

Schopnost mléčných bakterií kazit pivo a souvislost s přítomností genů *horA*, *horC* a *hitA*

Beer-spoiling Ability of Lactic Acid Bacteria and its Relation with Genes horA, horC and hitA

DAGMAR MATOULKOVÁ¹, PETRA KUBIZNIAKOVÁ¹, KAREL SIGLER²

¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Lípová 15, 120 44 Prague 2, Czech Republic*

² Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, 142 20 Praha 4

e-mail: matoulkova@beerresearch.cz, kubizniakova@beerresearch.cz, sigler@biomed.cas.cz

Matoulková, D. – Kubizniaková, P. – Sigler, K.: Schopnost mléčných bakterií kazit pivo a souvislost s přítomností genů *horA*, *horC* a *hitA*. Kvasny Prum. 58, 2012, č. 11–12, s. 336–342.

Sledovali jsme schopnost 69 kmenů bakterií mléčného kvašení kazit pivo, přítomnost genů *horA*, *horC* a *hitA* v jejich genomu a životaschopnost bakterií po 14 týdnech inkubace ve dvou typech piva při dvou teplotních režimech. Schopnost kazit pivo byla zjištěna u 12 (48 %) z 25 kmenů *Lactobacillus brevis*, 2 (25 %) z 8 kmenů *L. plantarum*, 7 (26 %) z 27 kmenů *L. paracasei subsp. paracasei* a 1 (33 %) z 3 kmenů *Leuconostoc spp.* Schopnost dlouhodobého přežívání v pivu bez jeho poškození byla mezi kmeny mnohem více rozšířena (*L. brevis* 89 %, *L. plantarum* 75 %, *L. buchneri* 100 %, *L. paracasei subsp. paracasei* 82 %, *L. lactis* 66 %, *Leuconostoc spp.* 33 %). U druhu *L. brevis* byla schopnost kazit pivo, zjištěna pouze u 2 kmenů obsahujících gen *horC* a u 6 kmenů obsahujících kombinace *horA/hitA* a *horA/horC/hitA*; 4 kmeny byly schopné zkazit pivo, aniž by obsahovaly kterýkoliv z uvedených genů. Schopnost kazit pivo zjištěná u 10 kmenů ostatních druhů nekorelovala s přítomností těchto genů.

Matoulková, D. – Kubizniaková, P. – Sigler, K.: Beer-spoiling ability of lactic acid bacteria and its relation with genes *horA*, *horC* and *hitA*. Kvasny Prum. 58, 2012, No. 11–12, p. 336–342.

Beer-spoiling ability, survival after 14 weeks of incubation in 2 beer types under 2 temperature regimes and the presence of spoilage-associated *horA*, *horC* and *hitA* genes in the genome were studied in 69 strains of lactic acid bacteria. Beer spoilage was determined in 12 (48 %) of 25 strains of *Lactobacillus brevis*, 2 (25 %) of 8 strains of *L. plantarum*, 7 (26 %) of 27 strains of *L. paracasei subsp. paracasei*, and in 1 (33 %) of 3 strains of *Leuconostoc spp.* Survival in beer without adverse effects on its quality was more widely spread among the strains (*L. brevis* 89 %, *L. plantarum* 75 %, *L. buchneri* 100 %, *L. paracasei subsp. paracasei* 82 %, *L. lactis* 66 %, *Leuconostoc spp.* 33 %). In the strongest beer spoiler *L. brevis*, beer spoilage was observed only in 2 strains containing *horC* and in 6 strains containing the combinations *horA/hitA* and *horA/horC/hitA*; 4 strains spoiled beer without having any of these genes. Beer spoilage, detected in a total of 10 strains of all other species, was not associated with the presence of these genes.

Matoulková, D. – Kubizniaková, P. – Sigler, K.: Die Fähigkeit der Milchsäurebakterien das Bier zu verderben und Zusammenhang mit der Anwesenheit mit Gene *horA*, *horC* und *hitA*. Kvasny Prum. 58, 2012, Nr. 11–12, S. 336–342.

Es wurde die Fähigkeit der 69 Milchsäurebakterienstämme das Bier zu verderben, die Anwesenheit der Gene *horA*, *horC* und *hitA* in ihrem Genom und die Bakterienlebensdauer nach 14 Wochen Inkubation in 2 Typen des Bieres unter 2 Temperaturregimen verfolgt. Die Fähigkeit das Bier verderben zu können wurde bei den 12 Stämmen, d.h. (48 %) aus den 25 Stämmen *Lactobacillus brevis*, bei den 12 Stämmen, d.h. (25 %) aus den 8 Stämmen *L. plantarum*, bei den 7 Stämmen, d.h. (26 %) aus den 27 Stämmen *L. paracasei subsp. paracasei* und beim 1 Stamm, d.h. (33 %) aus den 3 Stämmen *Leuconostoc spp.* verfolgt. Die Fähigkeit des langzeitigen Bakterien – Überlebens im Bier ohne es zu verderben wurde unter Stämmen mehr verbreitet (*L. brevis* 89 %, *L. plantarum* 75 %, *L. buchneri* 100 %, *L. paracasei subsp. paracasei* 82 %, *L. lactis* 66 %, *Leuconostoc spp.* 33 %). Bei der Bakterie *L. brevis* wurde die Fähigkeit das Bier zu verderben nur bei 2 Stämmen enthaltene Gen *horC* und bei 6 Stämmen enthaltene Kombinationen *horA/hitA* a *horA/horC/hitA*; 4 Stämme waren fähig das Bier zu verderben ohne Anwesenheit von obig genannten Gene. Die bei den anderen 10 Stämmen festgestellte Fähigkeit das Bier zu verderben hat mit der Anwesenheit dieser Gene nicht korreliert.

Klíčová slova: kažení piva, rezistence k hořkým chmelovým látkám, geny *horA*, *horC* a *hitA*, bakterie mléčného kvašení, *Lactobacillus brevis*

Keywords: beer spoilage, resistance to hop bitter compounds, genes *horA*, *horC* and *hitA*, lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*

1 ÚVOD

Pivo je považováno za nápoj s vysokou mikrobiologickou stabilitou. Hlavními faktory, které ovlivňují mikrobiologickou stabilitu piva, jsou hořké chmelové látky, alkohol, oxid uhličitý, nízké pH, nízký obsah kyslíku a nízké koncentrace živin (Sakamoto a Konings, 2003). I přes tyto nepříznivé podmínky existuje několik skupin mikroorganismů, které v pivu mohou růst a množit se. Nejvíce škodlivou skupinou jsou bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, které jsou zodpovědné za cca 60–90 % případů mikrobiálního kažení piva v Evropě v období 1980–2002 (Suzuki, 2011). Růst těchto mikroorganismů je doprovázen tvorbou viditelného zákalu a nežádoucími senzorickými změnami piva. Při mikrobiologické kontrole piva a pivovarského provozu je nejčastěji izolován *Lactobacillus brevis*, který je charakteristický svou schopností zkvašovat dextriny a škrob a způsobovat tak tzv. super-atenuaci (hlubší prokvašení) piva (Sakamoto a Konings, 2003).

1 INTRODUCTION

Beer is a beverage with high microbiological stability. The main factors affecting the microbiological stability of beer are hop bitter compounds, alcohol, carbon dioxide, low pH, low oxygen content and low levels of nutrients (Sakamoto and Konings, 2003). Despite these unfavorable conditions, several groups of microorganisms can grow and reproduce in beer, lowering its quality. The most common beer spoilers are lactic acid bacteria (LAB), especially *Lactobacillus* and *Pediococcus*, which have been responsible for ca. 60–90 % of the microbial beer spoilage in Europe in 1980–2002 (Suzuki, 2011). Their growth in beer is accompanied by the formation of visible haze and undesirable changes of the sensorial properties of beer. LAB contamination of beer has also been linked to the production of biogenic amines (Lorencová et al., 2012). Microbiological surveillance of beer and brewery plants most often reveal the presence of *Lactobacillus brevis*, which is characterized by its ability to ferment dex-

Hořké chmelové látky jsou ve své isomerované formě zodpovědné za hořkou chuť a vůni piva a vykazují antimikrobiální aktivitu proti gram pozitivním bakteriím a některým houbám (Simpson, 1993; Larson et al., 1996). Účinek chmelových látek může být bakteriostatický nebo baktericidní, v závislosti na koncentraci a délce expozice. Mechanismus antimikrobiálních účinků nebyl dosud zcela objasněn. Podle Simpsona (1993) jsou iso- α -kyseliny a jejich redukované deriváty slabé kyseliny, které se chovají jako protonofory – zvyšují permeabilitu lipidových dvojvrstev biologických membrán pro protony. V nedisociované formě pasivně difundují plasmatickou membránou dovnitř buněk. Vnitrobuněčné pH (pH_i) vyšší než hodnota pK_a iso- α -kyselin ($pK_a=3.1$) způsobí disociaci iso- α -kyselin v cytoplasmě na anionty a protony. V citlivých buňkách způsobí uvolněné protony pokles pH_i a narušení transmembránových transportních procesů (Simpson, 1993), které může vést k narušení příjmu živin a hladovění buněk. Životaschopnost buněk vystavených účinkům iso- α -kyselin je tak snížena. Pokles pH_i může způsobit pokles aktivity některých enzymů a ovlivnit buněčné proteiny a DNA. Uvolněné anionty tvoří neutrální komplexy s buněčnými dvojmocnými kationty, které následně pasivně opouštějí buňku a dochází tak k elektroneutrální výměně protonů za buněčné kationty, např. Mn^{2+} or Mg^{2+} (Simpson, 1993, Simpson and Smith, 1992).

I přesto, že mají mléčné bakterie gram pozitivní charakter buněčné stěny, vyznačují se některé kmeny silnou rezistencí k účinkům hořkých chmelových látek. Rezistence k chmelovým látkám je známa pouze u mléčných bakterií schopných růst v pivu (Sakamoto and Konings, 2003; Suzuki et al., 2006) a zahrnuje činnost ATP-dependentních a pmf-dependentních přenašečů kódovaných geny *horA* a *horC* (Suzuki et al., 2007). Podle Haakensena et al. (2008) koreluje přítomnost těchto genů se schopností *L. brevis* způsobovat kažení piva. Homology genů *horA* a *horC* jsou rozšířeny téměř výhradně pouze u pivo kazících mléčných bakterií, nezávisle na druhu (Suzuki, 2011). Produkty těchto genů, membránové pumpy, aktivně vylučují nedisociované chmelové kyseliny z buňky a snižují tak jejich antimikrobiální účinky. Ztráta buněčných kationtů jako výsledek antimikrobiálního působení chmelových látek může být kompenzována činností membránového přenašeče dvojmocných kationtů, kódovaného genem *hitA* (Hayashi et al., 2001). Geny *hitA*, *horC* a *horA* byly detekovány u bakterií *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*) a *Pediococcus damnosus* schopných rychlého růstu v pivu a jeho zkvažení (Haakensen et al., 2008; Suzuki et al., 2008).

Další mechanismy obrany bakterií proti působení chmelových kyselin zahrnují zvýšenou činnost membránové H^+ -ATPázy, dynamickou regulaci buněčných zásob manganu, zvýšenou pufrací kapacitu cytoplazmy, pozměněné složení buněčné stěny nebo modifikovanou plasmatickou membránu (Behr et al., 2006; Behr a Vogel, 2007a,b; Sakamoto et al., 2002; Simpson, 1993; Simpson a Fernandez, 1994). Rezistence mléčných bakterií k hořkým chmelovým látkám a různé mechanismy, které se na ní podílí, jsou detailně popsány ve velmi vydařeném review autora Suzuki (2011), a proto se jimi v našem článku nezabýváme podrobněji.

Schopnost některých mléčných bakterií kazit pivo je dána, zvláště u *L. brevis*, jejich rezistencí k antimikrobiálním účinkům hořkých chmelových látek. U kmenů *L. brevis* byla po opakované kultivaci v médiu bez chmelových látek pozorována ztráta schopnosti kazit pivo (Suzuki et al., 2006). PCR-detekce genů *horA* a *horC* je uváděna jako spolehlivá pro odlišení bakterií kazících pivo (Iijima et al., 2007; Sami et al., 1997; Suzuki et al., 2005). V našich experimentech jsme studovali přítomnost tří genů spojovaných se schopností kazit pivo (geny *horA*, *horC*, *hitA*) v genomu 69 kmenů bakterií mléčného kvašení pocházejících ze zkvaženého piva nebo z pivovarských provozů. Současně byla sledována schopnost bakterií kazit pivo, po inkubaci v MRS bujónu bez přídavku chmelových látek, a životaschopnost bakterií po 14 týdnech inkubace ve dvou typech piva, lišících se obsahem alkoholu a hořkostí.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Bakteriální kmeny a růstové podmínky

Seznam použitých bakteriálních kmenů a jejich původ je uveden v tab. 1. Kmeny pocházejí ze Sbírký pivovarských mikroorganismů (RIBM 655) VÚPS, a.s., v Praze. Pro experimenty bylo použito 25 kmenů *L. brevis*, 8 kmenů *L. plantarum*, 27 kmenů *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 3 kmeny *L. buchneri*, 3 kmeny *Lactococcus lactis* a 3 kmeny *Leuconostoc* spp. Všechny kmeny pocházejí ze zkvaženého piva (označeny jako SB; spoiled beer) nebo z pivovarského provozu (BP; brewery plant). Kultivace probíhala při teplotě 28°C/24 hod

trins and starch, causing the so-called super-attenuation (deeper fermentation) of beer (Sakamoto and Konings, 2002).

In their isomerized form, hop bitter compounds are responsible for the bitter taste and aromas of beer. They also exhibit antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and some fungi (Simpson, 1993, Larson et al., 1996). Their effect can be bacteriostatic or bactericidal depending on their concentration and length of exposure. The mechanism of the antimicrobial effect is not yet fully clarified. According to Simpson (1993) iso- α -bitter acids and their reduced derivatives are weak acids that function as protonophores, increasing the permeability of the lipid bileaflet of cell membranes for protons. In their undissociated form they diffuse through the plasma membrane into the cell interior. At the intracellular pH (pH_i), which is higher than their pK_a value ($pK_a=3.1$) the iso- α -acids dissociate to anions and protons. The protons so released cause in sensitive cells a drop of pH_i and disturbance of transmembrane transport processes (Simpson 1993) that may lead to the disturbance of nutrient uptake, cell starvation and ultimate drop in viability. The drop of pH_i can cause a drop of activity of some enzymes and affect cellular proteins and DNA. The anions form neutral complexes with cellular divalent cations, which then passively leave the cell, giving rise to an electroneutral exchange of protons for cellular cations such as Mn^{2+} or Mg^{2+} (Simpson, 1993, Simpson and Smith, 1992).

Even though the cell wall of lactic acid bacteria has a Gram-positive character, some strains exhibit a strong resistance to the effects of hop bitter compounds. The resistance to hop compounds is known to appear only in lactic acid bacteria capable of growing in beer (Sakamoto and Konings, 2003, Suzuki et al., 2006) and involves the activity of ATP-dependent and pmf-dependent transporters encoded by the genes *horA* and *horC* (Suzuki et al., 2007). According to Haakensen et al. (2008) the presence of these genes correlates with the ability of *L. brevis* to spoil beer. Homologues of genes *horA* and *horC* are widespread only in beer-spoiling bacteria irrespective of the species (Suzuki, 2011). The products of these genes, membrane pumps, actively extrude undissociated hop acids from the cells and thereby lower their antimicrobial effects. The loss of cellular cations caused by the antimicrobial action of hop substances can be compensated by the action of the membrane transport of divalent cations encoded by the *hitA* gene (Hayashi et al., 2001). Genes *hitA*, *horC* and *horA* were detected in genus *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*) and *Pediococcus damnosus*; all of which were capable of rapid growth and spoilage of beer (Haakensen et al., 2008, Suzuki et al., 2008).

Other mechanisms of bacterial protection against the action of hop bitter acids include an increased activity of the membrane H^+ -ATPase, dynamic regulation of cellular store of manganese, increased buffering capacity of the cytoplasm, altered cell wall composition or modification of the plasma membrane (Behr et al., 2006; Behr et al., 2007; Fernandez and Simpson, 1993; Sakamoto et al., 2002; Simpson, 1993; Simpson and Fernandez, 1994). The mechanisms of resistance of lactic acid bacteria to hop bitter compounds have been described in detail in the excellent review by Suzuki (Suzuki, 2011).

The ability of some lactic acid bacteria, especially *L. brevis* to spoil beer is given by their resistance to the antimicrobial effects of hop bitter compounds. Strains of *L. brevis* cultivated repeatedly in a medium without hop bitter compounds were observed to lose the ability to spoil beer (Suzuki et al., 2006). PCR-detection of *horA* and *horC* genes is taken as a reliable tool for distinguishing beer-spoiling bacteria (Iijima et al., 2007; Sami et al., 1997; Suzuki et al., 2005). We studied the presence of the three genes associated with the beer-spoiling ability (geny *horA*, *horC*, *hitA*) in the genome of 69 strains of lactic acid bacteria isolated from spoiled beer or from brewery plants. Simultaneously, we determined the beer-spoiling ability of the strains after incubation in MRS broth without the addition of hop substances and the survival of the bacteria after a 14-week incubation in two types of beer differing in the concentration of alcohol and in bitterness.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. All cultures, 69 in total, were obtained from the Culture Collection of Microorganisms (RIBM 655) of the Research Institute of Brewing and Malting in Prague, Czech Republic. The collection under study contained 25 strains of *L. brevis*, 8 strains of *L. plantarum*, 27 strains of *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 3 strains of *L. buchneri*, 3 strains of *Lactococcus lactis* and 3 strains of *Leuconostoc* spp. The origin of the

v bakteriologických zkumavkách v de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujónu modifikovaném přidavkem cystein hydrochloridu (0,5 g/l) a thiohykolátu sodného (0,5 g/l).

2.2 PCR-detekce genů *hitA*, *horC* a *horA*

Bakteriální DNA byla izolována s použitím kitu NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel, Německo) podle instrukcí výrobce. PCR-reakce probíhaly v termocykleru Labcycler Gradient (Sensoquest GmbH, Germany). Fragment genu *horA* o velikosti 210 bp byl amplifikován s použitím forward primeru 5'-AAA TCT TAA CCC TGC CGG-3' a reverse primeru 5'-GCG GAA CGG CGA TAA ACA TA-3' podle Haakensena et al. (2007). Fragmenty genů *horC* (94 bp) a *hitA* (179 bp) byly amplifikovány s použitím forward primeru 5'-CTT GTT GGA GCA ATT ATT GG-3' a reverse primeru 5'-CGT TGA CAA GTG CTA CAG G-3' u genu *horC* a forward primeru 5'-AGC GTA GCA GAA GAA CCT AAG-3' a reverse primeru 5'-CAA TTA CCA GGA TCC ATG TAC C-3' u genu *hitA* podle práce Haakensena et al. (2008). Jednotlivé PCR reakce probíhaly v reakční směsi o celkovém objemu 25 µl obsahujícím 12,5 µl master mixu Combi PPP (Top-Bio, ČR), 10,5 µl PCR H₂O, 0,5 µl každého z dvojice primerů (50 µM; KR, ČR) a 1 µl DNA. Počáteční denaturace byla provedena při teplotě 94°C/5 minut, následovaná 30 amplifikačními cykly: 94°C/30 s (denaturace), 55°C/30 s (nasednutí primerů) a 72°C/40 s (extenze), s konečnou extensí při 72°C/5 min. PCR produkt byl analyzován gelovou elektroforézou na 1,2% agarose v 1x koncentrovaném TAE pufru a barvením ethidium bromidem. Detekce byla provedena s použitím video-dokumentačního systému DOC-PRINT II a softwaru BIO 1D (Vilber Lourmat, Francie).

2.3 Stanovení schopnosti bakterií kazit pivo

Pro experimenty byly použity dva typy světlého piva. Pivo A – pasterované, s obsahem alkoholu 4,35 % (v/v), s průměrnou hořkostí 35,0 jednotek, pH 4,5. Pivo B – pasterované, s obsahem alkoholu 3,5 % (v/v), s průměrnou hořkostí 20,0 jednotek, pH 4,5. Piva byla zaočkována 24-hodinovými bakteriálními kulturami o výsledné koncentraci v pivu mezi 10³ a 10⁴ buněk/ml. Schopnost kazit pivo (tvorba zákalu a/nebo sedimentu) byla monitorována po dobu 14 týdnů při pokojové teplotě (RT; room temperature) a v inkubátoru při 28 °C. Všechny experimenty byly realizovány ve třech opakováních.

2.4 Přežívání bakterií po inkubaci v pivu

Životaschopnost bakterií po 14 týdnech inkubace v pivu při obou teplotních režimech byla stanovena membránovou filtrací každého ze zaočkovaných piv a inkubací filtrů na MRS-agaru při teplotě 28 °C po dobu až 7 dní. Všechny experimenty byly realizovány ve třech opakováních.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

U souboru 69 kmenů 6 druhů mléčných bakterií byla sledována schopnost kazit pivo, charakterizovaná vznikem zákalu a/nebo sedimentu. Schopnost kazit pivo byla zjištěna u 12 (48 %) z 25 kmenů *L. brevis*, 2 (25 %) z 8 kmenů *L. plantarum*, 7 (26 %) z 27 kmenů *L. paracasei subsp. paracasei*, 1 (33 %) z 3 kmenů *Leuconostoc* (tab. 1 a 2).

Ze všech 12 kmenů *L. brevis* se schopností kazit pivo jich 9 patří do skupiny SB, tj. pocházejí ze zkaženého piva, zatímco pouze tři kmeny byly původně izolovány z pivovarského provozu (BP; brewery plant) (tabulka 1). U druhu *L. paracasei subsp. paracasei* je poměr původu SB/BP kmenů kazících pivo 1/6. Kmeny se schopností kazit pivo patří do ostatních druhů jsou původu BP: 7 z nich kazilo oba typy piv, 9 kmenů pouze pivo A a dalších 7 kmenů pouze pivo B. Nebyly pozorovány rozdíly v čase potřebném k vytvoření viditelného poškození piva při pokojové teplotě a při 28 °C.

V tab. 2 je uveden vztah mezi přítomností genů *horA*, *horC* a *hitA*, schopností kazit pivo a přežívání bakterií v pivu. Z celkového počtu 69 kmenů jich 16 % obsahuje některý z genů *horA*, *horC* a *hitA*, 32 % kmenů vykazuje schopnost kazit pivo, 80 % přežívá v pivu. Pouze 1/3 kmenů schopných kazit pivo a 19 % přežívajících v pivu po dobu 14 týdnů obsahovala zároveň některý z uvedených genů.

Z 12 kmenů *L. brevis* vykazujících schopnost kazit pivo jich osm obsahovalo gen *horC* nebo kombinace *horA/hitA* a *horA/horC/hitA*, zatímco čtyři kmeny se schopností kazit pivo neobsahovaly ani jeden z uvedených genů. Schopnost kazit pivo byla dále pozorována u 10 kmenů ostatních druhů bakterií mléčného kvašení, u nichž nebyly geny *horA*, *horC* a *hitA* detekovány.

strains is documented in Table 1; indication SB stands for strains isolated from spoiled beer, BP for strains isolated from brewery plant. The strains were grown in 10-ml capped tubes containing de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth, modified with cysteine hydrochloride (0.5 g/l), at 28 °C/24 hours.

2.2 PCR detection of hop resistance genes

Bacterial DNA was extracted using NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel, Germany) according to manufacturer's instructions. PCR-reactions were performed in Labcycler Gradient (Sensoquest GmbH, Germany). A 210 bp fragment of *horA* gene was amplified using the forward primer 5'-AAA TCT TAA CCC TGC CGG -3' and reverse primer 5'-GCG GAA CGG CGA TAA ACA TA-3' according to Haakensen et al. (2007). Fragments of *horC* (94 bp) and *hitA* (179 bp) genes were amplified using the forward primer 5'-CTT GTT GGA GCA ATT ATT GG-3' and reverse primer 5'-CGT TGA CAA GTG CTA CAG G-3' for *horC* and the forward primer 5'-AGC GTA GCA GAA GAA CCT AAG-3' and the reverse primer 5'-CAA TTA CCA GGA TCC ATG TAC C-3' for *hitA* gene according to Haakensen et al. (2007). PCR was set up in a 25 µl reaction volume containing 12.5 µl of Combi PPP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 10.5 µl of PCR H₂O, 0.5 µl of each primer (50 µM; KR, Czech Republic) and 1 µl of DNA. Labcycler Gradient (Sensoquest GmbH, Germany) was used for PCR reaction. Initial denaturation was performed at 94°C for 5 min, followed by 30 amplification cycles. The amplification profile was 94°C for 30 s (denaturation), 55 °C for 30 s (annealing) and 72 °C for 40 s (extension). Final extension was carried out at 72 °C for 5 min. The PCR product was analysed by gel electrophoresis using 1.2% agarose in 1x TAE buffer and by ethidium bromide staining. DNA marker 155-970 coloured (Top-Bio, Czech Republic) was used as DNA fragment size marker. Detection was done using video documentation system DOC-PRINT II and software BIO 1D (Vilber Lourmat, France).

2.3 Assay for determining the beer-spoilage ability

Two pale beers were used in growth experiments. Beer A was a pasteurized 4.35 % vol/vol alcohol beer, pH 4.5, containing an average of 35.0 bitterness units (BU; determined using ASBC Methods (1992)). Beer B was a pasteurized 3.5 % vol/vol alcohol beer, pH 4.5, containing an average of 20.0 BU. Beers were inoculated aseptically with 24-hour bacterial cultures to form a suspension containing between 10³ and 10⁴ cells/ml. The beer spoilage ability (i.e., formation of visible turbidity and/or sediment compared with control beer) was monitored for 14 weeks at room temperature (RT) and 28 °C. All experiments were carried out in triplicate.

2.4 Determination of LAB survival after incubation in beer

Cell survival after 14 weeks of incubation in beer at both temperatures was evaluated by membrane filtration of 100 ml of each inoculated beer and incubation of the filters on MRS-agar plates. Incubation was performed at 28 °C for up to 7 days. All experiments were carried out in triplicate.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Out of the 69 strains of 6 species of lactic acid bacteria, beer spoilage, characterized by the appearance of haze and/or sediment, was determined in 12 (48 %) of 25 strains of *Lactobacillus brevis*, 2 (25 %) of 8 strains of *L. plantarum*, 7 (26 %) of 27 strains of *L. paracasei subsp. paracasei* and in 1 (33 %) of 3 strains of *Leuconostoc spp.* (Tab. 1 and 2).

As seen in Tab. 1, nine *L. brevis* isolates exhibiting beer-spoiling ability were of the SB type, i.e. were isolated from spoiled beer whereas only 3 isolates exhibiting this ability were collected in the brewery plant (BP) environment. In *L. paracasei subsp. paracasei* the SB/BP ratio of beer-spoiling isolates was 1/6 and the beer-spoiling strains of all the remaining species were of the BP type. Overall, 7 strains spoiled both beer types, 9 spoiled only the high-hopped beer A, and another 7 strains spoiled only low-hopped beer B. No clear difference was found between the length of the period to observable spoilage at room temperature and 28 °C.

Tab. 2 summarizes the relationship between the presence of spoilage-associated *horA*, *horC* and *hitA* genes in the bacterial genome, the beer-spoiling ability and the survival in beer. When the data are taken together for all 69 strains, the percentages of the presence of the three genes (16 %), beer spoilage (32 %) and survival (80 %) in-

Tab. 1 Bakteriální kmeny, přítomnost genů *hitA*, *horC* a *horA*, schopnost kazit pivo a přežívání v pivu / *Bacterial strains, presence of hitA, horC and horA genes, beer-spoilage ability and post-beer growth survival*

Druh / <i>Species</i>	RIBM kmen / <i>strain</i>	Původ / <i>Origin</i> ^a	Detekce genů / <i>Gene detection</i>			Pivo / <i>Beer A</i>			Pivo / <i>Beer B</i>					
						Kažení piva (týdny) / <i>Beer spoilage (weeks)</i> ^b		Růst / <i>Growth</i> ^d RT/28°C	Kažení piva (týdny) / <i>Beer spoilage (weeks)</i> ^b		Růst / <i>Growth</i> ^d RT/28°C			
			Hor A	Hor C	Hit A	RT ^c	28°C		RT ^c	28°C				
<i>L. brevis</i>	2-4	BP	-	+	+	-	-	+/+	-	-	-/+			
	2-16	SB	+	+	+	+	(9)	-	+ (13)	-	+/+			
	2-20	SB	+	+	+	+	(14)	-	-	-	-/-			
	2-27	SB	-	+	-	-	+	(10)	+	(11)	+	(10)	+/+	
	2-32	SB	-	-	-	+	(14)	+	(14)	+/-	-	-	+/-	
	2-33	SB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2-34	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-/-	
	2-38	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
	2-40	BP	-	-	-	-	-	+/-	+	(14)	-	+	+/+	
	2-42	BP	-	-	-	-	-	+/-	+	(11)	+	(10)	+/+	
	2-50	SB	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	+/+	
	2-56	BP	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	+/+	
	2-62	BP	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	+/-	
	2-67	SB	+	+	+	-	-	-/-	-	-	-	-	-/-	
	2-68	SB	+	+	+	+	(6)	+	(4)	+/-	-	-	-/-	
	2-69	SB	+	+	+	+	(5)	+	(12)	+/-	-	-	-/-	
	2-70	SB	+	+	+	+	(8)	+	(12)	+/-	-	-	+/-	
	2-72	BP	+	-	+	-	-	+/-	-	+	(12)	+	+/+	
	2-78	SB	+	-	+	-	-	-/-	-	-	-	-	+/-	
	2-85	SB	-	-	-	-	+	(12)	+/-	-	-	-	+/-	
	2-93	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-/-	
	2-98	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	+/-	
	2-101	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-/-	
	2-111	SB	-	+	-	+	(6)	+	(6)	+/-	-	+	(8)	-/+
	2-112	SB	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
<i>L. plantarum</i>	2-48	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
	2-89	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	+/+	
	2-90	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	+	(10)	+	+/+	
	2-91	BP	-	-	-	-	+	(9)	-/+	-	+	(9)	-/+	
	2-92	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	+/-	
	2-94	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-/-	
	2-96	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-/-	
	2-99	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-/-	
<i>L. buchneri</i>	2-8	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-/+	
	2-9	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/+	
	2-73	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	2-1	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-/-	
	2-2	BP	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+/-	
	2-3	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-/-	
	2-5	BP	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-/-	
	2-6	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-/+	
	2-10	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
	2-17	BP	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+/-	
	2-23	SB	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
	2-25	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	+/-	
	2-26	SB	-	-	-	-	-	+/-	+	(11)	+	(7)	+/+	
	2-30	SB	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/+	
	2-41	BP	-	-	-	-	-	+/-	+	(14)	+	(14)	+/+	
	2-45	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	
	2-46	BP	-	-	-	-	-	+/-	+	(10)	+	(11)	+/+	

Druh / Species	RIBM kmen / strain	Původ / Origin ^a	Detekce genů / Gene detection			Pivo / Beer A			Pivo / Beer B		
						Kažení piva (týdny) / Beer spoilage (weeks) ^b		Růst / Growth ^d RT/28°C	Kažení piva (týdny) / Beer spoilage (weeks) ^b		Růst / Growth ^d RT/28°C
			Hor A	Hor C	Hit A	RT ^c	28°C		RT ^c	28°C	
	2-49	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-
	2-51	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-
	2-59	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-
	2-63	BP	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-
	2-71	BP	-	-	-	-	+ (13)	+/-	-	-	+/-
	2-74	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
	2-76	SB	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-/-
	2-77	BP	-	-	-	-	+ (13)	+/-	-	-	+/-
	2-79	BP	-	-	-	-	+ (14)	+/-	-	-	-/-
	2-88	BP	-	-	-	-	+ (10)	+/-	-	+ (12)	-/+
	2-95	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
	2-100	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
	2-113	SB	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
<i>L. lactis</i>	2-21	SB	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-/-
	2-65	SB	-	-	-	-	-	-/-	-	-	+/-
	2-66	SB	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
<i>Leuconostoc</i>	2-87	BP	-	-	-	-	+ (12)	-/+	-	+ (14)	-/+
	2-102	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-
	2-103	BP	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-/-

^a SB, zkažené pivo / spoiled beer; BP, pivovarský provoz / brewery plant

^b +, viditelný růst v pivu; čísla v závorkách znázorňují počet týdnů potřebný k dosažení viditelného nárůstu bakterií v pivu / visible growth in beer; numbers in parentheses indicate the number of weeks required to attain visible growth in beer; -, bez tvorby zákalu a/nebo sedimentu / no haze and/or sediment formation

^c RT, pokojová teplota / room temperature

^d +, nárůst bakterií na agarových plotnách po vyočkování z piva po 14 týdnech inkubace / bacteria capable of forming visible growth on agar plates upon subculture from beer after 14 weeks of incubation; -, bez nárůstu / no growth

Přežívání bakterií v obou typech piva po dobu 14 týdnů (bez viditelného poškození piva) byla mezi kmeny mnohem více rozšířeným jevem, než samotná schopnost kazit pivo (*L. brevis* 89%, *L. plantarum* 75%, *L. buchneri* 100%, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 82%, *L. lactis* 66%, *Leuconostoc*). Nebyly pozorovány významné rozdíly v přežívání bakterií v pivu A a B.

Podle Suzuki et al. (2005) se geny *horA* a *horC* vyskytují u většiny bakterií mléčného kvašení, které vykazují schopnost kazit pivo, a genom každého z kmenů obsahuje alespoň jeden z uvedených genetických markerů. Přítomnost jednoho nebo obou z těchto genů je druhově nezávislým znakem, kterým se vyznačují mléčné bakterie kazící pivo (Haakensen et al., 2007; Haakensen et al., 2008; Iijima et al., 2007; Suzuki et al., 2005). Naše výsledky jsou v rozporu s tímto tvrzením. Z celkového počtu 69 kmenů jich 22 způsobilo zákal piva, přičemž jen u 7 z nich byl detekován některý z genů *horA*, *horC* a *hitA* (tab. 1 a 2). U kmene RIBM 2-67 byla zjištěna přítomnost všech tří genů, při našich experimentech nekazil žádné z piv a po 14 týdnech inkubace v pivu nebyly detekovány životaschopné buňky.

Autoři Fernandez a Simpson (1995) uvádí, že schopnost některých mléčných bakterií kazit pivo může být indukována jejich předchozím pasážováním v médiích se stoupající koncentrací hořkých kyselin. Tato skutečnost naznačuje, že zřejmě dochází k odpovědi organismu na stresové faktory v prostředí. U bakterií mléčného kvašení je běžným jevem tzv. odpověď na kyselý stres (acid stress response). V naší studii nebyla schopnost kazit pivo u bakterií indukována. Všechny bakteriální kmeny byly převedeny do piv z MRS-média bez obsahu chmelových kyselin.

U druhů *L. casei*, *L. paracasei*, *L. coryniformis* a *L. plantarum* je v literatuře uváděná slabá rezistence k působení hořkých chmelových látek a schopnost kazit pouze málo chmelené pivo nebo pivo s vyšším pH (Back, 2005). Při našich experimentech byla schopnost

dicat that only 1/3 of the strains spoiling beer and only 19% of all strains surviving in beer for 14 weeks contained any or all of the three genes.

Out of the 12 strains of *L. brevis* exhibiting beer spoilage ability, eight contained *horC* or the combinations *horA/hitA* and *horA/horC/hitA* while four strains spoiled beer without having any of these genes. The beer spoilage ability detected in the 10 strains of all other species was not associated with the presence of these genes.

Survival of the bacteria in the two beer types for 14 weeks (without producing visible adverse effects on beer quality) was more widespread among the strains than the spoiling ability (*L. brevis* 89%, *L. plantarum* 75%, *L. buchneri* 100%, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 82%, *L. lactis* 66%, *Leuconostoc* spp. 33 %). The survival did not perceptibly differ between beer A and B.

According to Suzuki et al. (2005) the genes *horA* and *horC* occur in most of lactic acid bacteria capable of beer spoilage and the genome of each of these strains contains at least one of these genetic markers. According to several authors the presence of one or both of these genes is a species-independent marker characteristic for beer-spoiling bacteria (Haakensen et al., 2007; Haakensen et al., 2008; Iijima et al., 2007; Suzuki et al., 2005). As stated above (Tab. 1 and 2), out of the total of 69 strains only 22 caused beer haze and/or sediment and only 7 of these contained some of the genes *horA*, *horC* and *hitA*. On the other hand, the *L. brevis* strain RIBM 2-67, which was found to contain all the three genes, did not spoil any of the two beers and no viable cells were detected after 14 weeks of incubation in beer.

Fernandez and Simpson (1995) stated that the beer-spoiling ability of some lactic acid bacteria can be induced by a previous passage in media with increasing concentration of bitter acids. This could imply that it may form part of a stress response of the cells to environmental factors, e.g. the commonly occurring acid stress response. In

kazit pivo, bez předchozí adaptace bakterií na hořké chmelové látky, prokázána u 2 (z celkových 8) kmenů *L. plantarum* a 7 (z celkových 28) kmenů *L. paracasei* subsp. *paracasei*, tedy u 25 % studovaných kmenů. Ze dvou kmenů *L. plantarum* se schopností kazit pivo kmen RIBM 2-90 zkazil pouze méně chmelové pivo s nižším obsahem alkoholu (pivo B), zatímco kmen RIBM 2-91 způsobil zkažení obou testovaných piv při teplotě 28 °C. Ze 7 kmenů *L. casei/paracasei* se schopností kazit pivo bylo u 4 pozorováno zkažení piva A s vyšším obsahem chmelových látek a alkoholu. Schopnost kazit pivo při teplotě 28 °C byla zjištěna u 1 ze 3 kmenů *Leuconostoc* spp. Žádný ze tří kmenů *Lactococcus* pivo nekazil, pouze jeden kmen přežíval v každém z piv; schopnost kazit pivo je u tohoto druhu uváděna jako minimální (Back, 2005).

Výsledky předložené práce naznačují, že schopnost *L. brevis* kazit pivo je spíše než na rezistenci k hořkým látkám chmele založena na schopnosti odolávat působení několika stresových faktorů: alkoholu, hořkým chmelovým látkám, přetlaku CO₂ a SO₂. V naší předchozí studii jsme prokázali, že se stoupající koncentrací hořkých chmelových látek dochází ke snížení koncentrace buněk v suspenzi, snížení specifické růstové rychlosti, a k prodloužení lag-fáze. Nebyl prokázán žádný vztah mezi schopností kazit pivo a rezistencí k hořkým chmelovým látkám. Stupeň rezistence k antibakteriálním účinkům chmelových kyselin je závislý na počátečním pH kultivační půdy, u žádného kmene *L. brevis* však nebyla prokázána korelace mezi pH-indukovanou změnou stupně rezistence a schopností kazit pivo (Matoulková et al., 2010). Vzhledem ke schopnosti bakterií přežívat v pivu se můžeme domnívat, že jejich schopnost kazit pivo je (i) silnějším projevem mnohem více rozšířené schopnosti bakterií přežívat v pivu; (ii) nemusí být nutně spojená s přítomností uvedených genů v bakteriálním genomu, a (iii) je závislá na kmeni.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z finančních prostředků Výzkumného Záměru MSM6019369701 a Výzkumného Centra 1M0570 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

this study we did not induce the beer-spoiling ability since all strains were transferred into the beers from MRS medium that did not contain hop bitter acids.

L. casei, *L. paracasei*, *L. plantarum* and *L. coryniformis* have been reported to exhibit weak resistance to the action of hop bitter compounds and to spoil only low-hopped beer or a beer with higher pH (Back, 2005). In our study, out of the 2 beer-spoiling strains of *L. plantarum* one (RIBM 2-90) spoiled only the lower-hopped, lower-alcohol beer B whereas strain RIBM 2-91 spoiled both this beer and the higher-hopped and higher-alcohol beer A at 28 °C. Out of the 7 *L. paracasei* subsp. *paracasei* strains with beer-spoilage ability four were also able to spoil higher-hopped and higher-alcohol beer A. One of the three *Leuconostoc* spp. strains spoiled both beers at 28 °C while *Lactococcus*, reported to have a minimum beer-spoiling ability (Back, 2005), failed to spoil the two beers and only 1 of 3 strains showed survival in each beer.

Our results show that, in addition to the resistance to hop bitter compounds, the beer-spoiling ability of *L. brevis* and other LAB species is likely to be based on the ability to withstand several stress factors such as alcohol, CO₂ overpressure and SO₂. In our previous study increasing concentrations of hop bitter compounds in culture media led to a decrease in cell suspension optical density and in the specific growth rate and extension of lag phase. No relationship was found between the beer-spoilage ability and hop-resistance. The degree of resistance to the antibacterial activity of hop bitter acids was strongly affected by the initial pH of culture medium, but there was no correlation between the pH-induced change in the level of resistance and the beer spoilage ability of any *L. brevis* strains (Matoulková et al., 2010). In view of the wide occurrence of survival of the bacterial strains in beer, it may be inferred that (i) the ability to spoil beer represents a stronger manifestation of the more widespread ability to survive in beer; (ii) furthermore, it need not be obligatorily associated solely with the presence of the above genes in the genome, and (iii) it is strongly strain-dependent.

Acknowledgements

This work was supported by the Institutional Research Concept MSM6019369701 and the Research Center 1M0570 of the CR Ministry of Education, Youth and Sports.

Tab. 2 Přítomnost genů *hitA*, *horC* a *horA*, schopnost kazit pivo a přežívání bakterií v pivu / The presence of beer spoilage-associated genes *hitA*, *horC* and *horA*, beer spoilage ability and post-beer survival of bacteria

Druh / Species	Počet kmenů / No. of strains	Gen(y) / Gene(s)	Kmeny s geny <i>hitA</i> , <i>horC</i> a <i>horA</i> / Strains with genes <i>hitA</i> , <i>horC</i> and <i>horA</i>	Kažení piva / Beer spoilage	Přežívání v pivu / Post-beer survival
<i>L. brevis</i>	25	-	0	4	12
		<i>horA</i>	0	0	0
		<i>horC</i>	2	2	2
		<i>hitA</i>	0	0	0
		<i>horA</i> / <i>horC</i>	0	0	0
		<i>horA</i> / <i>hitA</i>	2	1	2
		<i>horC</i> / <i>hitA</i>	1	0	1
		<i>horA</i> / <i>horC</i> / <i>hitA</i>	6	5	5
<i>L. plantarum</i>	8	-	0	2	5
<i>L. buchneri</i>	3	-	0	0	3
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	27	-	0	7	22
<i>L. lactis</i>	3	-	0	0	2
<i>Leuconostoc</i> spp.	3	-	0	1	1
Celkem / Total	69		11 (16 %)	22 (32 %)	55 (80 %)

Literatura / References

- American Society of Brewing Chemists. Method Beer-23A. Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists, 8th ed. The Society, St. Paul, MN, 1992.
- Back, W., 2005: Brewery. In: Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology, W. Back, Ed. Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, pp. 10–112.
- Behr, J., Gänzle, M. G., Vogel, R. F., 2006: Characterization of a highly Hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 6483–6492.
- Behr, J., Vogel, R. F., 2007: Mechanisms of hop-adaptation in emergence of beer spoiling *Lactobacillus brevis*. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., Venice, CD ROM 2007. Presentation 125.
- Fernandez, J. L., Simpson, W. J., 1993: Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. J. Appl. Bacteriol. **75**: 315–319.
- Fernandez, J. L., Simpson, W. J., 1995: Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. **78**: 419–425.
- Haakensen, M. C., Butt, L., Chaban, B., Deneer, H., Ziola, B., Dowgiert, T. A., 2007: *HorA*-specific real-time PCR for detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. J. Am. Soc. Brew. Chem. **65**: 157–165.
- Haakensen, M., Schubert, A., Ziola, B., 2008: Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. **66**: 63–70.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., Taguchi, H., 2001: Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. Appl. Microbiol. Biotechnol. **55**: 596–603.
- Iijima, K., Suzuki, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007: Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters. J. Inst. Brew. **113**: 96–101.
- Larson, A. E., Yu, R. R. Y., Lee, O. A., Price, S., Haas, G. J., Johnson, E. A., 1996: Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. Int. J. Food Microbiol. **33**: 195–207.
- Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F., 2012: Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from dairy products and beer. Int. J. Food Sci. Technol., doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x
- Matoulková, D., Němec, M., Sigler, K., 2010: Effect of tetrahydroisoo- α -acids on the growth of beer-spoiling and –nonspoiling bacteria. Kvasny Prum. **56**: 396–403.
- Sakamoto, K., Konings, W. N., 2003: Beer spoilage bacteria and hop resistance. Int. J. Food Microbiol. **89**: 105–124.
- Sakamoto, K., van Veen, H. W., Saito, H., Kobayashi, H., Konings, W. N., 2002: Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 5374–5378.
- Sami, M., Yamashita, H., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., Yamasaki, M., 1997: A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of lactobacilli. J. Am. Soc. Brew. Chem. **55**: 137–140.
- Simpson, W. J., 1993: Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. J. Gen. Microbiol. **139**: 1041–1045.
- Simpson, W. J., Smith, A. R. W., 1992: Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. J. Appl. Bacteriol. **72**: 327–334.
- Simpson, W. J., Fernandez, J. L., 1994: Mechanism of resistance of lactic acid bacteria to trans-isohumulone. J. Am. Soc. Brew. Chem. **52**: 9–11.
- Suzuki, K., 2011: 125th Anniversary Review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. J. Inst. Brew. **117**: 131–155.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kitamoto, K., 2008: Sake and beer spoilage lactic acid bacteria – a review. J. Inst. Brew. **114**: 209–223.
- Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007: Hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria (LAB) and other related quality assurance issues – review. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., Venice, CD ROM 2007. Presentation 128.
- Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., Yamashita, H., 2005: Isolation of hop-sensitive variant from *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic marker for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 5089–5097.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H., 2006: A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. J. Inst. Brew. **112**: 173–191.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 21. 8. 2012

Přijato k publikování / Accepted for publication: 5. 10. 2012

AZL PRAHA NABÍZÍ ANALYTICKÉ ROZBORY:

1. Nutriční balíček

Tento kompletní soubor metod k označování výživových hodnot piva a míchaných nápojů na bázi piva je připraven v dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 1169/2011 „O poskytování informací spotřebitelům“.

2. Potravinový zákon

Tento kompletní soubor analýz zahrnuje všechny nutné rozborů ve smyslu Zákona o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb.

3. Stanovení obsahu fluoru

Nová metoda pro stanovení fluoru v pivovarských odpadech, hlavně mlátě a pivovarských kvasnicích.

Bližší informace na www.beerresearch.cz

Kontaktní osoba: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D., olsovska@beerresearch.cz
tel.: + 420 224 900 150

