



Lichtmikroskopische Untersuchungen an Hefepilzen

**BrauLabor
4**
Hefequalität:
Viabilitätstest
Anteil lebender
Hefen $\% \text{Yn}$

Aufwand: gering	Material: mittel	Zeit: mittel	Experimenttyp: Untersuchung/Beobachtungen	Anspruch: einfach
---------------------------	----------------------------	------------------------	---	-----------------------------

Einführung

Die Anzahl und der Anteil an lebenden Hefezellen (sog. Viabilität) ist einer der wichtigsten Faktoren, welche sowohl den Geschmack als auch die Qualität des Bieres beeinflussen. Vitalfarbstoffe sind in der Mikroskopie verwendete unschädliche organische Farbstoffe zur Anfärbung von lebendem Gewebe oder von Organismen, besonders Mikroorganismen, zur besseren Sichtbarmachung oder Kontrastwirkung unter dem Mikroskop.

Mit bestimmten Vitalfarbstoffen lassen sich Vitalfärbungen zur Gewinnung von Informationen über den physiologischen Zustand der Zellen nutzen: sind die Zellen intakt, sind sie aktiv (viabel, lebendig), sind sie inaktiv (tot)?



Kennen lernen einer einfachen Methode eines Viabilitätstests für Hefezellen mit Methyleneblau

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Lichtmikroskop inkl. Zubehör, Präpariernadel/ Lanzettnadel, Pinzette, Glasstab
Verbrauchsmaterial	Wasser, Linsoft (Kosmetiktüchlein), Objektträger (OT), Deckgläser (DG), Pasteurpipetten, evtl. Filtrierpapierstreifen (ca. 1 x 5 cm), wasserfeste Faserschreiber, evtl. Linsenreinigungstüchlein
Chemikalien	Farbstofflösungen: <u>Methyleneblau-Lösung</u> (nach Löffler): 0.5 g Methyleneblau in 30 mL 95% Ethanol lösen und 100 mL 0.01% Kalilauge KOH zugeben; Fertiglösung (z.B. ROTH), zur allgemeinen Kontrastierung von Mikroorganismen (Bakterien/Pilze blau); färbt insbesondere Zellkerne intensiv blau. Kauf: z.B. hier.
Biologische Objekte	Brauhefen, Backhefen, Wildhefen, Begleitflora der Hefen (z.B. in Wasser aufgeschlammter Oberflächenbelag von Trauben).

Lichtmikroskopische Untersuchung: Methyleneblautest auf lebende Hefezellen = Viabilitätstest

Methyleneblau: lebende, atmende Zellen können den aufgenommenen Methyleneblau-Farbstoff mit Hilfe von Enzymen (Dehydrogenasen) von der blauen Form in eine farblose Leukoform reduzieren. Tote Hefen zeigen sich dunkelblau: der Farbstoff diffundiert einfach durch die Zellwände und Membranen hindurch.

Methyleneblau + Wasserstoff **H** (übertragen durch Dehydrogenasen) \rightarrow reduziertes farbloses **H**-Leukomethyleneblau (Info, S. 8) \rightarrow die Zellen sind dann blass bläulich oder farblos. Toten Zellen fehlen die Dehydrogenasen-Enzyme, sie färben sich deshalb intensiv blau!

Die Praxis zeigt jedoch, dass mit dem Methylentest die Viabilität der Hefezellen leicht überschätzt wird (Info); der pH sollte bei der Färbung nicht kleiner als 4.6 sein. Trotzdem wird er in der Brauindustrie als rascher und einfacher Test verwendet, den auch der Heimbrauer leicht nutzen kann (Methyleneblau ist langzeitstabil und leicht beschaffbar [z.B. Optik Riesen, Waldeck, Amazon]).

Vorgehen Methyleneblaufärbung für Hefen für einen Viabilitätstest

- Vorbereitung der Farblösung:

Farbstammlösung: 1.3 g Methyleneblau in 30 mL 95% Ethanol lösen und 100 mL 0.01% Kalilauge KOH zugeben

- Durchführung Färbung:

1: Hefesuspension entsprechend der Aufgabenstellung verdünnen (nur Beobachtung: Verdünnungsgrad unkritisch; Zellzahlbestimmung: vgl. Abb. 1 → zusätzliche Verdünnung notwendig)

2: pro 5 mL Hefesuspension 1 Tropfen Farbstammlösung zugeben

3: angefärbte Hefesuspension ca. 1-5 min stehen lassen

4: Hefesuspension nochmals durchmischen und mikroskopieren (z.B. 400x)

5: falls Zellzahlbestimmung: gemäss Verfahren "Braulabor 4: Lebendzellzahlen bestimmen"

6: Gesichtsfeld Mikroskop (besser: Quadrate in Zählkammer): farblose und leicht blau/grünliche Zellen als vital/lebend und dunkelblaue Zellen als tote Zellen festhalten (Hinweis: blaue Tochterzellen [Zellknospen] nicht zählen, wenn Mutterzelle nicht gefärbt ist)

7: **Viabilität** der Hefekultur berechnen: $\text{Viabilität} = 100\% \times \frac{\text{vitale Zellen}}{\text{vitale Zellen} + \text{tote Zellen}}$

Tipp: falls ein Wert zwischen 85-90% errechnet wird, sollte die Kultur wegen der Überschätzungstendenz der Methyleneblauemethode nicht verwendet werden → frische Hefekultur anziehen [Hinweis: Frischhefe enthält etwa 0.5-1% tote Zellen].

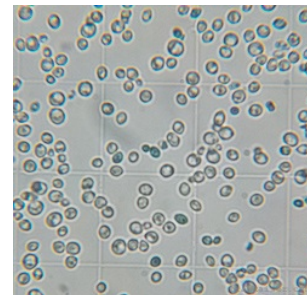


Abb. 1. Eine vitale Hefekultur in einer Zählkammer: pro Quadrat des Liniennetzes hat es zu viele Hefezellen → Zusatzverdünnung notwendig [Quelle Bild: [Abb. 7](#)]

Hinweis: tolle Bildfolgen zur Methyleneblaufärbung (Most-/Weinhefen) [hier !!](#)

Neben dem beschriebenen Effekt der Farbstoffreduktion Blau → Farblos ist auch die "abschirmende" Zellmembran bei intakten lebenden Hefezellen für den Farbunterschied lebend - tot verantwortlich.

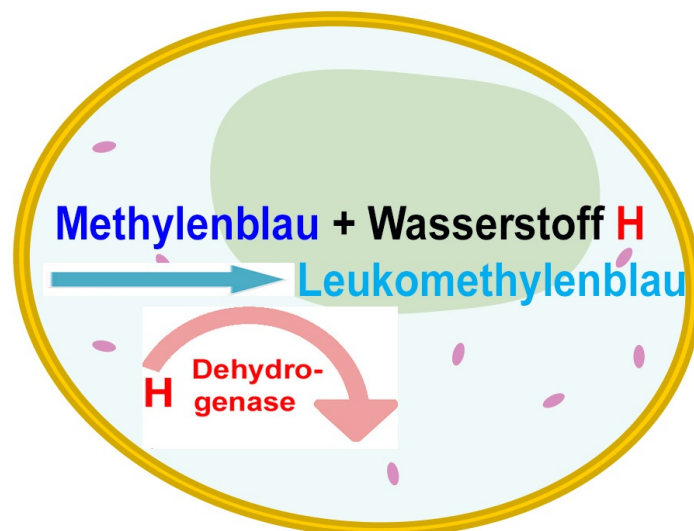


Abb. 2. Das blaue oxidierte Methyleneblau wird mittels des Enzyms Dehydrogenase durch $H^+ + 2e^-$ zum farblosen Leukomethylenblau reduziert (vereinfachte Darstellung, vgl. Abb. 3).

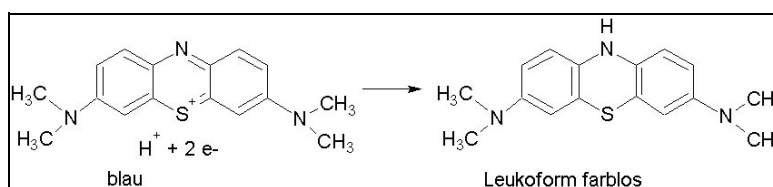


Abb. 3. Die Reduktion vom blauen Methyleneblau zur farblosen Leukoform.

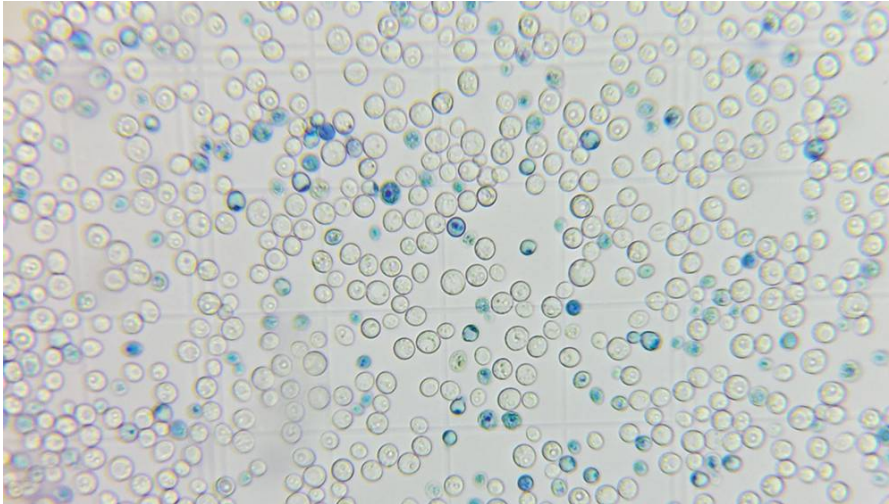


Abb. 4. Methylenblau-gefärbte Hefezellen. Tote Zellen deutlich blau gefärbt, lebende (viable, vitale) Hefezellen sind ungefärbt und prall-rundlich. [Quelle: [hier](#)]