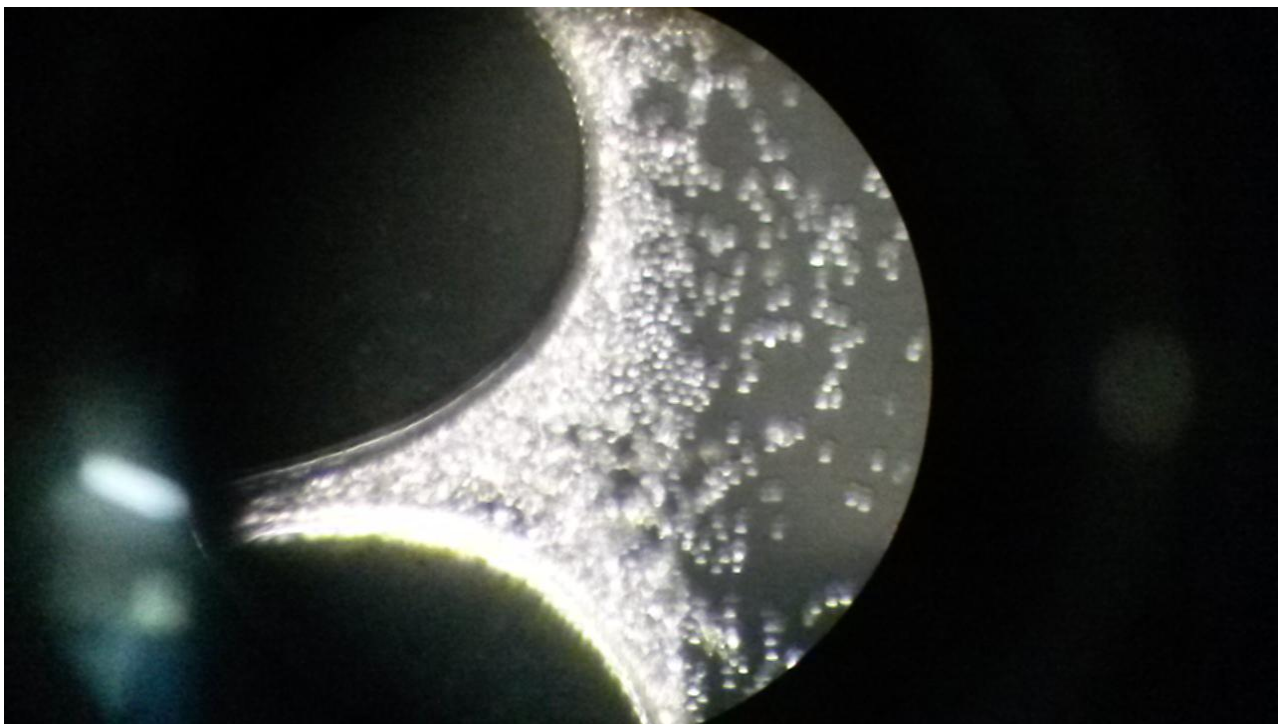


Brauhefezucht DIY



Charlotte Assenmacher und Melissa Giesen

Jugend forscht 2016

St. Michael-Gymnasium, Bad Münstereifel

Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung und Zielsetzung
2. Die Kältefalle
3. Hefe allgemein
4. Bierhefe
5. Hefezucht / Hybridhefe
6. Link- und Quellenangabe

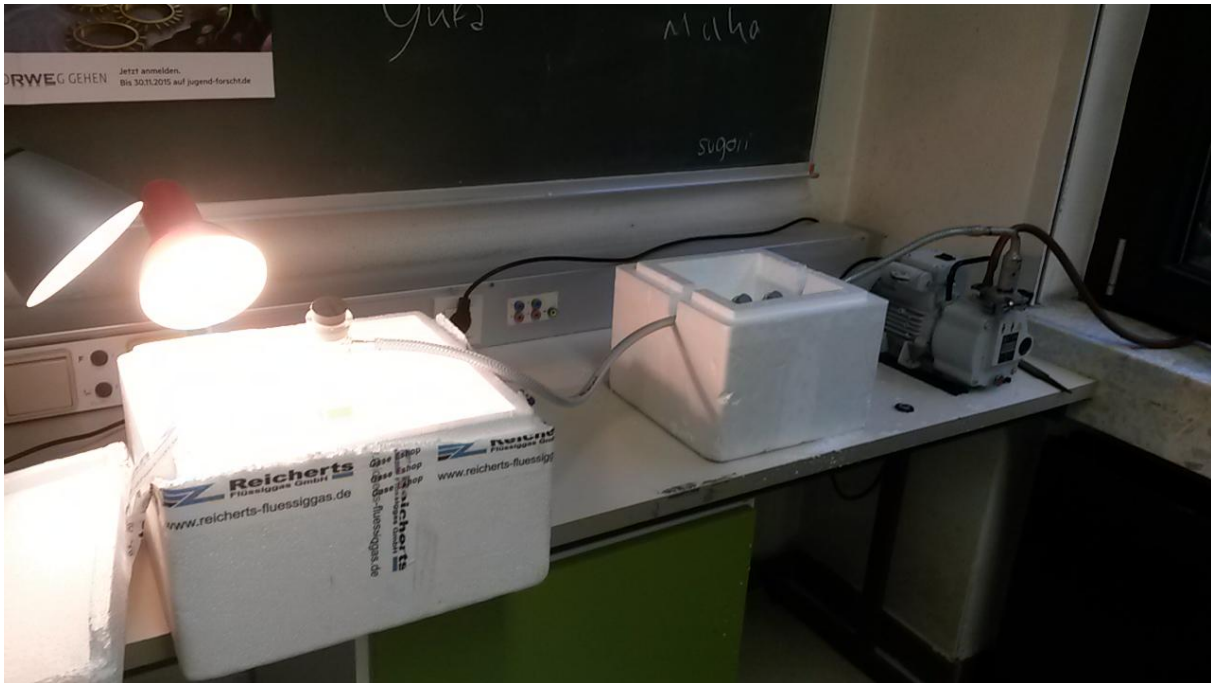
1. Kurzfassung und Zielsetzung

Unser Ziel ist es eine autonome Hefezucht mit schulischen Mitteln aufzubauen. Hierbei spielen zwei Faktoren eine zentrale Rolle:

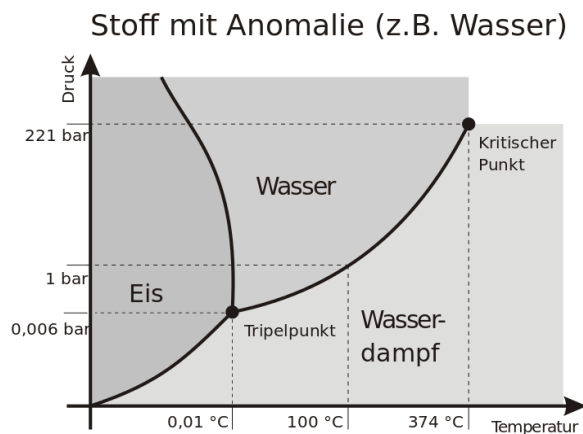
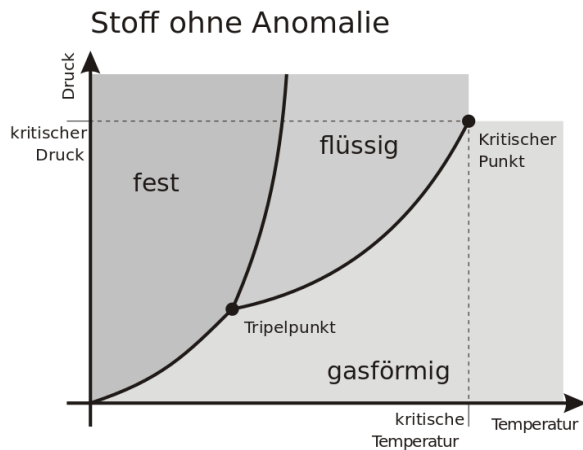
1. Entwicklung einer geeigneten Methode zur Konservierung der Hefezellen.
Das angestrebte Ziel hierbei ist eine optimale Überlebensrate der Hefezellen zu erreichen, weshalb wir uns für das Verfahren des Gefriertrocknens entschieden haben. Dabei wird eine Hefesuspension zunächst in einer Mischung aus Trockeneis und Ethanol schockgefroren, dass keine Eiskristalle entstehen. Anschließend erfolgt die Trocknung durch Sublimation im Vakuum. Die Schwierigkeit besteht dabei in der Realisierung einer geeigneten Anlage mit schulischen Mitteln.
2. Sobald das Problem der Konservierung gelöst ist, werden wir gezielte Kreuzungs- experimente durchführen um einen Hefestamm zu züchten, der optimal an unsere regionalen Gegebenheiten angepasst ist.
Letztendlich wollen wir ein Maximum an Unabhängigkeit von kommerziellen Anbietern erreichen.

2. Die Kältefalle

Am Anfang steht eine Vakuumpumpe, welche die Flüssigkeit der Hefe entfernen soll, indem sie ein Vakuum erzeugt. An dieser Pumpe sind zwei Schläuche befestigt, einer, um den Dampf des Rizinusöls an die Luft zu leiten, der andere, als Verbindung zu der eigentlichen Kältefalle. Dieser Schlauch ist dann an der anderen Seite mit dem u-förmigen Rohr verbunden, welches die eigentliche Kältefalle darstellt. Dieses Rohr steht in einem Behälter, in welchem eine Mischung aus Trockeneis und Ethanol gegeben wurde, damit sich die Flüssigkeit aus der Hefe, aufgrund der Kälte, darin sammelt. Weiter geht es dann mit einem weiteren Schlauch, welcher an das Gefäß, in welchem sich die Hefe befindet, angeschlossen ist.



Die Kältefalle funktioniert mit Druckunterschieden. Der Druck, der normal in einem Raum herrscht liegt bei einem Bar. Bei einer Temperatur von null Grad und einem Bar geht Eis normalerweise von einem festen Zustand in einen flüssigen Zustand über, wenn man jedoch den Druck bis unter 0,006 Bar senkt, geht Eis von einem festen direkt in einen gasförmigen Zustand über, so wird die Entstehung von flüssigem Wasser verhindert. Bei dem Bau der Kältefalle haben wir uns dieses Prinzip zunutze gemacht. Zunächst wird das Gefäß, in welchem sich die Hefe befindet in eine Ethanol-Trockeneis-Lösung gegeben, damit die Hefe schockfrosted, ohne, dass sich Eiskristalle bilden. Das gefrorene Hefefäß wird dann an die Kältefalle angeschlossen, an welcher sich die Vakuumpumpe befindet. Durch die Vakuumpumpe wird der Druck in dem Hefefäß, welches außer dem Schlauchanschluss verschlossen ist, soweit gesenkt, dass kein flüssiges Wasser mehr entsteht, anschließend wird durch erwärmen der Hefe durch zwei Lampen dafür gesorgt, dass das warme Eis sofort sublimiert, also gasförmig wird und so in den Schlauch entweicht, über den es in die eigentliche Kältefalle gelangt. Durch die Ethanol-Trockeneis-Lösung, welche sich in dem Gefäß befindet, in dem das u-förmige Rohr ist, wird der Wasserdampf so schnell runtergekühlt, dass es in dem Rohr absetzt, ohne, dass das Wasser flüssig wird. Dadurch kann die Flüssigkeit aus der Hefe gezogen werden, ohne dass sich Eiskristalle bilden, und die Membran der Hefe wird nicht beschädigt, so kann die Hefe überleben und getrocknet werden, sowie später wieder reaktiviert werden.



<https://de.wikipedia.org/wiki/Phasendiagramm#/media/File:Phasendiagramme.svg>

Den ersten Versuch mit der Hefe haben wir circa einen Tag laufen lassen und danach gesehen, dass der Schlauch mit Eis zugesetzt war, sodass der Versuch nicht mehr weiter laufen konnte, da keine Flüssigkeit mehr aus den Behälter mit der Hefe durch den Schlauch in das u-förmige Rohr gelangen konnte, um sich dort abzusetzen.

Der nächste Versuch ist erst einmal für den gleichen Zeitraum angesetzt und dann wird geschaut, wie sich der Versuch bis dahin entwickelt hat und dann die Zeit des Weiterlaufens entschieden.



Der erste Versuch, die Hefe mit der Kältefalle zu trocknen hat nicht komplett funktioniert, da der Versuch in der Mitte abgebrochen werden musste, weil sich der Schlauch, der das Wasser aus der Hefe in das u-förmige Rohr führt sich mit Eis zugesetzt hat. Als nächstes werden wir einen dickeren Schlauch nehmen, damit dieser sich nicht zusetzt. Dann werden wir den Versuch noch einmal durchführen und danach noch einmal auswerten und kontrollieren, ob wir noch etwas optimieren können und dies dann noch tun.

3. Hefe allgemein

Hefen gehören zu den einzelligen Pilzen. Die eukaryotischen Zellen sind fast überall zu finden: In der Atmosphäre, Luft, Wasser in Fruchtsäften und auf der Haut von Menschen. Heutzutage sind über 700 Hefe-Arten mit mehr als 5000 Stämmen bekannt. Es besteht noch keine eindeutig eingrenzende Definition für Hefe. Die gängigen Eigenschaften wie alkoholische Gärung oder Vermehrung durch Zellteilung sind nicht bei allen Arten vertreten. Die meisten Hefen sind fakultiv anaerob also nicht auf Sauerstoff angewiesen. Wenn jedoch Sauerstoff vorliegt können sie einen oxidativen Stoffwechsel nutzen. Hierbei können sie verschiedene Zucker zu Wasser und Kohlenstoff oxidieren. In Abwesenheit von Sauerstoff können sie jedoch nur den Zucker zu niedermolekularen Stoffen, wie zum Beispiel Ethanol und Kohlenstoffdioxid abbauen. Der Zuckerabbau unter aeroben Bedingungen liefert jedoch mehr Energie als die alkoholische Gärung, darum ist auch die Massenzuwachsrate unter aeroben Bedingungen sehr viel höher.

Durch den Gärungsprozess spielt die Hefe schon seit Jahrtausenden eine wichtige Rolle in der Nahrungsmitteltechnologie. Denn schon seit längerer Zeit (6000-2000 v. Chr.) ist bekannt, dass Menschen Bier oder Weine herstellen. Somit zählen die Hefen zu den wichtigsten Mikroorganismen mit kommerzieller Bedeutung für den Menschen. Zudem spielen sie eine zentrale Rolle als Modellorganismen, da sie im Gegensatz zu Bakterien mehr Ähnlichkeiten zu höher gestellten Organismen besitzen und ihr Genom schon länger vollständig sequenziert wurde, somit ist einer Arbeit mit den Genen der Hefe schon mal ein grundlegender Baustein gelegt. Sie besitzen eine komplexe Membranstruktur, Chromosomen mit einer Vielzahl von Organellen einschließlich Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum.

Hefezellen vermehren sich hauptsächlich asexuell durch Sprossung oder Teilung, jedoch ist auch eine sexuelle Fortpflanzung, unter schlechten Bedingungen, möglich.

Als Nahrung bezieht die Hefe ein breites Spektrum von Kohlenstoffen, es wurde jedoch noch keine Art beschrieben, die alle Zuckerarten abbauen kann. Vielmehr gibt es Unterschiede zwischen obergärigen Hefestämmen und untergärigen Hefen.

4. Bierhefe

Die Bierhefe ist in der Lage pro Zelle bis zu 25-mal Zellteilung zu betreiben, da die Proteindisulfidreduktase bei der Sprossung die Zellwand schwächt. Dabei entstehen

sogenannte Sprossnarben, welche jeweils zwei Prozent der Zelloberfläche einnehmen, daher sinkt die Stoffwechselleistung der Bierhefezelle mit zunehmender Zellteilungsrate. Die Sprossnarbe verhindert den Stoffaustausch an diesen Stellen. Nach circa 25 Teilungen stirbt die Bierhefezelle ab. In der Plasmamembran dienen Sterine zur Verfestigung derselben, da eine Beschädigung der Plasmamembran zum Zelltod führt. Eine Bierhefezelle besitzt 16 Chromosomenpaare, welche in 6 Chromosomenfragmente aufgeteilt sind, im Zellkern. Die Mitochondrien enthalten ein eigenes autonomes Erbmaterial, welches 20% des DNA-Gehaltes ausmacht. Diese mitochondriale DNA ist eigenreplikationsfähig, da sich bei der Zellteilung auch die Mitochondrien teilen. Hefezellen besitzen eine Vakuole, welche sich bei zu hohen Druckschwankungen öffnet und Hydrolasen (Katalysatoren bei hydrolytischen Spaltungen von Verbindungen unter Verbrauch von Wasser, reversibler Vorgang) freisetzt, welche die polymeren Zellbestandteile abbaut. Dadurch sind Bierhefezellen in der Lage, sich selbst zu verdauen. Das in Bierhefezellen vorhandene Enzym Proteinase A ist wichtig für die Bierschaumhaltbarkeit, es beteiligt sich am intrazellulären Stoffwechsel der Zelle und ist in der Vakuole für die Aktivierung, Inaktivierung und Modifikation von Enzymen verantwortlich. Wenn nicht genug Stickstoffnährstoffe im Fermentationsmedium (Gärmedium) vorhanden sind, und Aminosäuren gebraucht werden, wird es bei der Proteolyse von vegetativen Zellproteinen der Hefezelle genutzt.

Vegetative (ungeschlechtliche) Vermehrung:

Die Zelle wird nicht halbiert, sondern die Mutterzelle bildet eine Ausstülpung vor der Kernteilung, ein Tochterkern, also ein zweiter gebildeter Zellkern, wandert danach in die Tochterzelle ein. Zum Schluss werden die beiden Zellen durch eine Trennwand (Zellwand) abgeschnürt, die Anzahl der Zellen hat sich verdoppelt.

Konjugation (geschlechtliche) Fortpflanzung:

Hierbei gibt es keine Geschlechter im eigentlichen Sinne, sondern sogenannte Paarungstypen, welche sich häufig nur genetisch unterscheiden. Diese Zellen werden durch Pheromone zusammengeführt bzw. angelockt. Hierbei gibt es einmal einen a-Paarungsfaktor, welcher als Signal für eine Alpha-Zelle fungiert, die Alpha-Zelle (beide haploid) stoppt dann ihren Zellteilungszyklus und die ungeschlechtliche Vermehrung wird unterdrückt. Die Zellen bilden nun Korputationsauswüchse aus, welche man auch als Shmoos bezeichnet. Ist dies geschehen, bewegen sich die Zellen aufeinander zu und verschmelzen zu einer diploiden Zelle a/alpha, das Erbgut liegt nun gemischt vor. Die neu entstandene Zelle kann sich zwar noch teilen und so Zellen mit gleichem Erbgut entstehen lassen, sie kann sich jedoch nicht mehr geschlechtlich vermehren.

Buch: Die Hefe in der Brauerei, Prof. Dr. Gerolf Annemüller, Dr. Hans-J. Manger, Dr. Peter Lietz; Januar 2014; erste Auflage 2003; S. 143-154

<http://www3.hhu.de/biodidaktik/Hefe/allg/seiten/vermehrung/konjugation.html>

5. Hefezucht/ Hybridhefe

Unser zweiter Versuch war das Züchten einer Hybridhefe. Hierzu haben wir erst einmal zwei geeignete Hefestämme herausgesucht:

Danach haben wir die Hefe erst einmal in Malzbier angesetzt und sich vermehren lassen, damit wir genug für mehrere Versuche hatten und uns auch unter dem Mikroskop die Unterschiede, falls man denn welche sehen wird, ansehen können. Nachdem wir genug Hefe hatten, haben wir zuerst einmal eine Hefekultur mit jeweils einem Teil der einen und einen Teil der anderen Hefe angelegt und geschaut, bis zu welchen Temperaturen bzw. Temperaturschwankungen die Hefe überlebt. Zunächst haben wir die Hefe nach draußen gestellt und dann in unterschiedlichen Zeiträumen wieder rein geholt, damit die Bedingungen nicht allzu schlecht sind und die Chancen hoch sind, dass die Hefe überlebt, jedoch hat sich nachher bei dem Gärungstest mit einer 10%-igen Zuckerlösung in einem Gärröhrchen nichts getan. Auch nach 30-minütigem Warten war noch kein CO₂ vorhanden bzw. man hat keine Blässchen beobachten können. Als nächstes haben wir dann wieder zu gleichen Teilen Hefe beider Arten in einen Behälter mit Überdruckventil gegeben und haben diese dann in einen unbeheizten Raum und eine zweite Probe des gleichen in einen leicht beheizten Raum gestellt. Beide Proben haben überlebt, sich jedoch wesentlich langsamer vermehrt. Nun war es daran herauszufinden, ob die Hefe sich nur geteilt hat, also asexuelle Vermehrung stattgefunden hat, oder ob die Hefe sich sexuell vermehrt hat, also, dass sich aus zwei Zellen eine neue Zelle gebildet hat. Zunächst haben wir die Hefe unter einem Mikroskop betrachtet, erst jeweils beide reinen Hefestämme, dann die beiden gemischten Proben. Man kann Augenscheinlich erst einmal keine Unterschiede erkennen, selbst bei vierzigfacher Vergrößerung sah man zwar die Zellen, jedoch konnte man erst einmal keinen Unterschied zwischen den beiden reinen Hefestämmen erkennen, demnach konnte man auch nicht sagen, welche Unterschiede bei den beiden gemischten Proben hätten herauskommen können, da auch hier kein Unterschied zu sehen war. Also mussten jetzt neue Kriterien her. Nun müssen wir weitere Versuche durchführen, um herauszufinden, ob die Hefe sich jetzt zu einer neuen Art verpaart hat, oder ob es jetzt zwei parallel lebende Stämme in den Proben gibt. Zum einen könnte man jetzt noch die Gärungsrate bestimmen, das heißt, wir nehmen uns das Gärröhrchen mit einer geeigneten Flüssigkeit, zum Beispiel einer Zucker-Wasser-Lösung, und schauen, ob sich abgrenzbare Unterschiede bei den beiden reinen Hefen ergeben, diesen Versuch führen wir dann ein paar mal mit den reinen Hefen durch, um einen Mittelwert zu erhalten, welcher hoffentlich aussagekräftig ist. Dann testen wir, in welche Ausmaß die Gärung stattfindet, wenn wir beide Hefen ohne den Akt der Vermehrung, das heißt bei Temperaturoptimum, also optimalen Bedingungen, in das Gärröhrchen geben und vergleichen dies dann mit den Ergebnissen, welche wir bei dem Gärversuch mit den Mischhefen herausbekommen. Auch eine Möglichkeit wäre die Bestimmung des pH-Werts in der Lösung, in welcher das Bier sich befindet und die Veränderungen in einem gleichen Zeitraum. Auch kann man einen Stoff hinzugeben und die Zeit messen, welche die Hefe (in gleicher Konzentration) für den Abbau dieses Stoffes benötigt.

Buch: Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 5: Getränke, Professor Dr. Werner Back; S.139-141

<http://biologie.ch/index.php/Pilze>



6.Link- und Quellenangaben

<http://www3.hhu.de/biodidaktik/Hefe/allg/seiten/washefe/washefen.html>

<http://www3.hhu.de/biodidaktik/Hefe/allg/seiten/vermehrung/konjugation.html>

<http://www.meine-molekuele.de/die-chromosomen-zellteilung-rekombination/>

<http://flexikon.doccheck.com/de/Spezial:Mainpage>

Buch: Die Hefe in der Brauerei, Prof. Dr. Gerolf Annemüller, Dr. Hans-J. Manger, Dr. Peter Lietz;
Januar 2014; erste Auflage 2003; S. 143-154

Buch: Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 5: Getränke, Professor Dr. Werner Back; S.139-141

<http://biologie.ch/index.php/Pilze>

<https://de.wikipedia.org/wiki/Phasendiagramm#/media/File:Phasendiagramme.svg>