Kryokonservierung: Hefestamm-kulturen in Hefe-Kryoröhrchen Herstellung von Gerfrierkulturen

BrauLabor 15
Kryokulturen

Stammhaltung in Kryoröhrchen

Material:	Aufwand:	Zeit:	Experimenttyp:	Anspruch:
hoch	hoch	mittel	Verfahrenstechnik	mittel

Einführung

Die Aufbewahrung von Hefekulturen im eingefrorenen Zustand bei tiefen Temperaturen ist die sicherste Konservierungsmethode: genetische Stabilität - kaum Mutationen und Konstanz der physiologischen Merkmale über lange Zeiträume hinweg. Das Tiefgefrieren hat jedoch auch Nachteile und Gefahren: Kosten und apparativer Aufwand (Cryo-Tiefkühlgeräte sind teuer), Einfrieren, Lagerung und Auftauen können zur Schädigung (z.B. durch Bildung von Eiskristallen in den Zellen, Zunahme der intrazellulären Konzentration an Elektrolyten*) und zum Tod der Zellen führen.

Zur Gefrierkonservierung verwendet man Kryoröhrchen*. Für Hefen wird dem Suspensionsmedium häufig Glycerin als Schutzstoff zugesetzt. Die hier eingesetzten Roti-Store Hefe-Cryoröhrchen von CARL ROTH AG ermöglichen dank dem speziell entwickelten Einfriermedium sowohl die sichere Aufbewahrung als auch die Rekultivierung von Hefezellen. Die Aufbewahrung erfolgt bei dem hier vorgestellten Verfahren in einem ganz normalen Haushalts-Tiefkühler ganz am Boden der Tiefkühltruhe, deren Temperatur mit -27°C gemessen wurde. Da kein Kryo-Tiefkühlgerät zur Verfügung stand, wurde auch die Dauerlagerung statt bei der empfohlenen -80°C ebenfalls bei -27°C getestet.

*: definierte Begriffe –> siehe Info > Glossar

Mit dieser Anleitung zur Kryokonservierung von kostbaren Bierhefen soll ein aufwändigeres Verfahren zur sicheren Stammhaltung über Monate und Jahre hinaus mit relativ einfachen Mitteln vorgestellt werden, das ambitionierte Heimbrauer mit Basiswissen in mikrobiologischen Techniken genutzt werden kann. Kaufen von guten kommerziellen Hefesuspensionen im SmackPack oder PurePitch macht auch Spass, aber Hefen selbst weiter züchten und die sichere Stammkulturhaltung über einen längeren Zeitraum sind pure Freude und lösen bierische Emotionen aus.

Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	Cryoblock (z.B. Rotilabo-Kühlbox, Roth Best.-Nr. K088.1), sterile 1-mL-Pasteurpipetten oder Dispenser-/Mikroliter-Pipetten mit sterilen Spitzen, Tiefkühlgefrierschrank < -20°C (nicht geeignet: Tiefkühler mit Abtauautomatik –> verursacht Temperaturschwankungen), Kryobox, Styropor-Box als Ummantelung der Kryobox, evtl. Minizentrifuge, Pinzette oder Impfnadel, Kulturröhrchen bzw. Glas-/ Kunststoff-behälter steril mit Vol. > 10 mL
Verbrauchsmaterial	Roti-Store Hefe-Cryoröhrchen (Carl Roth AG, Art.Nr. X983.1 mit 50 Cryoröhrchen; pro Cryoröhrchen sind je ca. 25 Glaskügelchen in einem speziellen Cryomedium vorhanden; Lagerung: lichtgeschützt zw. +4-+ 8°C; Info), sterile Einweg-Petrischalen, Frischhaltefolie oder Parafilm, kleine Probenbeutel, wasserfester Faserschreiber
Chemikalien	Ethanol (oder Isopropanol) 70% für Oberflächenentkeimung, Material zur Hefekultivation: cf. Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien (z.B. M2-Rezept), inkl. Hefenährstoff zur Hefe-Rehydration GO-FERM Evolution Protect (auch GO-FERM oder GO-FERM Protect) [Info], Hefenahrung, Ascorbinsäure (in steriler Schutzlösung: 1000 mg Ascorbinsäure in 50 mL Glycerol + 50 mL YPD-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose, auch YEPD Medium [Info]: 5 g/100 mL Medium), sterilisieren; feinzerhacktes Eis für Styropor-Kryoboxumhüllung
Biologische Objekte	Brauhefen-Flüssigkulturen (z.B. eingekaufte Hefeflüssigkulturen [Wyeast, White Labs], Hefe-Anzuchtkultur aus eigenen Stamm-Schräg-agarkulturen)

gefrorenes Bier tut der Flasche nicht gut,
gefrorene Hefen ohne Vorsorge (= Kryoschutzlösung) tun der Gärung nicht gut ....

Vereinfachtes Verfahren: Kryokonservierung von Hefezellen bei ca. - 20 bis -25°C

I. Beimpfung der Cryoröhrchen: Abb. 2

I.1. 1: **H**efen-**Ü**bernacht**k**ultur (HÜK), 2: Schrägagar-Stammkulturen bzw. 3: kommerzielle Flüssighefen

- 1 HÜK: es werden Hefezellen in 10 mL M2-Malzanzuchtmedium gezüchtet, ca. 48 h bis zu einer OD_{660} von ≥2
  Hinweis: vgl. "Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien" sowie Braulabor 12 "Bestimmung der optischen Dichte einer Hefeflüssigkultur"

- 2 RHK: **R**esuspendierte **Hefe**k**o**lonien: Es können auch Hefekolonien aus einer Stamm-Schrägagarkultur mit einer sterilen Impföse direkt in ein steriles M2-Medium eingebracht werden:
  - 0.5 mL M2-Malzanzuchtmedium mit steriler Pasteurpipette direkt in abgeflammtes Hefe-Stammkulturröhrchen einbringen
  - mit abgeflammter und wieder abgekühlter Impföse Hefekolonien von der Agaroberfläche ablösen und durch Rühren und Schütteln möglichst homogen zu sehr hoher Zellkonzentration (OD_{660} von ≥2) suspendieren

- 3 KFH: **K**ommerzielle **F**lüssig**h**efen: es können natürlich auch frisch eingekaufte kommerzielle Flüssighefen als Ausgangsmaterial für die Kryokonservierung eingesetzt werden

I.2. Vorbereitung der Hefekulturen:

- vor der Kryokonservierung sollten je 10 mL der Flüssighefekulturen während 48 h auf Kühlschranktemperatur von ca. 4°C gebracht werden –> löst Trehalose*-Synthese aus
- die Hefezellen sollten sich während dieser Zeit als Hefesediment abgesetzt haben
- wenn Minizentrifuge vorhanden können auch je 1 mL der Hefezellkulturen unter sterilen Bedingungen zentrifugiert werden
- die überstehende Kulturflüssigkeit bis auf 0.5 mL sorgfältig unter sterilen Bedingungen (z.B. zwischen 2 brennenden Gasbrennern) dekantieren

I.3. Vorbereitung Cryoröhrchen:

- Cryoröhrchen vor dem Einsatz auf evtl. Kontamination (= Trübungen) kontrollieren
- mit wasserfestem Faserschreiber beschriften: Hefestamm, Datum, Kulturmedium (z.B. WLP 011, 03.10.17, M2)

Abb. 1. Cryoröhrchen mit Glasperlen und Hefe-Cryomedium.

I.4. Cryoröhrchen beimpfen: vgl. Abb. 2

- Hefesediment mit der restlichen 0.5 mL Kulturlösung aus HÜK-, RHK- oder KFH-Suspension aufwirbeln, zusätzlich 100 µL (0.1 mL) Ascorbinsäure-Schutzlösung steril einpipettieren, durchmischen und mit steriler Pasteurpipette bzw. Messpipette ins Cryoröhrchen einbringen
- Cryoröhrchen fest verschliessen und einige Male vorsichtig schütteln
- mit steriler Pipette den Überstand über den Glaskügelchen zu 2/3 entnehmen und korrekt entsorgen

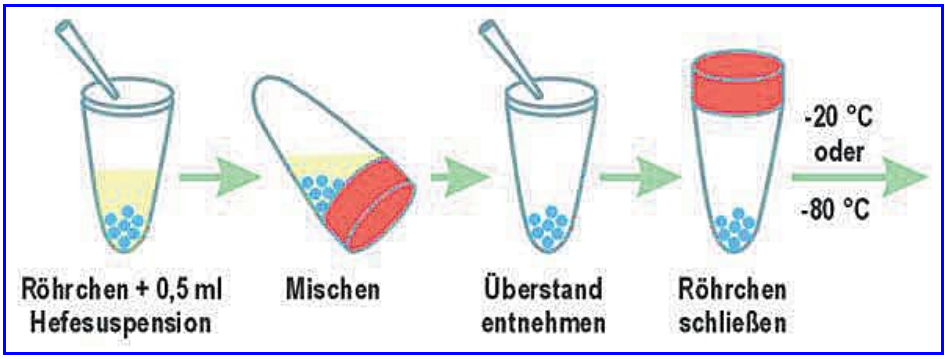

Abb. 2. Beimpfung der Hefe-Cryoröhrchen. [Quelle: Carl Roth AG]

1.5. Tiefgefrieren und Aufbewahren:
- das beimpfte und wieder fest verschlossene Hefe-Cryoröhrchen muss absolut dicht sein: daher zusätzlich mit einer Frischhaltefolie mehrfach einwickeln und in einen Probenbeutel zusätzlich einwickeln
- Cryoröhrchen in eine Cryobox stecken, diese wiederum von einer selbstgebastelten Styroporbox umschliessen, in der wiederum feingehacktes Eis die einzelnen Cryoröhrchen mit umschliesst ("Schutzeis"–> dämpft evtl. Temperaturschwankungen in der Tiefkühl-truhe) und in der Tiefkühltruhe ganz unten am Boden aufbewahren
- in einer Cryobox können die Cryoröhrchen nun einige Monate bis zu 1 Jahr oder - je nach Hefestamm - sogar länger bei $\leq -20^0$C eingefroren und aufbewahrt werden

2. Rekultivierung der Hefezellen

2.1. Entnahme der Cryozellen:
Roti-Store-Hefecryoröhrchen aus dem Tiefkühler nehmen und in einem tiefgekühlten Cryoblock platzieren
Hinweis: Das Cryoröhrchen mit den Hefezellen sollte niemals auftauen

2.2. Glaskügelchen entnehmen:
- mit einer sterilen Pinzette oder Impfnadel unter sterilen Bedingungen 1 bis 2 Glaskügelchen entnehmen und direkt in 10 mL steriles Hefe-Anzuchtmedium M2 (oder YPD-Medium) geben, oder
- Glaskügelchen auf einem festen Malzagarmedium ausrollen
  [Herstellung Malzagarmedien: siehe "Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien" > Medium M3, sowie "Braulabor 8 Herstellung flüssiger und fester Nährmedien" > Giessen von Nähragarplatten]
- Cryoröhrchen wieder absolut dicht verschliessen, in Beutel einpacken und zurück in den Tiefkühler bringen

2.3. Inkubation beimpfter Malzmedien:
- Flüssigkultur: nach 48 h-Anzucht gemäss "Braulabor 20 Hefestarter: Anzucht der Anstellhefen" eine Hefestarterreihe ansetzen
- Festmedium auf Malzagarplatte:
  - Agarplatte während 48 h bei ca. 22°C inkubieren
  - steriles Anzuchtmedium herstellen (ca. 1 - 2 Liter)
    [gemäss "Braulabor 7: Nährmedienrezepte für Hefen und Bakterien" > M1 Startermedium für die Anstellwürze;
    einfacher und kostengünstigerer Ansatz: siehe "Braulabor 20 Hefestarter: Anzucht der Anstellhefen" > Rezept unter "2. Verfahren: Grundrezept Hefestarterkultur" sowie "Braulabor 8: Nährmedienzubereitung für Hefen und Bakterien"]
  - ca. 10 mL steriles M1-Anzuchtmedium in keimfreier Umgebung (z.B. zwischen 2 brennenden Gasbrennern) über die bewachsene Malzagarplatte giessen und mit einer abgeflammten und erkalteten Impföse die Hefekolonien sanft von der Agaroberfläche ablösen
  - Hefesuspension weiter züchten in folgenden Anreicherungsschritten: von ❶ 10 mL –> ❷ 100 mL –> ❸ 1'000 -1'500 mL –> ❹ 20 Liter Anstellwürze.
  - Anstellkonzentration (Hefegabe) berücksichtigen: vgl. "Braulabor 19 Bestimmung der optimalen Anstellzellzahl (Hefegabe, Hefedosage)"

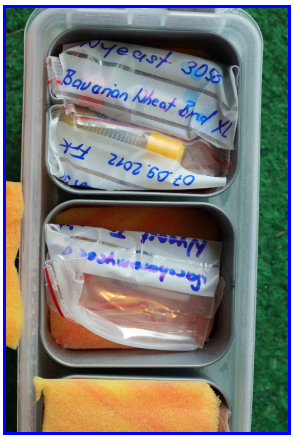

Abb. 2. Hefe-Kryokonservierung im Haushalt-Tiefkühler bei - 27°C.
li: Blick in den Tiefkühler mit Kryobox.
re: Blick auf eingehüllte Cryoröhrchen, ohne "Schutzeis".

© K. Frischknecht vl 03.10.2017 kfrisch@rsnweb.ch