



Inkubation: Anzucht von Hefen für optimales Wachstum Handlingtipp Nr. 4

BrauLabor

Inkubation
Hefeanzucht
Handlingtipps

Tipps für das Braulabor

Die Vermehrung der Hefen basiert auf Wachstum durch asexuelle Sprossung oder Teilung; auch sexuelle Fortpflanzung kommt vor. Die meisten Hefen sind fakultativ anaerob, d.h. sie sind nicht zwingend auf Sauerstoff angewiesen. Bei Verfügbarkeit von Sauerstoff aber können sie ihn für einen oxidativen **Energiestoffwechsel** nutzen ("aerobe Atmung"), die sehr viel mehr Energieeinheiten (ATP) für die Zelle zu produzieren vermag. Bei diesem O_2 -abhängigem Stoffwechsel können Hefen verschiedene **Zucker** zum Gas **Kohlenstoffdioxid** CO_2 und zu Wasser H_2O **oxidieren**. Der Energiereichtum dieser sauerstoffabhängigen Prozesse wird auch für die Teilung und der dadurch ermöglichten Zellvermehrung (=summarisch als Wachstum bezeichnet) benutzt.

In Abwesenheit von Sauerstoff aber können viele Hefen die Zucker nur zu niedermolekularen Stoffen, beispielsweise zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid (z.B. in der alkoholischen Gärung) abbauen. Die Zuckeroxidation unter aeroben Bedingungen liefert **19x mehr Energie** als die Vergärung (38 ATP vs. 2 ATP)! Deshalb sind die Massenzuwachsrate und die Zellteilungsrate bei oxidativem Zuckerabbau sehr viel höher als bei der Gärung, und die für den Heimbrauer wichtige Zellvermehrung vor der eigentlichen Gärung für die Bildung der Anstellkonzentration findet daher nur unter optimalen aeroben (also Luftsauerstoff-abhängigen) Bedingungen statt.

Ideale physiologische Wachstumsbedingungen sind daher: 1. genügend Luftsauerstoff \rightarrow setzt aktive Belüftung (z.B. Aquariumpumpe via Sterilfilter, Rühren mit Magnetrührer), 2. optimale Wachstumstemperatur (\rightarrow schnellerer Stoffwechsel, rascheres Wachstum) und 3. Lichtabwesenheit.

Hinweis: Die optimale Wachstumstemperatur ist höher als die optimale Fermentationstemperatur.

Zusatzinfo [hier](#).

Notwendige Verfahren/Gerätschaften für optimales Hefewachstum

I. Belüftung:

Die Hefe benötigt zu ihrer Vermehrung einen Sauerstoffgehalt von 8–9 mg/L. Da sich nicht der gesamte zugeführte Sauerstoff auch in der Würze löst, muss Sauerstoff im Überschuss zugeführt werden. Im Folgenden werden in aufsteigender Reihe zunehmend bessere Belüftungsverfahren angeführt:



- Stufe 1: kräftiges Schütteln des nährstoffhaltigen Gefäßes zu Beginn der Wachstumsphase (Abb. 1)
- Stufe 2: periodisches Schütteln während der Wachstumsphasen (Abb. 1)
- Stufe 3: Rühren mittels Magnetrührer (ideal in Gefäßen mit Schikanen, z.B. EMK mit Schikanen \rightarrow erhöhen die Durchmischung zwischen Nährlösung und Luftsauerstoff) (Abb. 2, Abb. 3)
- Stufe 4: Schaltuhr-gesteuertes periodisch-intermittierendes Belüften bzw. Dauerbelüftung mittels Aquariumpumpe und Sterilfilter (Umgebungsluft \rightarrow Aquariumsluftpumpe \rightarrow $0.2 \mu m$ Sterilfilter \rightarrow Belüftungsstein/Sintermetall \rightarrow Bierwürze) (Abb. 4)
- Stufe 5: Belüftung aus Sauerstoff-Flasche \rightarrow $0.2 \mu m$ Sterilfilter \rightarrow Belüftungsstein/Sintermetall \rightarrow Bierwürze)
- Stufe 6: Bestimmung des O_2 -Gehaltes in der Würzelösung \rightarrow bei Unterschreitung des Bandwertes von 8-9 mg O_2 /L wiederum Zufuhr von Luft- oder Flaschensauerstoff

2. Temperatur:

Die beiden Hefearten, obergärige und untergärige Hefen entwickeln ihre optimale Gärleistung in unterschiedlichen Temperaturbereichen. Obergärige Hefe benötigt optimalerweise eine Temperatur zwischen 15 und 25 °C, untergärige arbeitet hingegen bei Temperaturen zwischen 6 und 9 °C am besten.

Je nach Hefestamm kann die **optimale Wachstumstemperatur** variieren, die i.d.R. über der optimalen Gärtemperatur liegt. Sie wird allgemein zwischen **18 bis 24°C** angegeben, wobei **22°C ein guter Mittelwert für Ale- und Lagerhefen** gilt. Hohe Temperaturen z.B. um 37°C herum, würden zwar rascheres Hefewachstum fördern, aber hätten negative Auswirkungen auf die Viabilität und Stabilität (schwächere Zellmembranen) der Hefen.



Interessant ist auch der Vergleich mit den **kommerziellen Propagationsbedingungen**:

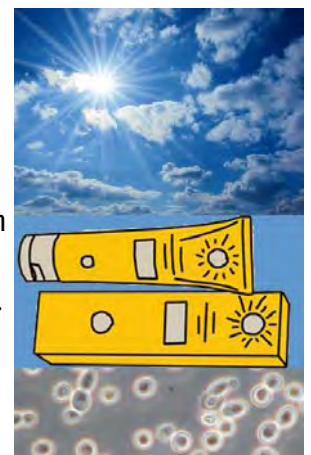
I: Reinstammschrägagarkultur: Kühlschrank 4°C → 2: 10 mL Würze (8 °P), 24 h, Schütteln, 25°C → 3: 100 mL Würze (8 °P), 24 h, Rühren, 25°C → 4: 1000 mL Würze (12-16 °P), 24-48 h, Rühren, 22°C → 5: 10 L Würze (12-16 °P), 48 h, 22°C, aktive Belüftung → 6: Brauerei, Anstellwürze → **Scale up:** 1 hL → 105 hL [1 hL = 100 L]
22°C → 20°C für Ale-Hefen
18°C → 16°C → 14°C → 12°C für Lager-Hefen

- Stufe 1: Anzuchtgefäß einfach bei Zimmertemperatur stehen lassen (Abb. 5)
- Stufe 2: Anzuchtgefäß an wärmere Orte stellen, z.B. auf Abluftgitter Kühlschrank (ohne ganze Ablüftung zu blockieren, Abb. 6), beheiztes Wohnzimmer/Nähe Heizung (im Winter), Nähe wärmeerzeugende Geräte (Nähe Abwaschmaschine in geschlossenem Raum, Raum unter Spülbecken), Nähe wärmeerzeugende Dauerlichtquelle (aber abgeschirmt vor der Lichteinstrahlung!)
- Stufe 3: Inkubation im Wasserbad (Anleitung zum Selbstbau: cf. [hier](#) > Box "How to build an inexpensive water bath/incubator")
- Stufe 4: Inkubation auf Wärmeplatte (Bsp. [hier](#), Abb. 7)
- Stufe 5: Inkubation im Brutschrank (Abb. 8.) [cf. auch Anhang "Brutschrank im Selbstbau"]

3. Lichtausschluss:

Sowohl sichtbares Licht als auch ganz besonders UV-Strahlung können das Wachstum von Hefen beeinträchtigen (sichtbares Licht), ja sogar verunmöglichen (UV). Sichtbares Licht mittlerer Intensität hemmt Wachstum, Atmung, Eiweißsynthese und Membranen in ihrer Transportfunktion. Daher sollte bei der Anzucht und Wachstum von Hefen das Licht möglichst ausgeschlossen werden.

- 1. Stufe: alle Wachstumsprozesse der Hefe, sei es in Flüssig- oder Nähragarkultur möglichst nicht am Fenster oder anderen lichtexponierten Stellen laufen lassen
- 2. Stufe: im dunklen Keller, in einer dunklen Kartonbox, in einem Brutschrank ohne Scheiben/bzw. verdunkelten Scheiben durchführen oder das Anzuchtgefäß in Alufolien einwickeln



Abbildungen zur Belüftung bei der Hefeanzucht



Abb. 1. Belüftung Stufe 1+2: Schütteln.

Gefäß ist nur locker geschlossen. Lichtschutz (Alufolie) entfernt.



Abb. 2. Belüftung Stufe 3: auf Magnetrührer rühren.

Anzuchtflasche ohne Schikanen und ohne Lichtschutz (steht in dunklem Kellerraum).

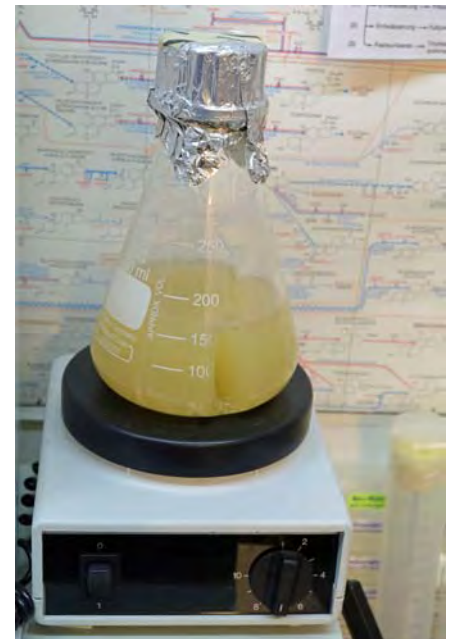


Abb. 3. Belüftung Stufe 3⁺: auf Magnetrührer rühren.

Erlenmeyerkolben mit *Schikanen* verbessert den Gasaustausch (Luftsauerstoff) zwischen Flüssigkeit und umgebender Gasphase.



Abb. 4. Belüftung Stufe 4: aktives Belüften mit Pumpe.

Belüftung mit Aquariumpumpe über Sterilfilter und Sintermetall [in Hefesuspension eingetaucht, knapp unten in Anzuchtflasche sichtbar]. Die Belüftung erfolgt nicht kontinuierlich, sondern durch einen Timer angesteuert intervallsweise, z.B. alle 60 min während 15 min.



Abb. 5. Temperatur Stufe I: Anzucht bei Zimmertemperatur.

Die Anzuchtflasche ist nur locker verschlossen (mit umhüllender Alufolie als Lichtschutz, nur für die Foto weggenommen).

Abbildungen zur Temperaturkontrolle bei der Hefeanzucht



Abb. 6. Temperatur Stufe 2: Anzucht an warmem Ort, Bsp. Abluftrost KÜhlschrank.
Die Anzuchtflasche steht über dem Abwärme abführenden KÜhlschrankrost. Die Anzuchtflasche ist nur locker verschlossen und mit Alufolie lichtgeschützt eingehüllt (hier weggenommen).

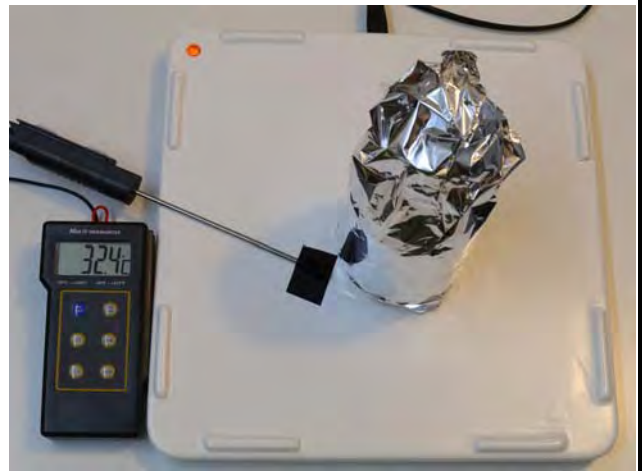


Abb. 7. Temperatur Stufe 4: Anzucht auf Wärmeplatte. Die lichtgeschützte Anzuchtflasche steht lichtgeschützt auf einer Wärmeplatte, welche die Temperatur sanft über der Umgebungstemperatur hält.



Abb. 8. Temperatur Stufe 5: Anzucht im temperatur-regulierten Mini-brutschrank.
Das lichtgeschützte Anzuchtgefäß steht in einem kontrollierten Temperaturraum und zudem auf einer Magnetrührplatte → bessere Durchmischung, auch mit Luftsauerstoff → schnelleres Wachstum.

Anhang: Brutschrank im Selbstbau

2.4.1 Brutschrank

Der Brutschrank ist für die Inkubation von Nährbodenplatten oder Flüssigkulturen geeignet. In ihm lassen sich Temperaturen zwischen 29 und 42°C einstellen. Er kann bei einer Vielzahl der im folgenden beschriebenen Versuche eingesetzt werden.

Das Gehäuse des Brutschranks besteht aus einer Styroporbox, an deren Boden sich im Innern eine 15 W-Glühlampe befindet. Von dieser wird stets die gleiche Wärmemenge erzeugt. Die Temperatur steigt im Innern solange an, bis sich zwischen der entstehenden und der an die Umgebung abgegebenen Wärme ein Gleichgewicht eingestellt hat.

Durch Löcher an der Vorder- und Oberseite des Styroporgehäuses, die mit Korkstopfen verschlossen werden können, läßt sich der Wärmeverlust und damit die Temperatur (auf $\pm 1^\circ\text{C}$ genau) regeln (Abb. 32.1). Die den verschiedenen Stopfenkombinationen entsprechenden Temperaturen werden mit zwei Thermometern im voraus genau ermittelt. Der Brutschrank muß in einem Raum stehen, in dem keine großen Temperaturschwankungen herrschen.

Material und Geräte

- 1 Lampenfassung passend dazu, befestigt an 15 cm langen Stahlrohr (Lampenrohr) (Durchmesser 1,0 cm), durch das ein Anschlußkabel (ca. 3 m lang, mit Normstecker) geführt ist
- 16 Büchsenstäbe (Durchmesser 0,5 cm, 32 cm lang)
- 2 Thermometer (0 bis 100°C)
- 1 Glühlampe (15 W) (Sockel E 27)
- 1 Hartfaserplatte (0,3 cm, einseitig weiß beschichtet, 32x26 cm)
- 12 Korkstopfen (Durchmesser 2,5 cm)
- 1 Dose Styroporklebstoff (Klebis, Fa. Teroson GmbH, Heidelberg)
- 1 Styroporplatte (1 m³/6 cm stark)
 - Zuschnitte:
 - (A) 2 St. 50x44 cm
 - (B) 2 St. 50x27 cm
 - (C) 2 St. 32x27 cm
- 1 Styroporplatte (0,5 m³/2 cm stark)
 - Zuschnitte:
 - (D) 1 St. 37,5x32 cm
 - (E) 2 St. 24,5x12 cm
 - (F) 1 St. 28x12 cm
 - (G) 2 St. 24,5x5,5 cm
 - (H) 2 St. 24,5x9 cm

- 1 Streifen Tesaband (4 cm breit, 50 cm lang)
- 1 Werkzeug:
- 1 Klebstoff-Spachtel oder Pinsel
- 1 Korkbohrer
- 1 Schere

Bauanleitung

Zunächst wird das Styroporgehäuse mit speziellem Styroporklebstoff oder weißem Holdeim (kein Deckenplatten-Klebstoff) zusammengeklebt; jeder andere Klebstoff könnte die Styroporplatten zerstören. Auf die Hinterwand (A) werden die beiden Seitenwände (B), der Boden (C) und die Oberseite (C) rechtwinklig aufgeklebt (Abb. 32.1). Der Lampenraum, der durch die Hartfaserplatte abgetrennt werden soll, hat eine Höhe von 12 cm. Die dafür benötigten Styroporzuschnitte (E bzw. F) werden flach auf die Seitenwände bzw. auf die Hinterwand aufgeklebt. Für die Regalböden werden mit je 0,5 cm Abstand zunächst die 5,5 cm breiten (G), dann die 9 cm breiten Styroporstreifen (H) angebracht. Die Tür des Brutschranks (A) erhält ebenfalls eine 2 cm starke Styroporauflage (D), deren Größe den vorderen Innenmaßen des Gehäuses angepaßt ist, so daß beim Schließen der

Tür der Innenraum vollständig abgedichtet wird (Abb. 31.1).

Für die Einschübe der beiden Thermometer werden auf der Mittelsenkrechten der rechten Seitenwand von außen übereinander zwei Löcher gebohrt (Durchmesser 0,7 cm). Die Abstände von der Bodenkante betragen 21,5 cm für das erste bzw. 40 cm für das zweite Loch. Für den Einschub der Lampenhalterung wird darunter ein Loch gebohrt (Durchmesser 1,0 cm, dessen Abstand von der Bodenkante 9 cm beträgt).

Die Hartfaserplatte wird anschließend in den Spalt zwischen den ersten und zweiten Einsatz geschoben, so daß der Lampenraum vom Brutraum getrennt ist. Anschließend werden die Büchsenstäbe mit einem Abstand von 3 cm in vorher angebrachte Kerben der Oberkanten des zweiten und dritten Styroporeinsatzes geklemmt (Abb. 32.1; G, H).

In die Gehäuseoberseite (C) werden in einem Abstand von 4 cm von der Rückseite mit einem Zwischenabstand von 2 cm sechs Löcher (Durchmesser 2,3 cm) gebohrt, ebenso in die Tür (etwas über dem Lampenraum). Die Tür wird auf die Vorderseite des Gehäuses gesetzt. Ein Tesabandstreifen verbindet auf der rechten



Abb. 31.1: Selbstgebauter Brutschrank, geschlossen und geöffnet

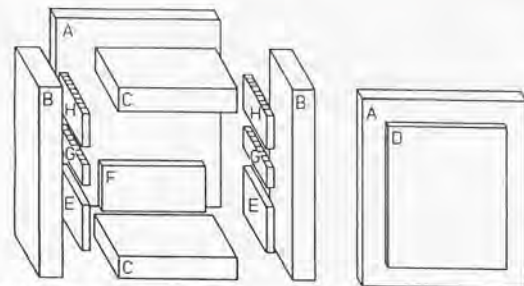


Abb. 32.1: Zusammensetzung des selbstgebauten Brutschranks: «Explosionszeichnung» des Styroporgehäuses (links) sowie der Tür (rechts) ohne Inneneinrichtung

Seite die Wand mit der Türkante wie ein Scharnier, so daß sich die Tür bequem öffnen oder schließen läßt.

Quelle: Bayrhuber, H., Lucius E. R. (Hrsg.): Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik. Bd. 1. Mikrobiologische Grundlagen, Metzler, Hannover (1992), S. 30-32.