



## Hefewachstum: Kultivierung von Mikroorganismen - Hefen und Bakterien - in flüssigen Nährmedien

**BrauLabor  
9  
Flüssig-  
kulturen  
Anzucht von  
Mikro-  
organismen**

<b>Aufwand:</b> mittel	<b>Material:</b> mittel	<b>Zeit:</b> mittel	<b>Experimenttyp:</b> Koloniewachstum	<b>Anspruch:</b> einfach-mittel
---------------------------	----------------------------	------------------------	--	------------------------------------

### Einführung

Für den Heimbrauer ist eine Begegnung mit Hefen fast immer eine solche mit Hefen in flüssiger Umgebung, also mit einer sog. **Hefekultur\***. Sei es mit dem eingekauften Wunschhefestamm von kommerziellen Hefeproduzenten (siehe Glossar A-M Mikrobiologie > Hefelieferanten) in Form von Flüssighefen (z.B. Wyeast- oder White Labs-Hefen) oder der vor dem Anstellen\* bzw. Beimpfung der sterilen Bierwürze mit Wasser rehydrierten Trockenhefen (Bsp. Fermentis-Hefen). Zur Anzucht für die Erneuerung einer Hefestammkultur\* und evtl. der daraus gezogenen Arbeitskulturen\* auf einem Schrägagarröhrchen\* oder zur weiteren Hefepropagation\* braucht es immer Flüssighefekulturen. Dabei sollte immer mit grösstmöglicher Hygiene, also steril\* gearbeitet werden. Die folgenden Ausführungen zur Anzucht und Vermehrung von Hefen gelten auch für andere Mikroorganismen mit der entsprechenden Nährlösung.

\*: definierte Begriffe → siehe Info > Glossar Mikrobiologie



Kennen lernen einer der üblichen Anzucht-/ Vermehrungsverfahren von Mikroorganismen in flüssiger Nährlösung.

### Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Gasbrenner, Impföse, Impföshalter (Ersatz: RG-Gestell mit RG), Magnetrührer, evtl. Inkubationsschrank, Schere, Pinzette, evtl. Belüftungseinrichtung
Verbrauchsmaterial	Zündhölzchen/ Gasanzünder, Kosmetiktüchlein
Chemikalien	Ethanol (oder Isopropanol) 70% für Oberflächenentkeimung, Ethanol (Brennsprit), Material zur Hefekultivation: cf. Braulabor 7 → EMK mit steriler Nährlösung, gegossene Schrägagarröhrchen, sowie weiteres steriles Material je nach Verwendungszweck (cf. Pkt. 2.5.)
Biologische Objekte	Brauhefen-Flüssigkultur (z.B. eingekaufte Hefeflüssigkultur [Wyeast, White Labs, Hefe-Anzuchtkultur aus Trocken-Bierhefe (rehydrierte Hefen), Anstellhefe [Starterkultur] u.a.), gewaschene Ernte-Hefen, Schrägagarkultur/Hefe-Arbeitskultur

### Durchführung

#### I. Herstellung steriler Nährmedien

##### I.1. Arbeitsplatz:

Arbeitsplatz "Mikrobiologie-gerecht" einrichten: vgl. Website "Mikrobiologische Grundlagen" > Minimaltechnik I sowie 2.5.1. Giessen von Nähragarplatten, Pkt. 1+2

##### I.2. Nährmedium auswählen:

geeignetes Nährmedienrezept für den gewünschten Mikroorganismus auswählen: siehe [Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien](#)



### 1.3. Nährmedien steril herstellen:

siehe Braulabor 8: Herstellung flüssiger und fester Nährmedien.

## 2. Beimpfung der sterilen flüssigen Nährlösungen

### 2.1. Mikroorganismenquellen bereit stellen: z.B.

- Flüssighefen-Originalkultur (vorzugsweise die im Behälter nach dem Anstellen verbleibenden Restmikroorganismen<sup>\*\*</sup>/<sup>\*\*\*</sup>)
- Reste des eigenen Hefestarters nach dem Anstellen<sup>\*\*</sup>
- Stammkultur im Schrägagarröhrchen
- Einzelkolonie aus einer Ausstrichplatte

*\*\* hier muss besonders auf Beibehaltung der Sterilität geachtet werden, z.B. \*\*durch Entkeimung der Beutel vor und nach der Hefenentnahme mit einem Desinfektionsmittel wie Isopropanol, \*\*\*durch korrektes Abflammen des Erlenmeyerkolbens bzw. Kulturgefässes vor und nach der Hefenentnahme*

### 2.2. Entnahme des Mikroorganismus - Hefe oder z.B. Milchsäurebakterien:

- Bsp. aus **Wyeast-oder White Labs-Beutel**:

- 1: den bereits für die Beimpfung der sterilen Bierwürze schon einmal geöffneten Beutel an der Probeentnahmestelle mit 70% Isopropanol entkeimen und wiederum öffnen (z.B. mit entkeimter Schere frisch schneiden, oder Büroklammer entfernen, vgl. Abb. 1)
- 2: Impföse gemäss Abb. 2 abflammen, sofort in die Öffnung des Beutels einführen und an einer Stelle ca. 10 sec abkühlen lassen
- 3: Impföse in die Reste der Organismensuspension eintauchen und langsam eine *volle* Impföse heraus ziehen
- 4: Anzuchtgefäss Erlenmeyerkolben (EMK) abflammen (Abb. 3) und Impföse in flüssige Nährlösung eintauchen und leicht schwenken
- 5: Anzuchtgefäss wieder abflammen und verschliessen

- Bsp. aus **Reste des Hefestarters**:

- 1: Zuchtgefässe wie Erlenmeyerkolben mit steriler Nährlösung sowie Gefäss mit Hefestarter abflammen (Abb. 3).
- 2: Impföse gemäss Abb. 2 ausglühen, in Gefäss mit Hefestarter eintauchen, etwas warten und dann langsam eine *volle* Impföse heraus ziehen
- 3: sofort in das sterile Nährmedium des EMK eintauchen und leicht schwenken
- 4: Anzucht-EMK abflammen und wieder verschliessen



Abb. 1. Hefeentnahme.

Entnahme der Wyeast-Resthefen aus entkeimtem Beuten mit entkeimter Schere und abgeflammerter Impföse.



Abb. 3. EMK abflammen.



Abb. 2. Ausglühen der Impföse.

Impföse steil in die Gasflamme hinein halten und warten, bis der Draht rot glüht. Falls der Schaft auch aus Metall ist, den unteren Teil ebenfalls durch die Flamme ziehen.



- Bsp. aus **Stammkultur im Schrägagarröhrchen**:
  - 1: Schrägagarkulturröhrchen (SA) in die linke Hand nehmen und abflammen
  - 2: Impföse wie in Abb. 2 durch Ausglühen in der Gasbrennerflamme sterilisieren, ins Stammkulturröhrchen einführen und bis zum Erkalten ca. 10 sec warten
  - 3: sanft mit der Impföse aus der mit Hefen bewachsenen S-Linie eine Impföse voll Hefen abkratzen (Abb. 4)
  - 4: Anzucht-EMK öffnen und abflammen (Abb. 3), Impföse mit Hefen in sterile Nährlösung eintauchen und schwenken, bis sich alle Hefen abgelöst haben
  - 5: Anzucht-EMK wiederum abflammen und dann verschliessen
  
- Bsp. aus **Einzelkolonie aus einer Ausstrichplatte**:
  - 1: Impföse wie in Abb. 2 durch Ausglühen in der Gasbrennerflamme sterilisieren
  - 2: Deckel der Ausstrichplatte leicht anheben und Impföse an hefefreier Stelle in den Nähragar eindrücken → Abkühlen (Abb. 5)
  - 3: mit der Impföse sanft eine Einzelkolonie abstreifen (Abb. 6)
  - 4: EMK mit steriler Nährlösung abflammen und Impföse mit Hefen in Nährlösung eintauchen und schwenken, bis sich alle Hefen abgelöst haben
  - 5: EMK nochmals abflammen und wieder verschliessen

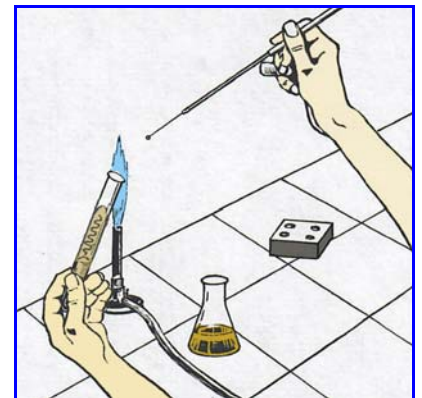


Abb. 4. Entnahme einer Hefeprobe aus dem Schrägagarröhrchen einer Stammkultur.

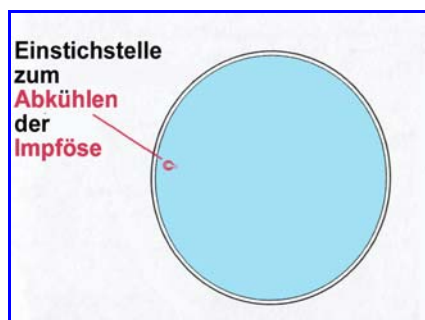


Abb. 5. Impföse abkühlen.

Nach dem Ausglühen in der Gasflamme wird die Impföse für ca. 5 sec unterhalb des Petrischalendeckels über der Agaroberfläche gehalten und dann am Rand in den Agar hinein gedrückt → vollständige Abkühlung.

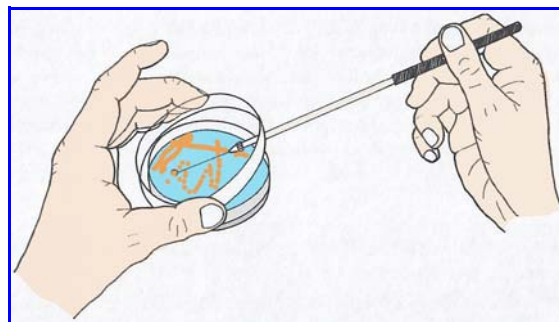


Abb. 6. Entnahme einer Einzelkolonie.

Mit der sterilen abgekühlten Impföse wird aus der Ausstrichplatte eine schöne vereinzelt Kolonie abgezogen und in die sterile Nährlösung des Anzucht-EMK eingebracht (cf. Pkt. 4).

### 2.3. frischbeimpften Anzucht-EMK beschriften:

mindestens mit Datum, Name des Organismus, Nährmedium (z.B. 12.08.2017, WLP 300 Hefeweizen, Malzagar M3)

### 2.4. Flüssigkultur bebrüten:

- Variante 1 (einfach): Zimmertemperatur, gerührt

EMK (mit beimpfter Nährlösung und Magnetrührstäbchen) auf Magnetrührer stellen und bei Zimmertemperatur rühren; nach ca. 3 Tagen sollte infolge des Hefewachstums eine deutliche Trübung sichtbar sein

*Hinweis: hat man vergessen, den Magnetrührstab zusammen mit der Nährlösung zu autoklavieren, kann man ihn nachträglich in einer 60-70%igen Isopropanollösung während ca. 60 sec entkeimen und dann mit einer ebenfalls entkeimten Pinzette nachträglich in die sterile Nährlösung einwerfen*

- Variante 2 (mittel): kontrollierte Temperatur, gerührt

EMK (mit beimpfter Nährlösung und Magnetrührstäbchen) im Brutschrank auf Magnetrührer stellen und bei leicht suboptimaler Temperatur\* rühren; nach 1 Tag dann im mittleren optimalen Bereich kultivieren, nach ca. 2 - 3 Tagen sollte infolge des Hefewachstums eine deutliche Trübung sichtbar sein

\* *suboptimale Organismus-Temperatur: aus dem Datenblatt des Hefestammes Temperaturbereich entnehmen und leicht darunter Anzucht starten (z.B. bei [Wyeast Weihenstephan Weizen 3068](#): 64-75 F → 18-24 °C → Anzuchttemperatur um 19-20 °C herum, mittlere optimale Anzuchttemperatur nach 1 Tag ca. 21 °C.*

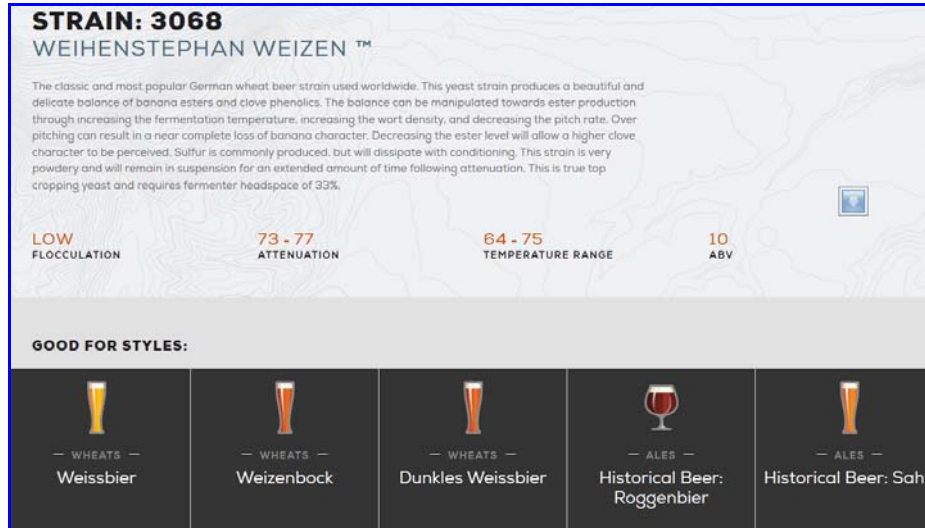


Abb. 7. Datenblatt zum Wyeast Weihenstephan 3068 Stamm. Info [hier](#).

- Variante 3 (aufwändig): kontrollierte Temperatur, gerührt, belüftet identisch mit Var. 2, aber zusätzlich wird die beimpfte Flüssigkultur mit Sterilluft begast: Silikonschlauch mit Sterilfilter 0.2 µm autoklavieren, an Aquarienpumpe anschliessen und mit Luftsauerstoff intervallsweise (z.B. alle 30 min, an eine Schaltuhr gekoppelt) belüften

## 2.5. Weiterverarbeitung der Hefesuspension:

ab einer sterilen Flüssighefekultur sind u.a. folgende Verarbeitungsschritte möglich:

1. Anlegen einer Stammkultur bzw. Arbeitskulturen auf Schrägagar → [Braulabor 14: Hefe-Stammkulturen auf Schrägagar](#), [Braulabor 15: Hefe-Stammkulturen in Hefe-Kryoröhrchen](#)
2. Erzielen einer Einzelkolonie zur Überprüfung der Reinheit und/oder zum Anlegen einer frischen Stammkultur → [Braulabor 13: Erzielung einer Einzelkolonie im Ausstrichverfahren](#)
3. Überprüfung der Kontamination der Hefekultur → [Braulabor 16: Kontrolle der Stammreinheit](#)
4. Anstellen /Beimpfen) einer sterilen Bierwürze → [cf. Braulabor 17, 18, 19.](#)
5. Weitere Verarbeitungsmöglichkeiten: siehe [Mikrobiologische Grundlagen](#) > ÜBERBLICK: im Braulabor einsetzbare mikrobiologische VERFAHREN rund um HEFEN und BAKTERIEN