



## Hefequalität II: Bestimmung der Hefevitalität Wie aktiv und gesund bzw. gärfreudig sind meine Hefezellen?

**BrauLabor  
22  
Hefequalität:  
Hefevitalität  
Gesundheits-  
zustand  
gute Gärkraft**

<b>Aufwand:</b> mittel-hoch	<b>Material:</b> mittel-hoch	<b>Zeit:</b> hoch	<b>Experimenttyp:</b> Experimentell/Beobachtungen	<b>Anspruch:</b> mittel-hoch
--------------------------------	---------------------------------	----------------------	--	---------------------------------

### Einführung

Wie kann man die Hefequalität umschreiben und messen? Zwei Begriffe werden zur Beschreibung von gesunden Hefen verwendet: die Viabilität und die Vitalität. Im Braulabor 4 wird die **Viabilität** oder **Lebensfähigkeit** behandelt: Die Anzahl und der Anteil an lebenden Hefezellen ist einer der wichtigsten Faktoren, welche sowohl den Geschmack als auch die Qualität des Bieres beeinflussen. Viabilität fragt also: Wie viele % der Zellen sind intakt und damit meist aktiv (viabel, lebendig), wie viele % in der Hefegesamtpopulation sind inaktiv (tot)? Zur Erfassung der Viabilität gibt es mehrere Tests, der wohl einfachste und bekannteste in der Brauszene ist die Anfärbung mit Methylenblau (cf. "Braulabor 4 Hefequalität I: Viabilitätstest ("Lebensfähigkeit")", [hier](#)).

Wenn wir etwas über den Zustand der Hefezellen im Sinne von Abschätzung der Gärleistung einer Hefesuspension vor deren Verwendung ("Gärkraft") oder allgemein der physiologischen Hefeaktivität wissen wollen, dann muss die **Hefevitalität** bestimmt werden. Vitalität muss die metabolische Aktivität oder Stoffwechselaktivitäten bzw. den physiologischen Zustand lebender Zellen erfassen. Wenn eine Hefekultur jung, sehr "gesund", "stark" und "fermentationsbereit" ist, dann sind die Hefezellen höchst vital. Sind die Zellen alt, ausgehungert und gärungsmüde, dann weisen sie eine geringe Vitalität auf. Wie kann man nun diese Hefevitalität messen? Neben Enzymaktivitäten wäre natürlich der ATP\*-Spiegel als Energiepotenzial im Zellinnern ein gutes Mass ([Lit.](#)), aber auch für den ambitioniertesten Heimbrauer nicht machbar. Weitere in der Literatur beschriebene Tests sind ebenfalls zu teuer, zu aufwändig und z.T. kontrovers beurteilt\*\*. Es bleiben fast nur das **Säurebildungsvermögen** (der sog. AP-Test oder APT, Acidification Power Test), ein **CO<sub>2</sub>-Drucktest** und ein Test zur **Gärgeschwindigkeit** übrig.

\*ATP: der universelle Energieträger in jeder lebenden Zelle, ohne den keine einzige Stoffwechselreaktion abläuft. [Info](#).

\*\*z.B. Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Res **14** (2014), 1068-1079; Thiele, F., Einfluss der Hefevitalität und der Gärparameter auf die Stoffwechselprodukte der Hefe und auf die Geschmacksstabilität. Dissertation Technische Universität München (2006)

Mit einem einfachen Test aus 3 möglichen Verfahren (1: Säurebildungsvermögen, 2: CO<sub>2</sub>-Drucktest, 3: Gärgeschwindigkeit) abschätzen lernen, wie vital im Sinne von "Gärleistungsvermögen" die Anstellhefen sind.



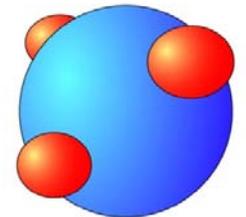
### Materialien

Glaswaren/Geräte/ andere Materialien	pH-Meter (cf. <a href="#">hier</a> > Nr. 3), 50 mL konisches Zentrifugenröhrchen, Magnetrührer, Magnetrührstäbchen, Pasteurpipetten, Messzylinder (10 mL oder 50 mL), Timer oder Stoppuhr, Waage (mind. 0.1 g genau), Glasstab, Bechergläser // 0.33 L Bierflasche, Manometer, ideal: Digitalmanometer, <a href="#">Info</a> , evtl. Zentrifuge, Zentrifugenröhrchen// Gasauffangsystem: Stativ inkl. Zubehör, grosse Wanne (oder: Lavabo, Plastikeimer), 100 mL-Messzylinder aus Glas, Schlauchmaterial, Dichtemessgeräte, z.B. Digital-Refraktometer, EasyDens digitales Biegeschwingermessgerät zur Dichtebestimmung (+ Tablet oder Smartphone), TILT-Hydrometer (+ Tablet oder Smartphone) <a href="#">Info</a> > 6, 9, 20]
Verbrauchsmaterial	Linsoft (Kosmetiktüchlein, grosser Gummiballon (Info), Glasröhrchen
Chemikalien	entionisiertes Wasser, 20.2%ige Glukoselösung, pH-Puffer 4.0, 7.0 und 10.0 (zur pH-Meter-Eichung), Milchsäure oder schwache Salzsäurelösung (HCl, 0.1 mol/L)//Trockenmalzextrakt, Bierwürze (12%, SG 1.048, aus Trockenmalzextrakt), Hefenahrung (cf. S. 5, Pkt. 1), Maltose
Biologische Objekte	Brauhefen (Reinstammhefen, Resthefen, Erntehefen), Backhefen, Wildhefen; alle Hefen zentrifugiert oder aus dem Sediment entnommen

## Vitalitätstest I: GAP (Glucose Acidification Power)-Test oder das Säurebildungsvermögen



**Theorie:** Der AP-Test beruht auf der Fähigkeit der Hefen, Protonen  $H^+$  (bzw. genauer Hydronium-Ionen  $H_3O^+$ ) aus der Zelle ausschleusen zu können. Es wird die Absenkung des pH-Wertes durch die Protonenabgabe der Hefe in einem nicht puffernden Medium, in destilliertem bzw. entionisiertem Wasser gemessen. Doch wieso geben Hefen Protonen an die Umgebung ab? Um Nährstoffe aus eben dieser Umgebung, also aus dem Zelläusseren aufzunehmen, brauchen sie ein Art Pumpe, sog. membranständige ATPasen (Plasma-Membran-ATPase). Werden nun Nährstoffe in die Zelle aufgenommen, muss der Protonenausstoss erhöht werden um den notwendigen Konzentrationsunterschied an Protonen (sog. Protonengradient) für die Nährstoffaufnahme zu erreichen. Dieser Konzentrationsunterschied, vergleichbar einem Stausee, ist eine Art Energiespeicher, mit dem die universelle biologische Energiewährung ATP gebildet wird und die dann die zellulären Pumpen antreibt. Die potenzielle Energie eines Stausees (**biol. Protonensee**) kann ja über Turbinen + Generatoren (**Enzyme: ATPasen**) zur Energieerzeugung (**ATP**) genutzt werden. **Nur aktive Zellen nehmen Nährstoffe auf, geben also Protonen ab.**



Hydronium ( $H_3O^+$ )

### Durchführung GAP-Test:

#### 1. pH-Meter eichen:

Je nach pH-Metermodell nach den Vorschriften eichen: 2- oder 3 pH-Puffer verwenden - pH 4.0, pH 7.0 und pH 10.0

#### 2. Umgebungsmedium:

Ca. 50 mL deionisiertes (oder destilliertes) Wasser auf ca. pH 6.3 bringen in einem 100 mL Becherglas auf einen Magnetrührer stellen, pH-Sonde eintauchen und mit Magnetrührstab bei mässiger Drehgeschwindigkeit solange unter langsamer Zugabe der Säure (verdünnte Salzsäure- oder Milchsäurelösung) rühren, bis der pH-Wert um ca. 6.3 konstant bleibt

#### 3. Hefepräparation:

- Zentrifuge vorhanden: zu untersuchende Hefesuspension abzentrifugieren, sodass ca. 2.5 g Hefesatz zur Verfügung stehen
- ohne Zentrifuge: Hefesuspension stehen lassen, Überstand abgiessen und aus dem Hefesediment ca. 2.5 g Hefen entnehmen

#### 4. Hefepräparation:

- diese 2.5 g Hefezellen werden in einem kleinen Becherglas (oder Erlenmeyerkolben) mit 7.5 g des Umgebungsmediums (ention.  $H_2O$ , pH 6.3) aufgeschlämmt
- zu 19.0 mL Umgebungsmedium wird 1.0 mL der aufgeschlämzten Hefesuspension (= ca.  $1 \times 10^9$  Zellen/mL) zugegeben und 10 min mittels Magnetrührer gerührt

#### 5. pH-Messungen:

pH-Sonde in Hefepräparation eintauchen und pH-Wert messen: während **10 min** alle 2 min pH-Wert notieren ( $AP_2$ ,  $AP_4$  etc.), aber



Abb. 1. Der GAP-Test: sind meine Hefen vital?

pH-Meter mit eingebautem Magnetrührer (Info) und Hefesuspension.

Im Uhrzeigersinn: Traubenzucker (Glukose) sowie 20.2%ige Traubenzuckerlösung mit Spatel, ention. Wasser, pH 6.3; 50 mL Messzylinder; Elektrolytkappe für pH-Elektrode; zu untersuchende Hefesuspension im Erlenmeyerkolben, steril; ention. Wasserspritzflasche; pH-Puffer 4.0 und 7.0; Timer;



nur der  $AP_{10}$ -Wert (pH-Wert nach 10 min) wird nachher zur Berechnung eingesetzt

6. Glucose-Zugabe:  
bei  $AP_{10}$  werden 5.0 mL einer 20.2%igen Glucoselösung zugefügt und weiter gerührt
7. pH-Messungen bis  $AP_{20}$   
der pH-Wert wird weiter verfolgt, der End-pH-Wert nach 20 min als  $GAP_{G20}$  notiert (G: Glucose)
8. GAP-Wert berechnen:  
die Glukose-Acidification-Power (GAP) wird wie folgt berechnet:  
$$GAP = \text{Anfangs-pH-Wert } 6.3 \text{ minus } GAP_{G20}$$
9. Interpretation:  
je kleiner der GAP-Wert, desto vitaler oder "gärbereiter" sind die Hefen.

## Vitalitätstest 2: CO<sub>2</sub>-Drucktest

**Theorie:** Kohlenstoffdioxid CO<sub>2</sub> ist ein direktes Produkt der alkoholischen Gärung der Hefe:

$C_6H_{12}O_6$  Glucose/ Traubenzucker  $\rightarrow$  2  $C_2H_5OH$  Ethanol + 2 CO<sub>2</sub> Kohlenstoffdioxid. Die CO<sub>2</sub>-Gasbildung wird unter standardisierten Bedingungen als gängige Methode zur Beurteilung des Gärvermögens für Hefen verwendet. Die Bildung von CO<sub>2</sub> wird indirekt über den Druckanstieg innerhalb einer festgelegten Dauer in einem geschlossenen Behälter erfasst. Diese Methode hat eine sehr gute Reproduzierbarkeit und scheint direkt mit der Gäraktivität zu korrelieren (Lit: THIELE, 2006).

### Durchführung:

1. Hefepreparation:
  - Zentrifuge vorhanden: zu untersuchende Hefesuspension abzentrifugieren, sodass ca. 10 g Hefesatz zur Verfügung stehen
  - ohne Zentrifuge: Hefesuspension stehen lassen, Überstand abgiessen und aus dem Hefesediment 10 g Hefe entnehmen
2. Gärlösung:  
eine 0.33 L handelsübliche Bierflasche wird mit 100 mL einer 12% Würze (12 °P, bzw. SG 1.048) gefüllt und ein Magnetrührstäbchen zugefügt
3. Hefesuspension:  
10 g abzentrifugierte Hefe bzw. Hefe aus dem Sediment in 20 mL ention./dest. Wasser lösen und dazu geben
4. Druckmanometer:  
nun wird ein handelsübliches Druckmanometer\* aufgesetzt, die Flasche gasdicht verschlossen und auf einen Magnetrührer gestellt  
\*: cf. Brau- und Messtechnik [hier](#) > Pkt. 12 Druckmessungen (ideal: Digitalmanometer, [Info](#))



Abb. 2. Der CO<sub>2</sub>-Drucktest. Druckanzeige mit Digitalmanometer.  
EMK mit Hefesuspension, Trockenhefen.



### 5. Druckmessungen:

- idealerweise sollten die Druckmessungen immer bei der gleichen Raumtemperatur durchgeführt werden (→ bessere Vergleichbarkeit der Resultate)
- der Druckaufbau wird unter Rühren mittels Magnetrührer (500 U/min, bzw. bei konstantem relativen Wert) verfolgt und protokolliert: Messwerte in [bar], im Bereich 0 - 4 bar.

**Tipp:** um die Druckwerte bezüglich der Gäraktivität der untersuchten Hefen verlässlich interpretieren zu können, empfiehlt sich eine Vergleichsreihe mit verschiedenen vitalen Hefen durchzuführen, d.h. z.B. eine Hefekultur einfach stehen lassen und dann nach einer bestimmten Zeitdauer (frisch, 1 Tag alt, 2 Tage alt etc.) die Druckmessungen durchführen.

### Vitalitätstest 3: Gärgeschwindigkeit

**Theorie:** Die Geschwindigkeit einer Reaktion  $A \rightarrow B + C$  kann 1. anhand der Rate des Verschwindens der Ausgangssubstanz A (= Edukatabbau), 2. der Rate des Entstehens des Produktes B und 3. anhand der Rate des Entstehens des Produktes C gemessen werden. Im Falle der alkoholischen Gärung  $C_6H_{12}O_6$  Glucose/ Traubenzucker  $\rightarrow 2 C_2H_5OH$  Ethanol +  $2 CO_2$  Kohlenstoffdioxid kann

1. der Zuckerabbau verfolgt werden durch Bestimmung der Stammwürze, d.h. als Abnahme des Extraktgehaltes in Grad Plato [°P] bzw. Abnahme des OG-Wertes (original gravity) z.B. von 1.040 auf 1.035 innerhalb einer bestimmten Zeitspanne. Messtechnisch erfasst durch Bierspindeln, Refraktometer, eDrometer, easyDens oder TILT Hydrometer (Kurzbeschreibung cf. Brau- und Messtechnik → Nr. 7, 6, 8, 9 und 20; [Info](#))
2. die Produktbildung des Alkohols Ethanol nur schwierig auf rel. aufwändig bestimmt werden (cf. Brau- und Messtechnik → Nr. 11)
3. die Produktbildung des Gases Kohlenstoffdioxid  $CO_2$  relativ einfach bestimmt werden (Volumetrische Bestimmung des  $CO_2$ ).

### Durchführung I: Bestimmung der Zuckerabbaurate durch Bestimmung der Stammwürze (Extraktgehaltsbestimmung)

Da bei einer zeitabhängigen Untersuchung doch relativ viele Proben entnommen werden müssen, fällt die Dichtebestimmung mittels Bierspindeln weg. Erforderliche Volumina jeweils für eine Messung beim Einsatz von Digital-Refraktometer: wenige Tropfen, eDrometer: 20-30 mL, easyDens: 2-3 mL, TILT-Hydrometer: kein Probenverbrauch, aber minimales "Schwimmvolumen" von ca. 500 mL. Empfohlene Messsysteme: Digital-Refraktometer, easyDens, Tilt-Hydrometer.



Abb. 3. Digital-Refraktometer.  
0.5 mL/Probe.



EasyDens-Dichtebestimmung.  
2-3 mL/Probe.



TILT-Hydrometer.  
Schwimmt in > 500 mL  
Gäransatz, kein Proben-  
verbrauch.



### 1. Anzuchtmedium Hefen:

1 g Trockenmalzextrakt (TME) pro 10 mL Testwürzelösung (z.B. 100 g TME in 1000 mL Wasser)

0.3 mL Hefenahrung = ca. 0.15 g (z.B. Yeast Nutrient WLN1000 White Labs [\[Info\]](#)/ Wyeast Beer Nutrient Blend [\[Info\]](#)/Servomyces [\[Info\]](#))

1 L Wasser

Gut mischen und aufkochen (15 min) oder autoklavieren (Details: cf. Braulabor 20 Hefestarter, S. 4, [hier](#))

### 2. Hefesuspension:

bei allen Testansätzen zu Vergleichszwecken immer die gleiche Hefekonzentration einsetzen (je nach Volumen des Anzuchtmedium, z.B. pro 1000 mL Testwürze: 1 - 2 g Trockenhefen (= ca. 7 - 14 x 10<sup>9</sup> Fermentis-Zellen bzw. 5 - 10 x 10<sup>9</sup> Lallemend-Zellen)

### 3. Bestimmung der Stammwürze bzw. Extraktgehalt ("scheinbarer Extrakt") während Gärung:

- mit **TILT-Hydrometer**: [Info](#), Abb. 4A,B.

1: Tilt-Hydrometer in einem Desinfektionsmittel wie 65%igem Isopropanol entkeimen (weitere Mittel: cf. [Braulabor 6 hier](#)), sowie Abb. 21 in "Mikrobiologische Grundlagen zur Hefezüchtung Teil I" hier)

2: Tilt-Hydrometer möglichst keimarm in Bierwürze im Gärbehälter fallen lassen

3: Tilt-App ([download](#)) auf dem eingesetzten elektronischen Gerät (Smartphone, Tablet) aktivieren

4: Tilt-Daten zum Extraktabbau als SG-Werte (specific gravity) und der Gärtemperatur ablesen bzw. in die Baron Brew Cloud transferieren: siehe 3 Vorgehensmöglichkeiten [hier](#). [Video](#).



Abb. 4A. Extraktbestimmung mit dem TILT-Hydrometer während Testgärung in einem I-L-Ansatz.



Abb. 4B. Tilt-Extrakt-dichtebestimmung während Hauptgärung (Testwürzegemisch).

Dauer: 3 Tage, Abnahme von SG/°P von 1.040/10 auf 1.010/2.5.

- mit **easyDens**: [Info](#), Abb. 5,6

1: Probenwürze - falls CO<sub>2</sub>-haltig - entgasen durch kräftiges Schütteln bzw. durch Filtration durch einen Papierfilter (z.B. Kaffeefilter)

2: Probenauslass des easyDens mit Abfallbehälter verbinden

3: EasyDens starten, EasyDens-App ([Info](#), [Android-App](#)) auf Smartphone oder Tablet öffnen

4: mit ention. Wasser auf SG (specific gravity) 1.000 justieren

5: 2 mL der entgasten Probe mit der easyDens-Spritze aufziehen, EasyDens "Start" drücken und Probe langsam direkt in das EasyDens injizieren



Abb. 5. EasyDens-Dichtemessgerät mit Smartphone, Injektionspritze, Auffangbehälter, ention. Wasser. Messanzeige auf SG (1.011 - Endpunkt der Hauptgärung).

6: Auf den App-Geräten mit dem Messbildschirm die Messresultate ablesen (die Daten können abgespeichert werden, bei mehreren Daten zu verschiedenen Zeitpunkten lässt sich Daraus eine **Gärverlaufskurve** darstellen lassen)

7: mit ention. Wasser spülen und nächste nächste Probe einfüllen, etc.

8: am Ende einer Messserie das Gerät mit Reinigungsflüssigkeit spülen (z.B. warmes dest./ention. Wasser).

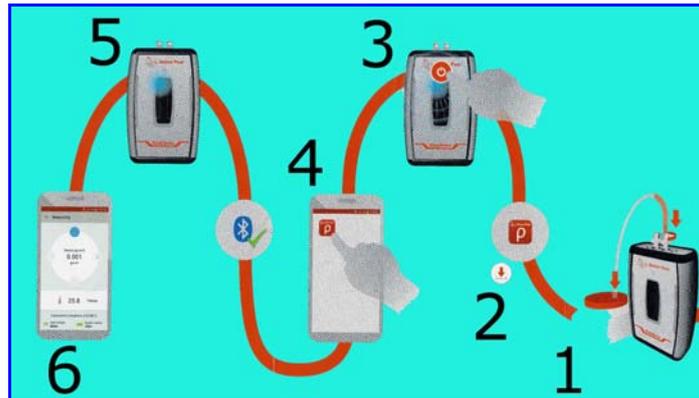


Abb. 6. EasyDens-Dichte/Konzentrationsmessgerät.

1: Probenauslass mit Sammelgefäß verbinden; 2: Smartphone/Tablet: EasyDens-App muss installiert und aktiviert sein; 3: EasyDens einschalten; 4: Smartphone/Tablet: Einstellen der gewünschten Messeinheit (meistens SG: specific gravity, relative Dichte [g/cm<sup>3</sup>]); 5: mit ention. H<sub>2</sub>O justieren, dann Probe mittels Spritze einspritzen; 6: Messwerte auf Smartphone/Tablet ablesen.

- mit **Digital-Refraktometer**: [Info](#), Abb. 7

1: Kalibrierung: Gerät mit On/Off-Taste einschalten, mit einer PET-Pasteurpipette ention. Wasser in die Probenmulde einbringen und auf "ZERO" drücken → Anzeige 0.0

2: Vorsichtig mit saugfähigem Kosmetiktüchlein Wasser aufsaugen

3: Probewürze mit Pasteurpipette auf Probenwanne blasenfrei auftropfen, bis Wanne vollständig gefüllt ist

**Hinweis:** Temperatur der Probe sollte etwa der Gerätetemperatur (wird im Display unterhalb Messwert angezeigt) entsprechen - wenn nicht, ca. 1 min warten

4: READ-Taste drücken → Messwert in % Brix ablesen und in °P bzw. SG-Werte umrechnen (Umrechnungstabelle [hier](#), oder einfach °P : 1.03 → % Brix; °P-Werte in SG-Werte umrechnen: siehe Tabelle [hier](#)).

5: weitere Probenwerte bestimmen: Probe mit Kosmetiktüchlein aus Wanne aufsaugen, dann jeweils mit ention. Wasser Probenmulde reinigen.

6: Auswertung Gärgeschwindigkeit:

aus dem zeitlichen Verlauf der Abnahme der °P- bzw. SG-Werte können Rückschlüsse auf die Gärgeschwindigkeit zwischen einem oder mehreren Hefestämmen gezogen werden



Abb. 7. Hanna Refraktometer für Stammwürze: Extraktgehalts-Bestimmung ([Info](#)).

Hanna-Refraktometer mit Zubehör für die Messungen.



## Durchführung 2: Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Produktionsrate

### 1. Anzuchtmedium Hefen:

10%ige Maltose-[Malzzucker]-Lösung: 10 g Maltose in z.B. 500 mL-Erlenmeyerkolben abwägen, dann mit ention. Wasser auf 100 g auffüllen

### 2. Hefesuspension:

optimale Hefekonz. Wird noch ermittelt! → demnächst update.3.  
gemäß Abb. 8 wird ein Gas auffangsystem zusammen gestellt

### 4. Inkubieren:

während 3 Stunden wird die Zucker-Hefelösung bei 20 °C stehen gelassen und das sich entwickelnde CO<sub>2</sub>-Gas im Ballon aufgefangen

### 5. CO<sub>2</sub>-Volumenbestimmungssystem:

in ein Wasserbecken (Lavabo, Plastikwanne u.ä.) wird kaltes Leitungswasser eingefüllt, darin eingetaucht ein Messzylinder mit Wasser gefüllt und dann aufgerichtet und fixiert (bzw. ein vollständig mit Wasser gefüllter Messzylinder wird mit einer Glasscheibe oder Hand "abgedichtet" und mit der Öffnung nach unten im Wasserbehälter eingebracht und fixiert]

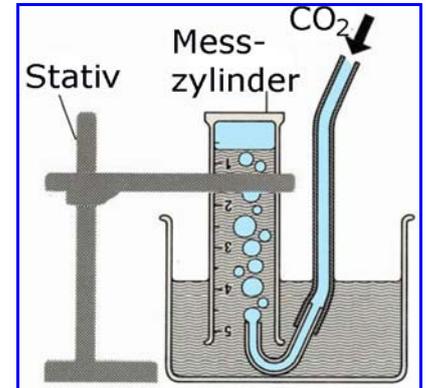


Abb. 8. Gas auffangsystem und Gasvolumenbestimmung mit Messzylinder.

### 6. Bestimmung CO<sub>2</sub>-Gasvolumen:

- der gasgefüllte Ballon wird ohne Gasverlust vom Glasrohr abgenommen und das Gas über das Glasröhrchen in den mit Wasser gefüllten Messzylinder gepresst
- das verdrängte Wasser entspricht dem Gasvolumen, das während der Versuchsdauer von 3 Std. entwickelt wurde: Wert ablesen und protokollieren als [mL CO<sub>2</sub>/

### 7. Auswertung:

Je mehr CO<sub>2</sub> innerhalb der Versuchsdauer von 3 Std. entwickelt wurde, desto vitaler sind die Hefen.

Die CO<sub>2</sub>-Bildungsrate kann als mL CO<sub>2</sub> pro 1 Stunde [mL CO<sub>2</sub>/h] angegeben werden.