrane Glycerinkanal Fps1 geschlossen wird und so die Wasseraktivität anpasst (Luyten et al. 1995). Durch die Anreicherung stabilisiert sich der Zellturgor und Wasser fließt wieder in die Zelle. Auf diese Art werden Biomoleküle vor Denaturierung geschützt (Reed et al. 1987).

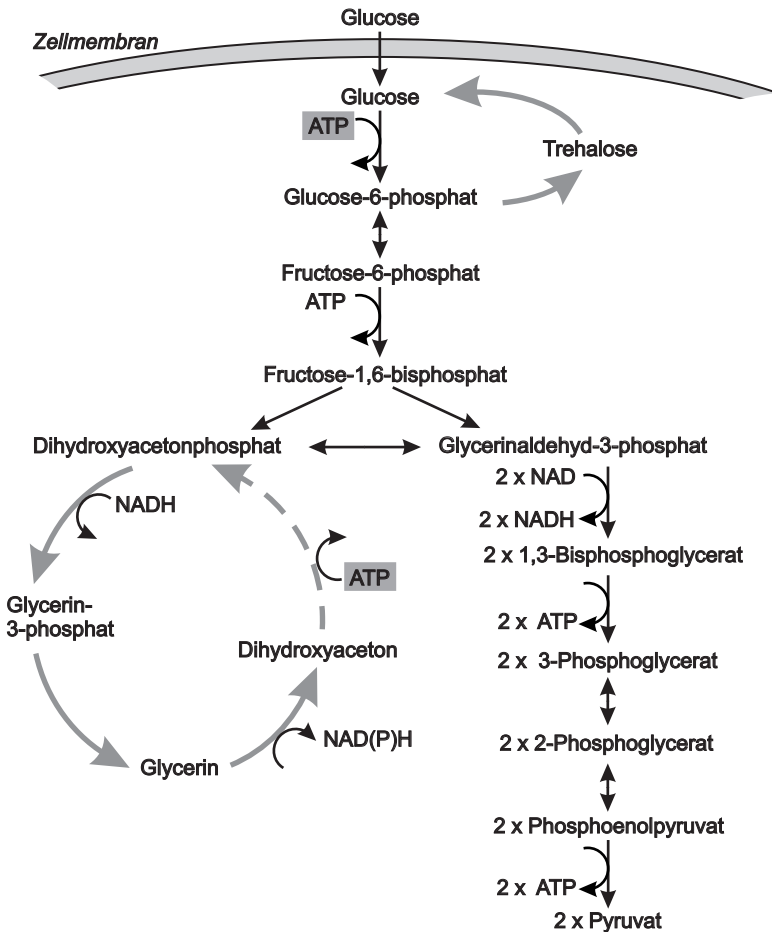


Abbildung 2.3: Glycerin-Metabolismus in *Saccharomyces cerevisiae*. Im oberen Teil der Glykolyse entstehen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu äquimolaren Anteilen. Der Hauptteil von DHAP wird über eine Triose-Phosphat-Isomerase zu GAP umgewandelt. Die Bildung von Glycerin findet ausgehend vom DHAP, über Glycerin-3-phosphat, zu Glycerin und weiter zu Dihydroxyaceton (DHA) statt. Bei der Umsetzung von DHA wiederum zu DHAP wird 1 ATP verbraucht.

Durch die Verminderung des Zellurgors werden bei einem hyperosmotischem Stress das Zellwachstum und die Wachstumsrate reduziert und kann sogar zu einem Wachstumsstopp führen (Erasmus et al. 2003, D'Amore et al. 1988, Tenge et al. 2006). Das Erliegen der Biosynthese resultiert in einem geringeren Bedarf an ATP (Blomberg 1995). In der Glykolyse werden im oberen Teil 2 ATP investiert und im unteren Teil 4 ATP gewonnen (Abbildung 2.3). Der Netto-ATP-Gewinn würde in diesem Fall zu einer Akkumulation von ATP führen. Bei hyperosmotischem Stress muss die Glykolyse jedoch weiter laufen, denn Dihydroxyacetonphosphat und NADH sind Substrate, die für die Glycerin-Bildung benötigt werden. Die Zelle reagiert auf hyperosmotischen Stress mit *futile cycles*, Kreisläufe, die auf den ersten Blick sinnlos erscheinen. Sie verbraucht bei der Bildung sowohl von Glycerin als auch von Trehalose je 1 ATP und verhindert dadurch eine Anhäufung von ATP in der Zelle.

Weiterhin kann die Zelle durch diese Kreisläufe den Substratfluss im oberen unverzweigten Teil der Glykolyse regulieren. Aufgrund des Netto-ATP-Gewinns wird der glykolytische Fluss stimuliert und führt theoretisch zu einer Akkumulation der Zwischenprodukte (Hexose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat) in der Zelle. Als Folge könnte Phosphatmangel für die Zelle entstehen und sogar den Zelltod herbeiführen. Ein stressinduzierter ATP-Verbrauch ermöglicht, dass der glykolytische Flux nicht weiter stimuliert wird und die intrazelluläre Akkumulation von energiereichen Intermediaten nicht stattfindet (Blomberg 2000, Erasmus et al. 2003).

Das Zellvolumen verringert sich innerhalb von 1-2 min nach osmotischer Stressinduktion und damit einhergehend auch das vakuoläre Volumen. Nach Latterich und Watson ist eine unversehrte Vakuole bei osmotischem Stress überlebenswichtig und nimmt am osmoregulatorischen Prozess solange teil, bis durch die Akkumulation von Glycerin das Wachstum fortschreiten kann (Latterich & Watson 1993). Vindeløv und Arneborg zeigten in ihren Versuchen, dass die Zelle und die Vakuole gleichzeitig schrumpfen und in dieser Größe bleiben. Sie gehen deswegen davon aus, dass die Vakuole nicht als Wasserspeicher dient, der das fehlende Wasser des Zytoplasmas ausgleicht (Vindeløv & Arneborg 2002).

Das Wachstum der knospenden Zelle von *Saccharomyces cerevisiae* ist asymmetrisch und ergibt sich aus der polaren Verteilung des Aktin-Zytoskeletts. Zwei Typen an Aktinfilamenten, die *actin filament cables* und die *actin filament patches*, sind hierbei wichtig. Chowdhury *et al.* demonstrieren eine schnelle und reversible Änderung der Zusammensetzung der Aktinfilamente unter hyperosmotischen Bedingungen. Eine Erhöhung der Osmolarität im Medium führt zu einem schnellen Zerfall der *actin filament cables*, gefolgt von einer langsameren Neuverteilung der kortikalen *actin filament patches*. Diese Neuorganisation bedeutet einen Verlust der Polarität und resultiert in einem temporären Wachstumsstopp und einer verminderten Wachstumsrate (Chowdhury *et al.* 1992).

2.4.3 Ethanolstress

Ethanol wird von *Saccharomyces cerevisiae* unter anaeroben Bedingungen gebildet und ebenfalls unter aeroben Bedingungen, wenn der Crabtree-Effekt einsetzt (Kapitel 2.3). Das Zellwachstum ist in Anwesenheit von Ethanol eingeschränkt und die Viabilität vermindert. Je höher die Ethanolproduktion, desto geringer ist die maximale Biomasse und desto länger dauert das Erreichen der maximalen Biomasse.

Bereits eine Ethanolkonzentration von 5 Vol % erzeugt nach Hallsworth einen sogenannten Wasserstress, indem die Wasseraktivität innerhalb der Zelle reduziert wird. Damit verbunden erfolgt eine Beeinträchtigung der Wasserstoffbrückenbindungen und resultiert in einer Zerstörung der Struktur und Funktion von Enzymen sowie der Membran (Hallsworth 1998). Die Plasmamembran von Zellen hat durch ihre Lipid-Doppelschicht hydrophobe und hydrophile Eigenschaften zugleich. Ethanol weist polare und unpolare Eigenschaften auf und kann so mit den Lipidschichten der Membran interferieren (Slater *et al.* 1993). Es schwächt die Bindungen der Membran und beeinträchtigt dadurch die Position membranständiger Proteine. Unter Ethanolstress sind beispielsweise die Aminosäuren-Permeasen beeinträchtigt (Cartwright *et al.* 1987). Die Aufnahmegeschwindigkeit von Glucose und die Funktion glykolytischer Enzyme ist ab einer Konzentration von 8,5 Vol % beeinflusst (Pascual *et al.* 1988).

Unter Wasserstress akkumuliert Hefe kompatible Solute wie Glycerin und Trehalose. Trehalose nimmt eine schützende Funktion für die Lipid-Doppelschicht, Membranproteine und hydrophile Enzyme ein (siehe Kapitel 2.4.1), spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle bei der Anpassung der Osmolarität (Hallsworth 1998).

Mit Erhöhung der Ethanolkonzentration steigt die Fluidität der Membran exponentiell an, daraus folgend auch ihre Permeabilität (Jones & Greenfield 1987). Mit erhöhter Membranpermeabilität nimmt wiederum das passive Einströmen von Protonen zu. Durch den Verlust des transmembranen pH-Gradienten sinkt die Aktivität der Permeasen. Der aktive Transport von Nährstoffen ist demnach eingeschränkt, denn dieser ist als Symport an den Ionenfluss gekoppelt (Leñoa & Uden 1984). Der intrazelluläre pH bleibt während einer Batch-Fermentation konstant (Dombek & Ingram 1987). Gemäß des erhöhten Protoneneinstroms müsste der intrazelluläre pH sinken. Daraufhin zeigten Rosa und Sá-Correia, dass bei Ethanolkonzentrationen zwischen 3 und 10 Vol % die Plasmamembran-ATPase *in-vivo* aktiviert wird. Die maximale Aktivität der ATPase wird in einem Konzentrationsbereich von 6 bis 8 Vol % erreicht und ist dreimal höher als bei Zellen, die in Abwesenheit von Ethanol wachsen (Rosa & Sá-Correia 1991).

Zur Senkung der Membranfluidität bei Ethanolstress bindet die Hefe Ölsäure verstärkt in die Zellmembran ein. In Anwesenheit von Ethanol ändert sich das relative Verhältnis der Fettsäuren; während Palmitinsäure bei 5 Vol % Ethanol um 38 % sinkt, steigt der Gehalt von Ölsäure um 50 % (You et al. 2002). Bei einer schrittweisen Erhöhung von Ethanol konnte sich die Hefe an hohe Ethanolkonzentrationen im Nährmedium gewöhnen. Die spezifische Wachstumsrate der Ethanol-adaptierten Hefen war im Vergleich zu nicht-adaptierten höher. Die Mutterzellen von Ethanol-adaptierten Stämmen sind größer als von nicht adaptierten Zellen (Dinh et al. 2008).

Verschiedene Gene werden bei hohen Ethanolkonzentrationen exprimiert. Zur Erhöhung der Ethanoltoleranz können Transkriptomanalysen herangezogen werden (Alper et al. 2006, Hu et al. 2007). Neueste DNA-microarray-Analysen sollen das Verständnis bei Ethanolstress verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Gene, die mit

ribosomalen Proteinen in Verbindung stehen, bei Ethanol-adaptierten Hefen stark hochreguliert sind. Daher wird vermutet, dass adaptierte Hefen eine erhöhte Aktivität der Genexpression haben, die für das Wachstum unter hohen Ethanolkonzentrationen wichtig ist. Die ATP-Synthese in Mitochondrien ist unter Ethanolstress ebenfalls erhöht und vermutlich für die Aktivierung der Proteinbiosynthese verantwortlich. Auch die Expression der Gene für die Aminosäuren-Biosynthese war unter Stressbedingungen hochreguliert. Für die Aminosäuren Glutamat, Arginin, Phenylalanin und Tyrosin konnte jedoch gezeigt werden, dass diese nicht für das Wachstum wichtig waren, sondern nur für die Stressantwort. Bei hohen Ethanolkonzentrationen treten nicht-adaptierte Hefen im Gegensatz zu Ethanol-adaptierten in die stationäre Phase ein. Durch eine langsame und langfristige Adaption können Hefen sehr gut an hohe Ethanolkonzentrationen von 10 Vol % gewöhnt werden und das Wachstum verbessert werden (Dinh et al. 2009).

2.5 Hefevitalität und Methoden zur Bestimmung

Die Vitalität ist ein Maß für die Aktivität einer lebenden Zelle. Sie grenzt sich von der Viabilität ab, die nur eine Unterscheidung zwischen lebenden von toten Zellen zulässt. Für die Erfassung der Viabilität stellt die Färbung der Zellen mit beispielsweise Methylenblau eine gebräuchliche Methode dar. Mit Hilfe von Dehydrogenasen reduzieren lebende, atmende Zellen Methylenblau zum farblosen Leukomethylenblau (Edelényi 1970).

Die Hefevitalität ist in der Brauereitechnologie ein sehr wichtiger Parameter. Der physiologische Zustand der Hefe beeinflusst die Gärleistung und damit die Qualität des Endproduktes Bier (Back et al. 1998, Smart 2003). Vitale Hefe ist in der Lage, ein hochqualitatives Bier zu produzieren und kann unerwünschte Nebenprodukte wie 2,3-Pentandion oder 2,3-Butandion (Diacetyl) besser abbauen. Die Dauer einer Fermentation kann mit einer vitalen Hefe ebenfalls reduziert werden (Back et al. 1998). Dies führt zu kürzeren Tankbelegungen, weniger Ausschuss und damit geringeren Produktionskosten. Trotz dieses wich-

tigen Aspekts sind bisher kaum Methoden in der Brauerei etabliert, um die Vitalität zu bestimmen. Lediglich Methoden zur Erfassung der Viabilität werden eingesetzt und für die Berechnung der benötigten Zelldichte für das Anstellen herangezogen. Damit existiert aber keine Aussage, wie vital die lebenden Zellen sind.

Die Messung der Vitalität kann laut Literatur mit mehreren Methoden geschehen. Eine Möglichkeit ist, die Kohlendioxidbildungsrate (Dinsdale et al. 1999) oder die spezifische Sauerstoffaufnahme (Peddie et al. 1991, Wheatcroft et al. 1988) zu erfassen. Nach Boulton *et al.* stellt die Reduktion der vicinalen Diketone ebenfalls einen Parameter für die Vitalitätsbestimmung dar (Boulton et al. 2001). Hutter zieht als Vitalitätsgröße die Färbung der Reservestoffe Trehalose und Glykogen heran, um den physiologischen Zustand der Zellen über eine Fluoreszenzmessung zu charakterisieren (Hutter et al. 2000, Hutter 2002, Hutter & Nitzsche 2002, Hutter et al. 2003). Weiterhin sind in der Literatur die Vitaltitration (Rodrigues et al. 2004), der Acidification Power Test (Fernández et al. 1991, Kara et al. 1988) und einige andere zu finden. Eine wichtige Methode für die Erfassung der Vitalität ist die Messung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) einer Hefezelle (Imai & Ohno 1995b). Die Bedeutung des intrazellulären pH-Wertes für eine Hefezelle wird im Folgenden näher beschrieben.

Der intrazelluläre pH-Wert der Hefezelle. Die Homöostase ist in der Physiologie die Aufrechterhaltung eines inneren Gleichgewichts trotz äußerer Einwirkungen. Dieser Gleichgewichtszustand wird durch Selbstregulation realisiert und betrifft auch die Regulation des extra- und intrazellulären Milieus für die Einstellung des intrazellulären pH-Wertes einer Hefezelle. Wird vom intrazellulären pH-Wert gesprochen, so ist der zytosolische pH-Wert gemeint.

Die Regulation des intrazellulären pH-Wertes ist für die Aufrechterhaltung zellulärer Stoffwechselvorgänge essentiell. Intrazelluläre metabolische Reaktionen in der Hefe werden durch Enzyme katalysiert. Die Wirkung dieser Enzyme ist stark pH-Wert-abhängig und der optimale Arbeitsbereich liegt gewöhnlich im neutralen Bereich (Madshus 1988). So ist zum Beispiel die Aktivität der Phosphofructokinase stark pH-abhängig. Dieses und andere an der Glykolyse und der Glukoneoge-

nese beteiligte Schlüsselenzyme werden durch die Kaskadenreaktionen der Proteinkinase A cAMP-abhängig geregelt. Die Konzentration von cAMP kann durch den intrazellulären pH-Wert geregelt werden (Noshiro *et al.* 1987). Die Proteinbiosynthese wird ebenfalls durch den intrazellulären pH-Wert kontrolliert. Die DNA- und RNA-Synthese kann bei einer Erhöhung des intrazellulären pH von 7 auf pH 8 gesteigert werden (Madshus 1988). Der Nährstofftransport in die Zelle ist ein weiterer durch den intrazellulären pH-Wert betroffener Vorgang. Einige Nährstoffe werden über einen Symport in die Zelle geschleust, d. h. zusammen mit einem Proton. Hierzu zählen Phosphat, Maltose, Aminosäuren und Nukleobasen wie Cytosin und Uracil (van der Rest *et al.* 1995). Für diesen Transport, ein sekundärer Transport, ist ein transmembraner pH-Gradient notwendig, d.h. die intrazelluläre Protonenkonzentration muss geringer als die extrazelluläre sein.

Die Erzeugung des transmembranen Gradienten erfolgt über ATPasen. Während einer Propagation oder Fermentation produziert die Hefe Kohlendioxid sowie organische Säuren und säuert durch die Protonen das sie umgebende Medium an. Diese Protonen diffundieren normalerweise aufgrund des transmembranen Protonengradienten in die Zelle. Für die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes pumpt die Hefe Protonen entgegen des Gradienten aus dem Zytosol in das extrazelluläre Medium. Die regulierenden Protonenpumpen sind die in der Plasmamembran lokalisierten ATPasen, auch P-ATPasen genannt. Je aktiver die ATPasen sind, desto mehr Protonen werden aus dem Zytosol befördert. Ein hoher intrazellulärer pH-Wert impliziert deshalb sehr aktive Protonenpumpen und damit eine sehr aktive, vitale Hefezelle. Der maximale intrazelluläre pH-Wert liegt im Moment der maximalen Proliferation. Die ATPasen sind für das Wachstum unerlässlich (Serrano *et al.* 1986).

Die Protonenverteilung in einer Zelle ist sehr unterschiedlich und abhängig vom Kompartiment. So ist der pH-Wert der Vakuole leicht sauer bei pH 6 (Preston *et al.* 1989) und der des Zytoplasmas wird mit Werten zwischen 7,0 und 7,4 angegeben (Madshus 1988). Furu-kubo *et al.* untersuchten den intrazellulären und vakuolären pH-Wert mit ^{31}P -NMR Spektroskopie über intrazelluläre anorganische Phosphate einer untergärigen Brauhefe. Der zytoplasmatische pH wird für eine

Erntehefe zwischen 6,6 und 6,9 angegeben, der vakuoläre pH-Wert liegt konstant bei 5,6 (Furukubo et al. 1997). Schneeberger *et al.* unterteilen die Vitalität einer Brauhefe in drei Bereiche. Ab einem intrazellulären pH-Wert von 6,1 wird der physiologische Zustand als sehr gut definiert, zwischen 5,7 und 6,1 als mittelmäßig und unterhalb von 5,7 als schlecht (Schneeberger et al. 2004).

Bisher sind verlässliche fluoreszenzbasierte Methoden entwickelt worden, um den intrazellulären pH-Wert mittels Photometrie zu bestimmen. Photometrische Messungen erfassen den Mittelwert des intrazellulären pH-Wertes einer Hefepopulation und wurden mit dem Farbstoff 5,6-Carboxyfluorescein durchgeführt (Back et al. 1998, Imai et al. 1994, Imai & Ohno 1995b, Thiele & Back 2005). Flusszytometrische Messungen hingegen bieten die Möglichkeit, einzelne Teilchen zu detektieren und damit die gesamte Population im Detail zu beschreiben. Es lässt sich eine Verteilungskurve des intrazellulären pH-Wertes über die Population darstellen. Ein gebräuchlicher Farbstoff für flusszytometrische Messungen ist SNARF (Valli et al. 2005, Wieder et al. 1993).

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt die eingesetzten Mittel, die zur Durchführung der Versuche und der zugehörigen Analysen benötigt wurden. Die verwendeten Chemikalien sind im Anhang in der Tabelle A.3 zu finden.

3.1 Propagationssysteme

Für die Versuchsreihen zur Hefevermehrung standen zwei Propagatoren zur Verfügung. Propagator 1 war ein Bioreaktor der Firma Bioengineering AG, Propagator 2 der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG. Weiterhin wurden zwei unterschiedliche Hefen und zwei verschiedene Medien verwendet. In den entsprechenden Abschnitten wird erwähnt, welcher Propagator, welches Nährmedium und welche Hefe das Propagationssystem bildete.

3.1.1 Propagatoren

Propagator 1. Propagator 1 war ein Laborfermenter (Typ L1523) aus Edelstahl der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz). Das Gesamtvolumen umfasste 16 L, das Arbeitsvolumen 8 L. Die ideale Durchmischung der Suspension erfolgte mit einem Sechs-Blatt-Scheibenrührer und vier Strömungsbrechern. Für den Leistungseintrag stand ein Motor (Unitec AG, Kloten, Schweiz) mit 0,75 kW zur Verfügung. Die Belüftung wurde anhand eines thermischen Massendurchflussreglers (Vögtlin Instruments AG, Aesch, Schweiz) mit Sterilluft realisiert, deren Dosierung über die Gelöstsauerstoffkonzentration geregelt werden konnte. Der Lufteintrag in die Flüssigkeit geschah mit einem Begasungsring. Für die Wärmeübertragung war der Fermenter mit einem Doppelmantel ausgestattet. Die Temperaturregelung erfolgte extern mit einem Kryostaten vom Typ RK 20 (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen) und einem Pt100-Sensor. Weitere Sonden waren

über seitliche Stutzen am Fermenter angebracht und dienten der Erfassung von Gelöstsauerstoffkonzentration, pH-Wert und Temperatur. Der pH-Wert wurde nicht geregelt. Die Drehzahl des Motors wurde konstant bei 500 rpm gehalten. Eine Skizze des Laborfermenters ist in Abbildung 3.1 zu sehen.

Die Regelung einer konstanten Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) erfolgte über das pO_2 -Regelmodul des Bioengineering-Fermenters, welches mit dem Luftregelventil gekoppelt war. Das PID-Regelmodul wies einen Regelbereich von 0-120 % auf. Die maximale Löslichkeit von Luft in Wasser wurde als Bezugsgröße herangezogen, um einen Sollwert in der Einheit mg/L einzustellen. Diese ist vor allem von der Temperatur, dem Druck und dem Gehalt an gelösten Stoffen abhängig. Für die maximale Löslichkeit von Luft in Wasser bei 1,013 bar wurden Daten der USGS (U.S. Geological Survey) herangezogen und ein Polynom 2. Grades in Abhängigkeit der Temperatur gebildet. Als Korrekturfaktor für eine 12%ige Würze schlagen Annemüller *et al.* ca. 0,88 vor (Annemüller *et al.* 2008). Liegt die maximale Löslichkeit für Luft in Wasser bei einer Temperatur von 25 °C bei 8,2 mg/L, so verringert sich dieser Wert in Würze auf 7,2 mg/L und wird für die Versuche als 100 % gesetzt.

Propagator 2. Der Fermenter der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG (Bonn) wurde für die Nährstoff-Dosageversuche verwendet. Der Propagator Proreakt 5 G bestand aus Edelstahl und hatte ein Gesamtvolumen von 22 L. Es wurde mit einem Volumen von 10 L gearbeitet. Er war mit einer speziellen Rotor-Stator-Turbine ausgerüstet, die ein selbstansaugender Begaser war und eine Leistung von 1,5 kW hatte. Die angesaugte Luft wurde zuerst über einen Grobpartikelfilter geleitet, anschließend über einen Durchflussmesser und einen Sterilluftfilter. Der Rotor dispergierte die ankommende Luft in sehr kleine Blasen und ermöglichte dadurch einen hohen Sauerstoffeintrag in das Medium. Die Belüftung wurde nicht geregelt, der Zuluftstrom wurde durch ein Handventil auf ca. 0,5 vvm gedrosselt.

Auch Propagator 2 hatte Strömungsbrecher und war zur Wärmeübertragung mit einem Doppelmantel versehen. Die Kühlung der Kultursuspension sowie der Gleitringdichtung des Motors erfolgte mit Stadtwasser. Der Wärmeeintrag erfolgte über den Leistungseintrag des Rührers und die Dissipationswärme der Hefe. Temperatur, Gelöstsauerstoffkonzentration und pH-Wert wurden über seitlich angebrachte Sonden

erfasst. Der pH-Wert wurde nicht geregelt, die Drehzahl wurde auf 3000 rpm eingestellt. Eine Skizze des Laborfermenters ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

3.1.2 Bierhefen und Nährmedien

Es wurden zwei unterschiedliche Hefestämme verwendet, die beide untergärrige Bruchhefen der Art *Saccharomyces cerevisiae* sind. Außerdem kamen zwei Medien zum Einsatz.

Bierhefen. In den Versuchen wurde eine Trockenhefe und eine Frischhefe propagiert. In Form von Trockenhefe wurde der Stamm W34/70 von Fermentis (Marcq en Baroeul, Frankreich) bezogen. Die Hefe wurde vor dem Anstellen laut Herstellerangabe resuspendiert. Pro Liter Propagationsmedium wurde 1 g Trockenhefe eingesetzt. Diese Menge wurde pro Liter Medium auf 10 mL Würze gegeben und 30 Min. bei 23 °C im Brutschrank gehalten. Anschließend wurde die Hefe bei Raumtemperatur mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer für eine weitere halbe Stunde leicht gerührt.

Als Frischhefe wurde der Stamm Rh verwendet, der, je nach Verfügbarkeit, entweder als Erntehefe aus der Studienbrauerei der Technischen Universität Berlin verwendet oder in Malzextrakt vom Schrägagarröhrchen zu einer ausreichenden Menge im Labor hergeführt wurde. Die Frischhefe wurde vor dem Animpfen zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen und die abzentrifugierte Biomasse in einer Menge abgewogen, sodass sich eine Anstellkonzentration von ca. 15 Mio. Zellen/mL ergab.

Medien. Die zwei Medien unterteilten sich in eine rein synthetisch zusammengestellte Nährlösung und in einen Malzextrakt. Der ungehopfte Malzextrakt „Bavarian Pilsener“ (Weyermann® Malzfabrik, Bamberg) wurde mit voll entsalztem Wasser verdünnt und auf ca. 11,5 % Stammwürzegehalt eingestellt. Durchschnittlich waren hier 88 g/L vergärbare Zuckern enthalten. Dieser Malzextrakt sollte eine Würze ersetzen und wird im Weiteren als Würze bezeichnet.

Die Trockenhefe wurde in Kombination mit der Würze verwendet. Trotz zahlreicher Nährstoffvariationen in synthetischem Medium war es

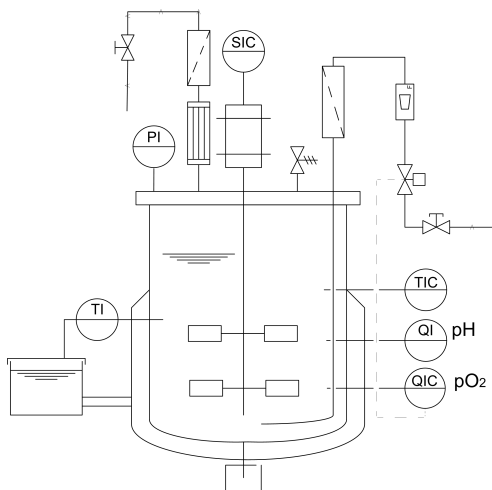


Abbildung 3.1: Skizze des verwendeten Propagators 1, Typ L1523 der Firma BioEngineering AG.

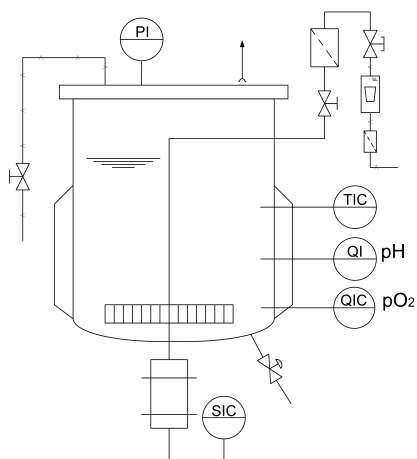


Abbildung 3.2: Skizze des verwendeten Propagators 2, Proreakt 5 G der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG.

nicht möglich, die Trockenhefe darin zum Wachsen zu bringen. Für die Erarbeitung aussagekräftiger Ergebnisse in definiertem Medium wurde deshalb auf Frischhefe zurück gegriffen.

Dieses synthetische Medium war hinsichtlich Konzentrationen und Zusammensetzung einer Bierwürze nachempfunden und ist in Tabelle 3.1 zu finden. Mengenangaben mit X, also die Konzentrationen an FAN, Zink und Pantothensäure, wurden nach der statistischen Versuchsplanung variiert und sind gesondert ausgewiesen. Die Aminosäuren L-Glutamin und L-Asparaginsäure wurden zu gleichen Anteilen verwendet. Der pH-Wert des synthetischen Mediums wurde mit konzentrierter Natronlauge auf $\text{pH} = 5,6$ eingestellt.

Beiden Medien wurde das Antischaummittel Polypropylenglykol P2000 (Fluka, Schweiz) in einer Konzentration von 1 mL pro Liter Medium hinzugefügt. Bei Versuchen mit Malzwurzelkeimextrakt musste aufgrund starker Schaumbildung die doppelte Menge verwendet werden. Im Propagator 1 wurde der Malzextrakt vor Propagationsbeginn pasteurisiert und 45 min bei 85 °C gehalten. Das synthetische Medium sowie der Malzextrakt im Propagator 2 wurde vorher nicht wärmebehandelt.

3.2 Analysen

3.2.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde in den dargestellten Versuchen mit der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Der NucleoCounter wurde nur anfänglich für Vergleichsmessungen herangezogen.

Zählkammer nach Thoma. Die Zelldichte wurde mittels einer Zählkammer nach Thoma (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) ermittelt (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm²). Die Hefesuspension wurde direkt nach der Probenahme innerhalb von 10 min ausgezählt und vorher geeignet verdünnt. In einer Doppelbestimmung wurden jeweils zweimal zehn Großquadrate unter dem Mikroskop vom Typ CH 2 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) ausgezählt und der Mittel-

Tabelle 3.1: Synthetisches Nährmedium mit bierwürzeähnlichen Konzentrationen („synthetische Bierwürze“). Die Anteile für Chlorid und Schwefel ergeben sich aus den eingesetzten Chemikalien.

Nährstoff	Menge	eingesetzte Chemikalie
Zucker	g/L	
Maltose	59	D(+)-Maltose-Monohydrat
Fructose	3	D(-)-Fructose
Glucose	12	D(+)-Glucose-Monohydrat
Saccharose	4	D(+)-Saccharose
Stickstoff	g/L	
Asparaginsäure	X	L-Asparaginsäure
Glutamin	X	L-Glutamin
Histidin	0,01	L-Histidin
Methionin	0,03	L-Methionin
Ionen	mg/L	
Calcium	35	Calciumchlorid wasserfrei
Eisen	0,2	Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat
Iodid	0,1	Kaliumiodid
Kalium	550	Kaliumchlorid
Kupfer	0,1	Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat
Magnesium	100	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
Mangan	0,15	Mangan(II)-sulfat-Monohydrat
Natrium	30	Natriumchlorid
Phosphor	375	Kaliumdihydrogenphosphat
Zink	X	Zinksulfat-Heptahydrat
Vitamine	mg/L	
Biotin	0,00065	D(+)-Biotin
m-Inosit, Bios I	55	myo-Inosit
Pantothensäure	X	Calcium-D(+)-pantothenat

wert gebildet, um das Ergebnis statistisch abzusichern. Über den Verdünnungsfaktor der Probe und das Volumen der Zählkammer konnte die Hefezellzahl pro mL berechnet werden. Die Abweichung der beiden Doppelkammern betrug nicht mehr als 5 %.

NucleoCounter. Der NucleoCounter YC-100 (Chemometec, Allerød, Dänemark) stellt eine weitere Möglichkeit zur Zelldichtebestimmung dar und basiert auf dem Prinzip eines Fluoreszenzmikroskops. Für die Bestimmung der Gesamtzelldichte wird die Probe mit einem Lyse-Reagenz Y-100 in einer geeigneten Verdünnung behandelt, sodass der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid den Zellkern aller Hefen anfärben kann. Im Lichtfeld werden die fluoreszierenden Zellen automatisch als Pixel ausgezählt.

3.2.2 Chemisch-technische und mikrobiologische Analysen

Folgende chemisch-technische und mikrobiell durchgeführten Analysen kamen zum Einsatz.

Bestimmung des scheinbaren Extrakts, des Ethanolgehalts und des freien α -Aminostickstoffs. Für diese Bestimmung wurden 50 mL der Fermentationsbrühe bei $2330 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert (Sorvall RC5B Plus, Du Pont, Bad Homburg) und der Überstand mit einem Faltenfilter vom Typ 597 ^{1/2} (Whatman, Dassel) mit einem Rückhaltevermögen von $4\text{--}12 \mu\text{m}$ filtriert. Extrakt und Ethanolgehalt wurden am „Biermessplatz“ (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) über eine Dichte- und Schallgeschwindigkeitsmessung direkt nach der Probenahme bestimmt. Die Nachweisgrenze des Biermessplatzes liegt bei würzeähnlichen Proben bei 1 Vol %, bei den synthetischen Medien bei 0,5 Vol %.

Die Messung der FAN-Konzentration erfolgte mit einer Fließinjektionsanalyse (Skalar Analytical B.V., Breda, Niederlande), die durch eine automatisierte Ninhydrinreaktion mit anschließender UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 570 nm eine quantitative Erfassung zuließ. Die filtrierte Überstand wurde bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Die Methoden sind gemäß der Brautechnischen Analysemethoden

MEBAK (Miedaner 2002) für Bier und Würze etabliert. Bei stark veränderter Medienzusammensetzung ist zu beachten, dass der angezeigte Wert aufgrund der neuen Matrix zu verfälschten Größen führen kann. Dies ist zum Beispiel bei Medien mit Zusätzen der Fall.

Bestimmung des Zinks. Das Spurenelement Zink der Medien wurde mittels Atomabsorptionsspektrometer (AAS) der Firma Analytik Jena AG (Jena), Modell novAA[®]400, gemessen. Die Proben wurden bei -18 °C bis zur Analyse gelagert. Die Kalibrierung erfolgte mit dem Additionsverfahren, indem zu drei von vier Ansätzen einer Probe ein Zinkstandard (Merck, Darmstadt) in bekannter Konzentration hinzugefügt wurde. Liegt Zink in einer Würzematrix vor, so muss die Probe vorher unter Druck aufgeschlossen werden. Dies erfolgte mit dem Mikrowellensystem speedwave MWS-2 (Berghof, Eningen). In die mikrowellengeeigneten Teflontöpfe wurden 10 mL Würze gefüllt, mit 1 mL Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) sowie 1 mL Salpetersäure (Merck, Darmstadt) versetzt und anschließend ca. 1 h aufgeschlossen. Die Bestimmungsgrenze des AAS wurde vom Hersteller mit 0,05 mg/L Zink angegeben. Die statistische Sicherheit lag bei 95,4 %.

Bestimmung der Pantothersäure. Die Bestimmung der freien Pantothersäure in Würze erfolgte in Anlehnung an die Brautechnischen Analysenmethoden der MEBAK (Pfenninger 1996). *Lactobacillus plantarum* ist ein Mikroorganismus, dessen Wachstum vom Vorhandensein der Pantothersäure abhängt und der nur in Gegenwart des Vitamins Stoffwechselprodukte bildet. Als Basis wurde ein Testmedium verwendet, welches pantothersäurefrei ist. Über die Zugabe verschiedener Konzentrationen an Calcium-D-Pantothenat zu diesem Testmedium konnte das Wachstum von *L. plantarum* anhand der Trübungsbildung kalibriert werden. Somit ließ sich die vorhandene Vitaminmenge in der zu untersuchenden Probe berechnen. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Vitalität

Die Vitalität wurde als intrazellulärer pH-Wert (ICP) bestimmt. Für die Messung standen ein Fluoreszenzphotometer und ein Zytometer zur

Verfügung. Die Messmethode basierte auf der Publikation von Thiele und Back (Thiele & Back 2005).

Chemikalien und Puffer. Das Anfärben der Zellen und die Bestimmung des ICP erfolgte mit 5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat (CF-DA) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA), welches 10 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde. Die nicht-veresterte Form 5,6-Carboxyfluorescein (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA) wurde 100 mM in DMSO gelöst und für die Kalibrierung verwendet. Als Beladungspuffer wurde ein 50 mM Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer (pH 3,0; bestehend aus 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , bei 1 °C) eingesetzt. Für die Kalibrierung wurde der Zitronensäurepuffer und der Natriumphosphatpuffer (50 mM Zitronensäure/50 mM Na_2HPO_4 , 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2) in geeignetem Verhältnis gemischt, sodass sich 16 Puffer mit pH-Stufen von 4,6 bis 7,6 mit einer Schrittweite von 0,2 ergaben.

Probenahme und -lagerung. Aufgrund der geringen Menge an verfügbarer Biomasse während der Propagationen wurden im Gegensatz zum Protokoll von Thiele und Back (Thiele & Back 2005) kleinere Volumina an Puffer und Stammlösungen eingesetzt. Für die Beladung der Zellen mit Farbstoff wurden ca. 200 mL propagierte Hefe bei Raumtemperatur mit $2300 \times g$ für 5 min zentrifugiert (Sorvall RC5B Plus, Du Pont, Bad Homburg). Das Pellet wurde in 10 mL physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und auf Eis bei 1 °C für maximal 24 h gelagert.

Waschen der Zellen. Vor dem Färben der Zellen war das Waschen der Hefeprobe notwendig. Während des kompletten Wasch- und Färbvorgangs wurden die Probe sowie der Puffer auf Eis gelagert. Zuerst wurde die Hefe durch ein Hefesieb mit einer Maschenweite von $32 \mu\text{m}$ (Joachim Edinger Industrievertretungen, Leinburg) gegeben, um grobe Verschmutzungen zu entfernen. Anschließend wurde die Hefeprobe bei $3600 \times g$ für 4 min bei 4 °C zentrifugiert (Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech, Osterode) und der Überstand verworfen. Diese Einstellungen wurden auch für weitere Zentrifugationsschritte verwendet. Restliche Ablagerungen nach dem Zentrifugieren, welche sich oben auf dem Pellet befanden, wurden mit einem Spatel entfernt und dieses danach in

3 mL eiskaltem Beladungspuffer resuspendiert. Nach diesem Schritt wurde die Hefeprobe weitere dreimal mit eiskaltem Beladungspuffer gewaschen und schließlich in 0,75 mL desselbigen resuspendiert (ca. $0,5 \text{ cm}^3$ Pelletvolumen).

Färben der Zellen. Für das Färben wurden zu der Probe 0,075 mL CF-DA Stammlösung gegeben und sofort für 1 min im Vortexer intensiv gemischt. Je 0,25 mL dieser Suspension wurde für die Doppelbestimmung in zwei Röhrchen überführt, mit je 8 mL Beladungspuffer aufgefüllt und für weitere 14 min in einem 30°C -warmen Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben zentrifugiert, zweimal mit eiskaltem Beladungspuffer gewaschen und schließlich in 3 mL davon resuspendiert.

Fluoreszenzphotometrische Analysen. Die photometrischen Analysen wurden mit einem Fluoreszenzphotometer F-2000 (Hitachi, Japan) durchgeführt. Die gefärbte Hefeprobe wurde zweimal durch eine Xenonlampe angeregt. Hierbei erzeugte die Exzitation bei 488 nm eine pH-abhängige und bei 441 nm eine pH-unabhängige Fluoreszenzintensität. Die Bildung eines Verhältnisses aus diesen beiden Intensitäten (488 nm/441 nm) ergab einen Wert unabhängig von der Konzentration und nur noch abhängig vom pH. Die Detektion des emittierten Lichts erfolgte bei 518 nm. Für die Berechnung des ICPs wurde die im Folgenden beschriebene Kalibrierung verwendet.

Flusszytometrische Analysen. Die flusszytometrischen Analysen wurden mit einem Coulter[®]Epics[®]XL-MLC[™] Durchflusszytometer (Beckman Coulter[©], Krefeld) realisiert. Die Probe wurde vor der Messung 1:11 mit Beladungspuffer verdünnt, um bessere Messergebnisse zu erhalten. Ein Argonlaser regte die Probe bei einer Wellenlänge von 488 nm an. Die Emission wurde durch Bandpassfilter bei 525 nm ($\pm 20 \text{ nm}$) und bei 575 nm ($\pm 15 \text{ nm}$) detektiert. Von jeder Probe wurden immer genau 20.000 Teilchen gemessen, die Fluoreszenzsignale durch die Elektronik logarithmisch verstärkt. Die anschließende Datenauswertung wurde mit der Software WinMDI (Version 2.9, Windows Multiple Document Interface für Flusszytometrie, Scripps Research Institute, La Jolla, CA) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Zelle wurden ins Verhältnis gesetzt (525 nm/575 nm). Dieses

wurde in die Kalibrierkurve eingesetzt und auf die zweite Nachkommastelle gerundet. Die Daten wurden mit einer Microsoft Excel Pivot Tabelle nach ICP sortiert und daraus eine ICP-Verteilungskurve erstellt.

Zytometereinstellungen. Die mit dem Flusszytometer detektierten Signale wurden in Spannungen umgewandelt und konnten verstärkt und weiter analysiert werden. Jedes Fluoreszenzsignal (in diesem Fall 525 nm und 575 nm) konnte hierbei einzeln bearbeitet werden. Für 525 nm waren es vier Spannungen, für 575 nm fünf Spannungen, sodass sich eine Matrix aus 20 möglichen Kombinationen an Spannungssignalen ergab. Die Verstärkung dieser Signale hatte einen starken Einfluss auf das Messergebnis. Je nach Spannungssignal-Kombination wurde die Spreizung der Verteilungskurve und damit die Auflösung geändert. Durch Vergleichsmessungen mit dem Photometer wurde eine geeignete Kombination gefunden, bei der die Fluoreszenzintensitäten der Probe und der Kalibrierung innerhalb des Messbereiches lagen. Für das verwendete Zytometer wurden 459 V für 525 nm und 707 V für 575 nm als optimal bestimmt.

Kalibrierung. Die Kalibrierung wurde mit den gleichen Geräteeinstellungen wie oben für Photometer und Zytometer beschrieben durchgeführt. Der Farbstoff 5,6-Carboxyfluorescein (CF) wurde zu den 16 Lösungen mit abgestuften pH-Werten gegeben, die den Bereich an möglichen ICP-Werten abdecken sollten. Die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse wurden mit den entsprechenden pH-Werten der Kalibrierlösungen korreliert. Für das Photometer ergab sich eine Kalibriergerade. Zytometer hingegen können nur Teilchen erfassen, sodass den Lösungen SuperdexTM 200 Partikel (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) zugefügt wurden. Diese inkubierten vier Tage auf einem Rundschüttler in den pH-Lösungen, damit sie den Farbstoff aufnehmen konnten. Diese angefärbten Teilchen konnten vom Zytometer erfasst werden. Die Datenanalyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Für das Zytometer ergab sich eine Kalibrierkurve.

3.3 Statistische Versuchsplanung

Die statistische Versuchsplanung hat das Ziel, Einflussfaktoren und deren Wechselwirkungen hinsichtlich der Zielgrößen Y zu ermitteln. Gleichzeitig wird die Anzahl der Versuche minimiert. Die Effekte zwischen Einflussgrößen können quantitativ erfasst und dadurch Prozesse optimiert werden.

Aufstellung des Versuchsplans. Multifaktorielle Experimente werden durchgeführt, um problemorientierte Ergebnisse zu erhalten, d. h. es findet die gleichzeitige Änderung mehrerer Einflussgrößen statt. Es wird eine Planmatrix eines vollständigen Versuchsplanes erstellt, mit n Experimenten und k Einflussgrößen.

$$n = 2^k \quad (3.1)$$

Bei $k = 2$ hat ein vollständiger Versuchsplan die geometrische Form eines Quadrats und bei $k = 3$ die Form eines Würfels. Die symmetrische Anordnung der Einflussgrößen in der Planmatrix führt zur freien Drehbarkeit im Raum, die Spalten der Planmatrix sind orthogonal. Der sogenannte Nullversuch wird sechs Mal wiederholt, um die Varianz der Experimente zu ermitteln. Der Nullversuch, oder auch Center Point, ist der Mittelpunkt des Würfels und bildet somit die Grundlage der Linearität. Die Abstände der oberen (normierte Stufe $+$) bzw. unteren Stufe (normierte Stufe $-$) zum Mittelpunkt (normierte Stufe 0) sind gleich und müssen entsprechend gewählt werden. Für den Mittelpunkt werden oft Werte ausgewählt, die bereits als gute oder etablierte Werte gelten. Tabelle 3.2 zeigt die Anordnung der normierten Stufen innerhalb einer Planmatrix für $k = 3$.

Anhand eines Zahlenbeispiels wird in Abbildung 3.3 der vollfaktorielle Versuchsplan als Würfel erläutert. Variiert werden in diesem Fall die Konzentration an Zink, an Pantothen säure (PS) und an freiem α -Aminostickstoff (FAN).

Versuchsauswertung. Die Auswertung der durchgeführten Versuche erfolgte mit dem Programm *STATISTICA Industrie*, Version 8 (StatSoft, Hamburg).

Tabelle 3.2: Planmatrix eines vollfaktoriellen Versuchsplans mit drei Einflussfaktoren *X*.

Versuche	X1	X2	X3
6 x Nullversuch (1-6)	0	0	0
7	-	-	-
8	+	-	-
9	-	+	-
10	+	+	-
11	-	-	+
12	+	-	+
13	-	+	+
14	+	+	+

3.4 Extraktion von Nährstoffen aus Malzwurzelkeimen

Die aus den Malzwurzelkeimen zu extrahierenden Stoffe waren FAN, Zink und Pantothensäure, die wie in Kapitel 3.2 erläutert analysiert wurden. Diese sollten dem erhöhten Nährstoffeintrag während der Propagation dienen.

Malzwurzelkeime. Für die Extraktionsversuche wurden Malzwurzelkeime aus drei Mälzereien bezogen, die folglich mit A, B und C gekennzeichnet wurden. Die Malzkeim-Muster der Quellen A und B wurden als ganze Malzwurzelkeime zur Verfügung gestellt und das Malzkeim-Muster der Quelle C bereits sehr fein zerkleinert, jedoch noch nicht pulverförmig. Die Muster A und B enthielten abgesplitterte Spelzenteile und andere Beimengungen. Muster C enthielt mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls Spelzen. Allerdings war aufgrund der starken Vorzerkleinerung keine Abschätzung des Anteils an Verunreinigungen möglich.

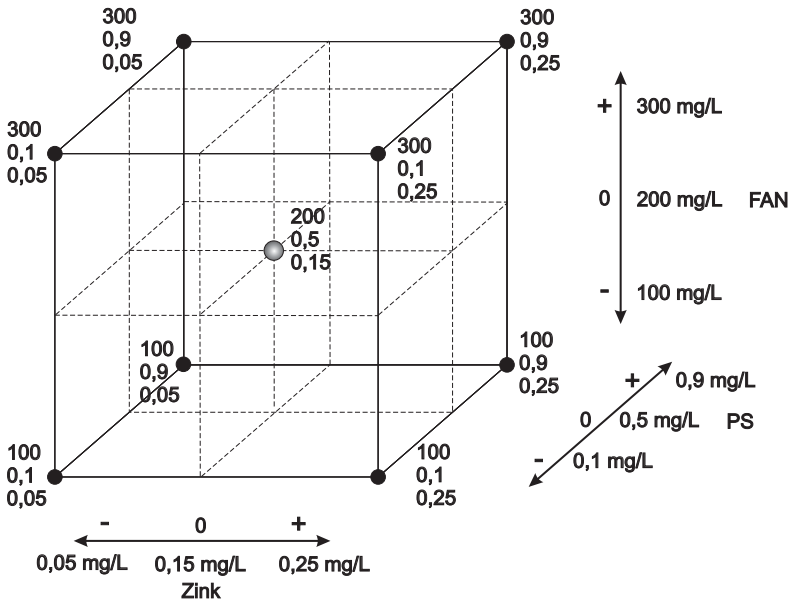


Abbildung 3.3: Vollständiger Versuchsplan mit drei Einflussfaktoren ($k=3$), die geometrisch einen Würfel bilden. Variiert werden die Konzentrationen an Zink, Pantothensäure (PS) und freiem α -Aminostickstoff (FAN). Die obere, mittlere und untere Stufe ist mit +, 0 beziehungsweise - gekennzeichnet.

Vorbereitung der Malzwurzelkeime. Für die Versuche wurden die Malzkeim-Muster A und B mit einem Plansichter (Bühler GmbH, Braunschweig) mit verschiedenen Siebeinlagen (1,25; 1; 0,5; 0,25 und 0,125 mm Maschenweite) von Verunreinigungen wie abgesplitterte Spelzenteile, etc. befreit. Die Malzwurzelkeime, die in den Siebeinlagen mit der Maschenweite 0,25 und 0,125 mm liegen blieben, wurden für Versuche verwendet und bis zum Einsatz trocken bei Raumtemperatur gelagert. Aufgrund der starken Vorzerkleinerung des Malzkeim-Musters C konnten eventuell enthaltene Verunreinigungen nicht mehr abgetrennt werden. Für die Untersuchungen zur Teilchengröße wurden die gemahlene Malzwurzelkeime nach der Bearbeitung mit dem Plan-

sichter in einer Hammermühle (Laboratory Mill 3100, Perten, Huddinge, Schweden) auf eine Teilchengröße von etwa 10 bis 20 μm zerkleinert.

Lösungsmittel. Für die Extraktionsversuche wurde entweder bidestilliertes Wasser (pH 6) aus einem Reinstwassersystem (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert) oder Würze (pH 4,7 bis 5) verwendet (vgl. 3.1.2).

Untersuchte Malzwurzelkeim-Konzentrationen. Die Konzentrationen betrugen 20 g/L, 40 g/L und 100 g/L. Für die Ansätze wurden 1 L oder 2 L DURAN[®]-Glasflaschen (Schott AG, Mainz) eingesetzt.

Schüttelmazeration. Die Ansätze für die Schüttelmazeration wurden für definierte Zeiträume in DURAN[®]-Glasflaschen auf einem Rundschüttler (Edmund Bühler, Hechingen) bei 200 rpm durchmischt. Die Schüttelmazeration erfolgte bei Raumtemperatur.

Digestion. Für die Ansätze der Digestion wurden die DURAN[®]-Glasflaschen mit der Malzwurzelkeim-Suspension in ein bei 85 °C temperiertes Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) platziert. Es fand keine weitere Durchmischung der Suspension statt.

Autoklavieren. Ein Teil der Ansätze wurde bei 121 °C für 20 min in einem Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) sterilisiert, um den Einfluss des Autoklavierens zu untersuchen. Der gesamte Vorgang des Autoklavierens dauerte ca. 5 h, sodass bei den entsprechenden Versuchen diese Dauer mit eingerechnet werden musste und sich der zeitliche Nullpunkt verschob.

Abtrennen der Malzwurzelkeime vom Lösungsmittel. Die Feststoffe wurden zu definierten Zeitpunkten von ihrem Lösungsmittel abgetrennt. Bei großen Volumina (20 bis 250 mL) wurde die Suspension zentrifugiert, bei kleinen (bis etwa 20 mL) mit einem Faltenfilter 597 ^{1/2} (Whatman, Dassel) filtriert. Das Zentrifugieren und das Filtrieren dauerte ca. 10 min. Die Malzwurzelkeime standen noch in Kontakt mit dem Lösungsmittel, sodass bei sehr kurzen Extraktionszeiten das Ergebnis beeinflusst werden kann.

Einengen des Malzwurzelkeim-Extrakts. Die Aufkonzentrierung des Malzwurzelkeim-Extrakts (100 g Malzwurzelkeime / 1 L Wasser Schüttelmazerat) erfolgte in einem Rotationsverdampfer (Büchi Labortechnik GmbH, Essen) mit einem 1 L DURAN®-Rundkolben (Schott AG, Mainz). Der Unterdruck von ca. 70 mPa wurde mit einer Pumpe (Ilmvac GmbH, Ilmenau) erzeugt, wodurch Wasser bei ca. 50 °C verdampft. Das zugehörige Wasserbad (Daglef Patz KG, Wankendorf) wies Temperaturschwankungen zwischen ± 5 °C auf. Die Flüssigkeit wurde von 10 L auf ca. 0,9 L reduziert.

3.5 Versuche zur Steigerung der Zelldichte

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welcher der Zielstoffe FAN, Zink und Pantothersäure den größten Einfluss auf die Steigerung der Hefeaussbeute während der Propagation hat und ob es Wechselwirkungen zwischen diesen Nährstoffen gibt. Es wurden zwei Betrachtungsweisen vorgenommen. Erstens wurden zur Würze, die eine Grundversorgung an Nährstoffen aufwies, weitere Nährstoffe zugesetzt. Zweitens wurden innerhalb eines synthetischen Mediums diese Konzentrationen variiert.

3.5.1 Dosage von Nährstoffen zur Würze

Typische in der Literatur benannte Mangelnährstoffe wurden der Würze beigegeben. Es sollte herausgefunden werden, ob es für verschiedene Komponenten eine Konzentration gibt, durch die keine weitere Erhöhung der Zelldichte möglich war. Es wurden synthetische und natürliche Stoffe zugesetzt. Folgendes System kam hierfür zum Einsatz:

Propagationssystem:

Propagator:	Propagator 2 (Frings)
Hefe:	Trockenhefe W34/70
Nährmedium:	Würze (Malzextrakt)

Synthetische Nährstoffe. Die Zugabe von synthetischen Nährstoffen (siehe Tabelle A.3) erstreckte sich in erster Linie auf die Aminosäuren L-Glutamin und Glycin. Hierbei wurde auf die unterschiedliche

Assimilationsreihenfolge der Aminosäuren geachtet (vgl. Tabelle 2.4). Zink wurde in Form von Zinksulfat sowie Zinkchlorid zugegeben, Pantothenensäure in Form von Calcium-D(+)-Pantothemat. Bei Versuchen zur Ermittlung der Zelldichte durch Zugabe verschiedener Aminosäuren wurden dem Medium zu Beginn der Propagation Zinkchlorid in einer Endkonzentration von 0,5 mg/L und Calcium-D(+)-Pantothemat in einer Endkonzentration von 1 mg/L zudosiert.

Malzwurzelkeim-Extrakt. Die Basis für zwei Propagationen war ein durch einstündige Schüttelmazeration hergestellter Malzwurzelkeim-Extrakt mit 100 g/L der Quelle A (Kapitel 3.4). Für einen Propagationsversuch wurde der Malzextrakt statt mit Wasser mit dem Malzwurzelkeim-Extrakt angerührt und ergab ein Gesamtvolumen 10 L. Für einen weiteren Propagationsversuch wurde der eingeeengte Malzwurzelkeim-Extrakt (ca. 0,9 L) dem standardmäßig angesetzten Malzextrakt hinzugefügt, sodass insgesamt 10,9 L Medium entstanden.

3.5.2 Nährstoffversuche mit synthetischem Medium

Die Versuche mit synthetischem Medium wurden nach einem vollfaktoriellen Versuchsplan angeordnet. Die Verwendung eines definierten Mediums erhöhte die Vergleichbarkeit sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus konnten gezielt Mangelsituationen dargestellt werden, was sich bei der Verwendung einer Würze schwierig gestaltet. Als Basis diente die Zusammensetzung der synthetischen Bierwürze, welche in Tabelle 3.1 zu finden ist.

Das Propagationssystem bestand aus:

Propagationssystem:

Propagator:	Propagator 1 (BioEngineering)
Hefe:	Frischhefe Rh
Nährmedium:	synthetische Bierwürze

Die Stickstoffquellen L-Glutamin und L-Asparaginsäure wurden zu gleichen Mengenteilen eingesetzt, sodass sich FAN-Werte von 100 mg/L (untere Stufe), 200 mg/L (mittlere Stufe, Nullversuche) und 300 mg/L ergaben. In Tabelle 3.3 sind die Mengen aller veränderten Konzentrationen der verschiedenen Stufen angegeben.

Tabelle 3.3: Planmatrix der Nährstoffversuche mit synthetischem Medium. Variiert wird die Konzentration an Zink, an Pantothensäure und an FAN.

Versuche	FAN mg/L	Zink mg/L	Pantothensäure mg/L
6 x Nullversuch	200	0,15	0,5
7	100	0,05	0,1
8	300	0,05	0,1
9	100	0,25	0,1
10	300	0,25	0,1
11	100	0,05	0,9
12	300	0,05	0,9
13	100	0,25	0,9
14	300	0,25	0,9

3.6 Versuche zur Vitalität

Untersuchungen zur Hefevitalität wurden unter verschiedenen Aspekten geplant. Zuerst wurden normal verlaufende Propagationen charakterisiert. Hierbei wurden die drei Wachstumsphasen Anlaufphase, exponentielle Phase und stationäre Phase miteinander verglichen. Basierend auf diesen Daten wurde die Hefe in weiteren Versuchen physiologischem Stress ausgesetzt.

Propagationssystem:

- Propagator:

Hefe:

Nährmedium:
- Propagator 1 (BioEngineering)

Trockenhefe W34/70

Würze (Malzextrakt), pasteurisiert

3.6.1 Differenzierung der drei Wachstumsphasen

Die Propagationstemperatur betrug 25 °C. Die Belüftung wurde konstant mit 0,5 vvm begonnen und nach 7 h auf eine Regelung für einen Gelöstsauerstoffanteil von 0,5 mg/L umgestellt. Die Propagation wurde 30 h lang verfolgt. Hefe wurde für die Vitalitätsbestimmung nach 3 h (Anlaufphase), 14 h (exponentielle Phase) und nach 26 h (stationäre Phase) geerntet. Die Versuche wurden sechs Mal wiederholt, die ICP-Messungen als Doppelbestimmung ausgeführt.

3.6.2 Stress während der stationären Phase

Die Propagationen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Hefe wurde nach 26 h (stationäre Phase) geerntet, anschließend gelagert oder auf drei im Folgenden beschriebene Arten gestresst.

Lagerung. Die Lagerung der Hefe erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) für 45 h auf Eis bei 1 °C im Kühlschrank und stellte einen Nährstoffmangel für die Hefe dar.

Osmotischer Schock. Der osmotische Stress erfolgte mit einer 18%igen (m/m) Lösung aus D(-)-Sorbitol (VWR International, Leuven, Belgien). Die Hefe wurde für 45 h in dieser hochosmotischen Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Hitzeschock. Ein Hitzestress wurde appliziert und wie folgt vorgegangen: Die Hefeprobe wurde zuerst für 42 h bei 1 °C in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gelagert, dann 3 h lang in einem Wasserbad bei 35 °C erhitzt und wieder auf 1 °C heruntergekühlt.

Ethanolstress. Der vierte Stress war eine hohe Ethanolkonzentration. 96%iges Ethanol (VWR International, Leuven, Belgien) wurde auf eine Konzentration von 10 Vol % verdünnt. Daraufhin wurde die Probe für 41 h bei 1 °C in einer physiologischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gelagert. Die Hefe wurde zentrifugiert und in die 10%ige Ethanollösung überführt und für 4 h bei Raumtemperatur belassen.

3.6.3 Stress während der exponentiellen Phase

Die Propagationen wurden ebenfalls unter den gleichen Bedingungen aus Kapitel 3.6.1 durchgeführt. Der Stress wurde 1 bzw. 2 h vor der standardmäßig nach 14 h (exponentielle Phase) erfolgten Probenahme angewendet. Ein Hauptaugenmerk lag hierbei auf einer sich eventuell einstellenden Regeneration bis zur stationären Phase.

Hitzeschock. Zwei unterschiedliche Stresstemperaturen wurden angewendet, um einen Hitzeschock zu erzeugen. In einem Versuch wurde die Suspensionstemperatur nach 12 h von 25 °C auf 35 °C erhöht, in einem zweiten Versuch auf 45 °C. Nachdem die Stresstemperatur erreicht war, wurde die Propagationsbrühe sofort wieder auf 25 °C abgekühlt. Bei dem 35 °C-Versuch dauerte das Aufheizen und Abkühlen 1,5 h und bei dem 45 °C-Versuch 3 h.

Osmotischer Schock. Ein hoher osmotischer Druck wurde erreicht, indem nach 13 h D(-)-Sorbitol (VWR International, Leuven, Belgien) in einer Konzentration von 12,5 % (m/m) hinzugegeben. Der scheinbare Extraktgehalt wurde dadurch auf insgesamt 18 % (m/m) angehoben.

Ethanolstress. Ethanolstress wurde 1 h vor der Probenahme mit Ethanol (96 %, VWR International, Leuven, Belgien) induziert. Mittels Biegeschwinger wurde eine Gesamtetanolkonzentration der Fermentationsbrühe von 7,8 Vol % detektiert.

4 Untersuchungen zur Nährstoffextraktion aus Malzwurzelkeimen

4.1 Zusammenfassung

Ziel war die Herstellung eines flüssigen Extraktes aus Malzwurzelkeimen, der während einer Propagation zur Erhöhung des Nährstoffgehaltes einer Würze nach Deutschem Reinheitsgebot zugesetzt werden kann. Die aus den Malzwurzelkeimen zu extrahierenden Zielstoffe waren FAN, Zink und Pantothensäure. Zur Optimierung der Extraktion wurden die Einflussgrößen pH-Wert (Extraktionsmittel Wasser/Würze), Zerkleinerungsgrad (ganz/gemahlen), Rohstoffqualität (drei Herkunftsquellen), Dauer sowie Extraktionstechnik und Temperatur (1 h Schüttelmazeration Raumtemperatur/ 45 min Digestion 85 °C) untersucht. Aus 40 g/L Malzwurzelkeimen konnten mit Würze (pH = 4,7-5) über 5 mg/L Zink und mit Wasser (pH = 6) 0,37 mg/L Pantothensäure extrahiert werden. Eine Oberflächenvergrößerung der Malzwurzelkeime durch Zermahlen ist ein unnötiger Prozessschritt, unabhängig vom Zielstoff. Die Digestion führte gegenüber einem Schüttelmazerat, bei nur 3/4 der Extraktionszeit, zu ähnlichen Resultaten. Eine hohe Temperatur beschleunigt Lösungs- und Diffusionsvorgänge besser als Schütteln. Die Rohstoffqualität hatte einen eindeutigen Einfluss auf die Ausbeute, jede Quelle war bei einem anderen Zielstoff am besten. Bereits nach 10 s Schütteln mit Wasser wurden bei einer Malzwurzelkeim-Konzentration von 100 g/L Werte von 164 mg/L FAN erreicht, maximale Werte nach 70 h lagen bei 515 mg/L FAN.

Aus Malzwurzelkeimen können sehr hohe Konzentrationen an FAN, Zink und Pantothensäure extrahiert werden, deshalb sind sie zur Nährstofferrhöhung während der Propagation geeignet.

4.2 Einleitung

Assimilierbarer Stickstoff (FAN - Freier α -Aminostickstoff), Zink und Pantothensäure liegen in einer Vollbierwürze defizitär vor, um die maximal mögliche Hefeausbeute zu erreichen (Annemüller et al. 2008). Zur Erhöhung des Nährstoffgehaltes einer Bierwürze dürfen nach Deutschem Reinheitsgebot nur die Bestandteile Hopfen, vermälzte Gerste und Wasser verwendet werden. Malzwurzelkeime bilden sich während des Keimvorgangs der Gerste beim Mälzen aus. Nach dem Darren werden die Malzwurzelkeime beim Malzputzen abgeschlagen und sind ein Nebenprodukt des Mälzungsprozesses. Als Bestandteil der Gerste sind diese als Additive für den zusätzlichen Eintrag an Nährstoffen in die Würze nach Deutschem Reinheitsgebot möglich.

Es existiert nur eine Quelle, bei der Malzwurzelkeime zur Maximierung der Hefeausbeute verwendet wurden. Die alleinige Zugabe von 0,5 g/L gemahlenen Malzwurzelkeimen zur Würze resultierte in einer Steigerung der Hefeausbeute von 54 %. Bei Einsatz von 1 g/L ergab sich eine Erhöhung um 73 % (Methner 1999). Eigene Vorversuche mit diesen Konzentrationen führten zu keiner Steigerung der Zelldichte. Eingesetzt wurde dabei ein Medium aus Malzextrakt (siehe Kapitel 3.1.2), dessen Konzentrationen bei FAN = 177 mg/L, Zink = 0,18 mg/L und Pantothensäure = 0,18 mg/L lagen. Die Konzentrationen der von Methner verwendeten Würze sind nicht bekannt. Bei Zugabe von 1 g MWK/L Würze würde nach Methner der Zinkgehalt um 0,15 mg/L, der Gehalt an Aminosäuren um 338 mg/L und die Konzentration der Pantothensäure um 96 μ g/L steigen (Methner 1999). Die eigenen FAN-Analysen ergaben, dass bei 1 g MWK/L keine messbare Erhöhung des FAN stattfand. Zur Steigerung des FAN müssten demnach deutlich höhere Malzwurzelkeim-Konzentrationen zum Einsatz kommen.

Der Eintrag an hohen Mengen Feststoff ins Medium führt im Brauprozess zu Schwierigkeiten. Das Fluidverhalten im Propagator würde sich ändern und der Leistungseintrag des Rührers müsste erhöht werden. Weiterhin wäre ein Abtrennen der gemahlenen Malzwurzelkeime von der propagierten Hefe nur unter großem Aufwand, vielleicht sogar gar nicht durchführbar. Die mit Malzwurzelkeimen versetzte Hefe käme bei der Gärung zum Einsatz und könnte unter anderem möglicherweise zu Filtrationsproblemen nach der Gärung führen.

Aus diesem Grund soll ein flüssiger Extrakt aus Malzwurzelkeimen hergestellt werden, der einem Propagationsmedium zur Erhöhung dieser Nährstoffkonzentrationen zugesetzt werden kann. Dieser Extrakt soll hohe Konzentrationen an FAN, Zink und Pantothensäure haben, um während einer Propagation den maximalen Hefezuwachs zu gewährleisten. Es soll untersucht werden, welcher der drei Zielstoffe unter welchen Bedingungen am besten extrahiert werden kann und welche Konzentrationen damit erreicht werden. Hierfür werden die Einflussgrößen pH-Wert des Extraktionsmittels, Zerkleinerungsgrad, Rohstoffqualität, Dauer, Extraktionstechnik und Temperatur untersucht und auf die Extraktivstoffe hin analysiert.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Extraktionsmittel und Zerkleinerungsgrad

Bei der Extrakterstellung stellt sich die Frage, ob durch eine Zerkleinerung des Materials mehr Stoffe extrahiert werden können. Außerdem sollte geklärt werden, ob ein unterschiedlicher pH-Wert einen Effekt auf das Herauslösen der Stoffe hat. Zur Untersuchung des Einflusses des Zerkleinerungsgrads wurden ganze Malzwurzelkeime und mit einer Hammermühle gemahlene Malzwurzelkeime verwendet. Reinheitsgebot konforme Lösungsmittel sind Wasser und Würze, die untersucht wurden. Der pH-Wert von Würze liegt bei 4,7 bis 5 und von Wasser bei 6. Die Auswirkungen sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Freier α -Aminostickstoff. Das Extraktionsmittel hatte bei der Extraktion von FAN keinen entscheidenden Einfluss. Würze lief gegenüber Wasser, bei Verwendung von gemahlenen Malzwurzelkeimen, einen geringfügig höheren Wert von 11 % hervor. Die Differenz zwischen gemahlenen und ganzen Malzwurzelkeimen bei Verwendung von Wasser und einstündiger Schüttelmazeration lag bei 13 % zugunsten der kleineren Teilchengröße.

Zink. Für Zink hatte die Zerkleinerung keine Auswirkung bei Einsatz von Wasser, beide Zinkwerte lagen bei 0,19 mg/L. Das Lösungsmittel hingegen zeigte einen großen Effekt. Ein Zinkwert von 5,1 mg/L bei Verwendung von Würze entspricht einer Steigerung um den Faktor 27.

Pantothensäure. Bei der Extraktion von Pantothensäure war das Extraktionsmittel Wasser besser und erzeugte eine Steigerung von 115 % gegenüber Würze bei gemahlenen Malzwurzelkeimen. Die Pantothensäurekonzentration war bei Verwendung von ganzen Malzwurzelkeimen sogar um 6 % höher als bei gemahlenen.

Die Zerkleinerung des Materials brachte entgegen aller Erwartungen keinen Vorteil hinsichtlich Ausbeute, und zwar bei allen drei Zielstoffen. Der pH-Wert hatte dagegen bei Zink einen großen Einfluss und führte zu enormen Ausbeuten, bei FAN und Pantothensäure waren die Vorteile eines Lösungsmittels gegenläufig.

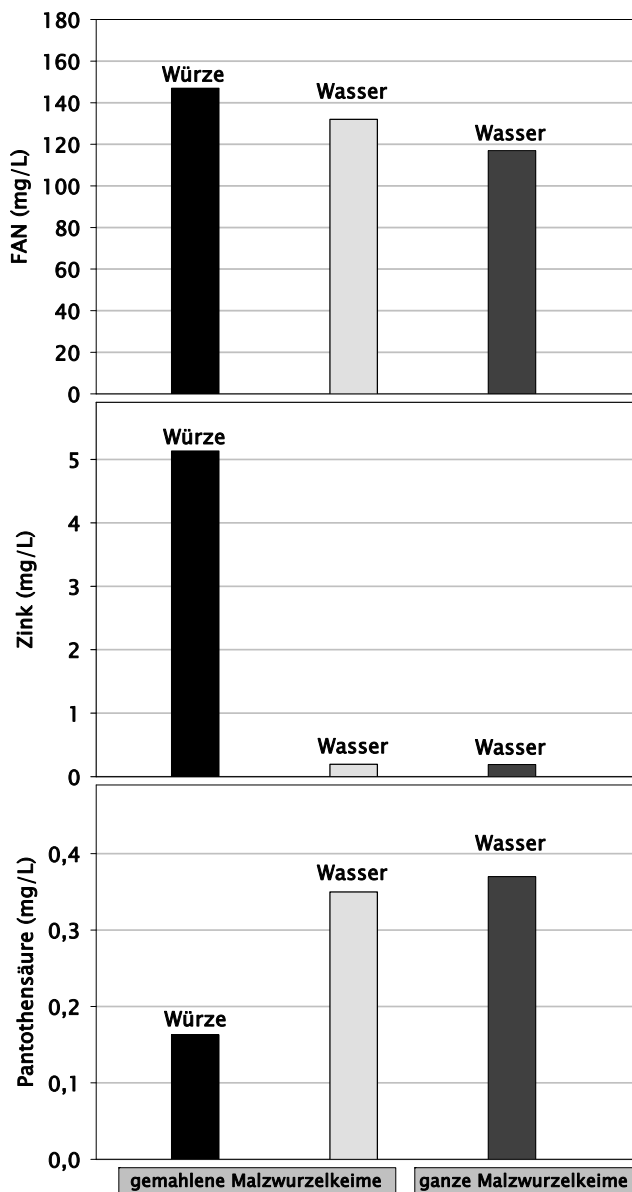


Abbildung 4.1: Extraktion von freiem α -Aminostickstoff (FAN), Zink und Pantothensäure aus Malzwurzelkeimen (40 g/L, Quelle A; 1 h Schüttelmazeration bei Raumtemperatur). Vergleich von Extraktionsmittel (Wasser/Würze) sowie Zerkleinerungsgrad (ganz/gemahlen).

4.3.2 Rohstoffqualität und Extraktionstechnik

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Extrakterstellung sind die einzusetzenden Rohstoffe. Der Einfluss der Qualität der Malzwurzelkeime auf die Ausbeute sollte geklärt werden, indem aus drei Mälzereien je ein Malzkeim-Muster untersucht wurde (A, B und C). Zusätzlich sollte aufgezeigt werden, ob eine bestimmte Extraktionstechnik zu einem schnelleren Konzentrationsausgleich führt. In diesem Fall kamen Schütteln und eine Temperaturerhöhung in Betracht, sodass Schüttelmazeration bei Raumtemperatur mit Digestion bei 85 °C verglichen wurden (Abbildung 4.2).

Freier α -Aminostickstoff. Unabhängig von der Extraktionstechnik zeigte sich bezüglich der Herkunftsquellen A, B und C das gleiche Muster an extrahierten FAN-Mengen. Die Differenz zwischen Quelle A und Quelle B lag bei Schüttelmazeration bei 24 % und bei Digestion bei 22 %. Trotz kürzerer Extraktionszeit wurden durch die Digestion bei 85 °C die gleichen bzw. minimal höhere FAN-Werte erlangt. Zwischen Quelle B und C lag bei Schüttelmazeration ein Unterschied von 184 % und bei Digestion von 182 % vor.

Zink. Auch bei Zink war das gleiche Verhalten hinsichtlich Herkunftsquellen A, B und C bei Vergleich der Extraktionstechnik zu erkennen. Quelle A erreichte einen Wert von 5,1 mg/L Zink während einer einstündigen Schüttelmazeration bei Raumtemperatur und war damit um 65 % höher als Quelle B und um 143 % höher als Quelle C. Bei Digestion war die Zinkausbeute mit Quelle A um 87 % besser als mit Quelle B und um 105 % besser als mit Quelle C.

Pantothensäure. Wie bereits bei FAN und Zink ist das gleiche Verhalten der Quellen A, B und C zu sehen. Bei einem einstündigen Schüttelmazerat gingen unter Verwendung von Quelle C 0,22 mg/L Pantothensäure in Lösung und während einer 45-minütigen Digestion 0,19 mg/L. Der Unterschied zwischen Quelle A und Quelle C lag bei 38 bzw. 6 % und zwischen Quelle B und Quelle C bei 63 bzw. 29 %.

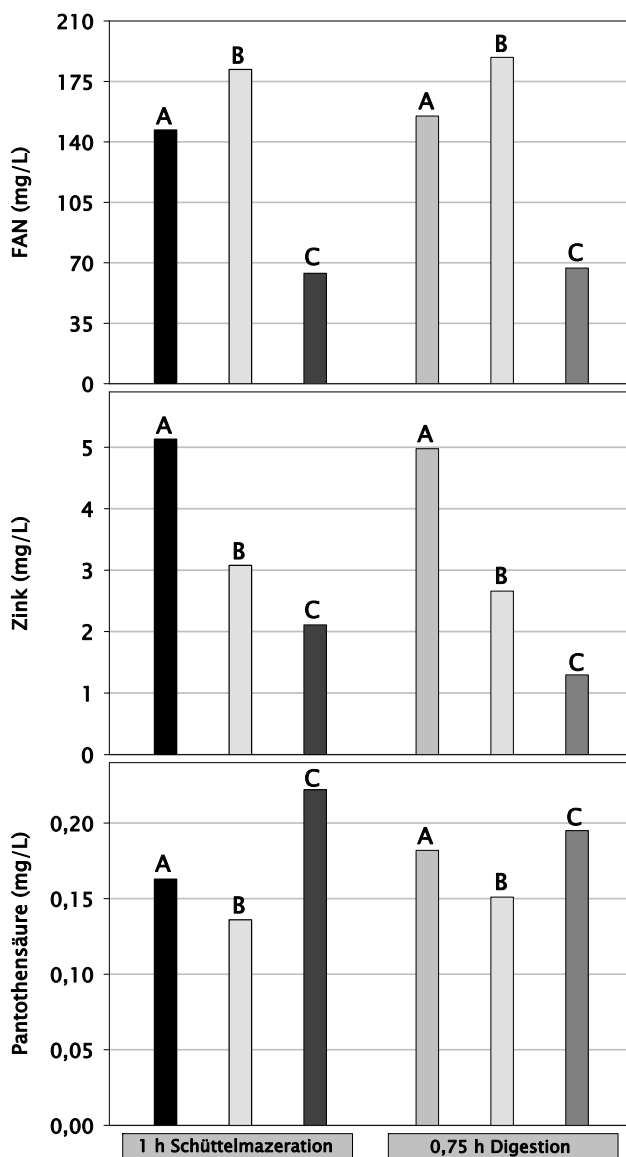


Abbildung 4.2: Extraktion von freiem α -Aminostickstoff (FAN), Zink und Pantothensäure aus Malzwurzelkeimen dreier Quellen A, B und C (40 g/L, gemahlen; Extraktionsmittel Würze). Vergleich von 1 h Schüttelmazeration bei Raumtemperatur mit 45 min Digestion bei 85 °C.

Für jeden Zielstoff war ein anderes Malzkeim-Muster von Vorteil. Wird für die Optimierung der Hefepropagation ein bestimmter Nährstoff fokussiert, so müssen Voruntersuchungen des Rohstoffs durchgeführt werden. Eine Temperaturerhöhung erzeugte bei nur 3/4 der Extraktionszeit gleiche Ausbeuten wie Schütteln, sodass höhere Temperaturen zu einem schnelleren Konzentrationsausgleich führten.

4.3.3 Zeitlicher Verlauf der FAN-Extraktion

Vermutlich ist die Hefevermehrung vor allem in der erforderlichen Stickstoffmenge limitiert. Für den maximalen Zuwachs wären bei Verwendung einer Vollbierwürze 586 mg/L FAN notwendig (Tabelle 2.2) (Anemüller et al. 2008).

Anhand des FAN sollte dargestellt werden, wie das Extraktionsverhalten über die Zeit ist. Es stellt sich die Frage, ob eine Sättigung der Lösung eintritt oder ob durch sehr lange Extraktionszeiten die Ausbeute weiter gesteigert werden kann. Davon ausgehend sollte ein optimaler Zeitpunkt für den Abbruch der Extraktion für FAN gefunden werden. Zusätzlich sollte gezeigt werden, ob innerhalb eines Konzentrationsbereiches für Malzwurzelkeime ein lineares Verhalten hinsichtlich Ausbeute zu erkennen ist, um Werte mit der Literatur vergleichen zu können. Hierfür wurden Schüttelmazerate mit Wasser hergestellt und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Konzentration der eingesetzten Malzwurzelkeime wurde in drei Schritten von 20 g/L, 40 g/L bis zu 100 g/L variiert. Ein Teil der Proben wurde vor Beginn der Schüttelmazeration autoklaviert, um Kontaminationen zu verhindern und die Ausbeute durch hohe Temperatur eventuell weiter zu steigern.

In Abbildung 4.3 sind verschiedene Konzentrationen an Malzwurzelkeimen über die Extraktionsdauer dargestellt. Der Startzeitpunkt war eine 10 s lang geschüttelte Suspension, der zur besseren Übersicht gesondert ausgewiesen ist. Alle ermittelten Werte sind in Tabelle D.5 im Anhang D aufgelistet.

Absolut unerwartet gingen bereits nach 10 s sehr große Mengen an FAN in Wasser über. Bei 20 g/L MWK liegen 36 mg/L FAN vor, bei 40 g/L MWK 55 mg/L FAN und bei 100 g/L MWK 164 mg/L FAN.

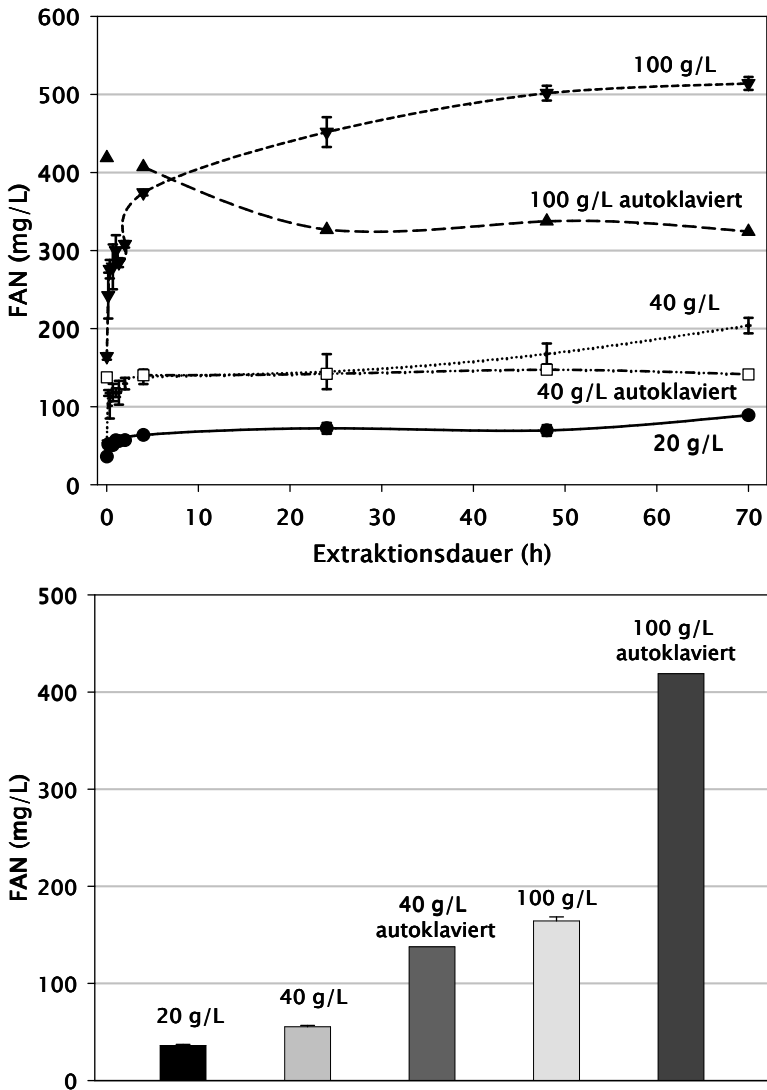


Abbildung 4.3: Extraktion von freiem α -Aminostickstoff (FAN) aus drei Konzentrationen an Malzwurzelkeimen (Schüttelmazeration, Wasser, Quelle A). Autoklavierte Malzwurzelkeime waren vor Beginn der Schüttelmazeration 5 h lang mit Lösungsmittel in Kontakt. Startzeitpunkt der Extraktion gesondert als Balkendiagramm ausgewiesen.

Die autoklavierten Malzwurzelkeim-Extrakte zeigten im Vergleich höhere Anfangswerte, jedoch muss bedacht werden, dass diese ca. 5 h lang im Lösungsmittel während des Autoklavierens lagen. Wird eine nicht autoklavierte Probe nach 5 h betrachtet, ist die Konzentration jedoch gleichwertig. Die Temperatur vermochte die Ausbeute nicht zu erhöhen, allerdings musste auch keine mechanische Einwirkung durch Schütteln vorgenommen werden und gleichzeitig wurden potentielle mikrobielle Schädlinge getötet.

Eine Sättigung der Lösung war bei den nicht autoklavierten Proben bis zu 70 h nicht zu erkennen; in diesem Zeitfenster hat sich kein Gleichgewicht zwischen Flüssigkeit und den extrahierbaren Stoffen eingestellt. Allerdings war nur bei Verwendung von 100 g/L Malzwurzelkeimen ein deutlicher Anstieg bis zum Ende der Schüttelmazeration zu sehen. Bei einer hohen Malzwurzelkeim-Konzentration kann sich eine lange Extraktionsdauer lohnen. Bei den niedriger konzentrierten Extrakten wurde nur noch sehr wenig Stickstoff extrahiert und eine lange Extraktionsdauer ist hier nicht zu empfehlen.

Wird davon ausgegangen, dass 586 mg/L FAN die maximal verstoffwechselbare Stickstoffmenge bei einer Vollbierwürze ist, so wäre bei Verwendung einer Vollbierwürze mit rund 180 mg/L FAN eine Konzentration von 400 mg/L FAN notwendig. Bei Einsatz von 100 g/L Malzwurzelkeimen wäre der Abbruch der Schüttelmazeration nach 5 h zu empfehlen. Mit 20 g/L oder 40 g/L Malzwurzelkeimen waren derart hohe Konzentrationen selbst nach 70 h nicht realisierbar.

Werden die drei Malzwurzelkeim-Konzentrationen von 20 g/L, 40 g/L bis zu 100 g/L verglichen, so ist in diesem Bereich die FAN-Ausbeute zu jeweils einem festen Zeitpunkt in der Größenordnung linear. Dies ermöglicht den Vergleich mit Werten für Malzwurzelkeime aus der Literatur.

Mit sehr hohen Konzentrationen an Malzwurzelkeimen können in kurzer Zeit sehr hohe Mengen an assimilierbaren Stickstoff extrahiert werden. Der Bedarf der Hefe an Stickstoff könnte für den maximalen Zuwachs während der Propagation mit einem Extrakt gedeckt werden.

4.4 Diskussion

Ziel des Kapitels war, einen flüssigen Extrakt aus Malzwurzelkeimen herzustellen, der einer Propagationswürze zur Erhöhung der Nährstoffkonzentration zugesetzt werden kann. Dieser Extrakt sollte hinsichtlich verschiedener Faktoren untersucht werden, um die Ausbeute der Nährstoffe FAN, Zink und Pantothensäure zu optimieren. Hierfür wurden die Einflussgrößen pH-Wert des Extraktionsmittels, Zerkleinerungsgrad, Rohstoffqualität, Extraktionstechnik, Dauer und Temperatur untersucht.

In der Literatur wurde bisher nicht über eine Extraktherstellung aus Malzwurzelkeimen für diesen Zweck berichtet. Nur Methner verwendete in Propagationsversuchen 0,5 g/L bzw. 1 g/L gemahlene Malzwurzelkeime als Additiv zur Würze und erzeugte dadurch eine Steigerung der Hefezellichte um 54 % bzw. 73 % (Methner 1999). In dieser Quelle sind Analysenwerte für Malzwurzelkeime angegeben, die hier zum Vergleich der gewonnenen Daten herangezogen werden. Das lineare Verhalten der Ausbeuten an FAN bei Malzwurzelkeim-Konzentration bis 100 g/L ermöglicht eine Relation zur Literatur. Für Zink und Pantothensäure wird dieses Verhalten ebenfalls angenommen.

Extraktionsmittel. Als Extraktionsmittel für die Malzwurzelkeime kommen gemäß Deutschem Reinheitsgebot Wasser, Würze, Bier (ethanolische Lösung) oder Kohlendioxid in Frage. In dieser Arbeit wurden Wasser und Würze untersucht, deren unterschiedlicher pH-Wert das Extraktionsergebnis beeinflussen sollte. Würze mit einem pH-Wert von 4,7 bis 5 erwies sich bei FAN und Zink als positiv, während Wasser mit einem pH-Wert von 6 bei der Extraktion von Pantothensäure vorteilhafter war.

Mit Würze wurden aus 40 g/L Malzwurzelkeimen 5,1 mg/L Zink extrahiert. Für Zink ist eine Konzentration von 15 mg/100 g Malzwurzelkeime in der Literatur zu finden (Methner 1999) und würde bei Einsatz von 40 g/L Malzwurzelkeimen eine Zinkerhöhung von 6 mg/L ergeben. Dies ist mit dem erzielten Extraktionswert stimmig. Bei Zink ist die hohe Ausbeute auf den niedrigeren pH-Wert der Würze zurückzuführen. Die Löslichkeit von Zink steigt im sauren pH-Bereich ab pH 6

stark an, zwischen pH 6 und 7,5 ist Zink kaum löslich und zwischen pH 7,5 und 11 unlöslich (Schwedt 1996). Eine Verringerung des pH-Wertes erhöht in Würze die Verfügbarkeit des Zinks, da die Bindungskapazität der Metall-Chelator-Komplexe durch Protonen erniedrigt wird. Chelat-Bildner in der Würze sind beispielsweise Aminosäuren und Polyphenole (Lie et al. 1975), so auch Trub, hauptsächlich aus einem Protein-Polyphenolkomplex bestehend. Anzumerken ist, dass bei der Analyse alle in der Lösung vorhandenen Zinkionen erfasst werden. Wird der Extrakt der Propagationswürze zudosiert, kann es sein, dass Zink durch Chelat-Bildung eventuell der Hefe nicht mehr komplett zur Verfügung steht (McLaren et al. 1999). Auf der anderen Seite existieren Untersuchungen, wo selbst Trub-gebundenes Zink von der Hefe assimiliert wird (Kreder 1999, Kühbeck et al. 2006).

Ist das Ziel vorrangig eine hohe Zinkausbeute, sollte Würze als Extraktionsmittel bevorzugt werden. Allerdings ist die Herstellung einer Würze kostenintensiv, Wasser im Vergleich ein günstiger Rohstoff. Bei entsprechend hoher Konzentration an Malzwurzelkeimen können auch mit Wasser Zinkausbeuten erreicht werden, die für die maximale Hefevermehrung benötigt werden. Denkbar wäre auch einen Teil des Extraktes mit Würze herzustellen, um den Zinkanteil zu erhöhen. Die bessere Variante ist sicherlich eine biologische Säuerung des Extraktionsmittels Wassers zur Erniedrigung des pH-Wertes.

Außerdem muss bedacht werden, dass bei Würze als Extraktionsmittel ein hoher Anteil an assimilierbaren Zuckern und anderen Stoffen vorliegt. Würde dieser Extrakt zu einer Propagationswürze gegeben, werden all diese Stoffe mitdosierte. Der hohe Zuckergehalt hätte negative Auswirkungen auf das Hefewachstum.

Die FAN-Ausbeute bei Extraktion mit Würze war gegenüber Wasser nur geringfügig höher. Auch die Löslichkeit von Aminosäuren ist pH-abhängig, allerdings ist der Einfluss des pH-Wertes für den FAN zu gering, um Würze als Extraktionsmittel zu empfehlen. Außerdem stellt Würze immer eine erhöhte Kontaminationsgefahr dar. Allerdings beinhaltet auch Wasser ein Risiko; bei langen Extraktionszeiten waren Proben oftmals durch die vermutlich auf den Malzwurzelkeimen befindlichen Milchsäurebakterien kontaminiert. Die Verwendung von Würze als Extraktionsmittel sollte immer in Zusammenhang mit einer Sterilisation oder Pasteurisation durchgeführt werden, bei Wasser und gleichzeitig hoher Extraktionsdauer ebenfalls.

Pantothensäure wurde mit Wasser um 115 % besser extrahiert als mit Würze. Der niedrigere pH-Wert der Würze ist von Nachteil. Pantothensäure ist in Wasser löslich, aber äußerst instabil, die Salze hingegen sind stabil. In pH-neutraler Lösung wird Pantothensäure bei 2-8 °C für vier Tage als stabil beschrieben (Stein & Jauch 2003), das Optimum der Stabilität liegt in einem pH-Bereich von 4-6 (Pietrzik et al. 2007). Zwar liegt der Würze-pH in diesem stabilen Bereich, die Lagerart und -dauer könnten jedoch das Ergebnis beeinflusst haben. Die Proben wurden eingefroren und bis zur Analyse bei -18 °C für mehrere Tage aufbewahrt. Die geringere Extraktionsausbeute mit Würze ist demnach eher auf Instabilität als auf geringe Löslichkeit zurückzuführen.

Im Vergleich zur Literatur war der maximale erreichte Wert von 0,22 mg/L Pantothensäure (Würze, 40 g/L Malzwurzelkeimen) generell sehr niedrig. Die Bestimmung erfolgte laut MEBAK für die freie Pantothensäure (Pfenninger 1996). Methner gibt für den Gehalt an Pantothensäure in Malzwurzelkeimen einen Wert von 9,6 mg/100 g an (Methner 1999). Wird davon ausgegangen, dass die gesamte Vitaminmenge in Lösung geht, würde bei beispielsweise 40 g/L Malzwurzelkeimen eine Erhöhung des Pantothensäuregehaltes des Mediums um 3,84 mg/L stattfinden. Priest und Stewart veröffentlichen einen Pantothensäuregehalt von 8,6 ppm in Malzwurzelkeimen (Priest & Stewart 2006). Die angegebenen Werte sind deutlich höher als die durch Extraktion erreichten Konzentrationen. Die Analysenarten sind bei beiden Quellen nicht erwähnt, möglicherweise wurde nicht nur wie hier die freie Pantothensäure ermittelt, sondern auch die gebundene Form (Acetyl-Coenzym A). Der Fehler der mikrobiellen Bestimmung von Pantothensäure mittels *Lactobacillus plantarum* war generell sehr hoch; die Variationskoeffizienten lagen zwischen 3 und 10 %.

Ist das Ziel ein hoher Gehalt an Pantothensäure, ist Wasser als Extraktionsmittel zu empfehlen. Die Pantothensäure ist bei neutralem pH stabiler als bei saurem Würze-pH. Für eine exakte Bestimmung der Konzentrationen sollte eine Analytik mit kleinem Fehler gewählt werden.

Zerkleinerungsgrad. Das Zermahlen der Malzwurzelkeime sollte zeigen, ob durch die damit verbundene Oberflächenvergrößerung die Ausbeuten erhöht werden. Eine Zerkleinerung des Materials erzeugt normalerweise eine Vergrößerung der Angriffsfläche für das Extrakti-

onsmittel. Zusätzlich werden die Zellen der Malzwurzelkeime mechanisch beschädigt, was ein Herauslösen der Stoffe begünstigt. Hierfür wurden die Malzwurzelkeime mit einer Hammermühle pulverisiert und mit ganzen, unbehandelten Malzwurzelkeimen verglichen. Das Zermahlen der Malzwurzelkeime lieferte bei einer 1 h Schüttelmazeration keinen Vorteil hinsichtlich der Extraktionsausbeuten. FAN war bei gemahlene Malzwurzelkeimen um 13 % höher, bei Zink lag kein Unterschied vor und bei Pantothensäure war die Ausbeute sogar um 6 % geringer. Extraktivstoffe können durch eine Auswaschphase, der ersten Phase der Extraktion, bei beschädigten Zellen schlagartig ins Extraktionsmittel übergehen. In der darauf folgenden eigentlichen Extraktionsphase muss das Lösungsmittel erst in intakte Zellen eindringen und quillt dabei die trockenen Malzwurzelkeime auf. Nachdem die Stoffe im Extraktionsmittel gelöst sind, diffundieren diese aus den Zellen heraus, wobei der Konzentrationsgradient die treibende Kraft darstellt. Allerdings kann ein zu kleiner Mahlgrad dazu führen, dass der Extraktivstoff sorptiv am Ausgangsmaterial gebunden ist und eine Abtrennung erschwert (Voigt 1987). Es ist davon auszugehen, dass die Zellen der Malzwurzelkeime bereits stark geschädigt waren und deshalb kein signifikanter Unterschied zwischen ganzen und gemahlene zu erkennen war. Eine thermische Belastung des Materials, welche beim Darren entsteht, erzeugt eine spröde Substanz. Der Trocknungsprozess führt zu Beschädigungen der Membranstruktur und ändert die Permeabilität. Eine mechanische Belastung durch das Malzputzen ist eher unwahrscheinlich.

Der Bearbeitungsschritt einer Zerkleinerung ist demnach unnötig. Bei einer Extraktion wird empfohlen, ganze Malzwurzelkeime zu verwenden, da diese eine einfachere Abtrennung vom Lösungsmittel als ein Pulver ermöglichen.

Zeitlicher Verlauf. Die Untersuchung des zeitlichen Extraktionsverlaufes von FAN sollte klären, ob bei langen Extraktionszeiten eine Sättigung der Lösung auftritt und ob ein optimaler Zeitpunkt für den Abbruch der Extraktion für FAN gefunden werden kann. Hierfür wurden Verläufe bis zu 70 h Extraktionsdauer aufgezeichnet.

Bereits nach 1 h Schüttelmazeration konnten hohe Mengen an FAN von 300 mg/L in Wasser detektiert werden (100 g/L Malzwurzelkei-

me). Aus diesem Grund wurden Extraktionszeiten im Sekunden- und Minuten-Intervall untersucht. Nach 10 s schütteln wurden 164 mg/L FAN detektiert. Dieser Wert war unerwartet hoch. Nach 10 min wurden 243 mg/L FAN extrahiert und entspricht damit fast der Hälfte der nach 70 h löslichen FAN-Menge von 515 mg/L.

Für Aminosäuren gibt Methner 33800 mg/100 g Malzwurzelkeime an (Methner 1999), was bei Verwendung von 100 g/L Malzwurzelkeimen einen zusätzlichen Eintrag von 33800 mg/L ergeben würde. Dieser enorm hohe Wert konnte durch Extraktion nicht beobachtet werden. Methner setzte 1 g/L gemahlene Malzwurzelkeime während einer Propagation ein, was 338 mg/L FAN entspräche. Selbst nach 70 h und 20 g/L Malzwurzelkeimen, also der 20-fachen Menge von Methner, wurden in dieser Arbeit nur 89 mg/L FAN in Wasser gelöst. Möglicherweise sind statt Aminosäuren Proteine gemeint, denn andere Quellen sprechen von ca. 30 % Eiweiß bei Malzwurzelkeimen (Kunze 2007). Auch durch das Lösungsmittel Würze, einer besseren Rohstoffqualität sowie durch eine Zerkleinerung der Malzwurzelkeime dürfte sich das Ergebnis aufgrund der hier erarbeiteten Resultate nicht drastisch verändern.

Eine HPLC-Analyse über die genaue Zusammensetzung des FAN könnte die hohen Mengen bei sehr kurzen Extraktionszeiten beleuchten. FAN ist ein Summenparameter für die Aminosäuren, kleine Peptidmoleküle (Di- und Tripeptide) sowie Ammoniumionen (Lekkas et al. 2005). Die unterschiedlichen Molekulargewichte resultieren in verschiedenen Diffusionskoeffizienten und -zeiten. Hierbei werden Aminosäuren mit großen Molekulargewichten am schwersten aus den Malzwurzelkeimen diffundieren. Es ist also anzunehmen, dass sich die hohen Extraktionsmengen der ersten Minuten aus Aminosäuren kleinerer Molekulargewichte bei gleichzeitig guter Löslichkeit in Wasser zusammensetzen. Ist dies nicht der Fall, kann von einer Beschädigung und einer starken Auswaschung der Zellen ausgegangen werden.

Die Entscheidung für den genauen Abbruch der Extraktion ist nach dem jetzigen Stand nicht eindeutig zu klären, falls es tatsächlich eine Verteilung der Aminosäuren über die Extraktionszeit gibt. Einige Aminosäuren rufen einen inhibitorischen und einige einen stimulierenden Effekt auf das Hefewachstum hervor. Glycin beispielsweise mit einem Molgewicht von 75,07 g/mol und einem hohem Diffusionskoeffizienten ist bei Gärungen als exogener Zusatz inhibitorisch (Thomas & Ingle-

dew 1990) und wird vermutlich leicht aus den Malzwurzelkeimen herausgelöst. Lysin (146,19 g/mol) ist stimulierend, während Methionin (149,21 g/mol) inhibitorisch ist (Lekkas et al. 2005). Die genaue Zusammensetzung des Extraktes ist für den Einsatz während der Propagation unerlässlich. Eine lange Extraktionsdauer steht in keinem Verhältnis zur Ausbeute, auch wenn nach 70 h bei hohen Malzwurzelkeim-Konzentrationen noch keine Sättigung anzutreffen ist. Die Extraktion sollte nicht länger als 25 h dauern. Weiterhin ist interessant, wie die Verläufe von Zink und Pantothersäure aussehen. Diese Daten könnten die Entscheidung erleichtern und den zeitlichen Rahmen einengen.

Rohstoffqualität. Die Untersuchung von drei Malzwurzelkeim-Mustern aus drei Mälzereien sollte Aufschluss über die Rohstoffqualität geben. Vor den Versuchen wurden die Muster mit einem Plansichter gesiebt, um Verunreinigungen abzutrennen und so nur die Eigenschaften der Malzwurzelkeime zu beurteilen. Die Herkunftsquelle der Malzwurzelkeime hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute. Für jeden Zielstoff war eine andere Quelle von Vorteil, bei Quelle A die Zink-Ausbeute, bei Quelle B die FAN-Ausbeute und bei Quelle C die Pantothersäure-Ausbeute. Quelle C zeigte prinzipiell schlechte Ausbeuten bei FAN und Zink. Dieses Malzwurzelkeim-Muster war bereits stark vorzerkleinert und konnte von eventuell vorliegenden Verunreinigungen mit dem Plansichter nicht befreit werden. Die niedrigen Ausbeuten sind vermutlich darin begründet. Über die zur Verfügung gestellten Muster war nicht bekannt, um welche Gerstensorte, welchen Mälzungsprozess (Keimdauer/Darrtemperatur) und welche Lagerart und -dauer es sich handelte. Weitere Untersuchungen mit diesen Informationen sind zur Korrelation der gewonnenen Daten notwendig. Voruntersuchungen über die Rohstoffeigenschaften sind unabdingbar, wenn Nährstoffe optimal und gezielt extrahiert werden sollen.

Temperatur. Eine Erhöhung der Temperatur führt im Allgemeinen zu einer erhöhten Diffusion. Aus diesem Grund wurde eine Schüttelmazeration bei Raumtemperatur durchgeführt und einer Digestion bei 85 °C gegenübergestellt. Die Temperatur zeigte einen positiven Effekt auf das Herauslösen der Stoffe. Die Digestion benötigte nur 3/4 der Extraktionszeit, um die gleichen Größenordnungen an Konzentrationen wie bei den Schüttelmazerationen zu erlangen. Der wesentlich höhere ener-

getische Aufwand sollte bei der Wahl der Extraktionstechnik bedacht werden, ebenso wie die Temperaturstabilität der Extraktivstoffe. Eine Aktivierung von Enzymen bei Verwendung höherer Temperaturen kann zum Abbau gewünschter Inhaltsstoffe führen. Die Kontaminationsgefahr des Extraktes durch lebende Keime auf den Malzwurzelkeimen führt jedoch zur Empfehlung der Anwendung höherer Temperaturen. Dieser positive Effekt der Temperatur auf das Herauslösen der Stoffe kombiniert gleichzeitig einen Schritt zur Keimreduktion.

Schlussfolgerung. Aus Malzwurzelkeimen können hohe Konzentrationen an FAN, Zink und Pantothensäure extrahiert werden. Aufgrund der gewonnen Daten wird empfohlen, eine hohe Konzentration an Malzwurzelkeimen (100 g/L) zu verwenden, diese unzerkleinert mit Wasser zu versetzen und anschließend zu autoklavieren oder pasteurisieren. Eventuell sollte eine biologische Säuerung des Wassers zur pH-Wert-Senkung erfolgen. Die Qualität der Malzwurzelkeime muss in Vorversuchen getestet werden, da die Ausbeuten stark von der Rohstoffqualität abhängen. Aufgrund der guten Resultate und hohen Ausbeuten ist die Herstellung eines Extraktes zur Nährstofferrhöhung während der Propagation sinnvoll.

5 Propagationsversuche zur Steigerung der Zelldichte

5.1 Zusammenfassung

Bierwürze ist ein Komplexmedium, welches im Allgemeinen Stickstoff, Zink und Pantothensäure in nicht ausreichender Konzentration für die maximale Hefevermehrung enthält. Als erstes sollte geklärt werden, welcher dieser drei Mangelnährstoffe der am meisten limitierende Faktor des Hefewachstums ist. Als zweites sollte die Hefeausbeute nach Deutschem Reinheitsgebot während der Propagation maximiert werden. Mit einem synthetischen Medium und einem vollfaktoriellen Versuchsplan wurde herausgefunden, dass nach 26 h der Propagation Stickstoff ($p < 0,0001$) und Zink ($p = 0,0018$) signifikante Einflussgrößen auf die Zelldichte waren, Pantothensäure hingegen nicht ($p = 0,574$). Zwischen FAN und Zink bestand eine Wechselwirkung ($p = 0,0013$), d. h. bei einer hohen Zinkkonzentration konnte bei guter Stickstoffversorgung die Ausbeute weiter gesteigert werden. Dieses Ergebnis wurde auf ein würzebasiertes System durch die Dosierung von Zinkchlorid, Zinksulfat, Pantothensäure, Glutamin und Glycin übertragen und gilt hier ebenfalls.

Für die Erhöhung der Zelldichte nach Deutschem Reinheitsgebot wurde ein Malzwurzelkeim-Extrakt hergestellt und einer Würze zudosiert. Ein durch einstündige Schüttelmazeration produzierter Extrakt aus 100 g/L Malzwurzelkeimen erhöhte den assimilierbaren Stickstoffgehalt des Mediums von 177 mg/L auf 472 mg/L. Bezogen auf den assimilierten Stickstoff wurden gleiche Zelldichten wie mit der synthetischen Stickstoffquelle Glutamin erreicht. Innerhalb von 26 h erzielte die Zugabe des Malzwurzelkeim-Extrakts eine Zelldichte von 198 Mio./mL und entsprach einer Anhebung um 50 %. Maximale Hefezelldichte lagen nach 42 h bei 282 Mio. Zellen/mL. Dies entsprach einer Zunahme von 112 %.

Malzwurzelkeime stellen ein geeignetes Additiv zur Nährstofferhöhung nach Deutschem Reinheitsgebot dar.

5.2 Einleitung

Hefepropagationen dienen in der Brauereitechnologie der Zellvermehrung, um eine ausreichende Menge an frischer Hefe zum Vergären der Würze zu Bier bereitzustellen. Die Bierwürze ist ein Komplexmedium, welches im Allgemeinen alle notwendigen Nährstoffe für die Bierhefe enthält. Nach Annemüller *et al.* (2008) liegen freier α -Aminostickstoff (FAN), Zink und Pantothersäure in einer Vollbierwürze defizitär vor, um die maximal mögliche Hefeausschüttung zu erreichen. Sie vermuten, dass die Hefevermehrung hauptsächlich in der erforderlichen Stickstoffmenge limitiert ist (Annemüller *et al.* 2008). In Versuchen von Methner resultierte die alleinige Zugabe von 0,5 g/L gemahlenen Malzwurzelkeimen zur Würze in einer Steigerung der Hefeausschüttung von 54 %. Er vermutet, dass die bessere Ausstattung der Würze an Zink, Wachstumsstoffen und Spurenelementen sowie ungesättigten Fettsäuren zu einer besseren Hefevermehrung führt (Methner 1999). Welcher Stoff nun wirklich ausschlaggebend ist, ist nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Hefepropagation nach Deutschem Reinheitsgebot optimiert werden. Malzwurzelkeime als Bestandteil der Gerste sind demnach als Additive für den zusätzlichen Eintrag an Nährstoffen in die Würze möglich. Im Kapitel 4 wurde erfolgreich ein Extrakt aus Malzwurzelkeimen hergestellt, der während einer Propagation zudosiert werden soll. Über diesen Extrakt und über die verwendete Würze sind die Konzentrationen an assimilierbarem Stickstoff (FAN), Zink und Pantothersäure bekannt und damit eine Bewertung der Ergebnisse möglich.

Die zweite Fragestellung ist, welche Zelldichte durch den Einsatz des Malzwurzelkeim-Extrakts erreicht werden kann und wo dieses Ergebnis steht. Hierzu wird ein Abgleich mit Daten vorgenommen, die über die Dosage von synthetischen Nährstoffen zu einer Würze erzielt werden sollen. In dem Komplexmedium Würze könnten andere Effekte als bei Verwendung eines rein synthetischen Mediums auftreten. Dies soll ausgeschlossen werden.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Nährstoffversuche mit synthetischem Medium

Durch die Verwendung eines synthetischen Mediums mit bierwürze-ähnlichen Konzentrationen (Tabelle 3.1) sollte geklärt werden, welcher der normalerweise in der Würze defizitären Stoffe die größte Einflussgröße auf die Hefeausbeute ist. Mit diesem Medium als Basis wird ein vollfaktorieller Versuchsplan (Kapitel 3.3) erstellt, dessen Einflussgrößen FAN, Zink und Pantothensäure sind. Zielgröße ist die maximale Zelldichte. Vorteil des Versuchsplans ist, im Gegensatz zur unifaktoriellen Änderung von Einflussgrößen, die Möglichkeit zur Erfassung von Wechselwirkungen zwischen diesen. Der Nullversuch hatte 200 mg/L FAN, 0,15 mg/L Zink und 0,5 mg/L Pantothensäure. Dieser wurde sechs Mal unabhängig voneinander wiederholt und bildet die Grundlage des linearen Zusammenhangs der Ergebnisse. Die untere und obere Stufe für FAN war 100 mg/L und 300 mg/L, für Zink 0,05 mg/L und 0,25 mg/L sowie für Pantothensäure 0,1 mg/L und 0,9 mg/L (Tabelle 3.3).

In Abbildung 5.1 ist der zeitliche Verlauf der Zelldichte in einer 26-stündigen Propagation zu sehen. Die Nullversuche endeten bei einer Hefekonzentration von 137 Mio./mL. Mit den jeweils höchsten Stufen wurden ca. 205 Mio. Zellen/mL erreicht. Ausgehend von den Nullversuchen entsprach dies einer Anhebung um 50 %. Dieser Wert wurde auch erreicht, wenn jeweils die obere Stufe von FAN und Zink gewählt wurde, aber die untere Stufe von Pantothensäure. Lag ein Zinkmangel mit 0,05 mg/L vor, so konnte dieser mit einer hohen FAN-Konzentration ausgeglichen werden, unabhängig davon, ob viel oder wenig Pantothensäure vorhanden war. Der Metabolismus verlangsamte sich jedoch. War FAN der limitierende Faktor, so wurden in allen Fällen maximal 83 Mio. Zellen/mL erreicht. Durch Anhebung des FAN von 100 mg/L auf 300 mg/L wurde die Zelldichte um 65 % maximiert. Wurde zusätzlich Zink von 0,05 mg/L und 0,25 mg/L angehoben, nahm die Zelldichte um 147 % zu.

Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab, dass die Einflussgrößen FAN ($p < 0,0001$) und Zink ($p = 0,0018$) sowie die Wechselwirkung zwischen FAN und Zink ($p = 0,0013$) signifikant waren. Pantothensäure hingegen war nicht signifikant ($p = 0,574$). Wechselwirkungen zwischen Pantothensäure und den anderen Faktoren existierten nicht (Tabelle 5.1). Die beobachteten Randmittelwerte für die drei Einflussgrößen zum Zeitpunkt 26 h sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Eine niedrige Pantothensäurekonzentration (links) sowie eine hohe Pantothensäurekonzentration (rechts) führten zu dem gleichen Verhalten. War der FAN niedrig, bewirkte Zink keine Steigerung der Hefezelldichte. War der FAN hoch, so konnte durch eine hohe Zinkkonzentration die Ausbeute weiter erhöht werden.

FAN ist für diese Bedingungen der am stärksten limitierende Faktor. Pantothensäure spielt keine Rolle und Zink beeinflusst die Ausbeute positiv und kann zusammen mit einer hohen FAN-Konzentration diese weiter steigern.

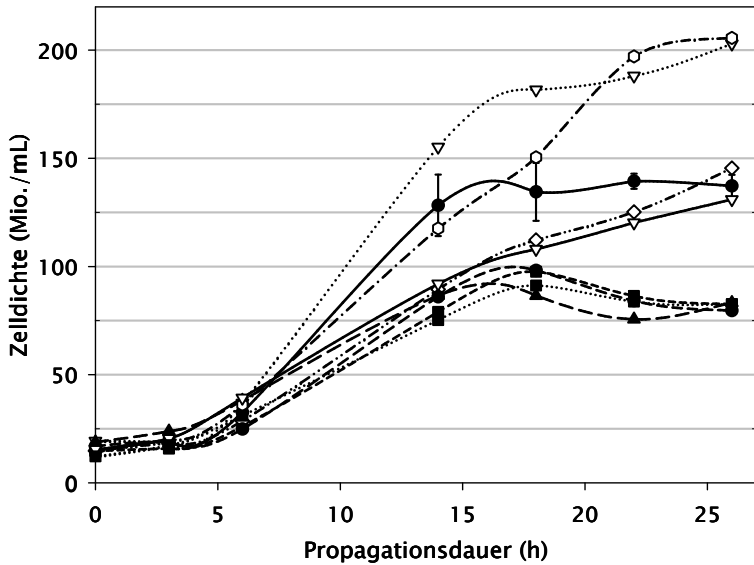


Abbildung 5.1: Verlauf der Zelldichte des Hefestammes Rh in einem synthetischen Medium, dessen Nährstoff-Zusammensetzung einer Würze nachempfunden sind. Variiert werden die Nährstoffkonzentrationen von FAN, Zink (Zn) und Pantothersäure (PS) im Rahmen der statistischen Versuchsplanung. Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Nullversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

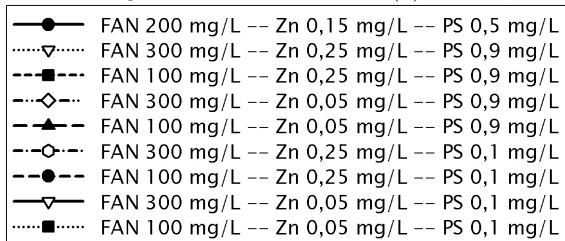


Tabelle 5.1: Varianzanalyse des Zeitpunkts 26 h der Propagationen des Hefestammes Rh in einem synthetischen Nährmedium mit den Einflussgrößen FAN, Zink und Pantothensäure. Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. $r^2 = 0,971$.

	SQ	FG	MQ	F-Wert	p-Wert
FAN (1)	15935,59	1	15935,59	185,2778	0,000003
Zink (2)	2062,43	1	2062,43	23,9791	0,001759
Pantothensäure (3)	29,84	1	29,84	0,3469	0,574372
1 * 2	2303,51	1	2303,51	26,7821	0,001288
1 * 3	8,30	1	8,30	0,0965	0,765076
2 * 3	27,57	1	27,57	0,3205	0,588992
Fehler	602,06	7	86,01		
Gesamt-SQ	20969,29	13			

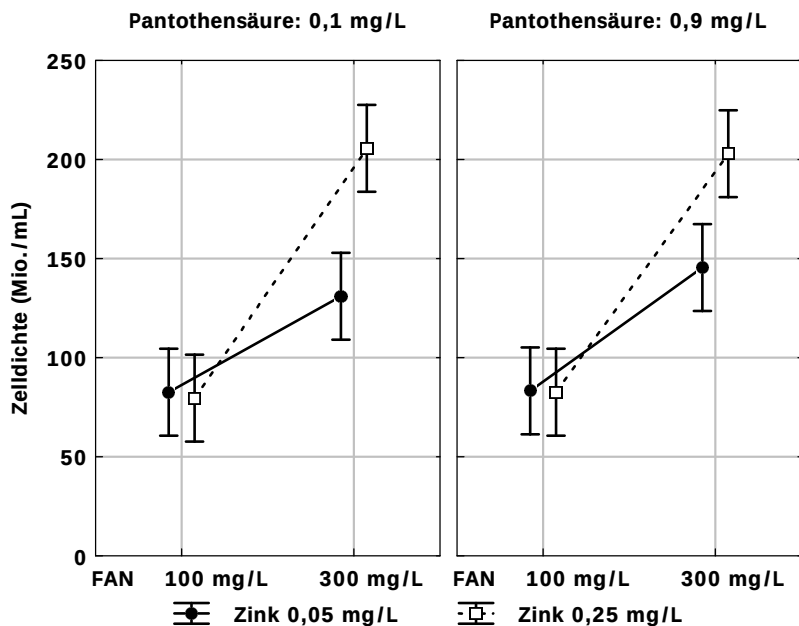


Abbildung 5.2: Beobachtete Randmittelwerte für die Einflussgrößen FAN, Zink und Pantothensäure während der Propagation des Hefestammes Rh bei 25 °C in einem synthetischen Medium für den Zeitpunkt 26 h.

5.3.2 Dosage von synthetischen Nährstoffen zur Würze

Die Ergebnisse mit dem synthetischen Medium führten zu der Überlegung, ob diese Aussagen für FAN, Zink und Pantothensäure auch innerhalb einer Würzematrix gelten. Hierfür wurde ein Medium aus Malzextrakt verwendet (siehe Kapitel 3.1.2), dessen Konzentrationen bei FAN = 177 mg/L, Zink = 0,18 mg/L und Pantothensäure = 0,18 mg/L lagen (Referenzversuch), und zu einer Zelldichte von durchschnittlich 133 Mio./mL führte. Die angegebenen Konzentrationen der im Folgenden zudosierten Nährstoffe sind immer die eingestellten Werte zu Beginn der Propagation.

Zusatz von Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothensäure. Als erstes sollte geklärt werden, ob die Zugabe von Zink und Pantothensäure zur Würze eine Auswirkung auf die Hefeausschüttung hat. In der Literatur ist zu finden, dass ein Unterschied besteht, ob als Zinkquelle Zinksulfat oder Zinkchlorid verwendet wird (McLaren et al. 1999). Aus diesem Grund wurden die beiden Zinkquellen in Versuchen verglichen. Unabhängig davon, ob Zink als Zinksulfat oder Zinkchlorid in einer Startkonzentration von 0,5 mg/L verwendet wurde, konnte keine Erhöhung der Zelldichte nach 26 h hervorgerufen werden. Eine hohe Pantothensäurekonzentration bewirkte ebenfalls keinen Effekt. Lediglich mit einer Zinksulfat-Konzentration von 1,17 mg/L wurde ein geringfügig erhöhter Wert von 18 % festgestellt. Unterschiede im Verlauf des scheinbaren Extrakts, des FAN und des Ethanols waren nicht signifikant (Anhang E).

Würze mit einer Zink-Konzentration von 0,18 mg/L und Pantothensäure von ebenfalls 0,18 mg/L war bei einer vorliegenden FAN-Konzentration von durchschnittlich 177 mg/L ausreichend für das Wachstum. Eine Anhebung der beiden Nährstoffe führte zu keiner Ausbeutesteigerung; somit ist Stickstoff der limitierende Faktor. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit synthetischem Medium war dies für Pantothensäure stimmig. Bei den Zinkversuchen sollte sich theoretisch eine leichte Erhöhung der Zelldichte ergeben, die aber vermutlich innerhalb der hohen Standardabweichung der Zelldichte lag.

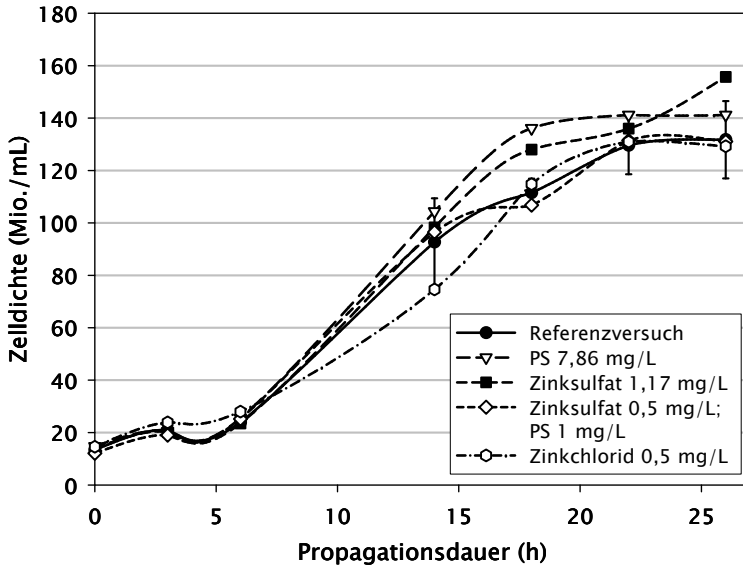


Abbildung 5.3: Verlauf der Zelldichte des Hefestammes W34/70 während der Propagation bei 25 °C mit Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothenensäure (PS) als Zusatz zur Würze; die angegebenen Konzentrationen sind berechnete Werte zu Beginn des Versuches. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

Zusatz von Glutamin und Glycin zur Würze. Annemüller *et al.* vermuten, dass die Hefevermehrung hauptsächlich in der erforderlichen Stickstoffmenge limitiert ist (Annemüller *et al.* 2008). Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Schritt Stickstoffquellen zudosiert. Hierfür wurden Glutamin und Glycin ausgewählt, die aus zwei unterschiedlichen Assimilationsgruppen stammen (Tabelle 2.4). Glutamin ist aus Gruppe A und wird von der Hefe bevorzugt aufgenommen, Glycin ist aus Gruppe C und wird drittrangig assimiliert. Zink und Pantothenensäure werden zu Versuchsbeginn auf 0,5 bzw. 1 mg/L aufgestockt, sodass diesbezüglich keine Limitierung vorliegen sollte und der reine Einfluss des Stickstoffs untersucht werden kann. Zum einen wurde ein direkter Vergleich zwischen Glutamin und Glycin gezogen, um zu

sehen, ob die Assimilationsgruppe Auswirkungen auf die erreichbare Zelldichte hat. Zum anderen sollte mit Glutamin untersucht werden, ab welcher FAN-Konzentration kein weiterer Hefezuwachs möglich ist.

Die Aminosäuren Glycin und Glutamin wurden derart zugegeben, dass eine gleiche anfängliche Konzentration von 292 mg/L FAN eingestellt wurde. Die Zelldichte mit Glutamin endete bei 195 Mio./mL (+ 47 %) und mit Glycin bei 178 Mio./mL (+ 34 %). Das Wachstum schien mit Glycin als Stickstoffquelle geringer zu sein, überschneit sich jedoch mit der Standardabweichung des Zelldichteverlaufs von Glutamin.

Höhere Dosagen an Glutamin ergaben eine höhere Zelldichte von rund 270 Mio./mL (+ 103 %) zum Zeitpunkt 26 h, ein eindeutiger Unterschied zwischen den Konzentrationen 438 mg/L, 584 mg/L und 1168 mg/L FAN war nicht zu erkennen (Abbildung 5.4, Bild A). Im Verlauf der FAN-Konzentrationen in Bild B ist zu sehen, dass bei einer Dosage von 1168 mg/L nach 26 h ein reichlicher Überschuss vorlag, den die Hefe nicht verwerten konnte. Die Hefe assimilierte innerhalb von 26 h 458 mg/L FAN bei einem Startwert von 1168 mg/L FAN. Bei der Propagation mit Startwert 584 mg/L FAN nahm die Hefe in der gleichen Zeit 465 mg/L FAN auf und es waren noch 80 mg/L FAN nach 26 h im Medium vorhanden. Mit einer Konzentration von 438 mg/L FAN war für die Hefe bereits nach 22 h kein assimilierbarer Stickstoff mehr vorhanden, der Restgehalt der Würze lag bei 40 mg/L FAN.

Demnach ist bei Verwendung von rund 88 g/L vergärbaren Zuckern (Weyermann®-Malzextrakt „Bavarian Pilsener“) eine FAN-Konzentration von 584 mg/L für den maximalen Zuwachs notwendig. Höhere Konzentrationen werden nicht assimiliert.

Der Verlauf des scheinbaren Extrakts (Abbildung 5.5, Bild A und Bild B normiert) hingegen wies einen klaren Unterschied zwischen der Stickstoffquelle Glycin und Glutamin mit je 292 mg/L FAN auf. Die geringen Standardabweichungen belegen dies. Mit Glycin als Substrat endete der scheinbare Extrakt nach 26 h bei 6,5 % und mit Glutamin bei 5,3 %. Mit den höher dosierten Stickstoffquellen wurde ein scheinbarer Extrakt von ca. 3,7 % erreicht.

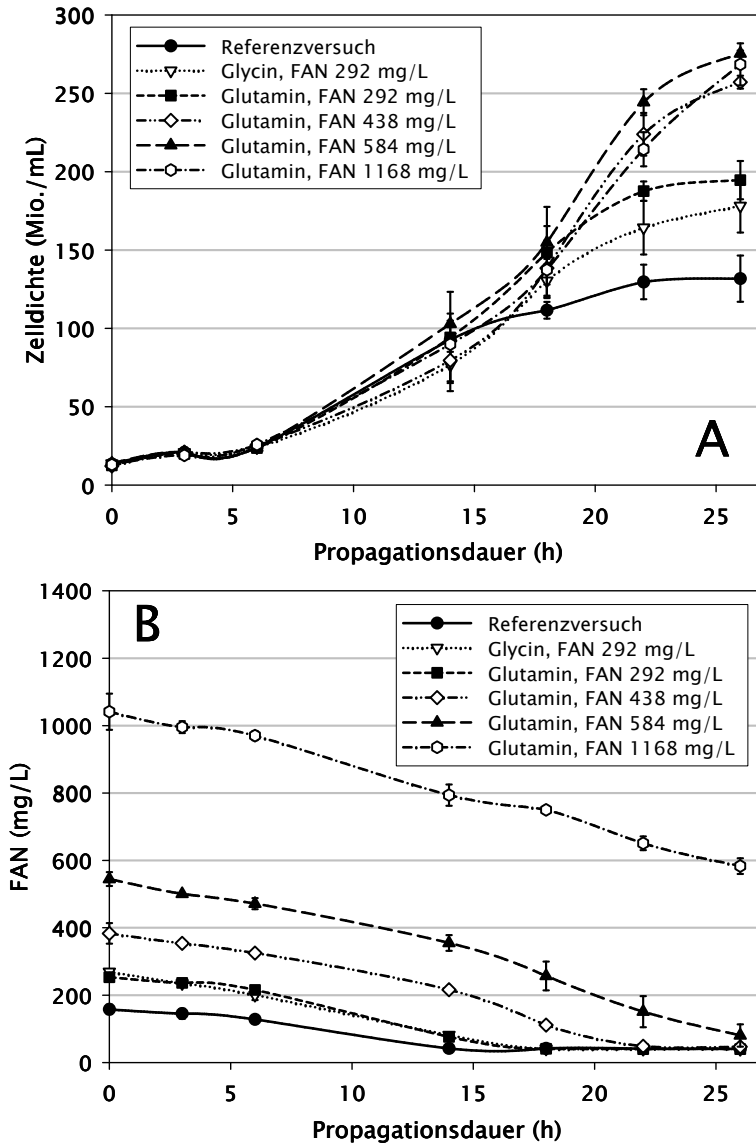


Abbildung 5.4: Verlauf der Zelldichte (A) und des FAN (B) während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze; die angegebenen Konzentrationen sind berechnete Werte zu Beginn des Versuches. Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 2$.

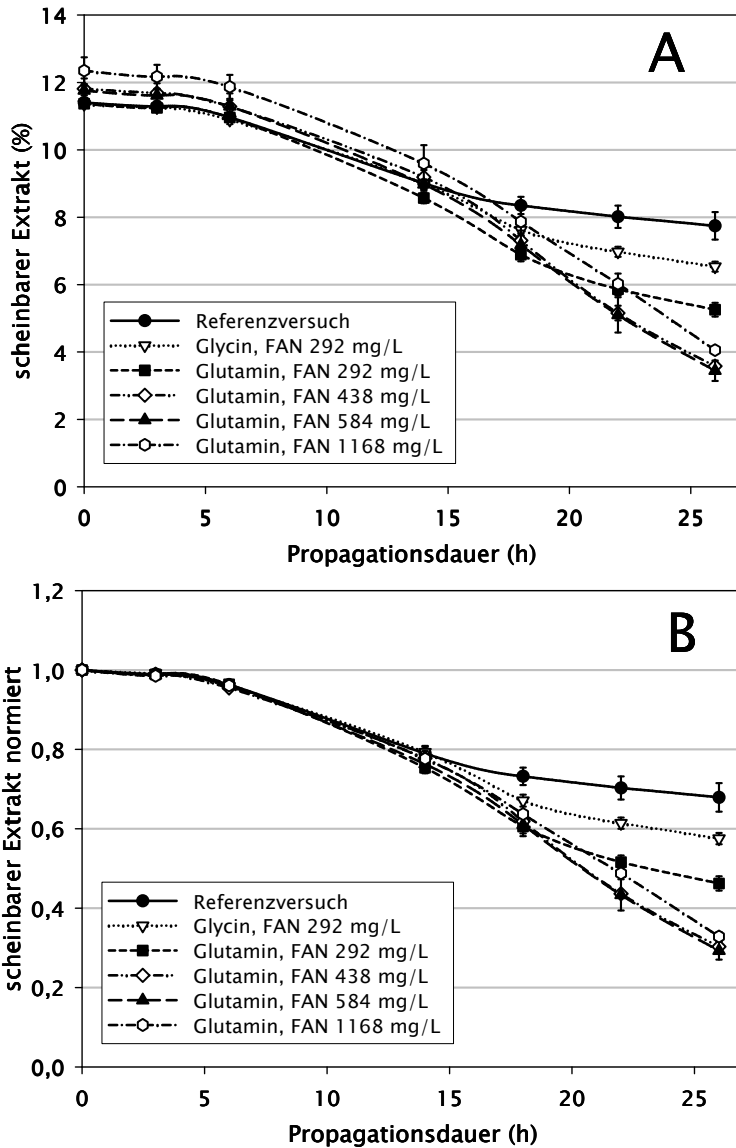


Abbildung 5.5: Verlauf des scheinbaren Extrakts (A) und normiert (B) während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 2$.

Auch die Ethanolbildung während der Propagation zeigte eine deutliche Differenz zwischen dem Glutamin- und dem Glycinversuch (Abbildung 5.6). Bei gleicher FAN-Konzentration von 292 mg/L wurden mit Glycin als Substrat 1,4 Vol % Ethanol und mit Glutamin 1,9 Vol % gebildet. Mit 1168 mg/L FAN wurde die höchste Konzentration von 3,2 Vol % erreicht, mit 438 mg/L und 584 mg/L FAN rund 2,9 Vol % Ethanol.

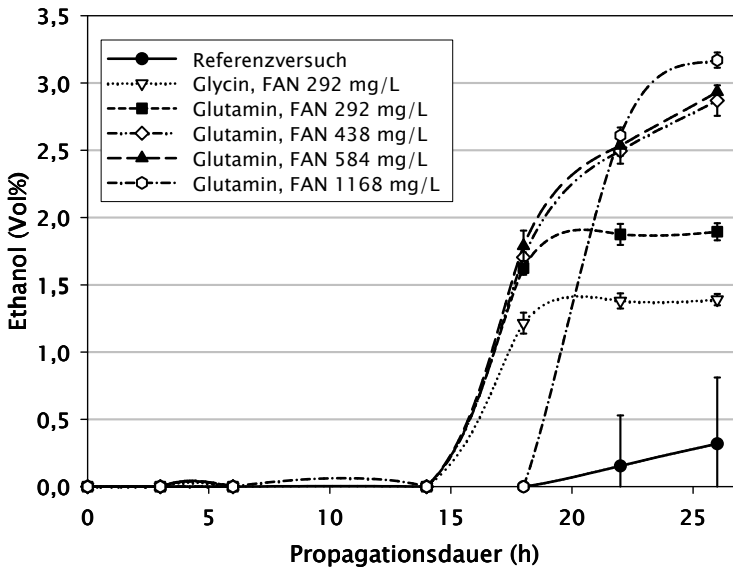


Abbildung 5.6: Verlauf der Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 mit Glutamin und Glycin als Zusatz zur Würze; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 2$.

In den Versuchen konnte ein Unterschied zwischen der Assimilationsgruppe A (Glutamin) und C (Glycin) erkannt werden. Obwohl die Gruppen anhand der Zelldichte nicht ausreichend differenziert werden konnten, war dies beim Extraktabbau und der Ethanolbildung der Fall. Eine Startkonzentration von 584 mg/L FAN mit einer Stickstoffquelle

der Assimilationsgruppe A war für den maximalen Zuwachs innerhalb von 26 h ausreichend. Die Versorgung mit Zink und Pantothensäure war hoch genug angesetzt, sodass der alleinige Einfluss des Stickstoffs in den Versuchen zu erkennen war.

Die auf Würzebasis erzielten Ergebnisse waren mit den Resultaten des synthetischen Mediums stimmig. Bei guter Zink- (0,5 mg/L) und Pantothensäureversorgung (1 mg/L) zu Versuchsbeginn kann durch eine FAN-Erhöhung die Zellausbeute deutlich gesteigert werden. Eine Erhöhung des FAN um 65 % führte zu einer Zelldichtesteigerung von 47 %, eine Anhebung des assimilierbaren Stickstoffs um 230 % zu 103 % Ausbeutesteigerung.

5.3.3 Dosage des Malzwurzelkeim-Extrakts zur Würze

Die Hefepropagation soll nach Deutschem Reinheitsgebot optimiert werden. Hierfür wurde ein Extrakt aus Malzwurzelkeimen hergestellt und der Würze zugegeben. Die mit dem Malzwurzelkeim-Extrakt erreichte Zelldichte soll anhand der bisherigen Ergebnisse mit synthetischen Nährstoffen in Würze und dem synthetischen Medium bewertet werden. Der Malzwurzelkeim-Auszug wurde während zweier Propagationen eingesetzt, einmal mit dem Malzextrakt vermischt (10 L) und einmal als Konzentrat zum standardmäßig angesetzten Malzextrakt hinzugefügt (10,9 L) (Kapitel 3.4). Bild A der Abbildung 5.7 zeigt den Zelldichteverlauf mit Malzwurzelkeim-Extrakt und -Konzentrat. In beiden Fällen wurde nach 26 h eine Zellkonzentration von 198 Mio./mL erreicht, was einer Anhebung ausgehend von 133 Mio./mL des Referenzversuchs um 50 % entsprach. Zum Vergleich ist der Glutamin-Versuch mit einer Konzentration von 292 mg/L FAN mit dargestellt. Dieser führte zum gleichen Resultat. Nach Ablauf der 26 h stieg die Zelldichte bei Versuchen mit Malzwurzelkeim-Auszug weiter an und lag für den Extrakt nach 29 h bei 235 Mio./mL und 77 % Ausbeute-Steigerung. Mit dem Konzentrat wurden nach 42 h 282 Mio./mL (+ 112 %) erreicht. Aufgrund fehlender Daten für die Referenzversuche nach Ablauf der 26 h kann jedoch keine weitere Aussage getroffen werden. Das Wachstum war bei Propagationen mit Malzwurzelkeim-Auszug zu Beginn langsamer als bei Vermehrungen mit Glutamin-Zusatz oder auch bei den Referenzversuchen.

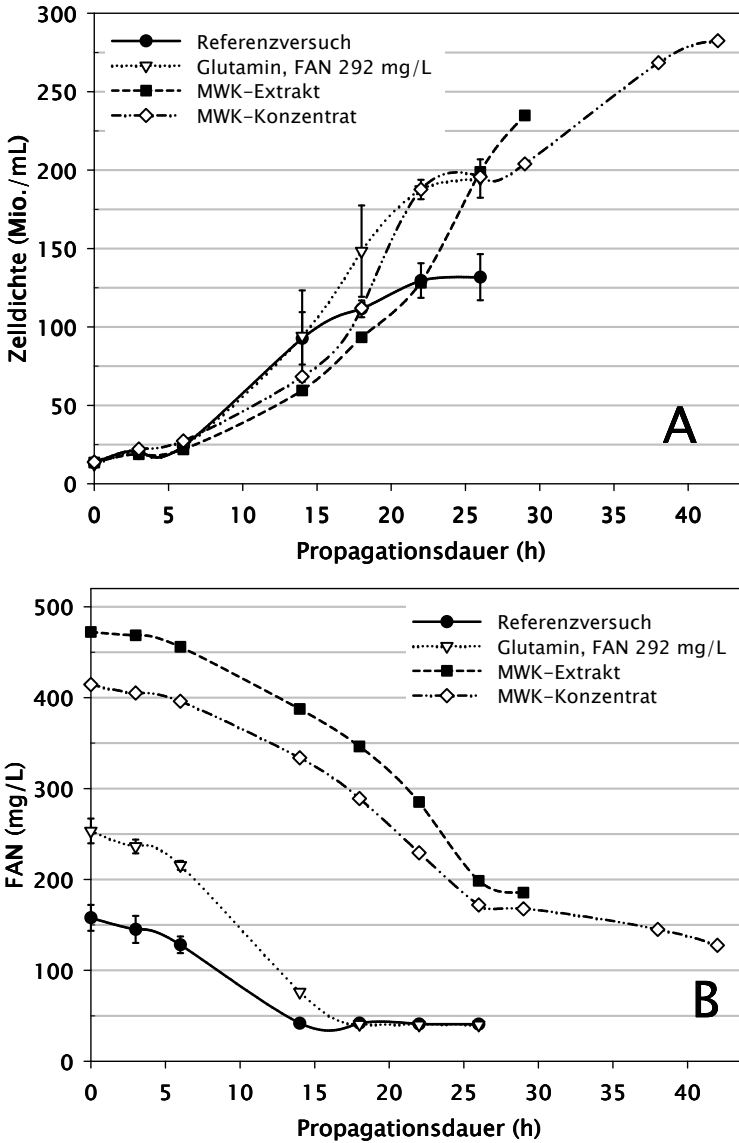


Abbildung 5.7: Verlauf der Zelldichte (A) und des FAN (B) während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Glutamin und Malzwurzelkeim(MWK)-Konzentrat und -Extrakt als Zusatz zur Würze; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, Glutamin $n = 2$, MWK-Versuche $n = 1$.

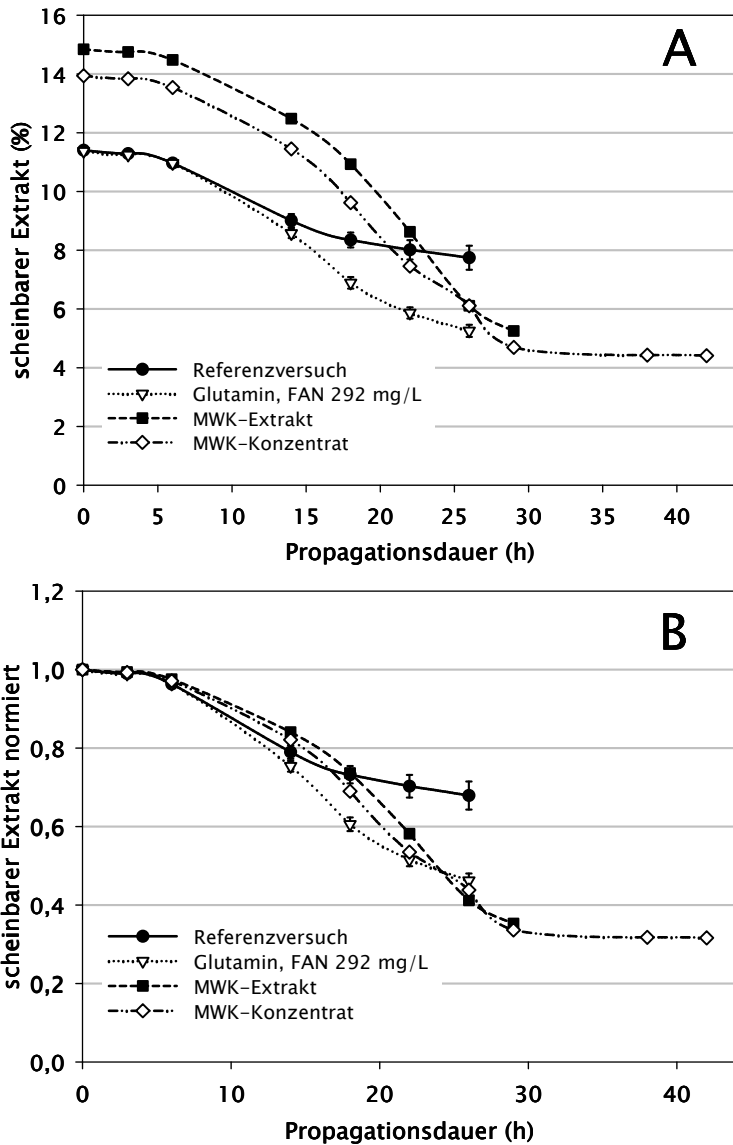


Abbildung 5.8: Verlauf des scheinbaren Extrakts (A) und normiert (B) während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Glutamin und Malzwurzelkeim(MWK)-Konzentrat und -Extrakt als Zusatz zur Würze; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, Glutamin $n = 2$, MWK-Versuche $n = 1$.

Bild B der Abbildung 5.7 zeigt den Verlauf des FAN. Die Anfangskonzentrationen an FAN von Malzwurzelkeim-Extrakt und -Konzentrat lagen weit höher als die des Referenzversuchs. Mit Malzwurzelkeim-Extrakt wurde ein Stickstoffeintrag von 472 mg/L erreicht; nach 26 h waren davon 274 mg/L assimiliert. Mit Malzwurzelkeim-Konzentrat waren anfänglich 415 mg/L im Medium zu finden, wovon 243 mg/L verstoffwechselt wurden. Nach 26 h lag im Gegensatz zu den Referenzversuchen noch ausreichend FAN vor. Nach Ablauf der 26 h war bis 29 h kurzzeitig nur noch ein minimaler Abbau des Stickstoffs bei Versuchen mit Malzwurzelkeim-Auszug zu erkennen. Danach allerdings wurden im Versuch mit Malzwurzelkeim-Konzentrat weitere 44 mg/L FAN assimiliert und lag nach 42 h bei 128 mg/L.

Der scheinbare Extrakt (Abbildung 5.8, Bild A) wurde durch Zugabe des Malzwurzelkeim-Auszugs stark erhöht. Bei dem Konzentrat wurde ein Wert von 13,9 % und beim Extrakt von 14,8 % erreicht. Damit befanden sie sich deutlich über einem üblichen Wert für eine typische Vollbierwürze von 10,5-12,5 %. In der normierten Darstellung (Bild B) ist zu erkennen, dass der Abbau des scheinbaren Extrakts im Vergleich zum Referenzversuch bis 18 h ähnlich verlief und danach weiter sank. Im Gegensatz zum Glutamin-Versuch war der Abbau bis 22 h langsamer.

Die Ethanolbildung wurde bei Zusatz von Malzwurzelkeim-Auszügen stark gefördert (Abbildung 5.9) und endete nach 26 h bei 4,2 Vol %. Im Gegensatz zum Versuch mit 292 mg/L FAN durch Glutamin ist dies eine Steigerung um 121 %. Die Ethanolkonzentration im Versuch mit Malzwurzelkeim-Konzentrat sank nach 26 h, die des Malzwurzelkeim-Extrakts stieg leicht an.

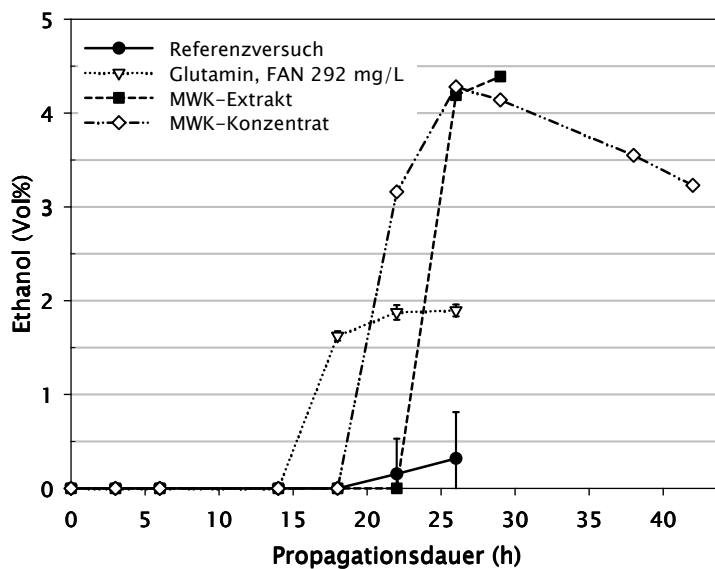


Abbildung 5.9: Verlauf der Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Glutamin und Malzwurzelkeim(MWK)-Konzentrat und -Extrakt als Zusatz zur Würze; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, Glutamin $n = 2$, MWK-Versuche $n = 1$.

Erreichbare Zelldichte als Funktion des FAN. Die Ausbeuten, die mit den Malzwurzelkeim-Auszügen erreicht wurden, sollten in Relation zu den Versuchen mit synthetischen Nährstoffen in Würze gebracht werden. Hierfür wurde die erreichte Zelldichte nach 26 h als Funktion der FAN-Konzentration dargestellt (Abbildung 5.10). Die Kurven wurden über die Dosierung von Glutamin zum Medium erzeugt. Zum Vergleich sind die Zelldichten nach 26 h unter Verwendung des Malzwurzelkeim-Extrakts sowie des -Konzentrats als Punkte mit abgebildet. Werden die damit erreichten Zelldichten herangezogen, so ist zu sehen, dass der bei Versuchen mit Malzwurzelkeim-Auszug verbrauchte FAN dem FAN-Verbrauch der Glutamin-Versuche entsprach.

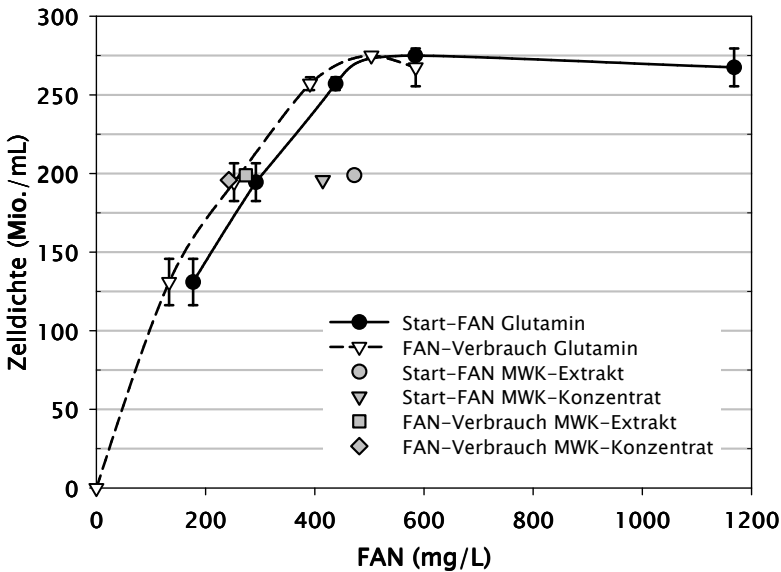


Abbildung 5.10: Erreichte Zelldichte nach 26 h während der Propagation von W34/70 bei 25 °C als Funktion der FAN-Konzentration. Die Kurven werden durch Zusatz der Aminosäure Glutamin erzeugt. Die grauen Symbole sind Versuche mit Malzwurzelkeim(MWK)-Extrakt und -Konzentrat. Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Referenzversuche (•) $n = 6$, Glutamin $n = 2$, MWK-Versuche $n = 1$.

Mit Malzwurzelkeim-Extrakt konnten, bezogen auf den assimilierten Stickstoff, gleiche Zelldichten wie mit der synthetisch zudosierten Stickstoffquelle Glutamin erreicht werden. Hinsichtlich des eingesetzten FAN zu Beginn der Propagation war der Malzwurzelkeim-Extrakt schlechter zum Zeitpunkt 26 h.

5.4 Diskussion

Ziel der Propagationsversuche war, den Einfluss der Nährstoffe auf die Ausbeute zu beleuchten und die Ausbeute nach Deutschem Reinheitsgebot zu optimieren. FAN, Zink und Pantothensäure liegen als Mangelnährstoffe in einer Würze vor (Annemüller et al. 2008).

5.4.1 Nährstoffversuche mit synthetischem Medium

Mit einem synthetischen Medium war es möglich, die Konzentrationen exakt einzustellen und den Einfluss anderer Größen zu eliminieren. FAN ($p < 0,0001$) und Zink ($p = 0,0018$) sowie die Wechselwirkung zwischen FAN und Zink ($p = 0,0013$) hatten einen signifikanten Einfluss auf das Hefewachstum. Pantothensäure war im vorliegenden Fall nicht entscheidend an der Ausbeute beteiligt ($p = 0,574$).

Biochemisch kann die Wechselwirkung zwischen FAN und Zink derart begründet werden, dass Zink am Abbau sowie am Aufbau von Biomolekülen beteiligt ist und im aktiven Zentrum vieler Enzyme vorliegt (Eide 1998). Die höchsten Ausbeuten wurden nur erreicht, wenn Stickstoff und Zink gleichzeitig in hohen Konzentrationen vorlagen. Allerdings konnte bei einer hohen FAN-Konzentration durch die Anhebung des Zinkgehaltes eine Steigerung der Ausbeute erreicht werden, unabhängig von der Pantothensäurekonzentration, und resultierte in einer 50%igen Steigerung der Zelldichte. Der Zinkgehalt wurde in diesem Fall ausgehend von 0,15 mg/L um 10 mg/L Zink erhöht. Bei Versuchen von Methner erzeugte die Zugabe von 0,5 g/L Malzwurzelkeimen eine Zelldichtesteigerung um 54 % während einer Propagation (Methner 1999). Diese Malzwurzelkeim-Konzentration trug gemäß angegebener Analysen 7,5 mg/L Zink zusätzlich ins Medium ein. Die Nährstoff-Konzen-

trationen der verwendeten Würze sind nicht bekannt, und somit auch nicht die tatsächlich zu Verfügung stehenden Mengen. Seine Resultate könnten jedoch in der verbesserten Zinkversorgung begründet sein, wenn von einer guten FAN-Ausstattung der Würze ausgegangen wird.

Bei den Versuchen mit Zinkmangel (0,05 mg/L) konnte durch einen hohen FAN-Wert (300 mg/L) nach 26 h doch noch eine Zelldichte erzielt werden, die jener des Nullversuches entsprach. Dies überraschte durchaus, denn in der Literatur wird eine Untergrenze für Zink von 0,12 mg/L angegeben, um eine störungsfreie Gärung zu gewährleisten. Bei weiteren Führungen verarmt die Hefe an Zink (Donhauser 1981, Wagner et al. 1983). Die Hefe wurde für die Versuche entweder frisch propagiert oder als Erntehefe verwendet, immer jedoch ohne Nährstoffmangel vermehrt. Wenn Hefe in einem zinkreichen Medium gezüchtet wird, kann sie Zink über die Transporter Zrc1p und Cot1p zur Speicherung in die Vakuole transportieren. Bei Zinkmangel mobilisiert die Hefe über den vakuolären Transporter Zrt3p das Metallion und entlässt es ins Zytoplasma (Abbildung 2.1) (MacDiarmid et al. 2000). Es wäre also denkbar, dass durch die Mobilisierung von Zink aus den Vakuolen bei den Zinkmangelversuchen mit 0,05 mg/L doch noch gute Ausbeuten erreicht werden konnten. Bei Wiederverwendung der Hefe in weiteren Propagationen oder Gärungen sollte sich der Zinkmangel bemerkbar machen.

Ein niedriger FAN resultierte immer in einem langsamen und bezogen auf die Ausbeute schlechten Wachstum. Dies wurde auch bei Wang et al. beobachtet und zeigte sich bei einem FAN von 60 mg/L im langsamsten Zuckerverbrauch. Bei ihnen führte allerdings ein hoher Gehalt an FAN von 250 mg/L und ein Pantothersäuremangel von 10 µg/L zum schlechtesten Hefewachstum gemessen als koloniebildende Einheiten unter Verwendung zweier *Saccharomyces*-Weinhefen (Wang et al. 2003). In den Versuchen mit synthetischem Medium war eine Konzentration von 10 µg/L Pantothersäure für die Bierhefe Rh und in den Versuchen mit Würze für die Hefe W34/70 von 18 µg/L ausreichend. Der Bedarf an Pantothersäure ist stammspezifisch (Wang et al. 2003, Annemüller et al. 2008) und ist für diese Hefen eher im unteren Konzentrationsbereich angesiedelt.

5.4.2 Dosage von Nährstoffen zur Würze

Ausgehend von dem synthetischen Medium wurde das Verhalten der Nährstoffe für das Medium Würze untersucht. Aufgrund der sehr komplexen Zusammensetzung der Würze und Verwendung einer anderen Hefe sollten Artefakte ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mittels Thoma-Kammer, wobei die Abweichung der beiden Doppelkammern nicht mehr als 5 % betrug. Selbst bei den Referenzversuchen mit Würze, die sechs Mal unter gleichen Bedingungen wiederholt werden, lagen die Werte nach 26 h zwischen 116 und 159 Mio./mL (132 ± 15 Mio./mL) und der relative Fehler bei 11,2 %. Anfängliche Vergleichsmessungen mit dem NucleoCounter (ChemoMetec, Dänemark) zeigten, dass die Schwankungen nicht methodisch bedingt sind. Mit dem NucleoCounter wurde nach 26 h ein Bereich zwischen 106 und 133 Mio./mL gemessen (119 ± 11 Mio./mL) mit einem relativen Fehler von 9,4 %. Der absolute Unterschied dieser beiden Messsysteme liegt darin, dass der NucleoCounter knospende Zellen als eine Zelle zählt.

Zu Beginn der Referenzversuche (0 h) lag der Variationskoeffizient für die Zelldichte bei 8,4 %, für den scheinbaren Extrakt bei 1,0 % und für FAN bei 9,0 %. Der Variationskoeffizient der Referenzversuche nach 26 h lag für den scheinbaren Extrakt bei 5,3 %, für FAN bei 9,3 % und für Ethanol bei 155 %. Der Fehler der Ethanolmessung war in diesem Fall mit der Nachweisgrenze des Biermessplatzes bei geringen Ethanolkonzentrationen zu begründen. Zwei der sechs Referenzversuche wiesen ca. 1 Vol % auf und die restlichen vier Messungen lagen bei 0 Vol %. Die Standardabweichung der Ethanolkonzentrationen bei den Versuchswiederholungen mit Glycin und Glutamin als Zusatz war sehr gering ($\pm 0,01$ - $0,11$) und wies auf eine gute Reproduzierbarkeit bei Ethanolkonzentrationen über 1 Vol % hin.

Zusatz von Zink und Pantothensäure. Die Würze bzw. der Malzextrakt hatte im Mittel zu Beginn der Propagation Konzentrationen von FAN = 177 mg/L, Zink = 0,185 mg/L und Pantothensäure = 0,182 mg/L. In der Literatur ist zu finden, dass ein Unterschied zwischen den Zinkquellen Zinksulfat oder Zinkchlorid besteht (McLaren et al. 1999). Aus diesem Grund wurden die beiden Zinkquellen

in Versuchen verglichen. Weiterhin wird angegeben, dass die bessere Versorgung an Wuchsstoffen und Zink die Hefevermehrung positiv beeinflusst (Methner 1999), weshalb zusätzlich Pantothensäure zudosiert wurde.

Weder Zinksulfat und Zinkchlorid in einer Startkonzentration von 0,5 mg/L, noch Pantothensäure in einer Konzentration von 7,86 mg/L sowie die Kombination von Zinksulfat (0,5 mg/L) und Pantothensäure (1 mg/L) bewirkten eine Steigerung der Zelldichte. Hingegen lag bei einer Startkonzentration von 1,17 mg/L Zinksulfat nach 26 h eine Zelldichte von 155 Mio./mL vor und schien damit eine Auswirkung zu haben. Der maximale erreichte Wert bei den Referenzversuchen lag jedoch bei 159 Mio./mL und deshalb hatte auch diese Konzentration keinen Effekt. Bei den eingestellten Konzentrationen wird davon ausgegangen, dass Stickstoff der limitierende Faktor ist. Sehr hohe extrazelluläre Zinkkonzentrationen sind nicht für die Zelle toxisch. In diesem Fall werden die Zinktransporter Zrt1p und Zrt2p auf posttranslationaler Ebene nach Endozytose in den Vakuolen abgebaut (Abbildung 2.1) (Eide 1998, MacDiarmid et al. 2000, Ho et al. 2002, Eide 2009). Dies verhindert den weiteren Import von Zink in die Zelle. Bei vorliegenden 177 mg/L FAN und 0,185 mg/L Zink führte die Anhebung auf höhere Zinkwerte zu keiner Ausbeutesteigerung. Eine positive Beeinflussung des Stoffwechsels war nicht zu erkennen.

Die Aussage von McLaren *et al.*, dass ein Unterschied in der Zinkquelle Zinksulfat oder Zinkchlorid besteht (McLaren et al. 1999), konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Zusatz von Stickstoffquellen. In den Versuchsreihen wurde einerseits ein Vergleich zwischen Glutamin und Glycin aus unterschiedlichen Assimilationsgruppen gezogen und andererseits das Augenmerk auf die maximal erreichbare Zelldichte durch unterschiedliche Konzentrationen an Glutamin gelegt.

Bis zu einer Dosierung von 584 mg/L FAN Glutamin kann für die ersten 26 h festgehalten werden: Je höher dosiert der Stickstoff ist, desto höher ist auch die erreichbare Zelldichte, unabhängig von der gewählten Stickstoffquelle. Zink und Pantothensäure wurden zu Versuchsbeginn auf 0,5 bzw. 1 mg/L aufgestockt. Diese Konzentrationen waren hoch genug gewählt, sodass Stickstoff in diesen Versuchen der

limitierende Faktor war und das Erreichen der stationären Phase bestimmte (Annemüller et al. 2008).

Bei der Startkonzentration 438 mg/L FAN verblieb in den Propagationsversuchen eine Restkonzentration von 40 mg/L FAN im Medium. Dieser Wert ist ein Indikator für eine komplette Aufnahme des in der Würze vorhandenen niedermolekularen und assimilierbaren Stickstoffs. Andere Nährstofflimitierungen können dadurch ebenfalls ausgeschlossen werden (Annemüller et al. 2008). Bei den Startkonzentrationen 584 mg/L und 1168 mg/L FAN war die Assimilation des Stickstoffs gleich groß und lag zum Zeitpunkt 26 h bei rund 460 mg/L FAN. Es konnte also innerhalb von 26 h bei höherer FAN-Dosage nicht mehr Stickstoff verwertet werden. Bei 584 mg/L Start-FAN war ein Restwert von 80 mg/L FAN vorhanden. Die restlichen rund 40 mg/L würde die Hefe sicherlich nach Ablauf der 26 h assimilieren, solange keine anderen Nährstoffe das Hefewachstum limitieren.

Die höchste erreichte Zelldichte von rund 270 Mio./mL zum Zeitpunkt 26 h war durch den *Crabtree*-Effekt beschränkt. Dieser beschreibt den Umstand, dass bei Zuckerkonzentrationen über 0,1 g/L die reine Atmung gehemmt ist und eine „aerobe Gärung“ einsetzt. Der maximal mögliche Zuwachs liegt bei 8,1 kg Hefetrockensubstanz pro 100 kg verstoffwechselte Zuckermenge und entspricht einem Bedarf von 586 mg/L FAN (vergleiche Tabelle 2.2). Mit höheren FAN-Konzentrationen können keine höheren Ausbeuten erzielt werden. Mit dem synthetischen Nährstoff Glutamin war die maximale Zelldichte bei einer Konzentration von 584 mg/L festgelegt und ist mit theoretischen Berechnungen übereinstimmend.

Mit Zusätzen an Stickstoff wurden im Vergleich zu den Referenzversuchen deutlich höhere Ethanolkonzentrationen gegen Ende der Propagation nachgewiesen. Bei den Referenzversuchen ging die Hefe bereits ab 14 h in die stationäre Phase über, was im verlangsamten Extraktabbau und an der kompletten Verstoffwechselung des verfügbaren Stickstoffs zu sehen war. Bei den Aminosäure-Zusätzen wurde das Erreichen der stationären Phase auf einen späteren Zeitpunkt verschoben. Solange Stickstoff bei ausreichendem Zuckerangebot verfügbar ist, können die vergärbaren Kohlenhydrate zu Ethanol umgesetzt werden. Dementsprechend ist auch die Ethanolkonzentration höher.

Die Art der Stickstoffquelle spielt für den Hefemetabolismus eine große Rolle. Die beiden Aminosäuren Glutamat und Glutamin bilden den zentralen Stickstoff-Metabolismus (*central nitrogen metabolism*, CNM), aus denen alle stickstoffhaltigen Komponenten der Zelle hergestellt werden können (ter Schure et al. 2000). Andere Aminosäuren müssen erst in diese beiden umgewandelt werden. Der Mechanismus der Stickstoff-Katabolitrepression (*nitrogen catabolite repression*, NCR) unterscheidet zwischen gut und schlecht verwertbaren Stickstoffquellen und zwar in Abhängigkeit, wie schnell die Zelle auf ihnen wachsen kann (ter Schure et al. 2000, Forsberg & Ljungdahl 2001). Verschiedene Autoren teilen Aminosäuren unterschiedlich in zumeist vier Gruppen ein, die unterschiedlich schnell assimiliert werden (Tabelle 2.4) (Jones & Pierce 1969, Palmqvist & Åyräpää 1969, Ramos-Jeunehomme et al. 1979, Perpète et al. 2005). Für die Propagationsversuche wurden Glutamin und Glycin ausgewählt, die aus zwei unterschiedlichen Assimilationsgruppen stammen, Glutamin aus Gruppe A und Glycin aus Gruppe C. Glutamin kann direkt genutzt werden, ohne vorher metabolisiert werden zu müssen. Der Abbau des Glycins in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt über die Aminosäuren Serin und Threonin oder in Anwesenheit von Sauerstoff zu Glyoxylat. Der Katabolismus von Serin endet in erster Linie in der Bildung von Pyruvat (Michal 1999). Glutamin kann genutzt werden, indem es über Glutamat in α -Ketoglutarat umgewandelt wird und so in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden kann.

Ein direkter Vergleich zwischen Glutamin und Glycin mit jeweils 292 mg/L Startkonzentration FAN zeigte unterschiedliches Verhalten. Die erreichte Zelldichte lag im Mittel mit Glutamin nach 26 h bei 195 Mio./mL und Glycin bei 178 Mio./mL. Die Aufnahme der Zucker gemessen als scheinbarer Extrakt war bei Glycin geringer und auch die Ethanolbildung war niedriger. Die zueinander gehörenden Analysen waren soweit stimmig. Die Assimilation der Stickstoffquellen gemessen als FAN war jedoch bei beiden Versuchen identisch.

Die Hefe wuchs mit Glutamin nicht schneller als mit Glycin. Die Einteilung der Aminosäuren in unterschiedliche Assimilationsgruppen konnte hier nicht beobachtet werden. Durch die Verwendung der Würze als Nährstoffbasis lag auch hier ein Gemisch aus Aminosäuren vor, wobei mindestens 25 % aus der zudosierten Aminosäure bestanden.

Zwar liegen keine zeitlichen Aufnahmezeiten der einzelnen Aminosäuren vor, allerdings wurde erwartet, dass sich bei dieser Einteilung in Assimilationsgruppen ein deutlicher Unterschied in der Wachstumsrate und somit auch im FAN-Verlauf zeigt. Wenn die Assimilation von Glycin genauso schnell wie bei Glutamin ist, kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Glycin-Transporter stärker exprimiert sind. Permeasen werden im Laufe der Propagation exprimiert, wenn gut verwertbare Stickstoffquellen nicht mehr verfügbar sind und andere Aminosäuren assimiliert werden müssen (Forsberg & Ljungdahl 2001, Rautio et al. 2007). Über die erreichte Zelldichte kann statistisch keine Bewertung der beiden Aminosäuren erfolgen, da die Standardabweichungen der zweifachen Wiederholung sehr groß waren und sich überschneiden. Trotzdem war die Ausbeute im Mittel mit Glycin schlechter und der Zuckerabbau geringer. Bei Thomas und Ingledew erzeugte die exogene Zugabe von Glycin einen inhibitorischen Effekt auf das Hefewachstum von *Saccharomyces cerevisiae*, obwohl es bereitwillig assimiliert wurde. Glutamin hingegen wies einen stimulierenden Effekt auf (Thomas & Ingledew 1990). Diese Effekte konnten hier genauso beobachtet werden.

Das schlechtere Wachstum mit Glycin könnte folgendermaßen begründet sein. Bei Überschuss von Glycin wird die zytoplasmatische Serin-Hydroxy-methyltransferase (SHMT) inhibiert und verursacht einen Abfall der zytoplasmatischen 5,10-Methylen-THF Konzentration. Dieser Abfall induziert Gene des *glycine cleavage systems*, welches auch als Glycin-Decarboxylase-Multienzymkomplex (GDC) bekannt ist und aus GCV1, GCV2 und GCV3 besteht (Piper et al. 2000, Gelling et al. 2004). 5,10-Methylen-THF ist Ausgangssubstanz für den Monocarbon-Metabolismus und liefert C₁-Einheiten für die Synthese von DNA- und RNA-Bausteinen, beispielsweise die Methylgruppe bei der Pyrimidinsynthese für die Bildung von Thymidylat aus d-Uridylat sowie für die Biosynthese von Serin und Coenzym A (Michal 1999). Wenn die Synthese von DNA- und RNA-Bausteinen durch eine hohe Glycinkonzentration eingeschränkt ist, kann dadurch das Hefewachstum wie in den Propagationsversuchen vermindert sein. Entsprechend sind der Extraktabbau und die Ethanolbildung geringer, aber die Stickstoffassimilation gleich.

Es kann festgehalten werden, dass die Stickstoffquelle durchaus einen Einfluss auf das Hefewachstum und den Metabolismus hat. Mit einer gut verwertbaren Stickstoffquelle wie Glutamin kann der maximale Hefezuwachs erreicht werden, wenn keine anderen Nährstoffe limitieren.

5.4.3 Dosage des Malzwurzelkeim-Extrakts zur Würze

Die Heferausbeute sollte nach Deutschem Reinheitsgebot optimiert werden, weshalb in zwei Versuchen je ein Malzwurzelkeim-Auszug zudosiert wurde, um die Nährstoffkonzentrationen zu erhöhen.

Die Malzwurzelkeim-Auszüge wurden durch einstündige Schüttelmazeration mit 100 g/L Malzwurzelkeimen hergestellt. Ausgehend von den Analysen für 40 g/L würde dies bei linearem Verhalten einen zusätzlichen Eintrag von 293 mg/L FAN, 0,48 mg/L Zink und 0,93 mg/L Pantothensäure ins Medium bedeuten. Mit 177 mg/L FAN der Würze ergäbe sich ein Gesamt-FAN von 470 mg/L. Dieser Wert stimmte mit den Messungen für den Malzwurzelkeim-Extrakt zu Beginn der Propagation mit einer Konzentration von 472 mg/L sehr gut überein. Beim Malzwurzelkeim-Konzentrat lag der gemessene anfängliche FAN-Wert bei 415 mg/L. Die FAN-Differenz von 12 % zwischen den beiden Malzwurzelkeim-Auszügen war auf ein unterschiedliches Anfangsvolumen zurückzuführen. Durch die Zugabe des Konzentrats zum Medium ergab sich eine Vergrößerung des Gesamtvolumens um 9 % und damit folglich eine Verringerung der vorliegenden Konzentrationen um diesen Wert. Weiterhin muss bedacht werden, dass 177 mg/L FAN der Würze ein Mittelwert aus mehreren Versuchen war und der tatsächliche FAN nicht jedes Mal vor Versuchsbeginn bestimmt wurde.

Ein Restgehalt von 40 mg/L FAN im Medium nach Erreichen der stationären Phase verweist auf eine komplette Verstoffwechselung des assimilierbaren Stickstoffs. Dieser Wert schließt außerdem andere Nährstofflimitierungen aus ([Annemüller et al. 2008](#)). Der sehr hohe FAN-Restgehalt von rund 170 mg/L nach 26 h bei Einsatz der Malzwurzelkeim-Auszüge war deutlich höher. In diesem Fall stellt sich die Frage, welcher Stoff zu diesem Zeitpunkt limitierend wirkt.

Bei dem Versuch mit Malzwurzelkeim-Konzentrat wurde Ethanol nach 26 h abgebaut, das bedeutet, dass assimilierbare Zucker zu die-

sem Zeitpunkt komplett verbraucht waren und Ethanol als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt wurde (Diauxie-Shift). Eine HPLC-Analyse der Malzwurzelkeim-Auszüge ergab, dass keiner der Zucker Maltose, Maltotriose, Glucose, Fructose und Saccharose herausgelöst wurde (Daten nicht dargestellt). Demnach fand auch kein Eintrag an vergärbaren Kohlenhydraten ins Medium statt. Nachdem die Zellen im Anschluss mit Ethanol als Energiequelle weiterwachsen konnten, ist dies ein Indiz dafür, dass alle anderen notwendigen Nährstoffe noch ausreichend vorlagen. Der weitergehende Abbau von FAN bestätigte dies. Obwohl die genaue Zusammensetzung der Malzwurzelkeim-Auszüge nicht bekannt war, wurden vermutlich viele weitere essentielle Nährstoffe mit ins Medium eingetragen. Diese ermöglichten die komplette Assimilation der Zucker und sogar das Weiterwachsen auf Ethanol. Der hohe FAN-Restgehalt von rund 170 mg/L bedeutete nicht, dass ein großer Anteil an nicht oder schlecht verwertbarer Stickstoffquellen vorlag.

Die Ethanolbildung war mit Malzwurzelkeim-Zusatz deutlich höher als mit Glutamin-Zusatz. Wenn allerdings kein erhöhter Eintrag der fünf Hauptzucker einer Würze durch die Malzwurzelkeime ins Medium stattfand, so konnte über Zucker nicht mehr Ethanol gebildet werden. Durch den Malzwurzelkeim-Zusatz war die Zusammensetzung der ursprünglichen Würze stark verändert und könnte in einem Messfehler des Biermessplatzes resultieren. Dieser ist für normale Vollbierwürzen kalibriert. Eine gaschromatographische Messung könnte Aufschluss geben, wie hoch der tatsächliche Ethanolgehalt war.

Die starke Ethanolbildung könnte möglicherweise durch die Aminosäure Alanin hervorgerufen werden. Aus der Aminosäure Alanin entsteht über den Ehrlich-Weg Ethanol. Alanin hat eine sehr hohe Löslichkeit von 165,1 g/L bei 25 °C in Wasser. Mit einem geringen Molekulargewicht von 89,09 g/mol kann Alanin aufgrund eines hohen Diffusionskoeffizienten leicht aus Malzwurzelkeimen herausgelöst werden. Liegt diese Aminosäure in erhöhter Menge im Malzwurzelkeim-Extrakt vor, kann dies in erhöhter Ethanolbildung resultieren.

Das Hefewachstum war innerhalb der ersten 18 - 22 h deutlich langsamer und spiegelte sich auch in der langsameren Assimilation des Stickstoffs wider. Wird die assimilierte FAN-Menge bezogen auf die erreichbare Zelldichte nach 26 h betrachtet (Abbildung 5.10), zeigen

die Versuche mit Malzwurzelkeimen den gleichen Effekt wie die Zugabe der Aminosäure Glutamin. Bei Glutamin ist jedoch die Aufnahme von FAN innerhalb von 18 h abgeschlossen, bei den Malzwurzelkeim-Versuchen erst nach 26 h.

Mit dem Eintrag der Malzwurzelkeim-Lösungen stieg auch der osmotische Druck und führte zu hohen Werten des scheinbaren Extrakts von 14-15 %. Ein hoher osmotischer Druck resultiert in einer verlängerten Anlaufphase und verlangsamt das Hefewachstum in der exponentiellen Phase (D'Amore et al. 1988, Tenge et al. 2006). Dieses Verhalten war in den Propagationsversuchen ebenfalls zu erkennen. Chowdhury et al. zeigten in Experimenten, dass bei hohem osmotischen Druck ein schneller Zerfall der *actin filament cables* stattfindet, der von einer langsameren Neuverteilung der kortikalen *actin filament patches* gefolgt ist. Es resultiert ein Polaritätsverlust aufgrund der Neuorganisation und beeinflusst das Wachstum der knospenden Zelle (Chowdhury et al. 1992). Dies ist eine Möglichkeit, weshalb das Wachstum der Hefe zu Beginn der Propagation mit Malzwurzelkeimen im Vergleich zu Glutamin langsamer war. Nachdem der osmotische Druck nicht mehr so hoch war (ab ca. 8 % scheinbarer Extrakt), wuchs die Hefe sehr schnell. Normalerweise wird bei hohem osmotischen Druck Glycerin als kompatibles Solut gebildet (Reed et al. 1987, D'Amore et al. 1988, Rep et al. 2000). Die Glycerinbildung resultiert in verminderter Ethanolbildung, da der Stoffwechselweg der Glykolyse gestört ist (Abbildung 2.3). Glycerin wird nur solange gebildet, bis wieder normale osmotische Verhältnisse herrschen. In der Tat wurde in den Propagationsversuchen mit Malzwurzelkeimen, im Vergleich mit Glutamin-Zusatz, erst zu späteren Zeitpunkten Ethanol am Biermessplatz gemessen. Nach Blomberg findet die Bildung von Glycerin unter Verbrauch von 1 ATP statt (Blomberg 2000). Aufgrund des fehlenden ATP könnte der Anabolismus der Hefe vermindert sein und in einem reduzierten Hefewachstum während hohem osmotischen Druck resultieren.

Einige Zusammenhänge hinsichtlich Hefemetabolismus bei Malzwurzelkeim-Zusatz sind noch nicht eindeutig geklärt. Über entsprechende Analysen für Zucker, Aminosäuren und Ethanol über beispielsweise HPLC oder GC könnten sichere Schlussfolgerungen gezogen werden. In weitergehenden Untersuchungen muss dies durchgeführt werden, um

den genauen Metabolismus beschreiben zu können und den Malzwurzelkeim-Extrakt weiter optimieren zu können.

Malzwurzelkeim-Extrakte könnten bei genauer Kenntnis über die Zusammensetzung zu einer neuen Propagationsweise führen. Aufgrund des hohen Zuckergehaltes und des daraus resultierenden *Crabtree*-Effektes ist der maximale Hefezuwachs bei Verwendung einer normalen Vollbierwürze limitiert. Die Propagationswürze könnte verdünnt und beispielsweise die Konzentration der Kohlenhydrate halbiert werden. Durch den Zusatz an Malzwurzelkeimen können die restlichen Nährstoffe, die dadurch ebenfalls verdünnt werden, wieder aufgestockt werden. Der maximale Zuwachs müsste auf diese Art und Weise gesteigert werden können, wenn tatsächlich keine assimilierbaren Zucker aus den Malzwurzelkeimen extrahiert werden.

Schlussfolgerung. Mit den Propagationsversuchen konnte gezeigt werden, dass FAN der am meisten limitierende Faktor des Hefewachstums in Bierwürzen ist, gefolgt von Zink. Zwischen FAN und Zink besteht eine signifikante Wechselwirkung, sodass mit einer hohen Zinkkonzentration bei guter Stickstoffversorgung die Ausbeute weiter gesteigert werden kann. Pantothenensäure war kein limitierender Faktor für die verwendete Hefe, wobei der Bedarf des Vitamins stammabhängig ist. Die Ergebnisse gelten sowohl für ein synthetisches Medium als auch für Würze. Die Stickstoffquelle wirkte sich auf das Hefewachstum aus. Mit einer gut verwertbaren Stickstoffquelle wie Glutamin konnte der maximale Hefezuwachs erreicht werden. Mit einem zu Würze dosierten Malzwurzelkeim-Extrakt wurden, bezogen auf den assimilierten Stickstoff, gleiche Zelldichten wie mit der synthetischen Stickstoffquelle Glutamin erzielt. Innerhalb von 26 h wurden 198 Mio. Zellen/mL erreicht und entsprach einer Anhebung um 50 %. Die maximale Hefezelldichte lag nach 42 h bei 282 Mio. Zellen/mL und entsprach einer Zunahme um 112 %. Über derart hohe Zellausbeuten wurde bisher im Rahmen des Deutschen Reinheitsgebotes nicht berichtet. Mit dieser Prozessführung wäre es möglich, immer ausreichend frische Hefe zum Vergären des Bieres bereitzustellen und auf Erntehefe zu verzichten. Die Optimierung der Hefepropagation über einen Malzwurzelkeim-Extrakt ist eine sehr gute Möglichkeit und bietet großes Potential für die Brauereitechnologie.

6 Untersuchungen zum intrazellulären pH-Wert

zum Teil veröffentlicht in: *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, Vol. 75, No. 17, S. 5615-5620.

6.1 Zusammenfassung

Die Messung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) einer Hefe ist eine Methode zur Bestimmung der Hefevitalität, die fluorometrisch durchgeführt werden kann. Im Gegensatz zur photometrischen Messung, die nur einen ICP-Mittelwert einer Hefepopulation erfasst, ermöglicht die Flusszytometrie die Darstellung einer ICP-Verteilungskurve.

Ziel war die Übertragung der bestehenden *short intracellular pH* (SICP)-Methode (Thiele & Back 2005) vom Photometer auf das Zytometer unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes 5,6-Carboxyfluorescein. Es sollte überprüft werden, ob der Verlauf einer Propagation mit beiden Methoden verfolgt werden kann. Hierfür wurden drei unterschiedliche Wachstumsphasen (Anlaufphase, exponentielle und stationäre Phase) während einer Propagation untersucht ($n = 6$). Die Korrelation der beiden Methoden war gut ($r^2 = 0,898$, $n = 18$). Mit beiden Methoden war es möglich, den Verlauf des Wachstums zu verfolgen. Exponentielle Hefe hatte die höchste Vitalität, gefolgt von stationärer Hefe und Hefe aus der Anlaufphase. Während die photometrische Methode keinen signifikanten Unterschied zwischen der exponentiellen und stationären Phase aufwies ($p = 0,415$), zeigte die flusszytometrische Methode ($p = 0,012$) diesen. Hefe in der exponentiellen Phase hatte eine unimodale ICP-Verteilungskurve und wies somit eine homogene Hefepopulation auf. Hefe aus der stationären Phase hatte eine zusätzliche Schulter in der ICP-Verteilungskurve, die eine Subpopulation darstellte und somit inhomogen war.

Basierend auf diesen Daten wurde überlegt, ob sich bei Stress der ICP ändert und ob dies mit der zytometrischen Methode dargestellt werden kann. Hierfür wurde Hefe in der exponentiellen Phase gestresst und der Verlauf bis zur stationären Phase verfolgt. Eine mit 45 °C gestresste Hefe zeigte den deutlichsten Vitalitätsverlust, während bei 35 °C kein Verlust vorlag. Die zweitstärkste Vitalitätsminderung erfuhr osmotisch geschockte Hefe (18 % Sorbitol). Eine hohe Ethanolkonzentration (7,8 Vol %) führte in den ICP-Verteilungskurven zu keinem Vitalitätsverlust, obwohl jegliche Stoffwechselprozesse stagnierten. In weiterführenden Versuchen muss getestet werden, ob eine dauerhafte Schädigung der Zellen vorliegt und ob die Proliferationsfähigkeit in neutralem Medium gegeben ist.

Die Flusszytometrie ermöglicht eine spezifischere Aussage als die Photometrie bei gleicher Probenvorbereitungs- und Messzeit und ist somit für die Routineanalyse geeignet.

6.2 Einleitung

Die Messung des intrazellulären pH-Wertes der Bierhefe ist ein sehr wichtiger Parameter in der Brauereitechnologie. Die Vitalität der Hefe, ein Maß für die Aktivität einer lebenden Zelle, beeinflusst die Gärleistung und damit die Qualität des Endproduktes Bier (Back et al. 1998, Smart 2003). Vitale Hefe ist in der Lage, ein hochqualitatives Bier zu produzieren. Unerwünschte Nebenprodukte wie 2,3-Pentandion oder 2,3-Butandion (Diacetyl) werden von einer vitalen Hefe besser und schneller abgebaut; die Dauer einer Fermentation kann ebenfalls reduziert werden (Back et al. 1998).

Basierend auf der Methode von Imai und Ohno (Imai & Ohno 1995b) entwickelten Thiele und Back eine schnelle Methode für die fluoreszenzphotometrische Erfassung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) (Thiele & Back 2005). Diese *short intracellular pH* Methode (SICP-Methode) reduziert die Probenvorbereitungszeit von ca. 3,5 h auf 1,25 h und ermöglicht damit den Einsatz als Routineanalyse. Die SICP-Methode verwendet als Farbstoff das fluoreszierende 5,6-Carboxyfluorescein (CF). Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes ist pH-Wert-abhängig (Abbildung 6.1). Die veresterte Form 5,6-Carboxyfluorescein-Dia-

cetat (CF-DA) fluoresziert nicht und kann als ungeladenes Molekül die Zellmembran leicht passieren. Nachdem die Zellen mit CF-DA beladen sind, spalten hefeeigene Esterasen das Diacetat ab und bilden so das pH-Wert-abhängige CF. CF kann aufgrund der hohen Ladung nicht mehr so schnell aus der Zelle austreten (Abbildung 6.2). Zur Aktivierung der Esterasen wird die Probe bei der Probenvorbereitung für 15 min in einem Wasserbad bei 30 °C inkubiert.

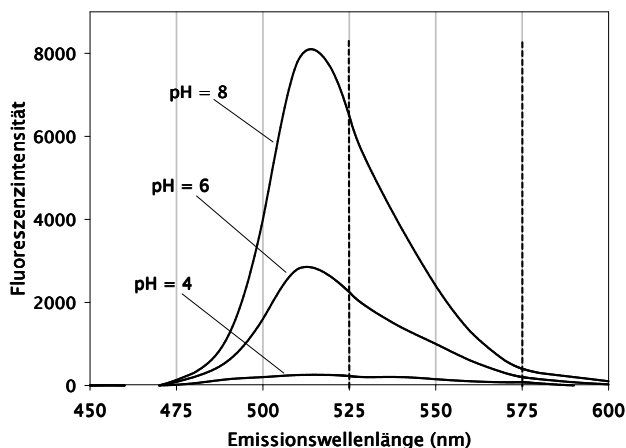


Abbildung 6.1: Schematische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von 5,6-Carboxyfluorescein (CF) bei verschiedenen pH-Werten bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Emissionsspektren bei 525 nm sind stark abhängig vom pH-Wert, bei 575 nm fast unabhängig vom pH-Wert.

Die Anregung der fluoreszierenden Zellen bei einer bestimmten Wellenlänge erzeugt je nach intrazellulärem pH-Wert unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzintensität von CF ist weiterhin von der Farbstoffkonzentration abhängig. Aus diesem Grund wird immer eine Verhältnismessung durchgeführt. Die Bildung eines Verhältnisses der pH-abhängigen und der pH-unabhängigen Fluoreszenzintensität ergibt Daten, die konzentrationsunabhängig sind (Imai & Ohno 1995a, Valli et al. 2006).

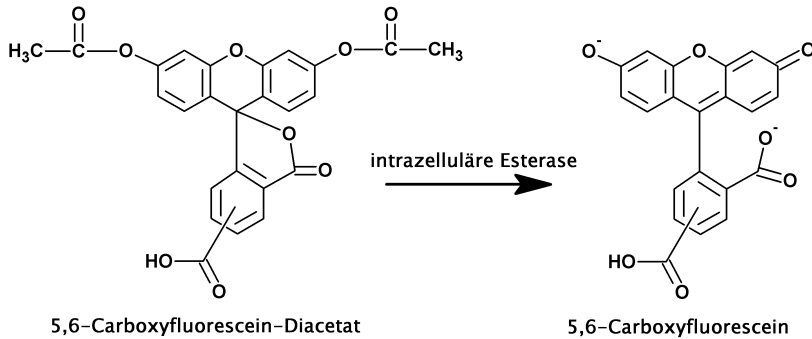


Abbildung 6.2: Mechanismus der Spaltung des farblosen 5,6-Carboxyfluorescein-Diacetats über hefeeigene Esterasen zum farbigen 5,6-Carboxyfluorescein.

Die Photometrie erfasst den ICP-Mittelwert einer Hefepopulation. Die Flusszytometrie bietet die Möglichkeit, einzelne Teilchen zu detektieren. Durch die Messung einzelner Zellen kann anstatt eines ICP-Mittelwertes einer Hefepopulation eine ICP-Verteilungskurve dargestellt werden. Die detaillierte Darstellung kann die Homogenität einer Hefepopulation aufzeigen. Die Flusszytometrie wird in der der biotechnologischen Forschung zu einem Standardwerkzeug. Durch die Messung einzelner Zellen wird sie bereits erfolgreich für die Analyse und Optimierung von Bakterien- (Fritsch et al. 2005) und Hefeprozessen eingesetzt (Hewitt & Nebe-Von-Caron 2001, Valli et al. 2006).

In dieser Arbeit soll die SICP-Methode (Thiele & Back 2005) vom Photometer auf das Zytometer übertragen werden. Während einer Propagation werden drei Wachstumsphasen (Anlauf-, exponentiell und stationär) verglichen. Es soll gezeigt werden, ob es Änderungen in der Vitalität von Phase zu Phase gibt und ob diese Änderungen mit beiden Methoden detektierbar sind. Mittels Flusszytometrie können Subpopulationen aufgedeckt werden (Valli et al. 2005, Valli et al. 2006) und die Inhomogenität einer Population dargestellt werden. Aus diesem Grund wird hier davon ausgegangen, dass es ebenfalls möglich ist, diese Subpopulationen mit der SICP-Methode aufzudecken.

Verläuft die Methodenkorrelation erfolgreich, soll die zytometrische Methode bei Versuchen angewendet werden, bei denen die Hefe in der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Faktoren gestresst wird. Es stellt sich die Frage, ob es bei Stress Änderungen im ICP gibt, die mit der zytometrischen Methode dargestellt werden können, und ob die Hefe sich bis zum Erreichen der stationären Phase von den applizierten Schocks regenerieren kann.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Methodenkorrelation

Für die Übertragung der SICP-Methode (Thiele & Back 2005) war es notwendig, die Daten der photometrischen und zytometrischen ICP-Messungen zu korrelieren. Hierzu wurden drei Wachstumsphasen einer Propagation mit Bierhefe untersucht. Die untersuchten Proben wurden während der Propagation nach 3 h (Anlaufphase), nach 14 h (exponentielle Phase) und nach 26 h (stationäre Phase) entnommen, um den kompletten Versuchsverlauf zu beschreiben und typische Wachstumsphasen zu charakterisieren (siehe Anhang Abbildung F.4). Es wurde jeweils dieselbe Probe mit beiden Systemen gemessen.

Kalibrierung von Photometer und Zytometer. Für die Erfassung des ICP war es notwendig, die Fluoreszenzintensitäten mit einem pH-Wert zu korrelieren. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte, indem der pH-Wert des Puffers gegen den natürlichen Logarithmus des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten von CF (488 nm/441 nm) aufgetragen wurde. Die sich ergebende Kalibriergerade hatte ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,991$. Die Kalibrierung des Zytometers wurde anhand eines Polynoms 3. Grades beschrieben ($r^2 = 0,989$) und ist in Abbildung 6.3 zu sehen.

Photometrisch gemessene ICP-Werte. Hefe aus der Anlaufphase zeigte den niedrigsten ICP-Mittelwert, aus der exponentiellen Phase den höchsten (Tabelle 6.1). Ein Vergleich der Mittelwerte mit einem

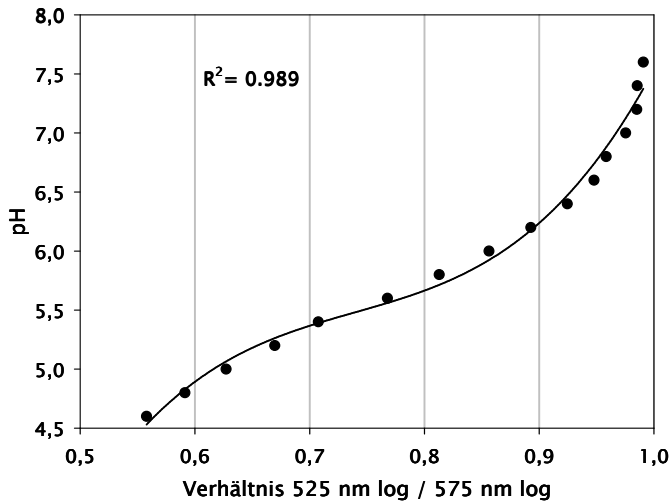


Abbildung 6.3: Kalibrierkurve des Zytometers für die Messung des intrazellulären pH-Wertes mit Superdex™ 200 Partikeln.

Tabelle 6.1: Photometrisch gemessene intrazelluläre pH-Werte (ICP) für drei unterschiedliche Wachstumsphasen während der Propagation.

Zeit in h	3	14	26
ICP der Proben	5,79	6,15	6,05
	5,89	6,19	6,13
	5,93	6,15	6,17
	5,86	6,19	6,00
	5,68	6,06	6,10
	5,82	6,04	5,97
Mittelwert	5,83	6,13	6,07
Standardabweichung	0,09	0,07	0,08
Varianzkoeffizient (%)	1,48	1,08	1,28

Sechs unabhängige Versuche. ICP-Werte sind Doppelbestimmungen.

Tukey HSD-Test zeigte, dass die ICP-Werte der Hefe aus der Anlaufphase signifikant kleiner als die der exponentiellen Phase ($p < 0,0001$) und der stationären Phase ($p = 0,001$) waren. Die Unterschiede zwischen der exponentiellen und der stationären Phase waren nicht signifikant ($p = 0,415$). Obwohl die Versuche unter den gleichen Bedingungen liefen und die Messungen gleich ausgeführt wurden, schwankten die Werte der Photometermessung. Bei Einzelmessungen kann es demnach zu einer Verwechslung der exponentiellen und der stationären Phase kommen.

Zytometrisch gemessene ICP-Werte. Untersuchte Hefezellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen ergaben verschiedene ICP-Verteilungskurven (Abbildung 6.4).

Die Hefe aus der Anlaufphase hatte ein Peakmaximum bei ca. 6,7. Bei Hefe aus der exponentiellen und stationären Phase hingegen wiesen die meisten Zellen einen ICP von 6,9 auf und waren somit aufgrund des höheren ICP vitaler. Hefe aus der stationären Phase zeigte eine breitere Verteilung mit einer zweiten Schulter. Diese zweite Schulter war eine Subpopulation mit einem eindeutig geringeren ICP und grenzte sich dadurch von der exponentiellen Phase ab. Die zweite Population lag bei ca. 6,7 und entsprach in der Lage dem Peak aus der Anlaufphase.

Vergleich photometrisch und zytometrisch gemessener Daten. Der Vergleich photometrisch gemessener Daten mit denen des Zytometers bedurfte der Berechnung eines Mittelwertes aus der ICP-Verteilungskurve. Dieser einzelne Wert wurde mit Formel 6.1 als geometrischer Mittelwert jeder einzelner Population berechnet. Hierbei ist w_i die Anzahl an Ereignissen (Zellen) und x_i das zugehörige pH-Verhältnis. Der geometrische Mittelwert wurde für den Vergleich mit den photometrisch ermittelten Werten benötigt (Tabelle 6.2).

$$\bar{x} = exp \cdot \left(\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot \ln x_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \right) \quad (6.1)$$

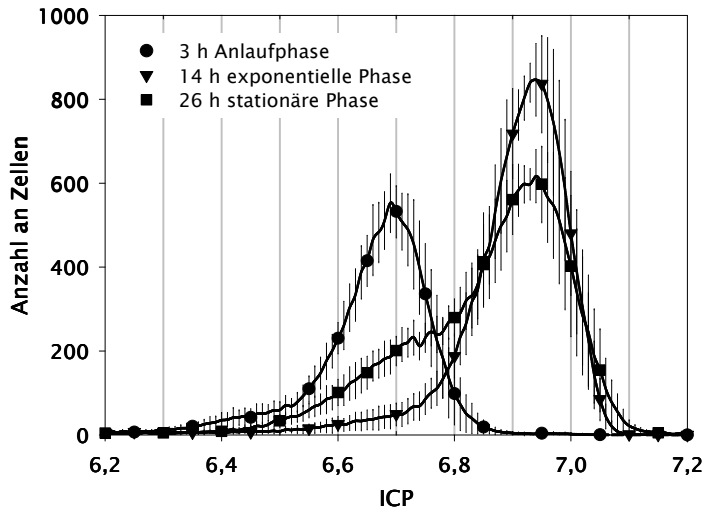


Abbildung 6.4: Zytometrisch gemessene Verteilungskurven des intrazellulären pH-Wertes (ICP) für verschiedene Wachstumsphasen, Anlaufphase (3 h ●), exponentielle Phase (14 h ▼) und stationäre Phase (26 h ■). Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, $n = 6$.

Tabelle 6.2: Vergleich der zytometrisch und photometrisch gemessenen intrazellulären pH-Werte (ICP) für drei unterschiedliche Wachstumsphasen während der Propagation.

Wachstumsphase	Anlauf		exponentiell		stationär	
Methode	Photo.	Zyto.	Photo.	Zyto.	Photo.	Zyto.
Mittelwert	5,83	6,61	6,13	6,83	6,07	6,77
Standardabweichung	0,09	0,03	0,07	0,03	0,08	0,03
Varianzkoeffizient [%]	1,48	0,49	1,08	0,40	1,28	0,44

Arithmetische Mittelwerte wurden aus sechs unabhängigen Versuchswiederholungen berechnet. Photometrische Werte sind Doppelbestimmungen. Die Mittelwerte der ICP-Verteilungskurven des Zytometers wurden als geometrischer Mittelwert berechnet.

Im Gegensatz zu den drei Wachstumsphasen, die mit dem Photometer gemessen wurden, zeigten alle drei Verteilungskurven signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei einem Tukey HSD-Test. Die flusszytometrische Methode zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der exponentiellen und stationären Phase ($p = 0,012$), der bei der photometrischen Methode nicht vorlag ($p = 0,415$). Die geometrischen Mittelwerte der ICP-Verteilungskurven wurden mit den photometrischen verglichen. Die zytometrischen Messungen führten außerdem zu höheren ICP-Werten und zu kleineren Varianzkoeffizienten bei allen Wachstumsphasen.

Methodenkorrelation. Die Bewertung des erfolgreichen Transfers der Messmethode vom Photometer auf das Zytometer benötigte eine Korrelation der beiden Techniken, die in Abbildung 6.5 dargestellt ist. Hierfür wurden Messungen aus allen drei Wachstumsphasen der sechs Propagationen verwendet, womit sich 18 Wertepaare ergaben.

Die lineare Korrelation der beiden Methoden war signifikant und zeigte die Anwendbarkeit des Zytometers für die SICP-Methode. Sie war unabhängig von der Wachstumsphase. 5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat scheint somit eine geeignete Chemikalie für die ICP-Bestimmung mittels Zytometer zu sein.

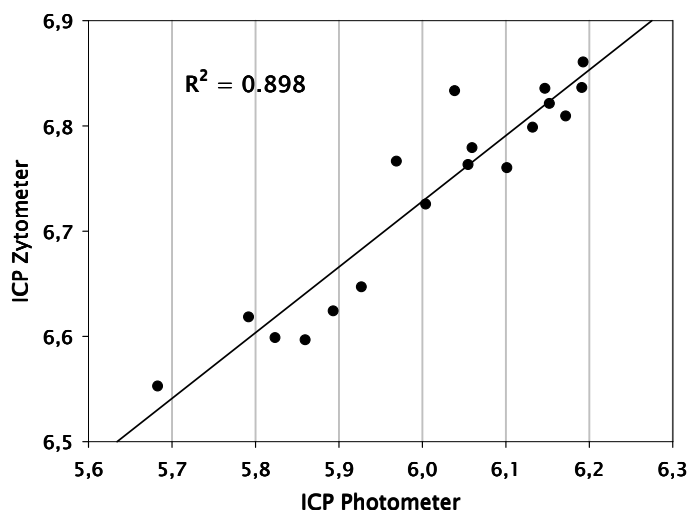


Abbildung 6.5: Korrelation der intrazellulären pH-Werte (ICP) von Photometer und Zytometer, $r^2=0,898$ ($p < 0,0001$), $n = 18$.

Stress- und Lagerversuche. Die Stressversuche während der stationären Phase wurden durchgeführt, um den großen ICP-Detektionsbereich mit dem Zytometer aufzuzeigen (Abbildung 6.6). Die Hefe wurde osmotischem Druck, Ethanol sowie Hitze ausgesetzt und zusätzlich in physiologischer Kochsalzlösung für 45 h gelagert, um einen Nährstoffmangel darzustellen. Alle Hefeproben wurden aus der stationären Phase nach 26 h entnommen, bevor sie gestresst wurden und mit unbehandelter Hefe verglichen wurden.

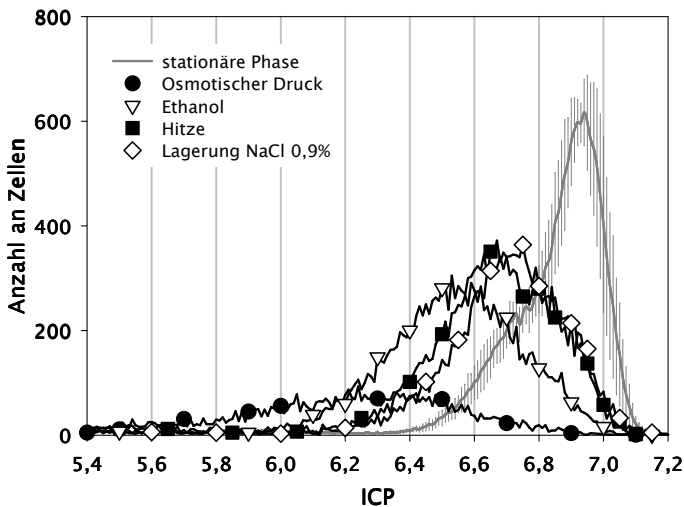


Abbildung 6.6: Zytometrisch gemessene Verteilungskurven des intrazellulären pH-Wertes (ICP) einer in der stationären Phase gestressten Hefe. Angewendet wurden hoher osmotischer Druck (Sorbitol ●), hohe Ethanolkonzentration (▽), Hitze (■) und Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung (◇). Zum Vergleich ist ungestresste frisch propagierte Hefe dieser Phase in grau dargestellt, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, Versuche ohne Stress $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

Die gelagerte oder gestresste Hefe hatte im Gegensatz zur frisch propagierten Hefe geringere ICP-Werte. Ein hoher osmotischer Druck hat-

te den größten Einfluss auf die Hefevitalität und zeigte sich in einer fast flachen Kurve und einem hohen Anteil an toten Zellen. Die Behandlung mit Ethanol wirkte sich nicht so stark aus wie ein osmotischer Schock, jedoch war die Hefe unvitaler als bei einem Hitzestress mit 35 °C oder der zweitägigen Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung. Hitze-Stress oder Nährstoffmangel erzeugten beide fast die gleiche Lage der Verteilungskurve. Beide Stressoren erzeugten ein Peak-Maximum des ICP bei ca. 6,7 und entsprachen somit einer frisch propagierten Hefe in der Anlaufphase. Nach diesem Stress war allerdings die Zahl der gezählten lebenden Zellen geringer. Wird der geometrische Mittelwert der gelagerten, der hitzegestressten und der nicht gestressten Hefe aus der Anlaufphase berechnet, so ergeben sich ähnliche Werte.

6.3.2 Stress während der exponentiellen Phase

Mit der zytometrischen Methode war es möglich, eine spezifischere Aussage über die Hefepopulation als mit Photometrie zu treffen. Dies führte zu der Überlegung, ob es bei Stress Änderungen im ICP der Hefe gibt, die mit der zytometrischen Methode dargestellt werden können. Hierzu wurde Hefe in der exponentiellen Phase mit verschiedenen Faktoren gestresst. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob sich die Hefe bis zum Erreichen der stationären Phase von den applizierten Schocks regenerieren kann und ob dies in den Verteilungskurven zu erkennen ist. Die Hefe wurde in dieser Versuchsreihe kurz vor der Probenahme nach 14 h in der exponentiellen Phase gestresst. Die genauen Stresszeitpunkte sind im Kapitel 3.6.3 zu finden. In Abbildung 6.7 werden die ICP-Verteilungskurven der exponentiellen Phase (14 h) sowie der stationären Phase (26 h) für die vier Stressbedingungen (Hitze 35 °C, 45 °C, hoher osmotischer Druck (Sorbitol) und hohe Ethanolkonzentration) dargestellt.

35 °C-Hitzeschock. Die Hefesuspension wurde 12 h nach Propagationsbeginn von 25 °C auf 35 °C erhitzt und nach Erreichen wieder auf 25 °C abgekühlt. Mit dieser Temperaturerhöhung auf 35 °C wurde die ICP-Verteilungskurve der exponentiellen Phase leicht nach links verschoben und wies damit augenscheinlich einen unvitaleren Zustand auf. In der stationären Phase war eine leichte Verschiebung der ICP-

Verteilungskurve nach rechts zu erkennen und deutete auf einen vitaleren Zustand hin.

Die zugehörigen Verläufe der Laboranalysen wie Zelldichte, scheinbarer Extrakt und FAN sind in Anhang F (Abbildungen F.5 bis F.8) zu finden. Diese Temperaturerhöhung führte beim Hefewachstum zu einer zeitlichen Verzögerung. Die maximale Zelldichte wurde zwar erreicht, allerdings ca. 4 h später als bei einer Standardpropagation ohne Stress. Die gleiche zeitliche Verzögerung war bei Erfassung des Ethanolgehaltes am Biermessplatz zu erkennen. Der Extraktabbau war ebenfalls etwas langsamer, der Abbau des FAN war nicht abweichend und innerhalb der Standardabweichung des Referenzverlaufes.

45 °C-Hitzeschock. Die Fermentationsbrühe wurde 12 h nach Propagationsbeginn auf 45 °C erhitzt und nach Erreichen wieder auf 25 °C abgekühlt. Die mit 45 °C geschockte Hefe wies in der exponentiellen Phase einen deutlichen Verlust an Vitalität im Vergleich zu den Standardpropagationen auf und auch in der stationären Phase konnte sich die Hefe noch nicht komplett vom ausgeübten Stress erholen. Ein Teil der Population stimmte in der Lage mit der zweiten Schulter einer Hefe aus der stationären Phase der Standardpropagation überein. Diese Lage der ICP-Verteilungskurve hatte auch die Hefe der Anlaufphase einer Standardpropagation.

Das Hefewachstum war direkt nach dem Stress stark beeinträchtigt und blieb konstant. Die Hefe benötigte nach Stressinduktion ca. 10 h, um diesen zu überwinden und weiter zu wachsen. Der Abbau des scheinbaren Extrakts und des FAN schritt fort, allerdings sehr langsam. Bis Versuchsende wurde keine Ethanolbildung am Biermessplatz erfasst (Anhang F, Abbildungen F.5 bis F.8).

Osmotischer Schock. Die durch osmotischen Druck, mit D(-)-Sorbitol induziert, geschockte Hefe wies eine nach links verschobene ICP-Verteilungskurve sowohl für die exponentielle als auch für die stationäre Phase auf. Die Anzahl an detektierten Zellen war bei beiden Kurven geringer. Bis zur Probenahme in der stationären Phase erholte sich die Hefe nicht vollkommen vom induzierten Stress.

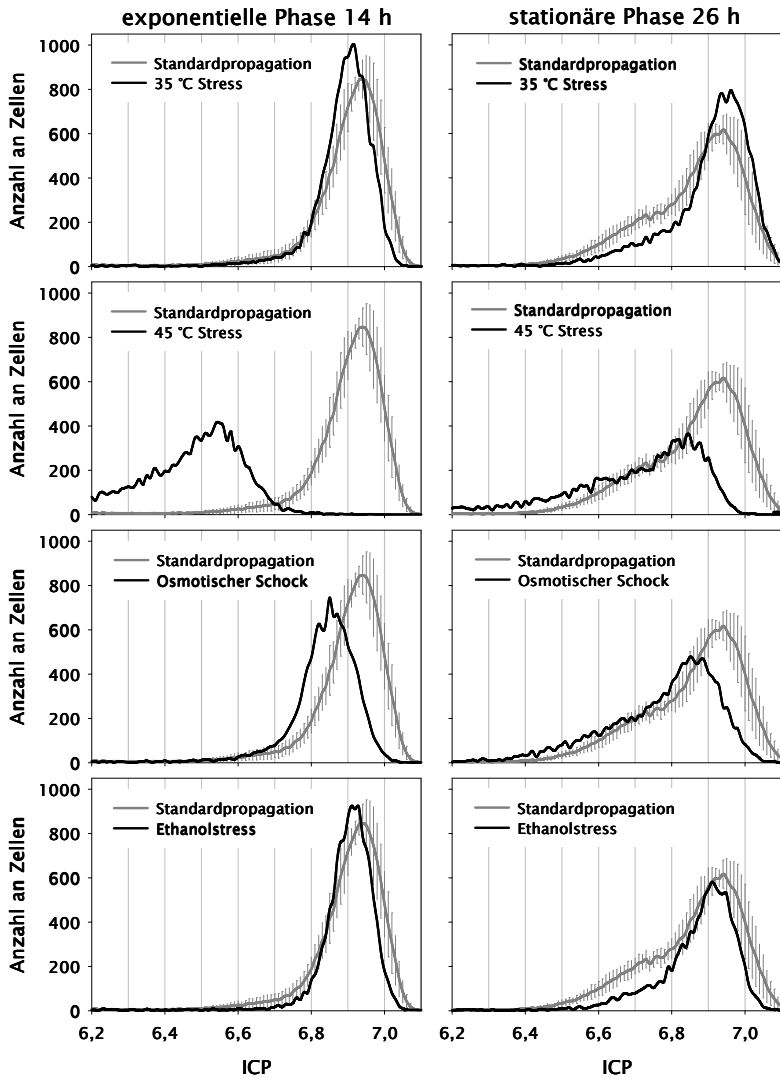


Abbildung 6.7: Zytometrisch gemessene Verteilungskurven des intrazellulären pH-Wertes (ICP) einer in der exponentiellen Phase mit Hitze (35 °C, 45 °C), mit hohem osmotischen Druck (Sorbitol) und hoher Ethanolkonzentration gestressten Hefe. Zum Vergleich ist ungestresste Hefe der Standardpropagationen bei 25 °C in grau mit dargestellt, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, Versuche ohne Stress $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

Der Abbau der Stickstoffquellen war nicht vom hohen osmotischen Druck beeinflusst. Der Abbau des scheinbaren Extrakts schritt langsamer voran. Das Hefewachstum wurde stark verzögert und war im beobachteten Zeitraum ca. halb so groß wie in den Standardversuchen. Bis zum Ende des Versuches konnte kein Ethanol am Biermessplatz nachgewiesen werden (Anhang F, Abbildungen F.5 bis F.8).

Ethanolstress. Der Nährlösung wurde 13 h nach Propagationsbeginn Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 7,8 Vol % zugesetzt. Die Zugabe von Ethanol hatte kaum einen Effekt auf den ICP der Hefe. Die Lage der Verteilungskurven wies in der exponentiellen und der stationären Phase einen leicht unvitaleren Zustand auf. Nach Stressinduktion wuchs die Hefe nicht weiter. Zelldichte, Extraktgehalt und FAN-Konzentration blieben konstant. Ethanol wurde nur minimal weiter gebildet (Anhang F, Abbildungen F.5 bis F.8).

6.4 Diskussion

6.4.1 Methodenkorrelation

Ziel war die Übertragung einer fluorometrischen Methode zur Messung des intrazellulären pH-Wertes vom Photometer auf ein Zytometer. Im Gegensatz zur Photometrie können mittels Flusszytometrie Subpopulationen aufgedeckt werden (Valli et al. 2005, Valli et al. 2006) und die Inhomogenität einer Population dargestellt werden. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass es ebenfalls möglich ist, diese Subpopulationen mit der SICP-Methode (Thiele & Back 2005) aufzudecken. Der Methodentransfer fand anhand von Daten statt, die während einer Hefepropagation mit Bierhefe gewonnen wurden. Proben wurden aus drei charakteristischen Wachstumsphasen genommen. Es wurde davon ausgegangen, dass der Verlauf einer Propagation mit einer Messung des intrazellulären pH-Wertes verfolgt werden kann. Es war nicht klar, ob dies mit beiden Methoden möglich ist.

Propagationen. Zu Beginn der Propagationen befand sich die Hefe in der Anlaufphase (Probenahme nach 3 h). Die Anpassung an das

neue Medium war noch nicht ganz abgeschlossen. Die Hefe hatte einen geringen ICP-Wert und damit geringe Vitalität. Nach 14 h befand sich die Hefe in der exponentiellen Wachstumsphase und hatte sich an die neue Umgebung angepasst. In dieser Phase sind die Proliferationsaktivität und das Wachstum am größten, der Metabolismus ist höchst aktiv und die ATPase-Konzentrationen hoch. Indem die ATP-asen aktiviert werden, ist die Hefe in der Lage, mehr Protonen aus dem Zytoplasma zu schleusen. Enzyme, die die Proliferation und die Reaktionen für das Wachstum regulieren, haben gewöhnlich ihr Aktivitätsmaximum bei höheren pH-Werten (Madshus 1988) und arbeiten deshalb besser. Die Reaktionen in der Zelle laufen dadurch in der exponentiellen Phase im Gegensatz zu anderen Wachstumsphasen am schnellsten. Folglich befindet sich die Hefe während der exponentiellen Phase im vitalsten Zustand; dies wird durch hohe ICP-Werte belegt (Back et al. 1998). Die Ergebnisse der durchgeführten Propagationen bestätigten diese Beobachtung.

Nach 26 h war das Ende der Propagation erreicht (F.4), gekennzeichnet durch eine Stagnation im Wachstum. Hefe, die sich in der stationären Wachstumsphase befand, unterteilte sich in zwei Subpopulationen mit unterschiedlicher Vitalität. Valli *et al.* berichteten ebenfalls, dass sich Hefe der stationären Phase in zwei Subpopulationen aufteilt (Valli et al. 2005). Eine Population war so vital wie Hefe aus der exponentiellen Phase, die andere war deutlich unvitaler und glich eher der Anlaufphase. Die unvitalere Subpopulation war durch einen einsetzenden Nährstoffmangel geprägt, der gegen Ende der Propagation eintrat. Diese Zellen waren am Sterben. Mit einsetzender Zellyse kehrten neue Nährstoffe ins Medium zurück, die durch andere Zellen assimiliert werden konnten. Die vitalere Subpopulation hatte weiterhin hohe Proliferationsaktivität und nutzte diese absterbenden Zellen als Nahrungsquelle. Valli *et al.* berichteten weiterhin, dass das Aussetzen der stationären Hefe in Puffer mit niedrigem pH einen schnellen Abfall des ICP bewirkt. Hingegen zeigte Hefe aus der exponentiellen Phase einen wesentlich langsameren Abfall des ICP in dem gleichen Puffer (Valli et al. 2005). Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass die Protonenpumpen der exponentiellen Hefe besser arbeiten und dadurch einen höheren ICP aufrechterhalten und sich in höheren Reaktionsraten widerspiegeln.

Methodenübertragung. Die Übertragung der SICP-Methode vom Photometer auf das Zytometer verlief erfolgreich, der ICP einer Hefepopulation konnte mit einer Kombination aus Zytometer und 5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat gemessen werden. Der größte Vorteil hierbei ist, eine ICP-Verteilung der Hefepopulation zu erhalten statt eines Mittelwertes und damit Anlaufphase, exponentielle und stationäre Phase signifikant zu differenzieren. Die stationäre Phase zeigte im Gegensatz zur exponentiellen und Anlaufphase eine verbreiterte ICP-Verteilung. Unabhängig von der Messmethode besaß Hefe in der Anlaufphase eine deutlich geringere Vitalität als in den anderen beiden Phasen. Mit Photometrie war es nicht möglich, zwischen exponentieller und stationärer Phase signifikant zu unterscheiden. Die unvitalere Subpopulation der stationären Phase konnte nur detektiert werden, indem jede einzelne Zelle gemessen und analysiert wurde. Dies war nur mit einem Zytometer möglich. Valli *et al.* deckten ebenfalls Subpopulationen durch zytometrische Messungen auf, allerdings verwendeten sie den Farbstoff SNARF-4F (Valli *et al.* 2005). Der Farbstoff SNARF findet üblicherweise bei zytometrischen Messungen Verwendung (Wieder *et al.* 1993, Chow *et al.* 1996), während der Farbstoff Carboxyfluorescein oder Fluorescein bei photometrischen Messungen angewendet wird (Thiele & Back 2005, Visser *et al.* 1979, Imai & Ohno 1995b, Bracey *et al.* 1998). Die Korrelation der beiden Methoden wies ein signifikant hohes Bestimmtheitsmaß auf ($p < 0,0001$) und bestätigte die Übertragbarkeit der fluoreszenzphotometrischen ICP-Messungen auf das Zytometer, unabhängig von der Wachstumsphase. Weiterhin wurden mit der zytometrischen Methode bei den Wiederholungen geringere Varianzkoeffizienten erreicht und damit reproduzierbarere Ergebnisse als mittels Photometrie.

Zytometrische ICP-Werte. Die Kalibrierung mit Superdex™ 200 Partikeln ermöglichte eine Universalkalibrierung für Flusszytometer. In der Fluoreszenzdetektion gab es keine Unterschiede zwischen Hefezellen und Superdex™ 200 Partikeln. Die mit Farbstoff absorbierten Partikel zeigten die gleiche Fluoreszenzcharakteristik (Intensität, Anregungs- und Emissionswellenlänge) wie Hefezellen. Visser *et al.* verwendeten Sephadex G-25 Kügelchen und konnten in ihren Versuchen sehr gut Zellen nachahmen. Sie zeigten, dass an Sephadex-Kügelchen gebundenes Fluorescein keine signifikanten Unterschiede in den An-

regungsspektren im Vergleich zu freiem Fluorescein gibt. Die Wellenlängenverschiebung durch die Bindung betrug nicht mehr als 10 nm (Visser et al. 1979).

Die Verwendung von Superdex™ 200 Partikeln vermied außerdem den Einsatz von Mitteln, die eine Zell-Permeabilisierung hervorrufen und somit eine In-situ-Kalibrierung möglich machen. Verschiedene Wissenschaftler verwendeten das antimykotische Mittel Amphotericin B (Valli et al. 2005, Valli et al. 2006) oder das Antibiotikum Nigericin (Chow et al. 1996, Wieder et al. 1993) zur Permeabilisierung der Zellwand. Die Aufnahme des Farbstoffs wird dadurch erleichtert. Die Zellen müssen zusammen mit dieser Substanz und einem starken K^+ -Puffer behandelt werden, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen internem und externem pH ergibt, indem die internen K^+ -Ionen mit externen H^+ -Ionen getauscht werden. Neben der Tatsache, dass diese Bearbeitung der Zellmembran Verfälschung hervorrufen kann, ist auch die Verwendung der Kalibrierung bei einem anderen Hefestamm fraglich.

Ein Vergleich zwischen den Messwerten von Photometer und Zytometer zeigte, dass mit letzterer Messmethode höhere ICP-Werte erreicht wurden. Die vorliegenden photometrischen Daten lagen in einem Bereich zwischen ICP 5,7 - 6,2. Normalerweise haben glykolytische Enzyme ihr pH-Optimum bei höheren pH-Werten um pH 7 (Madshus 1988). Niedrige photometrische ICP-Werte können ein Indiz für durch Puffer verfälschte Werte sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Fluoreszenzfarbstoff aus den Zellen ins umgebende Medium abgegeben werden kann (Breeuwer et al. 1994, Breeuwer et al. 1995, Breeuwer & Abee 2000). In diesem Falle befindet sich ein Teil des Farbstoffs im Puffer und ein Teil in der Zelle. Die Fluoreszenzintensität, die mit dem Photometer erfasst wird, setzt sich aus fluoreszierender Hefe und fluoreszierendem Medium zusammen. Der Farbstoff 5,6-Carboxyfluorescein hat in dem Puffer mit niedrigem pH ($pH = 3$) eine niedrige Fluoreszenz (Abbildung 6.1) und verfälscht dadurch das Ergebnis, indem der ICP niedriger ausfällt als der tatsächliche ICP der Zelle. Flusszytometrie hingegen misst nur die Fluoreszenz von Hefezellen und der ICP ist nicht durch das Fluoreszenzsignal des Puffers beeinflusst.

Breeuwer *et al.* berichteten, dass Carboxyfluorescein sehr gut in Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* zurückgehalten wird, wenn diese auf Eis gelagert sind. Bei höheren Temperaturen (30 °C) steigt der Austritt des Farbstoffs rapide an. Das Ausströmen ist außerdem vom pH-Wert des externen Puffers abhängig; je niedriger der pH, desto schneller tritt er aus der Zelle aus (Breeuwer *et al.* 1994). In späteren Experimenten berichteten diese Autoren, dass bei Zugabe von Glucose zum extrazellulären Medium die Zellen den Farbstoff 5,6-Carboxyfluorescein innerhalb von 20 min komplett zu den Vakuolen transportieren und nach ca. 1 h ins extrazelluläre Medium ausschleusen (Breeuwer & Abee 2000). Imai und Ohno gaben an, dass 5,6-Carboxyfluorescein nicht einfach in die Zellorganellen eintreten kann und bewiesen dies mit Fluoreszenzmikroskopie. Sie bewerteten das Risiko als sehr gering, dass der Farbstoff in die Zellvakuolen eintritt (Imai & Ohno 1995b). Letztendlich befand sich keine Kohlenstoffquelle im hier für die Flusszytometrie verwendeten Puffer. Der Austritt des Farbstoffs wurde minimiert, indem die Probenvorbereitung bei 4 °C durchgeführt wurde und so die Rückhaltung von 5,6-Carboxyfluorescein vergrößert wird. Die Messung der Probe selbst wurde allerdings bei Raumtemperatur durchgeführt, bei der das Risiko des Farbstoffaustritts steigt. Die schnelle Fluoreszenzdetektion ist wichtig, um Fehlerquellen zu vermeiden. Die Messungen dieser Arbeit wurden innerhalb einer Minute durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Grund, der zu höheren ICP-Werten führen kann, sind die Geräteeinstellungen des Zytometers. Alle ICP-Werte, die mit dem Zytometer gemessen werden, sind nicht absolut. Die Signalverstärkung des Gerätes muss angepasst werden, um ein gutes Signal zu erhalten. Die Kombination der Verstärkungen der Spannungssignale bestimmt die Lage und Weite der Peaks und kann stark verschoben werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist bei jedem Zytometer anders und die Geräteeinstellungen modellabhängig. Die optimalen Einstellungen wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen Stressversuchen getestet und mit Vergleichsmessungen am Photometer durchgeführt, um eine Kombination der Verstärkungen für die Spannungssignale mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis zu finden.

Stress während der stationären Phase. Die Stressversuche in der stationären Phase wurden nur durchgeführt, um den detektierbaren Bereich an ICP-Werten aufzuzeigen, die mit dem Zytometer gemessen werden können. Unvital Hefepopulationen wurden erzeugt, indem verschiedene Stressarten appliziert wurden, die teilweise auch miteinander kombiniert wurden. Vitale Hefepopulationen hatten einen ICP-Bereich zwischen 6,2 - 7,2. Gestresste Hefepopulationen erstreckten sich in einem Bereich zwischen 5,2 - 7,2. Diese Ausdehnung des Bereiches war nur mit dem Zytometer zu beobachten, jedoch nicht mit dem Photometer.

Hefe, die für 45 h in physiologischer Kochsalzlösung gelagert war, zeigte einen deutlichen Vitalitätsverlust. Back *et al.* geben für eine Temperatur von 0 °C eine maximale Lagerzeit von zwei Tagen an, vermutlich im Medium Würze (Back *et al.* 1998). Imai schlägt eine maximale Lagerzeit von 24 h in physiologischer Kochsalzlösung bei niedrigen Temperaturen vor. Dieser Vitalitätsverlust nach 45 h bei Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung kann zum einen durch einen Nährstoffmangel erklärt werden und zum anderen durch die Verlangsamung des Hefestoffwechsels, bei der die ATPase-Aktivität verringert wird und somit der ICP kleiner ist (Back *et al.* 1998). Die zusätzliche Hitzebehandlung erzeugte eine Vitalität, die geringfügig niedriger ist. Das Erhitzen der Hefeprobe für 3 h bei 35 °C sollte eine Antwort bei Hitzestress hervorrufen (Ferguson *et al.* 2005, Trotter *et al.* 2001), sodass ein stärkerer Vitalitätsverlust zu erwarten ist. Dieser war jedoch nicht zu erkennen. Die Behandlung mit Ethanol hingegen wirkte sich stärker auf die ICP-Verteilung aus. Ethanol ist ein Zellgift, dass die Zellwandkonstitution ändert und die metabolischen Transportwege stört (Nagar-Legmann & Margalith 1986, Nagodawithana & Steinkraus 1976). Die hohe Sorbitolkonzentration rief einen osmotischen Schock hervor (Blomberg 2000, Reed *et al.* 1987, Rep *et al.* 2000) und verursachte den größten Vitalitätsverlust und Tod. Dieser größte Verlust kann auch in der längeren Expositionszeit, im Gegensatz zu den anderen Versuchen, begründet liegen.

Schlussfolgerung. Der Transfer einer fluoreszenzbasierten ICP-Methode vom Photometer auf ein Zytometer wurde erfolgreich durchgeführt. Unterschiede zwischen der exponentiellen und stationären Pha-

se während der Propagation konnten mit zytometrischen Messungen dargestellt werden, jedoch nicht mit photometrischen. Weiterhin war es möglich, unvitalere Subpopulationen der stationären Phase mit Zytometrie aufzudecken, die mit Photometrie nicht beobachtet werden konnten. Die Probenvorbereitungszeit und Messdauer ist für beide Detektionssysteme die gleiche. Die detailliertere Information über die Verteilung der ICP-Werte innerhalb einer Population verbunden mit einer größeren Präzision machen die Flusszytometrie zu einem nützlicheren Werkzeug, um den physiologischen Zustand einer Hefepopulation zu erfassen.

6.4.2 Stress während der exponentiellen Phase

Nach der erfolgreichen Methodenkorrelation wurde Hefe in weiteren Versuchen während der exponentiellen Phase gestresst. Es sollte gezeigt werden, ob mit der zytometrischen Methode Vitalitätsänderungen im Laufe der Propagation aufgezeigt werden können und ob sich die Hefe bis zum Erreichen der stationären Phase regenerieren kann. Verwendet wurden hierzu Hitzestress, Ethanolstress und osmotischer Stress.

35 °C-Hitzeschock. Die Fermentationsbrühe wurde 12 h nach Beginn der Propagation auf 35 °C aufgeheizt und nach Erreichen dieser Temperatur wieder auf 25 °C abgekühlt. In den Versuchen war zu sehen, dass das Zellwachstum normal voranschritt (Abbildung F.5), nachdem die Temperatur wieder bei 25 °C war. Die maximale Zelldichte wurde ca. 4 h später erreicht als im Referenzversuch. Hitzestress verursacht ein Anhalten in der G₁-Phase des Zellzyklus, welches reversibel ist (Trotter et al. 2001, Rowley et al. 1993). Diese zeitliche Verzögerung in der Propagation ist somit höchstwahrscheinlich aufgrund der Temperaturerhöhung erfolgt.

Die Hefe war im Moment der Probenahme nach 14 h gemäß den ICP-Verteilungskurven aus Abbildung 6.7 leicht unvitaler und nach 26 h leicht vitaler. Dieses Anhalten im Zellzyklus kann auch die Verschiebung der Lage der ICP-Verteilungskurven im Gegensatz zu den Versuchen mit ungestressten Zellen erklären. Das Aufheizen begann nach 12 h. Der Hitzeschock hielt das Wachstum an und somit befand

sich die Hefe im Moment der Probenahme (14 h) eigentlich in einem früheren Wachstumsstadium als bei den Standardpropagationen. Die mit 35 °C gestresste Hefe war am Beginn der exponentiellen Phase und deshalb leicht unvitaler. Die Probenahme nach 26 h zeigte eine vitale Hefe. Durch den Wachstumsstopp war die Hefe tatsächlich eher der exponentiellen als der stationären Phase zuzuordnen. Eine kurzzeitige Erhöhung der Temperatur auf 35 °C schadet der Hefe nicht, führt aber auch nicht zu einer Hefe im besseren physiologischen Zustand.

45 °C-Hitzeschock. 12 h nach Propagationsbeginn wurde die Hefesuspension auf 45 °C erhitzt und danach sofort auf 25 °C abgekühlt. Nach Stressinduktion benötigte die Hefe ca. 10 h, um weiter zu wachsen. Die Aufnahme von Nährstoffen wie Stickstoff und Zucker fand stark verlangsamt statt. Vermutlich war ein großer Teil der Proteine durch die hohe Temperatur denaturiert und der gesamte Zellzyklus kam zum Erliegen. Die ICP-Verteilungskurve der Probe nach 14 h war drastisch nach links verschoben. Sie war sogar unvitaler als Hefe aus der Anlaufphase.

Bei Hitzestress akkumuliert die Zelle Trehalose als Stressantwort (Attfield 1987). Es dient der thermischen Stabilität von Proteinen und Enzymen und reduziert die Bildung von Proteinaggregaten bei Hitzeeinwirkung (Hottiger et al. 1994). Dieses Disaccharid wird als bester Stabilisator für Makromoleküle beschrieben (Sola-Penna & Meyer-Fernandes 1998). Weiterhin werden Hitze-Schock-Proteine induziert, die oft als Chaperone fungieren. Die Chaperone der Hsp100-Familie können Protein-Aggregate aufheben und fehlgefaltete Proteine entfalten. Sie sind an der Rückfaltung von denaturierten Proteinen beteiligt (Ben-Zvi & Goloubinoff 2001). Trehalose hilft dem Chaperon Hsp104 bei der Rückfaltung von hitzegeschädigten Proteinen (Simola et al. 2000).

Es wird davon ausgegangen, dass ein Teil der Population durch die hohe Temperatur gestorben ist. Die geringe Anzahl an gemessenen Zellen weist darauf hin. Hier hat eine Rückfaltung der Proteine und eine thermische Stabilisierung nicht stattgefunden. Vermutlich sterben Zellen, die schon unvital sind. Der Metabolismus ist bereits so langsam, dass die Regulationsmechanismen für Stress nicht ausreichend betrie-

ben werden können. Für den anderen Teil ist der 45 °C-Hitzeschock sublethal, die Fähigkeit sich zu vermehren setzt nach ca. 10 h wieder ein. Die vitalen Zellen können überleben und regenerieren sich im weiteren Verlauf. Allerdings wird der physiologische Zustand einer ungestressten Hefe nicht mehr erreicht. Eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 45 °C schadet der Hefe sehr.

Osmotischer Schock. Zur Induzierung des osmotischen Schocks wurde dem Medium 13 h nach Propagationsbeginn D(-)-Sorbitol zugesetzt, sodass der scheinbare Extrakt bei 18 % lag. Der Abbau der vergärbaren Zucker fand weiterhin statt, wenn auch etwas langsamer. Stickstoff, gemessen als FAN, wurde von der Hefe genauso schnell wie im Referenzversuch assimiliert. Ethanol konnte bis zum Versuchsende nicht detektiert werden. Das Zellwachstum war geringer. In den ICP-Verteilungskurven einer mit Sorbitol geschockten Hefe ist zu erkennen, dass die Hefe sowohl in der exponentiellen Phase als auch in der stationären Phase unvitaler war als die ungestresste Referenzhefe.

Vindeløv und Arneborg zeigten, dass nach einer Perfusion von *Saccharomyces cerevisiae* mit einem hyperosmotischen Medium der intrazelluläre pH-Wert sinkt und dass die Zelle und die Vakuolen gleichzeitig schrumpfen. Der intrazelluläre pH fällt nach Kontakt mit hyperosmotischem Medium innerhalb 1 min signifikant ab und sinkt in den nächsten 10 min weiter. Sie gehen davon aus, dass die intrazelluläre Ansäuerung ein Resultat des Zellschrumpfens ist, bei dem die intrazelluläre Protonenkonzentration durch die Verkleinerung der Zelle ansteigt (Vindeløv & Arneborg 2002). Dies würde in einem verminderten ICP resultieren, der hier beobachtet wurde. Bei einer aktiven, vitalen Hefe pumpen die ATPasen die Protonen aus dem Zellinnern in das extrazelluläre Medium. Die ATPasen benötigen für diesen Vorgang ATP als Substrat. Bei hohem osmotischen Druck wird als kompatibles Solut Glycerin gebildet, um den Zellturgor zu stabilisieren und Biomoleküle vor Denaturierung zu schützen (Reed et al. 1987, Rep et al. 2000). Nach Blomberg findet die Bildung von Glycerin unter Verbrauch von 1 ATP statt (Blomberg 2000). Dieses ATP fehlt für die Aufrechterhaltung des ICP durch die Protonenpumpen (ATPasen). Es ist vorstellbar, dass der gemessene ICP deswegen geringer war.

Die Ethanolbildung ist bei hyperosmotischem Stress minimiert, da der Stoffwechselweg der Glykolyse durch die Glycerinbildung gestört ist (Abbildung 2.3). In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Biermessplatz kein Ethanol bis Versuchsende nachgewiesen werden. Die Detektionsgrenze des Gerätes liegt jedoch bei 1 Vol %. Der nicht nachweisbare Ethanolgehalt stützt jedoch die Aussage eines gestörten Stoffwechselweges.

Während der Propagation erholte sich die Hefe nicht ganz vom osmotischen Stress. Bei D'Amore *et al.* wurde der osmotische Druck ebenfalls durch Zugabe von Sorbitol angehoben und resultierte in einer Verminderung des Hefewachstums und der Gärraten. Die Arbeitsgruppe zeigte außerdem die damit verbundene Glycerinproduktion (D'Amore *et al.* 1988). Auch Tenge *et al.* beobachteten ein verlangsamtes Wachstum in High-Gravity-Würzen, welches durch eine verlängerte Anlaufphase und ein geringeres Hefewachstum in der exponentiellen Phase zustande kam (Tenge *et al.* 2006). Das Wachstum der knospenden Zelle ist durch hohen osmotischen Druck beeinflusst. Es findet ein schneller Zerfall der *actin filament cables* statt, der von einer langsameren Neuverteilung der kortikalen *actin filament patches* gefolgt ist. Aufgrund der Neuorganisation der Filamente resultiert dies in einem Polaritätsverlust und vermindertem Wachstum (Chowdhury *et al.* 1992). Geringeres Zellwachstum wurde hier ebenfalls beobachtet. Die Zelldichte könnte aufgrund des fehlenden ATP bei der Glycerinbildung (Blomberg 2000) vermindert sein, da es für den Anabolismus nicht zur Verfügung steht.

Ethanolstress. Der Nährlösung wurde 13 h nach Propagationsbeginn Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 7,8 Vol % zudosiert. Erstaunlicherweise hatte die Zugabe von Ethanol kaum einen Effekt auf den ICP der Hefe. Dennoch stagnierte das Wachstum der Hefe danach komplett. Extraktgehalt und FAN-Konzentration blieben konstant. Es muss davon ausgegangen werden, dass die verwendete Bierhefe an hohe Alkoholkonzentrationen von rund 5 Vol % adaptiert ist. Die Ethanolkonzentration im Medium ist mit 7,8 Vol % deutlich höher. Zudem wurde Ethanol nicht langsam gebildet, sondern die Hefe damit geschockt. Nicht-adaptierte oder nicht ausreichend adaptierte Hefen treten im Gegensatz zu Ethanol-adaptierten bei hohen Ethanolkonzentrationen in die stationäre Phase ein (Dinh *et al.* 2009). Dies konnte hier ebenfalls beobachtet werden.

Ethanol beeinträchtigt Wasserstoffbrückenbindungen und resultiert in einer Zerstörung der Struktur und Funktion von Enzymen sowie der Membran (Hallsworth 1998). Die Position membranständiger Proteine wird geschwächt und Transportmechanismen unter Ethanolstress beeinflusst (Jones & Greenfield 1987). Die Aminosäuren-Permeasen könnten beeinträchtigt sein, denn die Aufnahme des freien α -Aminostickstoffs kam zum Erliegen (Cartwright et al. 1987). Auch der Abbau des scheinbaren Extrakts war gestört. Nach Pascual *et al.* ist die Funktion glykolytischer Enzyme ab einer Konzentration von 8,5 Vol % beeinflusst (Pascual et al. 1988). Diese Aussage stimmt mit den erzielten Ergebnissen überein.

Die Hefe zeigte während des Ethanolstress nur eine geringe unvitalere Änderung in der ICP-Verteilung. Ethanol erhöht die Membranfluidität der Zelle. Durch diese Erhöhung steigt die Permeabilität an, wodurch Protonen besser passiv in den intrazellulären Raum einströmen können. Dies würde in einem verminderten ICP resultieren. Allerdings wird bei Ethanolstress die Plasmamembran-ATPase *in-vivo* aktiviert (Rosa & Sá-Correira 1991). Somit treibt Ethanol den Protonenausstoß an, was wiederum zu hohen ICP-Werten bei der Messung führt. Auch Dombek und Ingram beobachten, dass der intrazelluläre pH während einer Batch-Fermentation konstant bleibt (Dombek & Ingram 1987). Die Vitalität scheint hoch, obwohl die Hefe in keinem guten physiologischen Zustand ist.

Schlussfolgerung. Mit der zytometrischen Methode konnten Änderungen im ICP bei Stressversuchen gut dargestellt werden. Hierbei wurden auch kleine Unterschiede in den Verteilungskurven im Vergleich zu den Standardpropagationen sichtbar. Die Änderungen im ICP konnten physiologisch sinnvoll begründet werden. Kurzzeitige Erhitzung auf 35 °C war kein Stress für die Hefe, während 45 °C-Stress den deutlichsten Vitalitätsverlust verzeichnete. Ein osmotischer Schock verminderte sichtbar den intrazellulären pH-Wert einer Hefezelle, während eine hohe Ethanolkonzentration keinen Vitalitätsverlust verursachte. Allerdings stagnierten bei Ethanolstress alle Stoffwechselprozesse, deshalb muss in weiterführenden Versuchen getestet werden, ob eine dauerhafte Schädigung der Zellen vorliegt und ob die Proliferationsfähigkeit in neutralem Medium gegeben ist. Dies sollte auch für die anderen Stres-

soren überprüft werden. Mit diesen Daten könnte eine abschließende Evaluierung der zytometrischen ICP-Methode erfolgen.

Literaturverzeichnis

- Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G. R., und Stephanopoulos, G. **2006**. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science*, **314**(5805):1565–1568.
- André, L., Hemming, A., und Adler, L. **1991**. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Letters*, **286**:13–17.
- Annemüller, G., Manger, H.-J., und Lietz, P. **2008**. *Die Hefe in der Brauerei*. VLB Berlin.
- Aon, M. A. und Cortassa, S. **1998**. Catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show altered fermentative metabolism as well as cell cycle behavior in glucose-limited chemostat cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **59**(2):203–213.
- Attfield, P. V. **1987**. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Letters*, **225**(1-2):259–263.
- Auld, D. S. **2009**. The ins and outs of biological zinc sites. *Biometals*, **22**:141–148.
- Back, W., Herausgeber **2005**. *Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie*. Fachverlag Hans Carl.
- Back, W., Imai, T., Forster, C., und Narziß, L. **1998**. Hefevitalität und Bierqualität. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **11/12**:189–195.
- Ben-Zvi, A. P. und Goloubinoff, P. **2001**. Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of Structural Biology*, **135**(2):84–93.
- Binder, H., Arnold, K., Ulrich, A., und Zschörnig, O. **2001**. Interaction of Zn²⁺ with phospholipid membranes. *Biophysical Chemistry*, **90**:57–74.
- Blomberg, A. **1995**. Global changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. *Journal of Bacteriology*, **177**(12):3563–3572.
- Blomberg, A. **2000**. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiology Letters*, **182**:1–8.
- Boulton, C., Box, W., Quain, D., und Molzahn, S. **2001**. Vicinal Diketone Reduction as a Measure of Yeast Vitality. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **2**:89–93.

- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M., und Labarre, J. **1999**. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Molecular Microbiology*, **33**(2):274–283.
- Bracey, D., Holyoak, C., von Caron, G. N., und Coote, P. **1998**. Determination of the intracellular pH (pH_i) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *Journal of Microbiological Methods*, **31**:113–125.
- Breeuwer, P. und Abee, T. **2000**. Assessment of the intracellular pH of immobilized and continuously perfused yeast cells employing fluorescence ratio imaging analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **39**:253–264.
- Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Bunschoten, N., Zwietering, M. H., Rombouts, F. M., und Abee, T. **1995**. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4):1614–1619.
- Breeuwer, P., Drocourt, J. L., Rombouts, F. M., und Abee, T. **1994**. Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(5):1467–1472.
- Carman, G. M. und Han, G.-S. **2007**. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1771**:322–330.
- Cartwright, C. P., Veazey, F. J., und Rose, A. H. **1987**. Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general Microbiology*, **133**(4):857–865.
- Chow, S., Hedley, D., und Tannock, I. **1996**. Flow cytometric calibration of intracellular pH measurements in viable cells using mixtures of weak acids and bases. *Cytometry Part A*, **24**:360–367.
- Chowdhury, S., Smith, K. W., und Gustin, M. C. **1992**. Osmotic Stress and the Yeast Cytoskeleton: Phenotype-specific Suppression of an Actin Mutation. *The Journal of Cell Biology*, **118**(3):561–571.
- Cruz, S. D., Cilli, E., und Ernandes, J. **2002**. Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **108**(1):54–61.
- Cvengrošchová, M., Šepel'ová, G., und Šmogrovičová, D. **2003**. Effect of mashing-in temperature on free amino nitrogen concentration and foam stability of beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **7/8**:128–131.
- D'Amore, T., Panchal, C. J., Russell, I., und Stewart, G. G. **1988**. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, **2**(6):365–372.
- Daveloose, M. **1987**. An Investigation of Zinc concentrations in brewhouse worts. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **3**:109–112.

- Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., und Shimizu, H. **2008**. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* Cells to High Ethanol Concentration and Changes in Fatty Acid Composition of Membrane and Cell Size. *PLoS ONE*, **3**(7):e2623.
- Dinh, T. N., Nagahisa, K., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., und Shimizu, H. **2009**. Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **32**(5):681–688.
- Dinsdale, M. G., Lloyd, D., McIntyre, P., und Jarvis, B. **1999**. Yeast vitality during cider fermentation: assessment by energy metabolism. *Yeast*, **15**:285–293.
- Dombek, K. M. und Ingram, L. O. **1987**. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(6):1286–1291.
- Domitrovic, T., Fernandes, C. M., Boy-Marcotte, E., und Kurtenbach, E. **2006**. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **580**:6033–6038.
- Donhauser, S. **1981**. Gärstörungen. Befunderhebung und Gegenmaßnahmen. *Brauwelt*, **22**:816–817, 820–824.
- Donhauser, S. und Wagner, D. **1986**. Möglichkeiten der Beeinflussung des Zinkgehaltes der Würze. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **6**:223–230.
- Edelényi, M. **1970**. Mikrobiologische Kontrolle bei der Sektherstellung nach dem Tankgärverfahren mit Hilfe von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Nahrung / Food*, **14**(5):394–401.
- Eide, D. J. **1998**. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, **18**:441–469.
- Eide, D. J. **2009**. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **in Press**, **R900014200**:1–11.
- Erasmus, D. J., van der Merwe, G. K., und van Vuuren, H. J. **2003**. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, **3**:375–399.
- Ferguson, S. B., Anderson, E. S., Harshaw, R. B., Thate, T., Craig, N. L., und Nelson, H. C. M. **2005**. Protein Kinase A Regulates Constitutive Expression of Small Heat-Shock Genes in an Msn2/4p-Independent and Hsf1p-Dependent Manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **169**:1203–1214.
- Fernández, S., González, G., und Sierra, A. **1991**. The acidification power test and the behaviour of yeast in brewery fermentations. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **28**:89–95.
- Forsberg, H. und Ljungdahl, P. O. **2001**. Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **40**(2):91–109.

- Fritsch, M., Starruß, J., Loesche, A., Mueller, S., und Bley, T. **2005**. Cell cycle synchronization of *Cupriavidus necator* by continuous phasing measured via flow cytometry. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**(5):635–642.
- Furukubo, S., Matsumoto, T., Yomo, H., Fukui, N., Ashikari, T., und Kakimi, Y. **1997**. The *in vivo* 31P-NMR analysis of brewing yeast and its practical application to brewing. In: *Proceedings of the 26th EBC Congress, Maastricht*, Seiten 423–430.
- Gancedo, J. M. **1998**. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(2):334–361.
- Gelling, C. L., Piper, M. D. W., Hong, S.-P., Kornfeld, G. D., und Dawes, I. W. **2004**. Identification of a Novel One-carbon Metabolism Regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(8):7072–7081.
- Gutierrez, L. **1993**. Effect of some vitamins and micronutrient deficiencies on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientia Agricola*, **50**(3):484–489.
- Hallsworth, J. E. **1998**. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85**(2):125–137.
- Hewitt, C. J. und Nebe-Von-Caron, G. **2001**. An Industrial Application of Multiparameter Flow Cytometry: Assessment of Cell Physiological State and Its Application to the Study of Microbial Fermentations. *Cytometry*, **44**(3):179–187.
- Ho, A. V., Ward, D. M., und Kaplan, J. **2002**. Transition metal transport in yeast. *Annual Review of Microbiology*, **56**:237–261.
- Hottiger, T., Virgilio, C. D., Hall, M., Boller, T., und Wiemken, A. **1994**. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. *European Journal of Biochemistry*, **219**(1-2):187–193.
- Hu, X. H., Wang, M. H., Tan, T., Li, J. R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R. M., und Luo, Z. W. **2007**. Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **175**:1479–1487.
- Hutter, K. und Nitzsche, F. **2002**. Untersuchungen über die Alterung der Bierhefen mit Hilfe der flusszytometrischen Analyse. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **9/10**:196–199.
- Hutter, K.-J. **2002**. Flow Cytometric Determinations of Glycogen Content of Yeast During Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **108**(1):52–53.
- Hutter, K.-J., Kliem, C., Nitzsche, F., und Wiekler, M. **2003**. Biomonitoring der Betriebshefen in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. IX. Mitteilung: Trehalose - Stressprotektant der *Saccharomyces*-Hefen. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **7/8**:121–125.
- Hutter, K.-J., Remor, M., und Müller, S. **2000**. Biomonitoring in praxi mit fluoreszenzoptischen Verfahren. VII. Mitteilung: Untersuchungen zur flusszytometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes der Betriebshefe. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **5/6**:68–76.

- Imai, T., Nakajima, I., und Ohno, T. **1994**. Development of a New Method for Evaluation of Yeast Vitality by Measuring Intracellular pH. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, **52**(1):5–8.
- Imai, T. und Ohno, T. **1995**. Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *Journal of Biotechnology*, **38**(2):165–172.
- Imai, T. und Ohno, T. **1995**. The Relationship between Viability and Intracellular pH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(10):3604–3608.
- Iwanyszyn, W. M., Han, G.-S., und Carman, G. M. **2004**. Regulation of Phospholipid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Zinc. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(21):21976–21983.
- Jacobsen, T., Lie, S., und Hage, T. **1981**. Wort Quality and the Zinc content of malt. In: *Proceedings of the EBC Congress, Copenhagen*, Seiten 97–104.
- Jauniaux, J.-C. und Grenson, M. **1990**. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*, **190**(1):39–44.
- Jauniaux, J.-C., Vandenbol, M., Vissers, S., Broman, K., und Grenson, M. **1987**. Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. *European Journal of Biochemistry*, **164**(3):601–606.
- Jones, M. und Pierce, J. S. **1969**. Nitrogen Requirements in Wort - Practical Applications. In: *Proceedings of the 12th EBC Congress, Interlaken*, Seiten 151–160.
- Jones, R. P. und Greenfield, P. F. **1987**. Ethanol and the Fluidity of the Yeast Plasma Membrane. *Yeast*, **3**:223–232.
- Kara, B. V., Simpson, W., und Hammond, J. R. M. **1988**. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *Journal of the Institute of Brewing*, **94**:153–158.
- Kieninger, H. **1978**. Abfallhefe-Verwendung im Sudhaus. *Brauwelt*, **24**:872–880.
- Klasson, H., Fink, G. R., und Ljungdahl, P. O. **1999**. Ssy1p and Ptr3p Are Plasma Membrane Components of a Yeast System That Senses Extracellular Amino Acids. *Molecular and Cellular Biology*, **19**(9):5405–5416.
- Kreder, G. **1999**. Yeast Assimilation of Trub-Bound Zinc. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **4**:129–132.
- Kühbeck, F., Back, W., und Krottenthaler, M. **2006**. Release of Long-Chain Fatty Acids and Zinc from Hot Trub to Wort. *Monatsschrift für Brawissenschaft*, **3**/4:67–77.
- Kunze, W. **2007**. *Technologie Brauer & Mälzer*. VLB Berlin, 9. Auflage.
- Latterich, M. und Watson, M. **1993**. Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**(3):1111–1117.

- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A., Taidi, B., und Hodgson, J. **2005**. The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **42**:113–116.
- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A. E., Taidi, B., und Hodgson, J. **2007**. Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **113**(1):3–8.
- Leñoa, C. und Uden, N. V. **1984**. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **774**(1):43–48.
- Lie, S., Haukel, A. D., und Jacobson, T. **1975**. The effect of Chelators in brewery fermentation. In: *Proceedings of the EBC Congress, Nizza*, Seiten 601–614.
- Liu, Z., Thornton, J., Spírek, M., und Butow, R. A. **2008**. Activation of the SPS Amino Acid-Sensing Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* Correlates with the Phosphorylation State of a Sensor Component, Ptr3. *Molecular and Cellular Biology*, **28**(2):551–563.
- Lowe, D. P., Ulmer, H. M., Goode, R. C. B. D. L., und Arendt, E. K. **2005**. Biological Acidification of a mash containing 20 % barley using *Lactobacillus amylovorus* FST 1.1: Its effects on wort and beer quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **63**(3):96–106.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M., und Hohmann, S. **1995**. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *The EMBO Journal*, **14**(7):1360–1371.
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L., und Eide, D. **2000**. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, **19**(12):2845–2855.
- Madshus, I. H. **1988**. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *The Biochemical Journal*, **250**(1):1–8.
- Maeda, T., Takekawa, M., und Saito, H. **1995**. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, **269**(5223):554–558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., und Saito, H. **1994**. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**:242–245.
- Magasanik, B. **2003**. Ammonia Assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, **2**(5):827–829.
- Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., und Andre, B. **1997**. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **17**(8):4282–4293.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., und Estruch, F. **1996**. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal*, **15**(9):2227–2235.

- McLaren, J. I., Fischborn, T., Briem, F., Englmann, J., und Geiger, E. **1999**. Zinkproblem gelöst? *Brauwelt*, **45/46**:2158–2160.
- Methner, F.-J. **1999**. Optimierte Hefepropagation mittels kontinuierlicher Belüftung. In: *Proceedings of the 27th EBC Congress, Cannes*, Seiten 637–646.
- Michal, G., Herausgeber **1999**. *Biochemical Pathways*. Spektrum-Verlag.
- Miedaner, H., Herausgeber **2002**. *Brautechnische Analysenmethoden Band II*. Selbstverlag der MEBAK, 4. Auflage.
- Nagar-Legmann, R. und Margalith, P. **1986**. A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentative capacities. *Applied and Environmental Microbiology*, **26**(1):49–54.
- Nagodawithana, T. W. und Steinkraus, K. H. **1976**. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in „rapid fermentation,“. *Applied and Environmental Microbiology*, **31**(2):158–162.
- Narziß, L. **1979**. Die Verwertung von Nebenprodukten in der Brauerei. *Brauwelt*, **19**:637–642.
- Narziß, L. **1982**. Qualitative Aspekte der Verwendung von Extraktresten. *Brauwelt*, **41**:1810–1822.
- Noshiro, A., Purwin, C., Laux, M., Nicolay, K., Scheffers, W. A., und Holzer, H. **1987**. Mechanism of stimulation of endogenous fermentation in yeast by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Journal of Biological Chemistry*, **262**(29):14154–14157.
- O'Dell, B. L. **2000**. Role of zinc in plasma membrane function. *Journal of Nutrition*, **130**(5):1432–1436.
- Palmqvist, U. und Åyräpää, T. **1969**. Uptake of amino acids in bottom fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, **75**:181–190.
- Parkin, G. **2000**. The bioinorganic chemistry of zinc: synthetic analogues of zinc enzymes that feature tripodal ligands. *Chemical Communications*, **10.1039/b004816j**:1971–1985.
- Pascual, C., Alonso, A., Garcia, I., Romay, C., und Kotyk, A. **1988**. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**(3):374–378.
- Peddie, F. L., Simpson, W. J., Kara, B. V., Robertson, S. C., und Hammond, J. R. M. **1991**. Measurement of endogenous oxygen uptake rates of brewers' yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, **97**:21–25.
- Perpète, P., Santos, G., Bodart, E., und Collin, S. **2005**. Uptake of Amino Acids During Beer Production: The Concept of a Critical Time Value. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **63**(1):23–27.
- Pfenninger, H., Herausgeber **1996**. *Brautechnische Analysenmethoden Band III*. Selbstverlag der MEBAK.
- Pietrzik, K., Golly, I., und Loew, D. **2007**. *Handbuch Vitamine: Für Prophylaxe, Therapie und Beratung*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag.

- Piper, M. D., Hong, S.-P., und Dawes, G. E. B. I. W. **2000**. Regulation of the Balance of One-carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(40):30987–30995.
- Preston, R. A., Murphy, R. F., und Jones, E. W. **1989**. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**:7027–7031.
- Priest, F. G. und Stewart, G. G., Herausgeber **2006**. *Handbook of Brewing*. CRC.
- Ramos-Jeunehomme, C., Keyser, L. D., und Masschelein, C. A. **1979**. Formation de Substances Aromatiques et Cinétiques d'Adsorption des Acides Amines du Mout. In: *Proceedings of the 17th EBC Congress, Berlin*, Seiten 505–519.
- Rautio, J. J., Huuskonen, A., Vuokko, H., Vidgren, V., und Londesborough, J. **2007**. Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression. *Yeast*, **24**(9):741–760.
- Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R., und Gadd, G. M. **1987**. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(9):2119–2123.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J. M., und Hohmann, S. **2000**. The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(12):8290–8300.
- Rodrigues, P., Rodrigues, J., Barros, A., Ferreira, A., Gonçalves, C., und Hammond, J. R. M. **2004**. Vitaltitration: A New Method for Assessment of Yeast Vitality. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, **41**:277–281.
- Rosa, M. F. und Sá-Correira, I. **1991**. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(3):830–835.
- Rowley, A., Johnston, G. C., Butler, B., Werner-Washburne, M., und Singer, R. A. **1993**. Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **13**(2):1034–1041.
- Rusz, W. und Meyer-Pittroff, R. **2003**. The use of phenolic protein precipitates (trub) from beer production in animal feed. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **5**/6:84–88.
- Schmidt, H.-J. **1993**. Beschleunigte Herführung von Reinzuchtheffen. *Brauwelt* **133**, **44/45**:2254–2260, 2269–2274.
- Schneeberger, M., Krottenthaler, M., und Back, W. **2004**. Hefesuspension - Der Einfluss der Aufbewahrungsbedingungen der Hefesuspension auf die Qualität des darin enthaltenen, wiedergewinnbaren Hefebieres. *Brauwelt*, **38**:1148–1151.
- Schwedt, G. **1996**. *Taschenatlas der Umweltchemie*. Georg Thieme Verlag.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C., und Fink, G. R. **1986**. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} -ATPases. *Nature*, **319**:689–693.

- Silljé, H. H. W., Paalman, J. W. G., ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q. B., Verkleij, A. J., Boonstra, J., und Verrips, C. T. **1999**. Function of Trehalose and Glycogen in Cell Cycle Progression and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, **181**(2):396–400.
- Simola, M., Hänninen, A.-L., Stranius, S.-M., und Makarow, M. **2000**. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for the maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Molecular Microbiology*, **37**(1):42–53.
- Slater, S. J., Ho, C., Taddeo, F. J., Kelly, M. B., und Stubbs, C. D. **1993**. Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: Effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol. *Biochemistry*, **32**(14):3714–3721.
- Smart, K. **2003**. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. Wiley-Blackwell.
- Sola-Penna, M. und Meyer-Fernandes, J. R. **1998**. Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **360**(1):10–14.
- Sonnleitner, B. und Käppeli, O. **1986**. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(6):927–937.
- Stein, J. und Jauch, K.-W. **2003**. *Praxishandbuch klinische Ernährung und Infusionstherapie*. Springer.
- Stolz, J. und Sauer, N. **1999**. The fenpropimorph resistance gene FEN2 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(26):18747–18752.
- Taherzadeh, M. J., Lidén, G., Gustafsson, L., und Niklasson, C. **1996**. The effects of pantothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**(2):176–182.
- Tenge, C., Nagel, M., Wellhoener, U., und Jacob, F. **2006**. Influence Of Yeast Propagation In High Gravity Wort On Subsequent Fermentation Performance. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **1/2**(60):41–44.
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A., und Verrips, C. T. **2000**. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**:67–83.
- Thiele, F. und Back, W. **2005**. Measurement of yeast vitality using a modified version of the intracellular pH measurement (ICP). *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **1/2**:2–5.
- Thomas, K. C. und Ingledew, W. M. **1990**. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(7):2046–2050.

- Trotter, E. W., Berenfeld, L., Krause, S. A., Petsko, G. A., und Gray, J. V. **2001**. Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(13):7313–7318.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., und Mattanovich, D. **2005**. Intracellular pH Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* Cell Populations, Analyzed by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**:1515–1521.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., und Mattanovich, D. **2006**. Improvement of Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Cell Sorting for High Intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(8):5492–5499.
- van der Rest, M. E., Kamminga, A., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., und Konings, W. **1995**. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microbiological Reviews*, **59**(2):304–322.
- van Hoek, P., Flikweert, M. T., van der Aart, Q. J. M., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P., und Pronk, J. T. **1998**. Effects of pyruvate decarboxylase overproduction on flux distribution at the pyruvate branch point in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(6):2133–2140.
- Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., McEwen, J. E., Olsson, L., und Nielsen, J. **2007**. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **104**(7):2402–2407.
- Vindeløv, J. und Arneborg, N. **2002**. *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast*, **19**(5):429–439.
- Visser, J. M., Jongeling, A. A. M., und Tanke, H. J. **1979**. Intracellular pH-determination by fluorescence measurements. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **27**(1):32–35.
- Voigt, R. **1987**. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. Wiley-VCH, 6 Auflage.
- Wagner, D., Geiger, E., und Birk, W. **1983**. Der Zink- und Mangangehalt der Hefe in Abhängigkeit von bestimmten gärungstechnologischen Faktoren. In: *Proceedings of the EBC Congress*, Seiten 473–480.
- Wang, X., Bohlscheid, J., und Edwards, C. **2003**. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, **94**(3):349–359.
- Webb, M. E., Smith, A. G., und Abell, C. **2004**. Biosynthesis of pantothenate. *Natural Product Reports*, **21**(6):695–721.
- Wheatcroft, R., Lim, Y. H., Hawthorne, D. B., Clarke, B. J., und Kavanagh, T. E. **1988**. An assessment of the use of specific oxygen uptake measurements to predict the fermentation performance of brewing yeast. In: *Proc. Int. Conv. Inst. Brew.*, Seiten 193–199.

- Wieder, E. D., Hang, H., und Fox, M. H. **1993**. Measurement of intracellular pH using flow cytometry with carboxy-SNARF-1. *Cytometry Part A*, **14**:916–921.
- You, K. M., Rosenfield, C. L., und Knipple, D. C. **2002**. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(3):1499–1503.
- Zagoa, M. P. und Oteiza, P. I. **2001**. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**(2):266–274.
- Zähringer, H., Burgert, M., Holzer, H., und Nwaka, S. **1997**. Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the NTH1 gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Letters*, **412**(3):615–620.

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Weigert, C.; Steffler, F.; Kurz, T.; Shellhammer, T. H.; Methner, F.-J.: Application of a Short Intracellular pH Method to Flow Cytometry for Determining *Saccharomyces cerevisiae* Vitality. Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75, No. 17, S. 5615-5620.

Posterbeiträge

Weigert, C.; Steffler, F.; Kurz, T.; Shellhammer, T. H.; Methner, F.-J.: Application of a Short Intracellular pH Method to Flow Cytometry for Determining *Saccharomyces cerevisiae* Vitality. BioProScale Symposium - Inhomogeneities in large-scale bioreactors, Berlin, 24.-27. November 2009.

Weigert, C.; Götz, P.: Multivariate Curve Resolution as a Tool for Process Monitoring during Cultivation of Microalgae. BioPerspectives, Köln, 30. Mai - 1. Juni 2007.

Konferenzbeiträge

Steffler, F.; Weigert, C.; Methner, F.-J.: Bestimmung der Hefephysiologie während der Propagation. 95. Oktobertagung der VLB, Berlin, 13.-14. Oktober 2008.

Klug, K. I.; Weigert, C.; Methner, F.-J.; Schöber, J.; Fleischer, A.; Quantz, M.; Beuermann, T.:

Fluoreszenzsensor zur Aktivitätsbestimmung in Fermentationen.

21. VH-Hefetagung, Wien, 21.-22. April 2008.

Klug, K. I.; Weigert, C.; Methner, F.-J.; Schöber, J.; Fleischer, A.; Beuermann, T.:

Miniaturisierter faseroptischer Fluoreszenzmessaufbau zur Prozessverfolgung von Fermentationen.

8. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, 10.-12. Dezember 2007.

Anhang

A Chemikalien

Für die Versuche kamen die in Tabelle A.3 gelisteten Chemikalien zum Einsatz.

Chemikalie	Hersteller		Bestell- Nummer
L-Asparaginsäure	Roth	Karlsruhe	T202.2
D(+)-Biotin	Roth	Karlsruhe	3822.2
Calciumchlorid wasserfrei	Merck	Darmstadt	1.02378
Calcium-D(+)-pantothenat	Roth	Karlsruhe	3812.1
5,6-Carboxyfluorescein	Sigma	St. Louis, USA	21877
5,6-Carboxyfluorescein-Diacetat	Sigma	St. Louis, USA	C-8166
Dimethylsulfoxid	Aldrich	Steinheim	27043-1
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	VWR	Leuven, Belgien	24208.237
Ethanol	VWR	Leuven, Belgien	20823.327
D(-)-Fructose	Merck	Darmstadt	1.04007
D(+)-Glucose-Monohydrat	VWR	Leuven, Belgien	24371.297
L-Glutamin	Roth	Karlsruhe	3772.2
Glycin	VWR	Leuven, Belgien	24404.235
L-Histidin	Merck	Darmstadt	4351.
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt	1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt	1.04873
Kaliumjodid	Merck	Darmstadt	1.05051
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	Roth	Karlsruhe	P.024.1
Magnesiumchlorid	Merck	Hohenbrunn	814733

Chemikalie	Hersteller		Bestell- Nummer
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck	Darmstadt	1.05886
D(+)-Maltose-Monohydrat	AppliChem	Darmstadt	A3631
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	Merck	Darmstadt	
L-Methionin	Merck	Darmstadt	5707.
myo-Inosit	Merck	Darmstadt	1.04507
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt	1.06404
Di-Natrium-Hydrogenphosphat 12 H ₂ O	Merck	Darmstadt	6579
D(+)-Saccharose	VWR	Leuven, Belgien	27480.294
Salpetersäure 65% Suprapur	Merck	Darmstadt	1.00441
D(-)-Sorbitol	VWR	Leuven, Belgien	28210.298
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	Darmstadt	1.07209
Zinkchlorid	VWR	Leuven, Belgien	29156.231
Zink-Standardlösung CertiPUR	Merck	Darmstadt	1.19806
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck	Darmstadt	1.08883
Zitronensäure	VWR	Leuven, Belgien	20282.293

Tabelle A.3: *Eingesetzte Chemikalien*

B Weitere Analysen

Bestimmung der vergärbaren Zucker. Die quantitative Bestimmung der vergärbaren Zucker erfolgte über eine Flüssigkeitschromatographie. Die Zucker Maltose, Maltotriose, Glucose, Fructose und Saccharose wurden refraktometrisch detektiert (HPLC-Anlage der Firma Agilent, 1100 series).

- Säule: SUPELCOSIL™ LC-NH2, 5 μm , 25 cm $\times$ 4,6 mm, Katalog-Nr. 58338 (SUPELCO, Bellefont, USA)
- Eluent: 75% Acetonitril / 25% Wasser (v/v)
- Flussrate: 1 mL/min
- Injektionsvolumen: 10 μL
- Umgebungstemperatur
- Druck ca. 68 bar
- Brechungsindex-Detektor (RI)

C Propagatoren

Tabelle C.4: Verwendete Online-Sensoren des Propagators 1 (BioEngineering AG, L1523)

	Hersteller	Typ	Messbereich	Genauigkeit
Temperatur	-	Pt100	0-150 °C	0,1 °C
Gelöstsauerstoff	Mettler-Toledo	InPro6900	0-120 %	$\pm$ 0,05 %
pH	Mettler-Toledo	InPro2000	0-14	$\pm$ 0,01
Luft	Vögtlin Instruments	red-y smart	0,2-20 L/min	$\pm$ 0,5 % vom Endwert

D FAN-Extraktion aus Malzwurzelkeimen

Tabelle D.5: Zeitlicher Verlauf der Extraktion von freiem α -Aminostickstoff (FAN) in mg/L aus Malzwurzelkeimen (MWK) (Quelle A, Schüttelmazeration, Extraktionsmittel Wasser).

Zeit	20 g/L MWK	FAN (mg/L) bei Einsatz von			
		40 g/L MWK	100 g/L MWK	40 g/L autokl.* MWK	100 g/L autokl.* MWK
1 min	36,1 $\pm$ 1,1	55,3 $\pm$ 1,4	164,3 $\pm$ 4,1	137,7	418,9
10 min	51,8 $\pm$ 1,6	117,6 $\pm$ 3,6	242,4 $\pm$ 29,4	—	—
20 min	51,5 $\pm$ 2,3	101,1 $\pm$ 16,4	276,2 $\pm$ 11,8	—	—
40 min	50,7 $\pm$ 1,3	118,2 $\pm$ 11,0	279,1 $\pm$ 28,7	—	—
1 h	56,9 $\pm$ 3,7	117,9 $\pm$ 5,6	300,2 $\pm$ 19,5	—	—
1,3 h	55,9 $\pm$ 4,4	117,8 $\pm$ 15,2	284,6 $\pm$ 5,7	—	—
2 h	57,1 $\pm$ 0,9	129,6 $\pm$ 7,5	308,1 $\pm$ 4,2	—	—
4 h	63,8 $\pm$ 2,9	138,3 $\pm$ 9,3	374,3 $\pm$ 3,6	140,3	407,3
24 h	72,3 $\pm$ 7,0	144,9 $\pm$ 22,5	451,9 $\pm$ 19,1	142,1	326,8
48 h	69,6 $\pm$ 6,9	167,7 $\pm$ 13,3	501,7 $\pm$ 9,4	147,3	337,7
70 h	89,1 $\pm$ 3,8	203,9 $\pm$ 9,9	514,2 $\pm$ 8,3	141,4	324,4

*Autoklavierte Malzwurzelkeime sind vor Beginn der Schüttelmazeration 5 h lang mit Lösungsmittel in Kontakt.

E Propagationsversuche

Zusatz von Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothensäure.

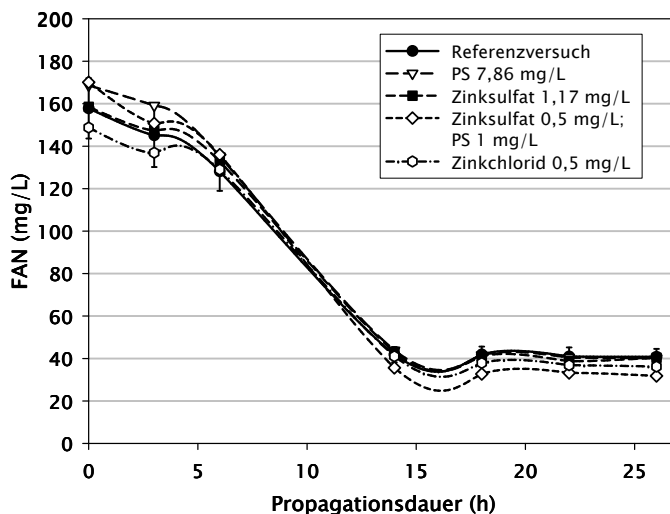


Abbildung E.1: Verlauf des FAN während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothensäure (PS) als Zusatz zur Würze; die angegebenen Konzentrationen sind berechnete Werte zu Beginn des Versuches. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

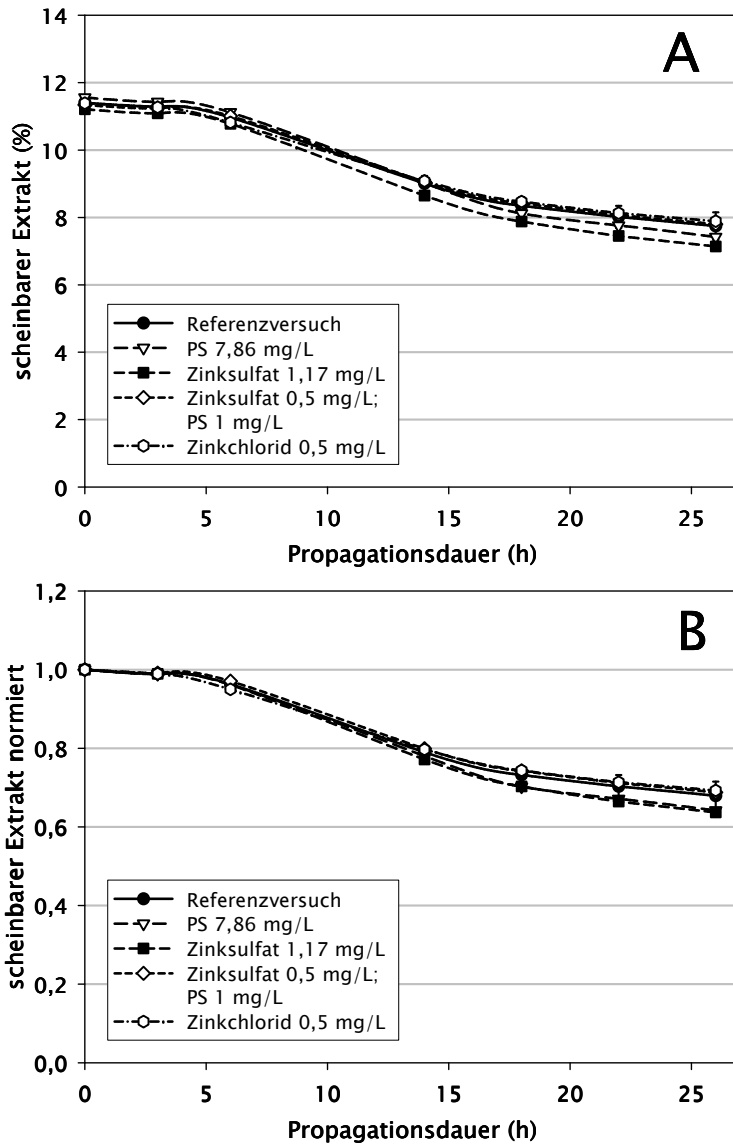


Abbildung E.2: Verlauf des scheinbaren Extrakts (A) und normiert (B) während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothensäure (PS) als Zusatz zur Würze; die angegebenen Konzentrationen sind berechnete Werte zu Beginn des Versuches. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

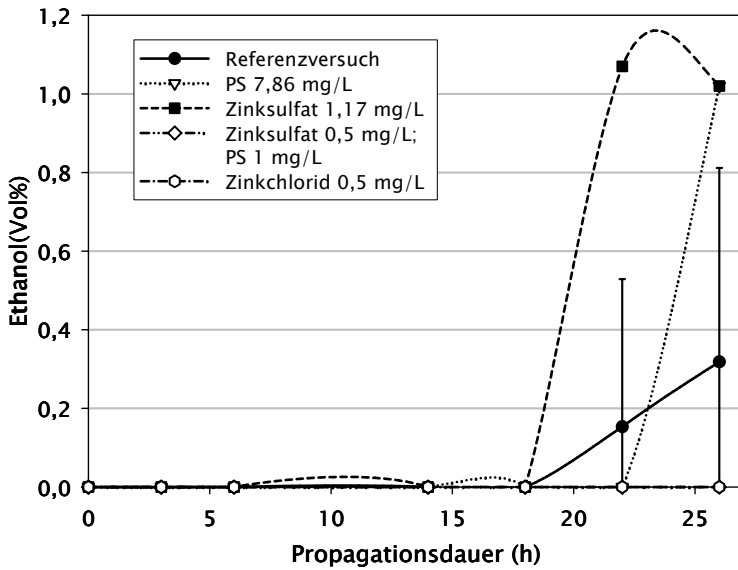


Abbildung E.3: Verlauf der Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 bei 25 °C mit Zinksulfat, Zinkchlorid und Pantothenensäure (PS) als Zusatz zur Würze; die angegebenen Konzentrationen sind berechnete Werte zu Beginn des Versuches. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Referenzversuche (●) $n = 6$, restliche Versuche $n = 1$.

F Vitalitätsversuche

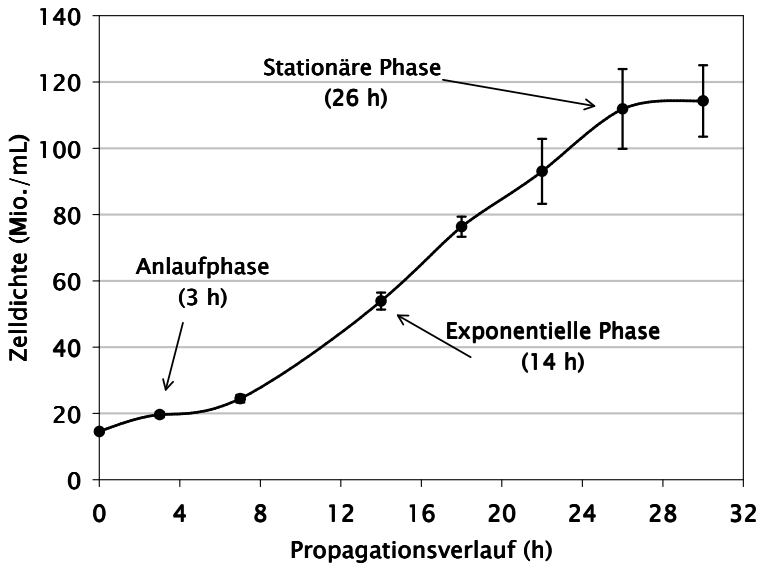


Abbildung F.4: Verlauf der Zelldichte während der Propagation von W34/70 in Würze und die zugehörigen Zeitpunkte für die Probenahme zur Vitalitätsbestimmung; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, $n = 6$.

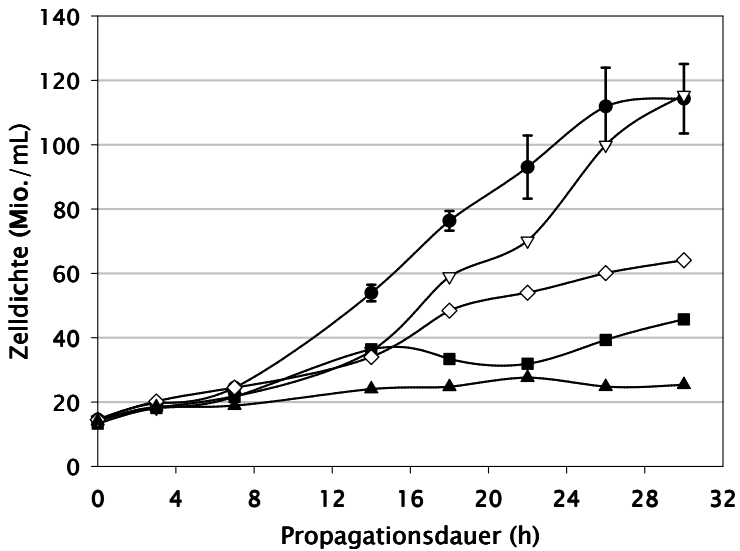


Abbildung F.5: Verlauf der Zelldichte des Hefestammes von W34/70 bei Stressversuchen und der Standardpropagation; Standardpropagation bei 25 °C, $n = 6$, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Dies Stressversuche sind Hitzeschock 35 °C (▽), 45 °C (■), Ethanolstress (▲) und osmotischer Schock (◇), $n = 1$.

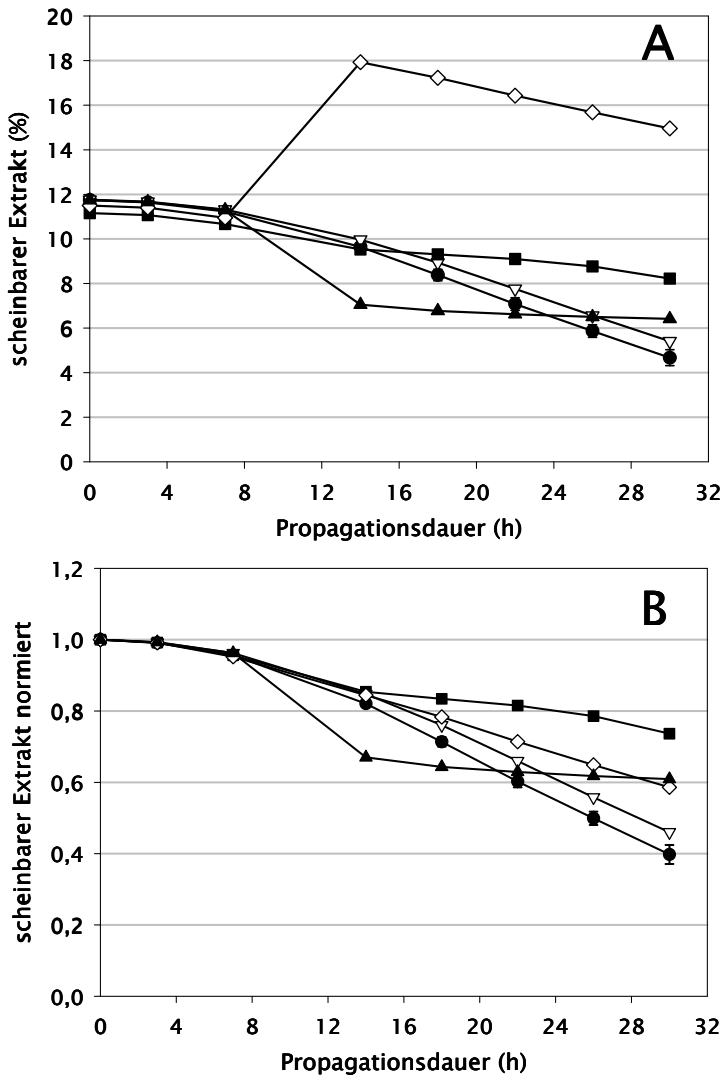


Abbildung F.6: Verlauf des scheinbaren Extrakts (A) und normiert (B) während der Propagation von W34/70 bei Stressversuchen; Standardpropagation (●) bei 25 °C, $n = 6$, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Dies Stressversuche sind Hitzeschock 35 °C (▽), 45 °C (■), Ethanolstress (▲) und osmotischer Schock (◇), $n = 1$. Verlauf von Ethanol/osmotischem Druck ist bei Normierung angepasst.

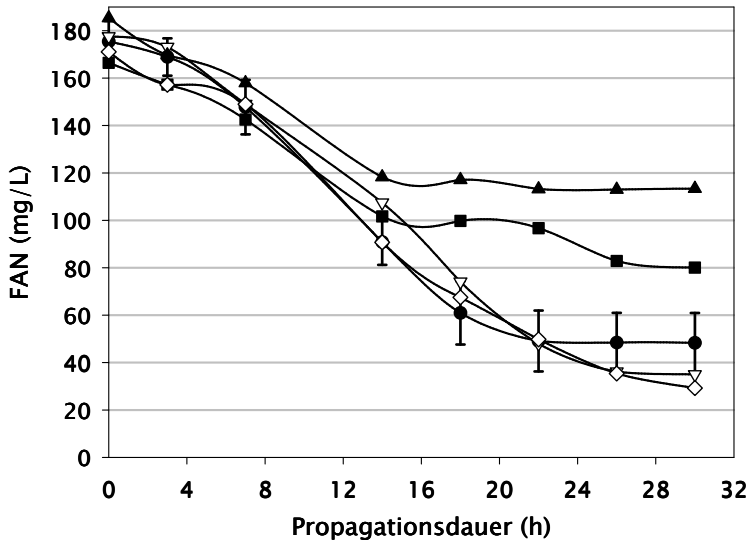


Abbildung F.7: Verlauf des freien α -Aminostickstoffs während der Propagation von W34/70 bei Stressversuchen; Standardpropagation (●) bei 25 °C, $n = 6$, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Dies Stressversuche sind Hitzeschock 35 °C (▽), 45 °C (■), Ethanolstress (▲) und osmotischer Schock (◇), $n = 1$.

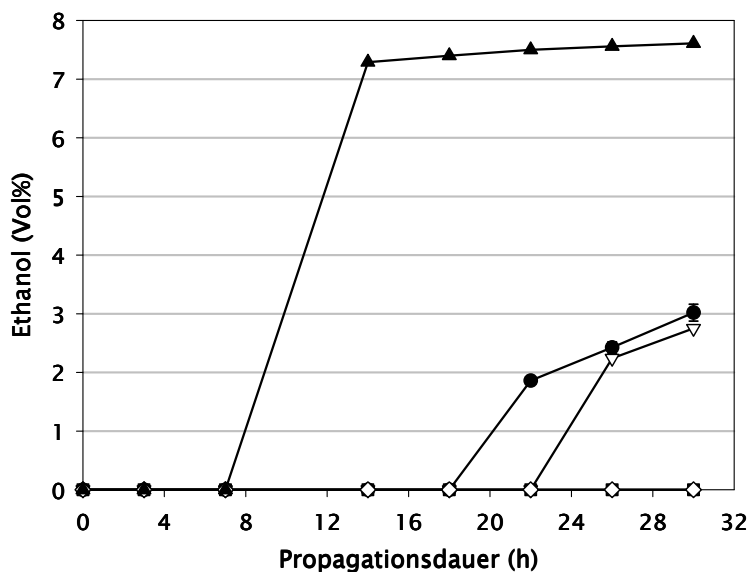


Abbildung F.8: Verlauf der Ethanolkonzentration während der Propagation von W34/70 bei Stressversuchen; Standardpropagation (●) bei 25 °C, $n = 6$, Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Die Stressversuche sind Hitzeschock 35 °C (▽), 45 °C (■), Ethanolstress (▲) und osmotischer Schock (◇), $n = 1$.