

# Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce

## Brewing Microbiology – Wild Yeasts and Methods of Their Detection

Dagmar MATOULKOVÁ<sup>1</sup>, Jana KOPECKÁ<sup>2</sup>, Petra KUBIZNIAKOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague  
e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

<sup>2</sup> Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37, 602 00 Brno / Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

Recenzovaný článek – Reviewed paper

**Matoulková, D. – Kopecká, J. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce.** Kvasny Prum. 59, 2013, č. 9, s. 246–257

V publikaci je uveden literární přehled problematiky detekce divokých kvasinek v provozní pivovarské praxi. V experimentální části práce byl sledován růst souboru 19 kmenů kulturních a divokých kvasinek na sladidlovém, mladidlovém a lysinovém agar, na půdách obsahujících kyselinu monoiodoctovou, krystalovou violet, síran měďnatý. Sledován byl dále růst kvasinek na WLN agar, na MYGP agar obsahujícím aktidion a na MYGP agar při teplotě 37°C. Publikace obsahuje fotodokumentaci kolonií vybraných kmenů kvasinek kultivovaných na různých ztužených půdách. Vyhodnocena byla reálná využitelnost půd v provozní pivovarské laboratoři.

**Matoulková, D. – Kopecká, J. – Kubizniaková, P.: Brewing microbiology – wild yeasts and methods of their detection.** Kvasny Prum. 59, 2013, No. 9, p. 246–257

This survey is focused on the techniques of detection of wild yeasts in brewery laboratory. The experimental part of the work deals with the ability of 19 strains of culture and wild yeasts to grow on wort, hopped-wort and lysine agar, and on media containing monoiodoacetic acid, crystal violet and copper sulphate. Growth of yeasts on WLN agar, on MYGP agar with actidione and on MYGP agar at 37°C was also monitored. Photographs of representative colonies of yeast strains on various agar media are presented. The practical usefulness of the media in brewery laboratory was evaluated.

**Matoulková, D. – Kopecká, J. – Kubizniaková, P.: Mikrobiologie der Bierherstellung – Die wilde Hefe und die Methoden ihrer Detektion.** Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 9, S. 246–257.

Die Publikation befaßt sich mit der Literaturübersicht einer Problematik der Detektion von Wildstämmen in der Brauindustrie. Im experimentellen Teil wurde Wachstum einer Kollektion von Wild- und kulturellen Hefestämmen am Süßwürze-, Würze- und Lysin-Agar und auf den Monojodessigsäure-, Kristallkupfer-, Kristallviolet- und Kupfersulfat enthaltend Böden verfolgt. Weiterhin wurde ein Hefewachstum am WLN – Agar, am Aktidion enthaltend MYGP – Agar bei der Temperatur 37 °C. Die Publikation enthält eine Photogalerie der Kolonien von auf den verfestigten Böden kultivierten ausgewählten Hefestämmen. Weiterhin wurde im Braulabor die reale Verwendbarkeit von verschiedenen Böden zur mikrobiologische Kultivierung ausgewertet.

**Klíčová slova:** mikrobiální kontaminace piva, divoké kvasinky, cizí kvasinky, *Saccharomyces*, *non-Saccharomyces*, „*S. diastaticus*“, *super-attenuace*, *kultivační půdy*

**Keywords:** microbial contamination of beer, wild yeast, *Saccharomyces*, *non-Saccharomyces*, „*S. diastaticus*“, *super-attenuation*, *cultivation media*

### 1 ÚVOD

Pojmem „divoké“ nebo „cizí“ kvasinky jsou popisovány kvasinky jiné nežli kulturní pivovarské kvasinky. Divoké kvasinky mohou být nacházeny v různých fázích výroby piva, největší problémy však působí při hlavním kvašení produkci nežádoucích chutí a aromat (Boulton a Quain, 2001). Dalším nežádoucím projevem kontaminace divokými kvasinkami může být zpomalení nebo zastavení kvašení a tzv. *super-attenuace*, tedy hlubší prokvašení hotového piva – hotové pivo pak obsahuje jen minimum zbytkového extraktu a vyšší koncentrace alkoholu (Vaughan et al., 2005). V širším slova smyslu lze mezi divoké kvasinky řadit i kulturní kvasinky přítomné v jiné části výrobního procesu, než je kvašení a dokvašování, tedy podle populární definice od Gillianda „kvasinky, které nejsou využívány úmyslně a nejsou plně pod kontrolou“ (Campbell, 2003a). Mezi divoké kvasinky pak můžeme řadit i kmeny s nežádoucími technologickými vlastnostmi – kmeny produkující toxiny (tzv. *killer-kmeny*) nebo respiračně deficientní mutanty.

Divoké kvasinky jsou běžně rozdělovány do dvou skupin: 1) kvasinky rodu *Saccharomyces* a 2) kvasinky patřící do jiných rodů, tzv. *non-Saccharomyces* (Ingledew a Casey, 1982). Divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou z hlediska své škodlivosti považovány za více rizikové – mnohé jsou schopné růst anaerobně a mohou tedy konkurovat kulturním kvasinkám při kvašení cukrů obsažených v mladině, za současně produkce nežádoucích aromatických látek. Schopnost produkovat fenolické látky dekarboxylací fenolických kyselin mladiny je charakteristická pro amylytické (tj. kvasinky schopné štěpit dextriny) i ostatní divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* (Ryder et al., 1978). Kvasinky schopné dekarboxylovat fenolové kyseliny mají funkční gen POF (POF = phenolic off-flavor; fenolické chutové vady, pachutě) a jsou někdy nazývány POF<sup>+</sup> (POF-pozitivní). Produkují 4-vinylguajakol a styren dekarboxylací kyseliny ferulové, resp. skořicové (Goodey a Tubb, 1982). Amylytické kvasinky, dříve označované jako „*S. diastaticus*“ (nyní klasifikovány

### 1 INTRODUCTION

The term „wild“ yeasts is used for any yeasts other than culture brewer's yeast. Although found in different stages of beer production, they cause the most serious effects by producing undesirable flavors and aromas during the main fermentation of wort (Boulton and Quain, 2001). Contamination of wort by wild yeasts can also lead to the slowing-down or cessation of fermentation or to the so-called *super-attenuation*, i.e. deeper fermentation of finished beer – the resulting beer then contains a minimum of extract and a higher concentration of alcohol (Vaughan et al., 2005). Culture brewer's yeasts present in another operation phase than fermentation and lagering can be considered as wild, according to the popular definition by Gilliland, „yeasts that are not used deliberately and not under full control“ (Campbell, 2003a). Wild yeasts can also include strains with undesirable technological properties – *killer yeast strains* or *respiratory-deficient mutants*.

Wild yeasts are generally divided into two groups: 1) yeasts belonging to the genus *Saccharomyces* and 2) yeasts of other genera, so-called *non-Saccharomyces yeasts* (Ingledew and Casey, 1982). *Saccharomyces* wild yeasts are considered as more hazardous – many are able to grow anaerobically and may thus compete with culture yeast in fermentation of wort sugars, which can then be accompanied by production of undesirable aromatic compounds. Amylytic yeast (tj. yeast able to utilize dextrins) and other wild yeast of genus *Saccharomyces* are able to produce phenolic compounds by decarboxylation of wort phenolic acids (Ryder et al., 1978). Yeasts that are able to decarboxylate phenolic acids possess a functional gene POF (POF = phenolic off-flavor) and they are sometimes called POF<sup>+</sup> yeasts (POF-positive). They produce 4-vinyl guaiacol and styrene by means of decarboxylation of ferulic and cinnamic acid, respectively (Goodey and Tubb, 1982). Amylytic yeast, formerly

jako *S. cerevisiae*) zkvašují dextriny za vzniku hluboce prokvašených pív (Jespersen a Jakobsen, 1996; Vaughan et al., 2005). Divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* jsou navíc blíže příbuzné kulturním kvasinkám, a jejich biochemická a fyziologická podobnost je příčinou často problematického odlišení. „Typické“ pivovarské divoké kvasinky dříve klasifikované jako *S. logos*, *S. uvarum*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus*, *S. willianus*, *S. ellipsoideus*, *S. turbidans* jsou nyní řazeny do druhu *S. cerevisiae* (Kreger van Rijn, 1984; Matoulková a Šavel, 2007).

Skupina non-*Saccharomyces* divokých kvasinek je různorodá – zahrnuje kvasinky rodu *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* a dalších. V pivovarském provozu se nejčastěji vyskytují *Candida* a *Pichia* (van der Aa Kühle a Jespersen, 1998). Z hlediska schopnosti kazit pivo jsou považovány za méně rizikové nežli kvasinky *Saccharomyces*, zejména pro svou omezenou schopnost růst a množit se za anaerobních podmínek a fermentovat cukry (Boulton a Quain, 2001). I kvasinky schopné růst v čisté kultuře anaerobně nebyly za podmínek napodobujících kvašení mladiny schopny konkurovat kulturnímu kmeni (Campbell a Msongo, 1991). Kvasinky skupiny non-*Saccharomyces*, pokud nejsou z piva odstraněny pasterací nebo sterilní filtrací, mohou v pivu přežít, ale nijak ho nepoškodí. Jejich detekce v pivu během rutinní mikrobiologické kontroly svědčí o nízké hygienické úrovni provozu (Boulton a Quain, 2001).

Pro účely detekce divokých kvasinek byla vyvinuta řada různých kultivačních metod, které fungují na jednom ze dvou základních principů:

1. některá ze složek půdy, případně podmínky inkubace, brání růstu kulturních kvasinek za současné podpory růstu divokých kvasinek (Linovo médium, půda s aktidionem, s  $\text{CuSO}_4$  a růst při 37 °C), anebo
2. médium obsahuje složky, které neumí kulturní pivovarské kvasinky využívat, zatímco divoké kvasinky na půdě rostou. Do druhé skupiny patří lysinový agar, kde je selektivita založená na výhradním zdroji dusíku, a XMACS médium obsahující selektivní zdroje uhlíku.

Prvním selektivním médiem pro detekci divokých kvasinek byl sladinový agar s krystalovou violetí (Kato, 1967). Krystalová violet potlačuje růst kulturních kvasinek, ale umožňuje růst některých divokých kvasinek, např. „*S. diastaticus*“, *S. cerevisiae* a některých druhů rodu *Pichia*, *Debaryomyces*, *Candida* a *Kloeckera* (Šavel, 1980). Tato půda však není univerzálně použitelná – u kvasinek *Saccharomyces* i non-*Saccharomyces* byla pozorována různá citlivost na krystalovou violet (Haikara a Enari, 1975).

Další selektivní půdou pro detekci divokých kvasinek bylo Schwarzo diferenciatní médium (SDM) obsahující fuchsin pro inhibici kulturních kvasinek (Brenner et al., 1970). Ani s půdou SDM nebylo dosaženo optimálních výsledků. V některých případech na půdě mohou vyrůst i kulturní kvasinky *S. pastorianus* a *S. cerevisiae* ve formě kolonií obtížně odlišitelných od divokých kvasinek *Saccharomyces* (Lin, 1973).

Linovo médium, někdy označováno LWYM (Lin's wild yeast medium; Linovo médium pro divoké kvasinky), je kombinací sladinového agaru s krystalovou violetí a SDM půdy. Obsahuje krystalovou violet a fuchsin-sířčitou směs jako selektivní složky (Lin, 1974). Při použití této půdy je doporučováno otestování růstu používaného kulturního kmene a úprava množství krystalové violeti. LWYN je vhodná pro průkaz divokých kvasinek skupiny *Saccharomyces* i non-*Saccharomyces*. Půda LWYN byla modifikována přidáním ergosterolu, Tweenu 80 a ethanolu pro detekci divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* (Longley et al., 1980).

Lysinový agar je syntetické médium obsahující glukosu, minerální soli, vitamíny a aminokyselinu L-lysin jako zdroj dusíku. Kulturní pivovarské kvasinky a většina ostatních kvasinek rodu *Saccharomyces* nedokáže využívat skupinu  $-\text{NH}_2$  lysinu jako výhradní zdroj dusíku (Walters a Thiselton, 1953). Pouze kvasinky patřící do skupiny non-*Saccharomyces* vytváří na této půdě kolonie běžné velikosti. Lysinový agar má dvě hlavní nevýhody: 1) není plně selektivní – růst kvasinek rodu *Saccharomyces* není zcela inhibován, protože kvasinky očkované ze vzorku na agar nejsou úplně vyhladovělé, nějaké množství živin (včetně zdroje dusíku) si přináší uvnitř a na povrchu svých buněk a vytváří zpravidla viditelné kolonie; 2) lysinový agar je pro využití v pivovarské kontrole nevyhovující právě pro svou selektivitu – nejdůležitější kvasinkovité kontaminanty (*Saccharomyces*) nejsou detekovány (Campbell, 2003b).

Později byl lysinový agar modifikován přidáním dalších zdrojů dusíku (Martin a Siebert, 1992). Nové médium nazvané CLEN obsahovalo, kromě L-lysinu, jako zdroje dusíku kadaverin, ethylamin a nitrát (CLEN=cadaverin, lysine, ethylamine, nitrate). CLEN agar umožňuje detekci širšího spektra cizích kvasinek. V tomto smyslu může být lysi-

“*S. diastaticus*” (now classified as *S. cerevisiae*) ferments dextrins, giving rise to super-attenuated beers (Jespersen a Jakobsen, 1996; Vaughan et al., 2005). *Saccharomyces* wild yeasts are closely related to the culture yeasts and their biochemical and physiological similarities are the cause of problematic differentiation. “Typical” brewery wild yeasts, formerly classified as *S. logos*, *S. uvarum*, *S. pastorianus*, *S. diastaticus*, *S. willianus*, *S. ellipsoideus*, *S. turbidans*, now belong to the species *S. cerevisiae* (Kreger van Rijn, 1984; Matoulková a Šavel, 2007).

The non-*Saccharomyces* wild yeast group is heterogeneous – it contains yeasts of genera *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* and others. Genera *Candida* and *Pichia* are most common in brewery plants (van der Aa Kühle a Jespersen, 1998). In terms of beer-spoiling ability they are considered as less risky than *Saccharomyces* wild yeast, particularly for their restricted ability to grow and multiply under anaerobic conditions and also to ferment sugars (Boulton a Quain, 2001). Wild strains capable of good anaerobic growth in a pure culture were not able to compete with brewer's yeast under anaerobic conditions simulating a brewery fermentation (Campbell a Msongo, 1991). Non-*Saccharomyces* wild yeasts, if not eliminated by pasteurization or sterile filtration, may survive in beer without its spoilage. Their presence in beer revealed during the routine microbiological control indicates a low hygienic standard of the brewery (Boulton a Quain, 2001).

Wild yeasts are detected by several cultivation methods that are based on one of the two basic principles:

1. some of the media components or growth conditions inhibit the growth of culture brewer's yeasts while the growth of wild yeasts is not affected (Lin's medium, agar with actidione, medium with  $\text{CuSO}_4$  and growth at 37 °C), or
2. the medium contains essential components that cannot be used by culture brewer's yeast while wild yeast can grow. This group includes lysine agar containing one sole source of nitrogen, and XMACS medium containing selective carbon sources.

Wort agar containing crystal violet was the first medium for detection of wild yeasts (Kato, 1967). Crystal violet inhibits culture yeast and permits the growth of some wild yeasts, e.g. “*S. diastaticus*”, *S. cerevisiae* and some species of the genera *Pichia*, *Debaryomyces*, *Candida* and *Kloeckera* (Šavel, 1980). However, the medium does not have an universal use – a wide range of sensitivities to crystal violet has been observed among *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeasts (Haikara a Enari, 1975).

The use of Schwarz Differential Medium (SDM) containing fuchsin for inhibition of culture yeasts proposed by Brenner et al. (1970) also does not allow for optimal results. Several culture yeasts, including both *S. pastorianus* and *S. cerevisiae*, are capable of growth on SDM in the form of colonies that are difficult to distinguish from the *Saccharomyces* wild yeast colonies (Lin, 1973).

Lin's medium, also called LWYM (Lin's wild yeast medium), is a combination of wort agar with crystal violet and SDM. It contains crystal violet and a fuchsin-sulphite mixture as selective compounds (Lin, 1974). When using this medium it is recommended to test the growth of culture yeast strain in order to set the optimum concentration of crystal violet. LWYN is suitable for detection of both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast. Modification of LWYN by enrichment with ergosterol, Tween 80 and ethanol allows the identification of *Saccharomyces* wild yeasts (Longley et al., 1980).

Lysine agar is a synthetic medium containing glucose, mineral salts, vitamins and the amino acid L-lysine as the sole source of nitrogen. Brewer's yeast (ale and lager) and most of the yeast belonging to the genus *Saccharomyces* are not able to utilize the  $-\text{NH}_2$  group of lysine as a sole nitrogen source (Walters a Thiselton, 1953). Only non-*Saccharomyces* wild yeasts can form colonies of a normal size. Lysine agar has two main disadvantages: 1) it is not completely selective – growth of *Saccharomyces* is not entirely inhibited, since cells inoculated from the sample are not completely starved and they carry some nutrients (including nitrogen source) inside and on the cell surface, so they can grow in the form of visible colonies; 2) lysine agar is insufficient in brewery control because of its low selectivity – the most important yeast contaminants (*Saccharomyces*) are not detected (Campbell, 2003b).

Lysine agar modified by an addition of other sources of nitrogen, CLEN (= cadaverin, lysine, ethylamine, nitrate) was proposed by Martin and Siebert (1992). CLEN allows for detection of a broad spectrum of wild yeasts. In this sense lysine agar may be fully re-

Tab. 1 Kmeny kulturních kvasinek / Culture yeast strains

Kvasinky / Yeast	Kmen / Strain*	Popis kmene / Strain characterization
<i>Saccharomyces bayanus</i>	DSM 70412 <sup>T</sup>	typový kmen / type strain
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449 <sup>T</sup>	typový kmen / type strain
<i>S. cerevisiae</i>	RIBM 139	kmen svrchního kvašení / top fermenting strain
<i>S. cerevisiae</i>	RIBM 140	kmen svrchního kvašení / top fermenting strain
<i>S. cerevisiae</i>	RIBM 154	kmen svrchního kvašení / top fermenting strain
<i>S. cerevisiae</i>	RIBM V7	vinařský kmen / winery yeast strain
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DSM 6580 <sup>T</sup>	typový kmen / type strain
<i>S. pastorianus</i>	RIBM 2	kmen spodního kvašení / bottom fermenting strain
<i>S. pastorianus</i>	RIBM 6	kmen spodního kvašení / bottom fermenting strain
<i>S. pastorianus</i>	RIBM 95	kmen spodního kvašení / bottom fermenting strain

\* Čísla kmenů: Sběrka RIBM – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, Česká republika; Sběrka DSMZ – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur, Braunschweig, Německo / Strain numbers: RIBM Collection – Research Institute of Brewing and Malting, Prague, Czech Republic; DSMZ collection – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

nový agar plně nahrazen CLEN agarem – kvasinka, která vyrostle na lysinové půdě, vyrostle také na CLEN agaru (Martin a Siebert, 1992).

Půda XMACS je založená na neschopnosti kulturních kvasinek využívat xylosu, manitol, adonitol, celobiosu a sorbitol jako zdroje uhlíku (De Angelo a Siebert, 1987). Půda XMACS umožňuje detekci podobného spektra divokých kvasinek jako lysinový agar, a zároveň i některých kvasinek *S. cerevisiae* včetně původně označovaného druhu „*S. diastaticus*“. Univerzální využití půdy XMACS je však sporné – vyjimečně mohou i kulturní kvasinky využívat některé z použitých zdrojů uhlíku a v takovém případě je nutná změna receptury (De Angelo a Siebert, 1987). Úpravy médií a testování jejich specifčnosti v provozní pivovarské laboratoři jsou poměrně nereálné.

Antibiotikum aktidion je běžně používáno pro potlačení růstu kvasinek a plísní při stanovení přítomnosti bakterií mléčného kvašení ve vzorku (Šavel, 1980). Při použití koncentrace aktidionu 10 mg/ml je růst kulturních kvasinek stále inhibován, ale některé rezistentní divoké kvasinky mohou na půdě růst (Campbell, 2003b; Harris a Watson, 1968). Tato metoda umožňuje stanovení některých divokých kvasinek, např. kvasinky *Hanseniaspora uvarum* (dříve „*Kloeckera apiculata*“), *S. globosus* a kvasinek rodu *Dekkera* a *Brettanomyces* (Ingledew a Casey, 1982).

Sladinový nebo mladínový agar s kyselinou monoiodoctovou podle Šilhánkové (1962) je vhodný pro detekci divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces*. Kyselina monoiodoctová navíc potlačuje růst většiny bakterií (Šavel, 1980).

Další půdou pro detekci divokých kvasinek je sladinový agar (případně MYGP, YPD) s přidavkem síranu měďnatého. Původně používaná koncentrace  $\text{CuSO}_4$  0,55 g/l umožňovala růst pouze kvasinek skupiny non-*Saccharomyces* (Lin, 1981). Snížením koncentrace  $\text{CuSO}_4$  na 0,2 g/l bylo možné detekovat i některé divoké kvasinky rodu *Saccharomyces* (Taylor a Marsh, 1984). Při použití syntetické půdy bez aminokyselin jako základu média obsahujícího  $\text{CuSO}_4$  v množství 0,05 g/l je možné inhibovat kulturní pivovarské kvasinky (Anonymous, 1992; Bendiak, 1991).

Půda WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient) je, podobně jako sladinový a mladínový agar, vhodná pro kultivaci kvasinek i bakterií. Přidavkem vhodného antibiotika se půda stává selektivní. WLN obsahuje bromkresolovou zeleň jako indikátor pH. Kolonie různých kvasinek se liší nejenom svým tvarem a velikostí, ale také ve změnách pH a v zadržování barvičky. Zbarvení kolonií je proto velmi rozmanité – od bílé, krémové, žluté, namodralé po různé odstíny zelené barvy (Jespersen a Jakobsen, 1996). Kvasinky svrchního kvašení *S. cerevisiae* neredukují bromkresolovou zeleň a vytváří tak tmavě zelené kolonie, zatímco spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus* a divoké kvasinky rostou na WLN agaru ve formě světle zelených, namodralých nebo bílých kolonií (Hall, 1970; Hall, 1971). Zbarvení kolonií spodních pivovarských kvasinek je velmi často podobné zbarvení kolonií divokých kvasinek rodu *Saccharomyces* (Ingledew a Casey, 1982). Využití půdy pro detekci divokých kvasinek pouze na základě zbarvení kolonií je v pivovarech využívajících kvasinky spodního kvašení tedy značně omezeno.

Kvasinky produkující kyseliny („*Kloeckera apiculata*“, *S. globosus*, *Brettanomyces*, *Dekkera*) mohou být detekovány pomocí tzv. křídového agaru, půdy s  $\text{CaCO}_3$ . Ve vodě nerozpustný uhlíkatý vápenatý vytváří v agaru mléčný zákal. Okolo kolonií produkujících např. kyselinu octovou se vytváří „vyčrešené zóny“ způsobené vznikem octanu vápenatého, který je ve vodě rozpustný (Campbell, 2003b; Ingledew a Casey, 1982). Komerčně křídový agar dodává např. Sigma-Aldrich

placed by CLEN – wild yeast that can grow on lysine agar can also grow on CLEN agar (Martin and Siebert, 1992).

Medium XMACS is based on the inability of culture brewer's yeast to utilize xylose, mannitol, adonitol, cellobiose and sorbitol as carbon sources (De Angelo and Siebert, 1987). The medium allows for detection of a similar spectrum of wild yeasts as lysine agar, along with some *S. cerevisiae* including „*S. diastaticus*“. However, some brewer's yeast strains may exert an ability to assimilate some of the sugars included in the medium and in such case the medium must be re-formulated (Jespersen and Jakobsen, 1996). Adjustments of media composition and their testing in brewery plant laboratory are not a standard practice.

The antibiotic actidione is currently used to suppress the growth of yeast and molds in media for detection of lactic acid bacteria (Šavel, 1980). The growth of culture yeasts is inhibited at actidione concentration as low as 10 mg/ml but some of the resistant wild yeasts can still grow (Campbell, 2003b; Harris and Watson, 1968). The method is suitable for detection of some wild yeasts, e.g. *Hanseniaspora uvarum* (formerly „*Kloeckera apiculata*“), *S. globosus* and genera *Dekkera* and *Brettanomyces* (Ingledew and Casey, 1982).

Wort or hopped-wort agar with monoiodoacetic acid according to Šilhánková (1962) is suitable for detection of non-*Saccharomyces* wild yeast. Furthermore, monoiodoacetic acid suppresses the growth of most bacteria (Šavel, 1980).

Wort agar (or MYGP, YPD) containing copper sulphate is also used for wild yeast assessment. Formerly used concentration of  $\text{CuSO}_4$  (0.55 g/l) allowed for the growth of non-*Saccharomyces* wild yeasts (Lin, 1981). Lowering the concentration to 0.2 g/l enables detection of some *Saccharomyces* wild yeasts (Taylor and Marsh, 1984). The use of synthetic media without amino acids as a base media containing  $\text{CuSO}_4$  (0.05 g/l) inhibits the growth of culture brewer's yeast (Anonymous, 1992; Bendiak, 1991).

WLN agar (Wallerstein Laboratories Nutrient) is, beside wort and hopped-wort agar, suitable for cultivation of both yeasts and bacteria. On adding a suitable antibiotic the media become selective. WLN agar contains bromocresol green as an indicator of pH changes. Colonies of different yeasts vary not only in their shape and size but also in the pH profile and the ability to retain the dye. Colonies thus can have diverse colors – from white, creamy, yellow, bluish to various shades of green (Jespersen and Jakobsen, 1996). Ale yeast *S. cerevisiae* do not reduce bromocresol green and form dark green colonies while lager yeast *S. pastorianus* and wild yeasts grow on WLN agar in the form of pale green, bluish or white colonies (Hall, 1970; Hall, 1971). Colony coloration of bottom brewer's yeasts is often similar to *Saccharomyces* wild yeast (Ingledew and Casey, 1982). Thus the use of the WLN agar based only on the color of colonies is considerably limited in the breweries that use bottom brewer's yeasts.

Acid-producing yeasts („*Kloeckera apiculata*“, *S. globosus*, *Brettanomyces*, *Dekkera*) may be detected using so-called „chalk agar“ containing  $\text{CaCO}_3$ . The water insoluble calcium carbonate produces in agar milky haze. Colonies producing for instance acetic acid are surrounded by clear zones caused by the formation of water-soluble calcium acetate (Campbell, 2003b; Ingledew and Casey, 1982). Chalk agar can be purchased e.g. from Sigma-Aldrich (Custer's Chalk Medium). The shortcomings of this medium are a narrow range of use and a long time period (up to 14 days) needed for the zones to appear.

(Custer's Chalk Medium). Nevýhodou této půdy je úzké zaměření a dlouhá inkubační doba nutná k vytvoření zón (až 14 dní).

Svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* a divoké kvasinky mají vyšší maximální růstovou teplotu (až 39,8 °C) nežli spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus* (max. 34 °C) (Lawrence, 1983; Walsh a Martin, 1977). Metodu lze použít pro odlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek (Anonymous, 1994) a pro detekci divokých kvasinek v pivovarech využívajících kvasinky spodního kvašení. Inkubace na sladinném agaru s pH 4,5 při teplotě 37 °C je doporučována pro detekci amylolytických kvasinek („*S. diastaticus*“) ve spodních kvasnicích (Röcken a Schulte, 1986).

Další metodou průkazu divokých kvasinek je sporulační zkouška založená na schopnosti divokých kvasinek vytvářet spory. Kulturní kvasinky jsou hybridní organismy, nevytváří spory nebo sporulují jen výjimečně (Anonymous, 1985; Polaina, 2002). Hlavními nevýhodami sporulační zkoušky je časová náročnost a fakt, že některé divoké kvasinky sporulují obtížně nebo vůbec (Šavel, 1980).

Spektrum různých půd určených pro detekci divokých kvasinek zahrnuje také některé půdy, jejichž použití bylo sice publikováno, nicméně z různých důvodů nebyly tyto půdy rozšířeny a rutinně využívány. Jedná se např. o půdu s kyselinou skořicovou podle Hopea (1987). Kvasinky POF<sup>+</sup> rostou na půdě s kyselinou skořicovou, zatímco růst kontrolního svrchního kmene *S. cerevisiae* je inhibován. Nevýhodou této půdy je dlouhá inkubační doba potřebná pro detekci divokých kvasinek, která se pohybuje v rozmezí 3–12 dnů (Hope, 1987). Svrchní pivovarské kvasinky vyžadují pro svůj růst pantotenát – kultivační médium bez pantotenátu bylo použito pro detekci divokých kvasinek *Saccharomyces* i non-*Saccharomyces* a spodních pivovarských kvasinek jako kontaminant pivovaru s produkcí svrchně kvašených pív (Röcken, 1983). Záměnu kulturního kmene lze považovat za kontaminaci. Podle Fernandez et al. (1989) lze i blízké příbuzné kmeny spodních pivovarských kvasinek odlišit pomocí kombinace různých kultivačních médií – Linovo médium s různými koncentracemi CuSO<sub>4</sub>, UBA (Universal Beer Agar; univerzální pивní agar) s bromokresolovou zelení a glukosový agar s fuchsinem, streptomycinem S a aktidionem.

Kvasinky *S. cerevisiae* schopné štěpit dextriny (dříve označované „*S. diastaticus*“) mohou být detekovány na půdách obsahujících dextriny jako jediný zdroj uhlíku. V médiu podle Nakagawy je přítomnost „*S. diastaticus*“ indikována barevnou reakcí fuchsinu, při kultivaci na půdě podle Takahashiho „*S. diastaticus*“ roste ve formě světlých kolonií na tmavém pozadí (Ingledew a Casey, 1982). Mnohem průkaznější je použití YNB bujónu (YNB = Yeast Nitrogen Base) jako základní půdy s přidávkou dextrinů v množství 0,5 %. Na půdě narostou pouze kvasinky s amylolytickou aktivitou. Alternativou je ME agar (ME = Malt Extract; sladový extrakt) s 0,5 % dextriny. ME agar obsahuje běžné zdroje uhlíku, proto je pro detekci amylolytických kvasinek nutné narostlé kolonie přelít jodovým roztokem – okolo amylolytických kolonií se vytvoří zóny hydrolysy dextrinů (Campbell, 2003b). Mnohem rychlejší alternativou je použití PCR s primery komplementárními k sekvencím kódujícím extracelulární glukamylasu „*S. diastaticus*“ (Yamauchi et al., 1998). Extracelulární glukamylasová aktivita kvasinek může být stanovena metodou podle Jespersena et al. (2000).

Specifickou skupinou divokých kvasinek jsou tzv. „killer“ kvasinky produkující toxiny zymociny, kterými jsou usmrcovány citlivé kvasinky patřící ke stejnému druhu. Tzv. killer kvasinky jsou popisovány jako mnohem škodlivější nežli běžné divoké kvasinky, neboť mimo kompetici s kulturními kvasinkami o sacharidy v mladině aktivně zabíjejí původní kulturní kmen (Hammond a Eckersley, 1984). Produkce toxinů byla prokázána u kvasinek rodů *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* a dalších (Magliani et al., 1997). Výskyt tzv. killer kmenů v souvislosti s pivovarskými kvasinkami je poměrně vzácný (Boulton a Quain, 2001). V extrémním případě může dojít k poklesu viability kulturního kmene vlivem produkce toxinů killer kmenem z 95 % až na méně než 20 % (Maule a Thomas, 1973).

Nežádoucí jsou u kvasinek tzv. respiračně-deficientní mutanty (RD-mutanty), k jejichž vzniku dochází při ztrátě, změnách nebo (zejména v případě spodních pivovarských kvasinek) rozsáhlých deletcích mitochondriální DNA. Tyto mutace mohou vznikat spontánně, při opakovaném nasazení kvasinek nebo mohou být vyvolány např. působením ethidium bromidu (Boulton a Quain, 2001). RD mutanty rostou pomaleji než původní kmen a také jejich kolonie jsou menší. Přítomnost RD mutantů v populaci pivovarských kvasinek se může projevit např. nedostatečným prokvašením mladiny, změnami flokulačních vlastností, zvýšenou produkcí alkoholu atd. (Hammond, 2003; Šilhánková et al., 1970 a,b). Pro průkaz RD mutantů v populaci kvasinek se nejčastěji používá přelivová metoda s TTC (tetrasolium trifenylyl chlorid) – mutanty nemetabolizují TTC a jejich kolonie

Top brewer's yeast *S. cerevisiae* and wild yeast have a higher maximum growth temperature (up to 39.8 °C) than bottom brewer's yeast *S. pastorianus* (max. 34 °C) (Lawrence, 1983; Walsh and Martin, 1977). This difference can be used for distinguishing top and bottom brewer's yeast (Anonymous, 1994) and for detection of wild yeast in breweries using bottom yeast. Incubation on wort agar of pH 4.5 at 37 °C is recommended for the detection of amylolytic yeast („*S. diastaticus*“) in bottom-fermenting yeast (Röcken and Schulte, 1986).

Another method of detection of wild yeast is the sporulation test based on the ability of wild yeast to produce spores. Culture yeasts are hybrid organisms which produce spores very rarely or not at all (Anonymous, 1985; Polaina, 2002). The main shortcoming of the sporulation test is the long time required for its performance and the fact that even some wild yeasts sporulate only poorly or not at all (Šavel, 1980).

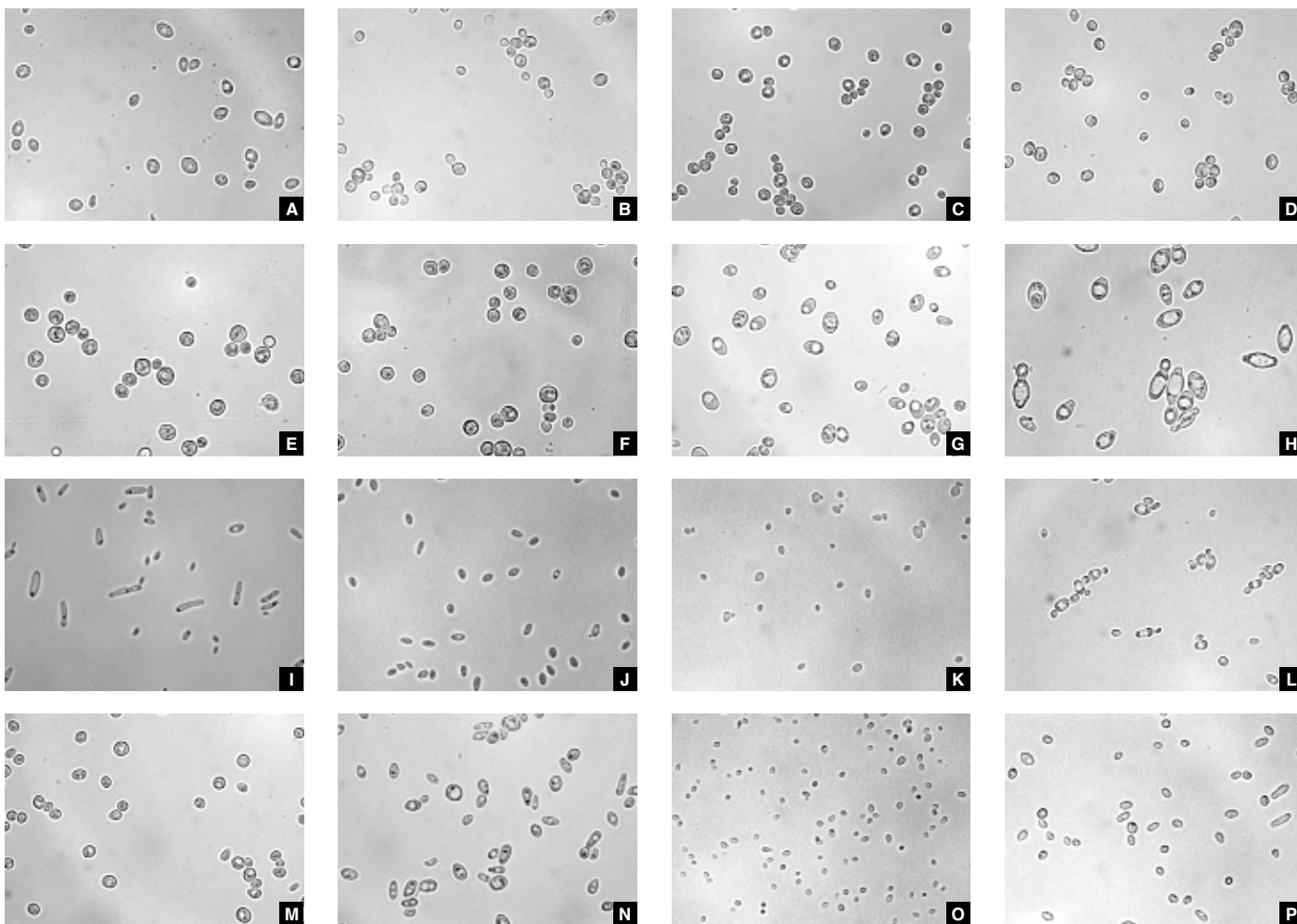
The spectrum of different media used for detection of wild yeasts includes some media that have been published but are for some reason less widely known or rarely used routinely, such as, e.g., the medium with cinnamic acid according to Hope (1987). POF<sup>+</sup> yeast can grow on media containing cinnamic acid while the growth of ale yeast *S. cerevisiae* is inhibited. The disadvantage of this medium is the long cultivation period (3 – 12 days) necessary for detection of wild yeasts (Hope, 1987). Since top brewer's yeast requires for growth pantothenate, a cultivation medium without pantothenate was used for detection of both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast and bottom brewer's yeast as contaminants in a brewery producing top-fermented beers (Röcken, 1983). A substitution of a culture yeast strain can be taken as contamination. According to Fernandez et al. (1989) even closely related strains of bottom brewer's yeast can be distinguished by using a combination of different cultivation media – Lin's medium with different concentrations of CuSO<sub>4</sub>, UBA (Universal Beer Agar) with bromocresol green and glucose agar with fuchsin, streptomycin S and actidione.

The yeast *S. cerevisiae* that is able to ferment dextrins (formerly called „*S. diastaticus*“) can be detected in media containing dextrins as the sole source of carbon. In Nakagawa medium the presence of „*S. diastaticus*“ is indicated by the color reaction of fuchsin, cultivation on Takahashi medium gives light colored colonies on dark background (Ingledew and Casey, 1982). Much more conclusive results can be obtained with the YNB broth (YNB = Yeast Nitrogen Base) as a basic medium with an addition of 0.5 % dextrins. Only amylolytic yeast grows on this medium. An alternative is ME agar (ME = Malt Extract) with 0.5 % dextrins. ME agar contains common carbon sources and it is thus necessary to overlay the produced colonies with iodine solution for the detection of amylolytic yeast. Amylolytic colonies are then surrounded by zones of dextrin hydrolysis (Campbell, 2003b). A much faster alternative is the use of PCR with primers complementary to the sequences coding for extracellular glucanase of „*S. diastaticus*“ (Yamauchi et al., 1998). The extracellular glucanase activity of yeast can be determined by the method according to Jespersen et al. (2000).

A specific group of wild yeasts is represented by the so-called „killer“ yeasts that produce the toxins zymocines, which kill sensitive yeast of the same genus. Killer yeasts are taken to be much more deleterious than common wild yeast since, in addition to competing with culture yeast for saccharides in the wort, they actively kill off the original yeast strain (Hammond and Eckersley, 1984). Production of toxins has been demonstrated in yeast of genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* and others (Magliani et al., 1997). The occurrence of killer strains in relation to brewer's yeast is relatively rare (Boulton and Quain, 2001). In an extreme case the viability of a culture strain due to the production of toxins by a killer strain can drop from 95% to less than 20% (Maule and Thomas, 1973).

An undesirable yeast kind is represented by the so-called respiration-deficient mutants (RD-mutants), which arise as a result of a loss, changes or (especially in the case of bottom brewer's yeast) extensive deletions of mitochondrial DNA. These mutations can arise spontaneously, during repeated pitching or can be induced by the action of, e.g., ethidium bromide (Boulton and Quain, 2001). RD mutants grow more slowly than the parent strain and their colonies are smaller. The presence of RD mutants in a population of brewer's yeast can have consequences such as insufficient wort attenuation, altered flocculation properties, increased production of alcohol, etc. (Hammond, 2003; Šilhánková et al., 1970 a,b). The presence of RD mutants in yeast population is most often demonstrated by the overlay method with TTC (triphenyl-tetrazolium chloride). The mutants do not metabolize TTC and their colonies are white whereas





Obr. 1 Morfologie buněk kvasinek / Fig. 1 Yeast cell morphology

A – *S. bayanus* DSM 70412<sup>1</sup>; B – *S. cerevisiae* DSM 70449<sup>1</sup>; C – *S. cerevisiae* RIBM 139; D – *S. cerevisiae* RIBM 154; E – *S. pastorianus* RIBM 2; F – *S. pastorianus* RIBM 6; G – *S. pastorianus* RIBM 95; H – *H. uvarum* RIBM Spk 91; I – *P. anomala* RIBM C5; J – *P. membranifaciens* RIBM Spk 25; K – *P. guilliermondii* CCM 8321; L – „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4; M – *S. cerevisiae* RIBM Spk 2; N – *S. cerevisiae* RIBM Spk 79; O – *T. delbrueckii* RIBM T2; P – *Z. rouxii* CCM 8224

se zbarví bíle, zatímco „zdravé“ kvasinky redukují TTC na formasan a jejich kolonie se zbarví červeně (Boulton a Quain, 2001). Dříve se pro průkaz RD mutant používala půda WLN (Kot a Helbert, 1977).

V této práci používáme termín „divoké kvasinky“ pro kvasinky jiné nežli kulturní. Nebudeme se zabývat ani detekcí respiračně-deficientních mutantů. Zároveň ale zdůrazňujeme, že záměna kulturního kmene, zejména v provozech, kde jsou používány současně spodní a svrchní pivovarské kvasinky, může být pro výsledný produkt stejně fatální, jako náhodná kontaminace divokými kvasinkami. Cílem naší práce byl literární přehled problematiky stanovení divokých kvasinek a v experimentální části pak zejména fotodokumentace kolonií narostlých na různých dostupných půdách. Naším zájmem byla prezentace různých metod stanovení divokých kvasinek s přihlédnutím na jejich reálnou využitelnost v provozní pivovarské laboratoři.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Složení a příprava kultivačních médií

Jako základní médium pro kultivaci kvasinek (a zároveň jako kontrolní médium pro porovnání růstu kvasinek na různých půdách) byl zvolen sladinový agar, který lze připravit z provozní sladiny nebo z dehydratované půdy dodávané komerčně (např. od firmy Merck nebo Oxoid).

#### Složení kultivačních půd:

- Sladinový agar (SA):** 8% (w/w) sterilní provozní sladina, 20 g/l bakteriologického agaru (Oxoid). Sladinový agar se připraví rozpouštěním agaru ve zfiltrované sladině (rozvařením ve vodní lázni) a sterilizací v proudící páře. Hotová půda má hnědou barvu.
- Wallerstein Laboratory nutrient agar (WLN),** byl připraven z komerčně dostupné dehydratované půdy dle návodu výrobce (Oxoid): rozpouštěním 75 g dehydratované půdy v 1000 ml desti-

lated cells reduce TTC formasan and their colonies assume a red color (Boulton and Quain, 2001). The proof of RD mutants was formerly performed by using WLN medium (Kot and Helbert, 1977).

In this study we use the term “wild yeast” for yeasts other than culture ones and we shall not discuss the detection of respiration-deficient mutants. However, we have to emphasize that a substitution of a culture strain, especially in breweries using top and bottom fermenting yeast at the same time, can have an equally fatal effect on the final product as an accidental contamination with wild yeast. We focused on a literature survey of the field of detection of wild yeasts and, in the experimental part, on the photographic documentation of colonies growing on available media. In the center of our interest was the presentation of different methods for determination of wild yeasts in terms of their practical usefulness in a brewery laboratory.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Composition and preparation of culture media

Wort agar, which can be prepared from brewery wort or is available commercially (e.g. by Merck Ltd. or Oxoid Ltd.), was used as a basic and also control medium (for comparison of yeast growth on various media).

#### Culture media:

- Wort agar (SA):** 8% (w/w) sterile brewery wort, 20 g/l of bacteriological agar (Oxoid). Wort agar is prepared by suspending agar in filtered wort (by boiling in water bath until complete dissolution) and sterilization in a steam current. The color of prepared medium is brown.
- Wallerstein Laboratory nutrient agar (WLN)** is prepared from the dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by suspending of 75 g dehydrated media in 1000 ml

lované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má zelenou barvu.

- c) **Mladinový agar s kyselinou monoiodoctovou (KJO):** 10% (w/w) sterilní provozní mladina, 20 g/l bakteriologického agaru (Oxoid) a 0,186 g/l kyseliny monoiodoctové (Sigma-Aldrich). Mladinový agar se připraví rozpuštěním bakteriologického agaru ve zfiltrované mladině a sterilizací v proudící páře. Do 1 litru hotové půdy, ochlazené na přibližně 45 °C je před jejím nalitím na misky přidána kyselina monoiodoctová ve formě asepticky připraveného roztoku (0,186 g kyseliny monoiodoctové v 10 ml destilované vody). Hotová půda má hnědou barvu.
- d) **Lysinový agar (LYS)** byl připraven z komerčně dodávané dehydratované půdy, dle návodu výrobce (Oxoid): rozpuštěním 66 g dehydratované půdy v 1000 ml destilované vody, přidavkem 10 ml 50% laktátu draselného (Oxoid) a povařením ve vodní lázni; pH hotové půdy 4,8. Hotová půda má mléčně bílé zbarvení.
- e) **Mladinový agar s krystalovou violetí (KV):** 10% (w/w) sterilní provozní mladina, 20 g/l bakteriologického agaru (Oxoid) a 0,02 g/l krystalové violeti (Riedel-de Haën). Půda se připraví rozpuštěním agaru ve zfiltrované mladině a sterilizací v proudící páře. Do 1 litru hotové půdy, ochlazené na přibližně 45 °C je před jejím nalitím na misky přidána krystalová violet ve formě asepticky připraveného roztoku (0,02 g krystalové violeti v 10 ml destilované vody). Hotová půda má fialovou barvu.
- f) **Mladinový agar se síranem měďnatým (CuA):** 10% (w/w) sterilní provozní mladina, 20 g/l bakteriologického agaru (Oxoid) a 0,312 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Lachema) (navážka odpovídá koncentraci 0,2 g/l  $\text{CuSO}_4$ ). Půda se připraví rozpuštěním agaru ve zfiltrované mladině a sterilizací v proudící páře. Do 1 litru hotové půdy, ochlazené na přibližně 45 °C je před jejím nalitím na misky přidán  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ve formě asepticky připraveného roztoku (0,312 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  v 10 ml destilované vody). Hotová půda má světle hnědou nebo žlutohnědou barvu.
- g) **MYGP agar (MYGP):** 3 g/l sladidového extraktu (Oxoid), 3 g/l kvasničného extraktu (Oxoid), 10 g/l glukosy (Sigma-Aldrich), 5 g/l bakteriologického peptonu (Oxoid), 20 g/l bakteriologického agaru (Oxoid). Půda se připraví rozpuštěním všech složek v 1000 ml destilované vody a sterilizací 20 minut při 121 °C. Hotová půda má světle hnědou barvu.
- h) **MYGP agar s aktidionem (ACT):** složení a příprava základní půdy viz bod g), aktidion v koncentraci 10 mg/l. Do 1 litru hotové půdy, ochlazené na přibližně 45 °C je před jejím nalitím na misky přidán aktidion ve formě asepticky připraveného roztoku (10 mg aktidionu v 10 ml destilované vody).

## 2.2 Mikroorganismy a růstové podmínky

Kmeny kvasinek, které byly použity v této práci, pocházejí ze Sbírky pivovarských mikroorganismů RIBM VÚPS, a.s., sbírky DSMZ v Braunschweigu (Německo) a České sbírky mikroorganismů CCM v Brně. Seznam kulturních kmenů kvasinek, jejich označení a bližší specifikace je uveden v tab.1. Jako zástupci divokých kvasinek byly použity kmeny *Hanseniaspora uvarum* RIBM Spk 91, *Pichia anomala* RIBM C5, *P. membranifaciens* RIBM Spk 25, *P. guilliermondii* CCM 8321, „*Saccharomyces diastaticus*“ RIBM Spk 4, *S. cerevisiae* RIBM Spk 2, *S. cerevisiae* RIBM Spk 79, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2 a *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8224.

Před vyočkováním na testované půdy byly kvasinky inkubovány na sladidovém agaru při teplotě 26 °C po dobu 48 hodin. Suspense kvasinek byla následně připravena rozmícháním 1 kolonie ve sterilním fyziologickém roztoku, s výslednou koncentrací buněk přibližně 5 mil/ml. Pomocí desítkového ředění byly suspenze naředěny tak, aby na Petriho miskách s testovanými půdami narostlo 10–50 kolonií. Po 96 hodinách inkubace při teplotě 26 °C byl vyhodnocen a zdokumentován nárůst kultur.

Pro rozdělení kvasinek na základě maximální růstové teploty byly kmeny inkubovány na MYGP agaru při teplotě 37 °C po dobu 96 hodin.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Morfologie kvasničných buněk na MYGP agaru po 96 hodinách inkubace při teplotě 26 °C je dokumentována na obr. 1. Divoké kvasinky mohou mít různý tvar a velikost buněk – od velmi drobných buněk *Torulaspora delbrueckii* (obr. 1O) přes citronovitý tvar *Hanseniaspora uvarum* (dříve *Kloeckera apiculata*) (obr. 1H), protáhlé buňky *Pichia anomala* (obr. 1I) a pravidelný oválný tvar *S. cerevisiae* (např. kmen Spk 2 na obr. 1M) podobný kulturním kvasinkám. Morfologie buněk

distilled water and sterilization by autoclaving at 121 °C for 20 minutes. The color of prepared medium is green.

- c) **Hopped-wort agar with monoiodacetic acid (KIO):** 10% (w/w) sterile brewery hopped wort, 20 g/l of bacteriological agar (Oxoid) and 0.186 g/l of monoiodacetic acid (Sigma-Aldrich). Medium is prepared by suspending agar in filtered hopped wort and steam sterilization. Monoiodacetic acid is added (in the form of aseptically prepared solution of 0.186 g of monoiodacetic acid in 10 ml of distilled water) into 1 liter of prepared medium cooled to approximately 45 °C prior to its dispensing in Petri dishes. The color of prepared medium is brown.
- d) **Lysine agar (LYS)** is prepared from the dehydrated medium according to the manufacturer's instructions (Oxoid) by suspending 66 g dehydrated media in 1000 ml distilled water, adding 10 ml of 50% potassium lactate (Oxoid) and boiling in water bath. The pH of prepared medium should be adjusted to 4.8. The color is milky white.
- e) **Hopped-wort agar with crystal violet (CV):** 10% (w/w) sterile brewery hopped wort, 20 g/l of bacteriological agar (Oxoid) and 0.02 g/l of crystal violet (Riedel-de Haën). Medium is prepared by suspending agar in filtered hopped wort and steam sterilization. Crystal violet is added (in the form of aseptically prepared solution of 0.02 g of crystal violet in 10 ml of distilled water) into 1 liter of prepared medium cooled to approximately 45 °C prior to its dispensing in Petri dishes. The color of prepared medium is purple.
- f) **Hopped-wort agar with copper sulphate (CuA):** 10% (w/w) sterile brewery hopped wort, 20 g/l of bacteriological agar (Oxoid) and 0.312 g/l of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Lachema) – the amount corresponds to the final concentration of  $\text{CuSO}_4$  0.2 g/l. Medium is prepared by suspending agar in filtered hopped wort and steam sterilization.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  is added (in the form of aseptically prepared solution of 0.312 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in 10 ml of distilled water) into 1 liter of prepared medium cooled to approximately 45 °C prior to its dispensing in Petri dishes. The color of prepared medium is light brown to buff.
- g) **MYGP agar (MYGP):** 3 g/l of malt extract (Oxoid), 3 g/l of yeast extract (Oxoid), 10 g/l of glucose (Sigma-Aldrich), 5 g/l of bacteriological peptone (Oxoid), 20 g/l of bacteriological agar (Oxoid). Medium is prepared by suspending all ingredients in 1000 ml of distilled water and autoclaving at 121 °C for 20 minutes. The color of prepared medium is light brown.
- h) **MYGP agar with actidione (ACT):** composition and preparation as in point g), 10 mg/l of actidione. The drug is added (in the form of aseptically prepared solution of 0,01 g of actidione in 10 ml of distilled water) into 1 liter of prepared medium cooled to approximately 45 °C prior to its dispensing in Petri dishes.

## 2.2 Microorganisms and growth conditions

Yeast strains under study were purchased from the Culture Collection of Brewery Microorganisms RIBM in Prague, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ in Braunschweig (Germany) and Czech Collection of Microorganisms CCM in Brno. Culture yeast strains, strain numbers and characterization are listed in Tab. 1. Nine representative wild yeast strains were used: *Hanseniaspora uvarum* RIBM Spk 91, *Pichia anomala* RIBM C5, *P. membranifaciens* RIBM Spk 25, *P. guilliermondii* CCM 8321, „*Saccharomyces diastaticus*“ RIBM Spk 4, *S. cerevisiae* RIBM Spk 2, *S. cerevisiae* RIBM Spk 79, *Torulaspora delbrueckii* RIBM T2 a *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8224.

Prior to inoculation on tested media the yeasts were incubated on wort agar at 26 °C for 48 hrs. Yeast suspension was then prepared by stirring 1 colony in a sterile physiological saline to a final cell concentration of about  $5 \times 10^6$ /ml. Serial 10-fold dilutions were used to dilute the suspensions so that 10–50 colonies appeared on Petri dishes with the tested media. Culture growth was evaluated and documented after a 96-hr incubation at 26 °C.

To divide the yeasts according to the maximum growth temperature, the strains were incubated on MYGP agar at 37 °C for 96 hrs.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The morphology of yeast cells growing on MYGP agar after 96 hrs of incubation at 26 °C is documented in Fig. 1. Cells of wild yeasts can have different shape and size, from the very small cells of *Torulaspora delbrueckii* (Fig. 1O) to the lemon-like shape of *Hanseniaspora uvarum* (formerly *Kloeckera apiculata*) (Fig. 1H), elongated cells of *Pichia anomala* (Fig. 1I) to the regular oval shape of *S. cerevisiae* (e.g. strain Spk 2 in Fig. 1M) resembling culture yeast. However, cell morphology depends on the cultivation medium, culture age and cultivation con-

je však závislá na použitém kultivačním médiu, stáří kultury a podmínkách kultivace, a za určitých okolností (např. při nedostatku živin) lze i u kulturních kvasinek pozorovat protáhlý tvar buněk. Přítomnost dobře vyvinutého pseudomycelia je možno považovat za předběžný průkaz přítomnosti divokých kvasinek ve vzorku (Šavel, 1980).

Na obr. 2 jsou dokumentovány různé příklady vzhledu kvasničných kolonií na sladidlovém agaru. Pro *S. pastorianus* jsou typické hladké, krémově zbarvené kolonie pravidelného tvaru (obr. 2E,F), kulturní kvasinky *S. cerevisiae* RIBM 154 rostou ve formě bílých až krémových kolonií s mírně vystouplým středem (obr. 2C), povrch kolonií *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup> je více zvrásněný (obr. 2A) a kolonie kvasinky *P. anomala* RIBM C5 jsou ve srovnání s kvasinkami *Saccharomyces* mnohem menší a mají zvrásněný povrch s vystouplou špičkou kolonie (obr. 2H).

Půda WLN umožňuje růst všech testovaných kmenů kvasinek. Obsahuje bromkresolovou zeleň jako indikátor pH. Zbarvení kolonií je velmi rozmanité – od bílé, krémové, až po různé odstíny zelené barvy s různým zbarvením půdy okolo kolonií. Nejsytější zelené odstíny lze pozorovat u kolonií *S. cerevisiae* DSM 70449<sup>T</sup> (obr. 3B) a *S. pastorianus* DSM 6580<sup>T</sup> (obr. 3G), světlejší pak u kolonií *S. cerevisiae* RIBM 139 (obr. 3C) a „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4 (obr. 3N). Světle zelené s tmavším zeleným středem byly pozorovány u *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup> (obr. 3A). Vinařské kmeny RIBM V7 a *H. uvarum* RIBM Spk 91 vytvářely na WLN agaru světle zelené kolonie (obr. 3 F a J). Zbývající kmeny rostly na WLN agaru ve formě bílých nebo krémově zbarvených kolonií – všechny spodní pivovarské kvasinky kromě výše uvedeného typového kmene, ze svrchních kvasinek kmeny RIBM 140 a 154, z kontaminujících kvasinek všechny tři kmeny kvasinky rodu *Pichia*, *S. cerevisiae* RIBM Spk 79, *T. delbrueckii* a *Z. rouxii*. Podle Halla (1970; 1971) neredukují kvasinky svrchního kvašení *S. cerevisiae* bromkresolovou zeleň a vytváří tak tmavě zelené kolonie, zatímco spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus* a divoké kvasinky rostou na WLN agaru ve formě světle zelených, namodralých nebo bílých kolonií. Naše výsledky jsou v rozporu s těmito údaji. Pokud by v jednom pivovaru byl používán spodní kmen *S. pastorianus* RIBM 95 (obr. 3I) a zároveň svrchní *S. cerevisiae* RIBM 140 (obr. 3D), bylo by jejich vzájemné odlišení pomocí WLN prakticky nemožné.

Mladinový agar s kyselinou monoiodoctovou (KJO) zcela inhibuje růst kvasinek rodu *Saccharomyces* – *S. pastorianus*, *S. cerevisiae*

and, in certain circumstances (e.g. nutrient shortage), culture yeast cells can also assume an elongated shape. As a tentative proof of the presence of wild yeast in the sample can be taken the presence of a well-developed pseudomycelium (Šavel, 1980).

Fig. 2 documents different appearances of yeast colonies on wort agar. Pro *S. pastorianus* shows typical smooth cream-colored colonies of regular shapes (Fig. 2E,F), culture yeast *S. cerevisiae* RIBM 154 grows in the form of white to creamy colonies with slightly protruding centers (Fig. 2C), the surface of the colonies of *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup> is more corrugated (Fig. 2A) and the colonies of the yeast *P. anomala* RIBM C5 are much smaller than those of *Saccharomyces* and have a corrugated surface with a raised tip (Fig. 2H).

The WLN medium supports the growth of all tested yeast strains. It contains bromocresol green as a pH indicator. The colorings of the colonies vary widely, from white or creamy to different shades of green, with different color shades of the medium around the colonies. The deepest green shades can be observed in colonies of *S. cerevisiae* DSM 70449<sup>T</sup> (Fig. 3B) and *S. pastorianus* DSM 6580<sup>T</sup> (Fig. 3G), lighter hues in colonies of *S. cerevisiae* RIBM 139 (Fig. 3C) and „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4 (Fig. 3N). Light green colonies with darker center were recorded in the type strain *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup> (Fig. 3A). The wine strain RIBM V7 and *H. uvarum* RIBM Spk 91 formed on WLN agar light green colonies (Fig. 3 F and J). The remaining strains grew on WLN agar in the form of white or creamy colonies. This included all bottom brewer's yeasts except for the above type strain and, among top brewer's yeast, strains RIBM 140 a 154. Among contaminating yeasts this colony appearance was found in all three strains of genus *Pichia*, in *S. cerevisiae* RIBM Spk 79, *T. delbrueckii* and *Z. rouxii*. According to Hall (1970; 1971) the top fermenting yeast *S. cerevisiae* does not reduce bromocresol green and forms dark green colonies whereas the bottom fermenting *S. pastorianus* and wild yeasts grow on WLN agar in the form of light green, bluish or white colonies. Our findings do not confirm these results. If the bottom fermenting *S. pastorianus* RIBM 95 (Fig. 3I) was used in a brewery at the same time as the top *S. cerevisiae* RIBM 140 (Fig. 3D), it would be practically impossible to distinguish the two strains by means of WLN.

Wort agar with monoiodacetic acid (KJO) completely inhibits the growth of *Saccharomyces* yeasts – *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* (including the „*S. diastaticus*“ strain RIBM Spk 4 and wild strains Spk 2

Tab. 2 Růst kvasinek na různých kultivačních půdách / Growth of yeast strains on various agar media

Kmen / Strain	WLN*	KJO	LYS	KV	CuA	ACT	37°C
<i>S. bayanus</i> DSM 70412 <sup>T</sup>	z	-	~	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> DSM 70449 <sup>T</sup>	z	-	~	-	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i> RIBM 139	z	-	~	+	+	-	+
<i>S. cerevisiae</i> RIBM 140	b	-	~	-	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i> RIBM 154	b	-	~	+	+	-	+
<i>S. cerevisiae</i> RIBM V7	z	-	~	+	+	-	+
<i>S. pastorianus</i> DSM 6580 <sup>T</sup>	z	-	~	-	-	-	-
<i>S. pastorianus</i> RIBM 2	b	-	~	-	-	-	-
<i>S. pastorianus</i> RIBM 6	b	-	~	-	-	-	-
<i>S. pastorianus</i> RIBM 95	b	-	~	-	-	-	-
<i>H. uvarum</i> RIBM Spk 91	z	+	~	-	+	-	+
<i>P. anomala</i> RIBM C5	b	+	+	-	+	-	+
<i>P. membranifaciens</i> RIBM Spk 25	b	+	+	-	+	-	-
<i>P. guilliermondii</i> CCM 8321	b	+	+	-	+	+	+
„ <i>S. diastaticus</i> “ RIBM Spk 4	z	-	~	+	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i> RIBM Spk 2	z	-	~	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> RIBM Spk 79	b	-	~	+	+	-	+
<i>T. delbrueckii</i> RIBM T2	b	-	~	+	+	-	+
<i>Z. rouxii</i> CCM 8224	b	+	+	-	+	+	+

\* WLN, Wallerstein Laboratory Nutrient agar; KJO, mladinový agar s kyselinou monoiodoctovou / wort agar with monoiodacetic acid; LYS, lysinový agar / Lysine agar; KV, agar s krystalovou violetí / agar with crystal violet; CuA, agar s CuSO<sub>4</sub> / agar with CuSO<sub>4</sub>; ACT, agar s aktidionem / actidione agar; 37 °C, kultivace při 37 °C / incubation at 37 °C;

+, velikost kolonií srovnatelná s kontrolou (sladidlový agar) / growth comparable to control (wort agar);

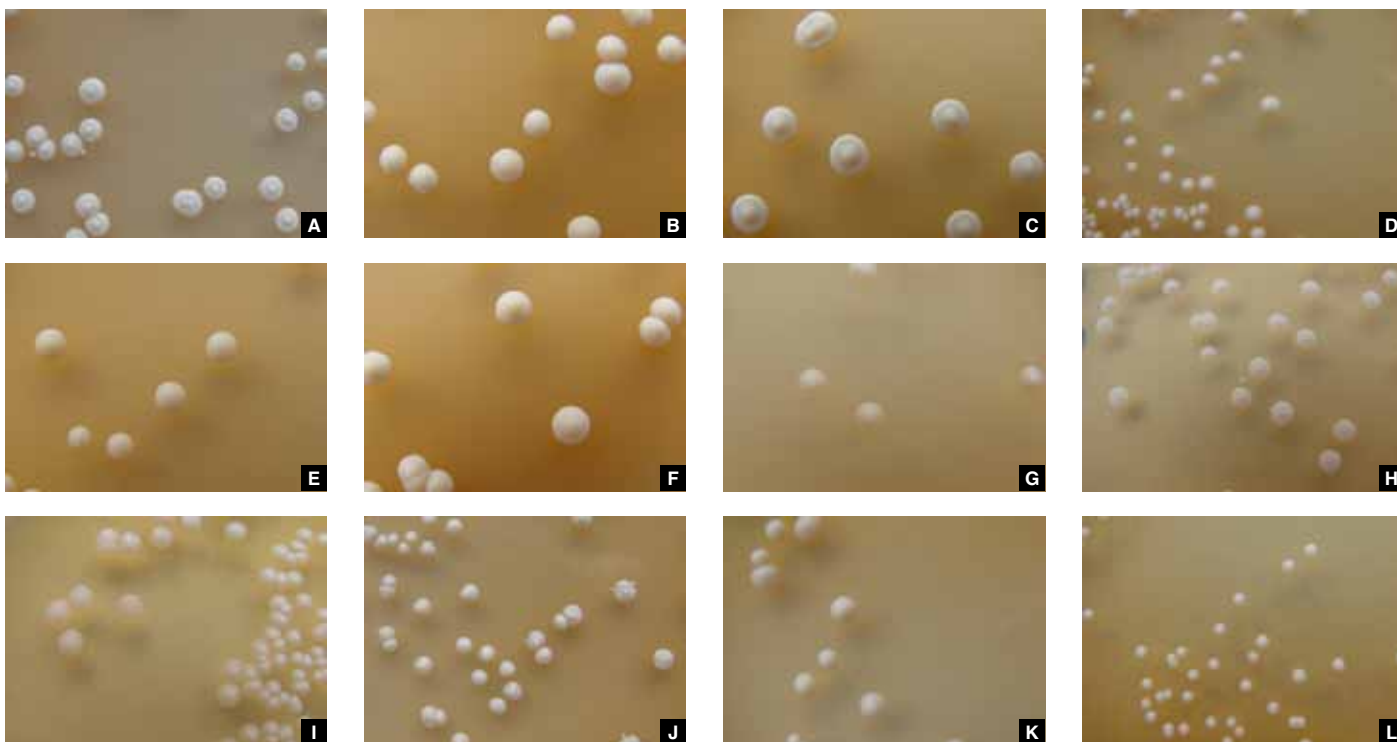
~, drobné kolonie / small colonies;

z, zelené kolonie / green colonies;

b, bílé až béžové kolonie / white to beige colonies;

-, bez nárůstu / no growth





Obr. 2 Vzhled kolonií kvasinek na sladinném agaru / Fig. 2 Yeast colonies on wort agar

A – *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup>; B – *S. cerevisiae* RIBM 140; C – *S. cerevisiae* RIBM 154; D – *S. cerevisiae* RIBM V7; E – *S. pastorianus* DSM 6580<sup>T</sup>; F – *S. pastorianus* RIBM 95; G – *H. uvarum* RIBM Spk 91; H – *P. anomala* RIBM C5; I – *P. guilliermondii* CCM 8321; J – „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4; K – *S. cerevisiae* RIBM Spk 79; L – *Z. rouxii* CCM 8224

(včetně kmene „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4 a divokých kvasinek Spk 2 a Spk 79), *S. bayanus* a *T. delbrueckii* RIBM T2 (tab. 2). Kolonie kmene *P. quellermondii* CCM 8321 narostly na KJO-agaru ve formě kolonií srovnatelných s nárůstem této kultury na sladinném agaru (obr. 2I). Kmeny Spk 25 a Spk 91 rostly na KJO agaru ve formě drobných kolonií, podobně jako kmen *P. anomala* C5 (obr. 4A).

Lysinový agar obsahuje jako jediný zdroj dusíku aminokyselinu L-lysin. Kulturní pivovarské kvasinky, vinařské kvasinky a z kontaminant kvasinky rodu *Saccharomyces*, *H. uvarum* RIBM Spk 91 a *T. delbrueckii* RIBM T2 na lysinovém agaru rostou ve formě velmi drobných kolonií, jak je patrné z obr. 5. Pouze všechny tři kmeny rodu *Pichia* a *Z. rouxii* vytvářely na této půdě kolonie srovnatelné s nárůstem na sladinném agaru (obr. 5E,F,G,I). Jak uvádí Campbell (2003b), pomocí lysinového agaru nelze zachytit nejdůležitější kvasinkové kontaminanty, tedy divoké kvasinky rodu *Saccharomyces*.

Na půdě s krystalovou violetí byl zcela inhibován růst spodních pivovarských kvasinek (tab. 2). Růst byl zjištěn u vinařských kvasinek RIBM V7 (obr. 6C) a u dvou svrchních pivovarských kvasinek, *S. cerevisiae* RIBM 139 a 154 (obr. 6A,B). Ze skupiny kontaminujících kmenů na půdě s krystalovou violetí rostly pouze „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4 (obr. 6D), *S. cerevisiae* RIBM Spk 79 (obr. 6E) a *T. delbrueckii* (obr. 6F). Kolonie na této půdě jsou si ve všech případech velmi podobné – bílé, hladké, lesklé, s pravidelným tvarem. Jak uvádí Haikara a Enari (1975), univerzální použití půdy s krystalovou violetí je omezeno ze důvodu různé citlivosti kulturních i divokých kvasinek (*Saccharomyces* i non-*Saccharomyces*) ke krystalové violeti. Cílem naší práce nebyla modifikace této půdy, proto nebyla sledována citlivost kvasinek k různým koncentracím krystalové violeti.

Zajímavějších výsledků bylo dosaženo při kultivaci kvasinek na mladinném agaru se síranem měďnatým (tab. 2). Růst spodních pivovarských kvasinek byl zcela potlačen, ze svrchních kvasinek došlo k nárůstu kolonií pouze u kmenů *S. cerevisiae* RIBM 139 a 154. Vinařské kvasinky RIBM V7 (obr. 7B), kontaminanty *S. cerevisiae* RIBM Spk 79 (obr. 7G) a *T. delbrueckii* (obr. 6H) na půdě se síranem měďnatým také rostly. V porovnání s půdou obsahující krystalovou violet, umožnil agar se síranem měďnatým zachytit širšího spektra kontaminant: *H. uvarum* RIBM Spk 91 (obr. 7C), *P. anomala* RIBM C5 (obr. 7D), *P. membranifaciens* RIBM Spk 25 (obr. 7E), *P. guilliermondii* CCM 8321 (obr. 7F) a *Z. rouxii* CCM 8224 (obr. 7I). Na rozdíl od půdy s krystalovou violetí však nedošlo k nárůstu „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4.

Při inkubaci kvasinek na MYGP agaru obsahujícím aktidion v koncentraci 10 mg/l byl zcela potlačen růst většiny kmenů, s výjimkou *P. guilliermondii* CCM 8321 a *Z. rouxii* CCM 8224 (tab. 2). Kultivace

and Spk 79), *S. bayanus* and *T. delbrueckii* RIBM T2 (Tab. 2). Colonies of the strain *P. quellermondii* CCM 8321 on KJO-agar grew similarly as on wort agar (Fig. 2I). Strains Spk 25 and Spk 91 grew on KJO agar in the form of tiny colonies, similarly to the strain *P. anomala* C5 (Fig. 4A).

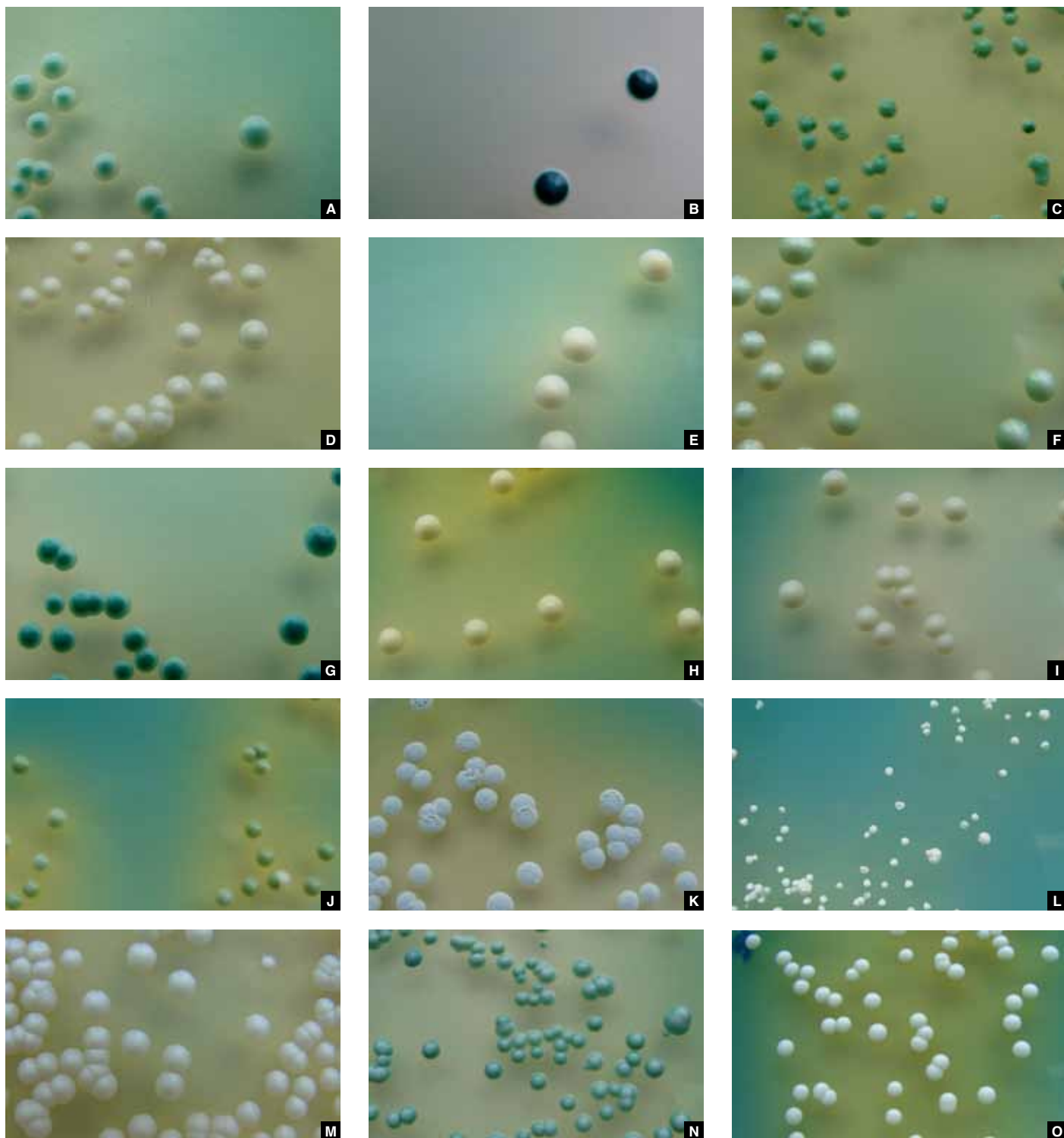
Lysine agar contains the amino acid L-lysine as the only source of nitrogen. Culture brewer's yeast, wine yeast and contaminating yeast of genus *Saccharomyces*, *H. uvarum* RIBM Spk 91 and *T. delbrueckii* RIBM T2 grow on lysine agar in the form of very tiny colonies, as seen in Fig. 5. On the other hand, all three strains of genus *Pichia* and *Z. rouxii* formed on this medium colonies comparable with those growing on wort agar (Fig. 5E,F,G,I). According to Campbell (2003b) lysine agar cannot be used to detect the most important yeast contaminants, i.e. wild *Saccharomyces* yeasts.

The medium with crystal violet completely inhibited the growth of bottom fermenting brewer's yeast (Tab. 2). On the other hand, growth was detected with the wine yeast RIBM V7 (Fig. 6C) and with two top fermenting yeast strains, *S. cerevisiae* RIBM 139 and 154 (Fig. 6A,B). Among the contaminant strains, only „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4 (Fig. 6D), *S. cerevisiae* RIBM Spk 79 (Fig. 6E) and *T. delbrueckii* (Fig. 6F) grew on the medium with crystal violet. On this medium all colonies were in all cases alike – white, smooth, glossy, with a regular shape. According to Haikara and Enari (1975) the universal use of the medium with crystal violet is limited because of the different sensitivity of culture and wild yeasts, (both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*) to crystal violet. We did not aim at modifying the medium and did not therefore study the sensitivity of yeasts to different concentrations of crystal violet.

Interesting results were obtained in cultivations of yeasts on wort agar with copper sulphate (Tab. 2). The growth of bottom brewer's yeast was completely inhibited, with top brewer's yeast colony growth being observed only with strains *S. cerevisiae* RIBM 139 and 154. Wine yeast strain RIBM V7 (Fig. 7B), contaminant *S. cerevisiae* RIBM Spk 79 (Fig. 7G) and *T. delbrueckii* (Fig. 6H) also grew on this medium. The agar with copper sulphate made it possible to detect a wider range of contaminants than the medium with crystal violet: *H. uvarum* RIBM Spk 91 (Fig. 7C), *P. anomala* RIBM C5 (Fig. 7D), *P. membranifaciens* RIBM Spk 25 (Fig. 7E), *P. guilliermondii* CCM 8321 (Fig. 7F) and *Z. rouxii* CCM 8224 (Fig. 7I). However, in contrast to the medium with crystal violet it did not support the growth of „*S. diastaticus*“ RIBM Spk 4.

When incubating the yeasts on MYGP agar containing 10 mg/l actidione the growth of most strains was completely inhibited, with the exception of *P. guilliermondii* CCM 8321 and *Z. rouxii* CCM 8224





Obr. 3 Vzhled kolonií kvasinek na půdě WLN / Fig. 3 Yeast colonies on WLN agar

A – *S. bayanus* DSM 70412<sup>T</sup>; B – *S. cerevisiae* DSM 70449<sup>T</sup>; C – *S. cerevisiae* RIBM 139; D – *S. cerevisiae* RIBM 140; E – *S. cerevisiae* RIBM 154; F – *S. cerevisiae* RIBM V7; G – *S. pastorianus* DSM 6580<sup>T</sup>; H – *S. pastorianus* RIBM 6; I – *S. pastorianus* RIBM 95; J – *H. uvarum* RIBM Spk 91; K – *P. anomala* RIBM C5; L – *P. membranifaciens* RIBM Spk 25; M – *P. guilliermondii* CCM 8321; N – “*S. diastaticus*” RIBM Spk 4; O – *Z. rouxii* CCM 8224

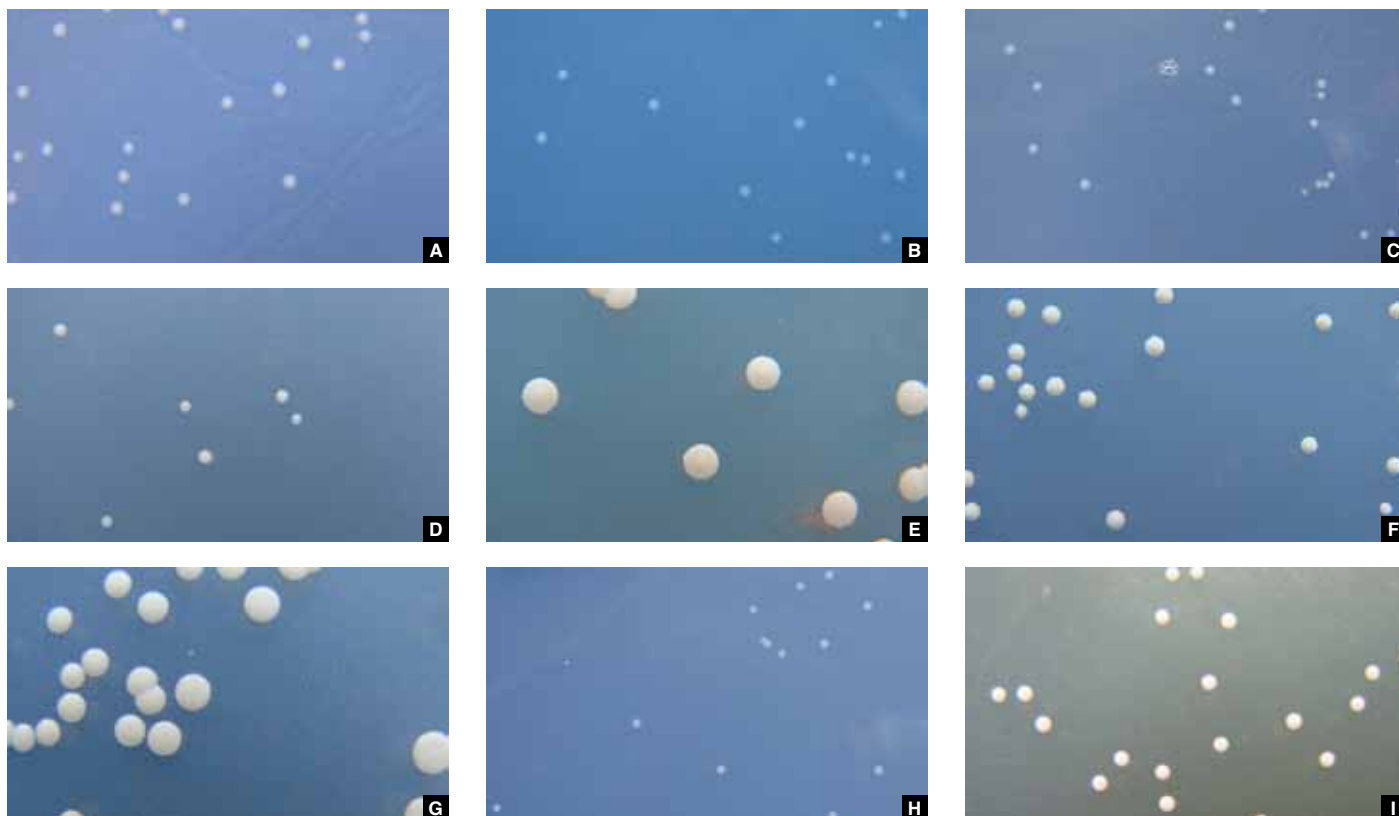
Obr. 4 Vzhled kolonií kvasinek na mladinném agaru s kyselinou monoiodoaceticovou / Fig. 4 Yeast colonies on wort agar with monoiodoacetic acid  
A – *P. anomala* RIBM C5; B – *P. guilliermondii* CCM 8321; C – *Z. rouxii* CCM 8224

v přítomnosti uvedené koncentrace aktidionu je doporučována pro detekci některých divokých kvasinek, např. *H. uvarum* (Campbell, 2003b; Ingledew a Casey (1982). Různé kvasinky se však zřejmě liší stupněm rezistence k tomuto antibiotiku, a proto je mnohem vhodnější použít jiný způsob detekce kontaminant.

V tab. 2 jsou dále shrnuty výsledky inkubace kvasinek na MYGP agaru při teplotě 37 °C. Růst spodních pivovarských kvasinek byl zcela inhibován, svrchní pivovarské kvasinky a vinařské kvasinky při této teplotě tvořily kolonie normální velikosti. Ze skupiny kontaminant byla schopna růstu při teplotě 37 °C většina kmenů s výjimkou *P. membranifaciens* RIBM Spk 25 a *S. cerevisiae* RIBM Spk 2. Tato metoda je doporučována pro odlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek (Anonymous, 1994), případně pro detekci divokých kvasinek v provozech, které používají kvasinky spodního kvašení. Avšak např. Kopecká et al. (2012) uvádějí, že růst některých kmenů svrchních kvasinek byl při teplotě 37 °C potlačen.

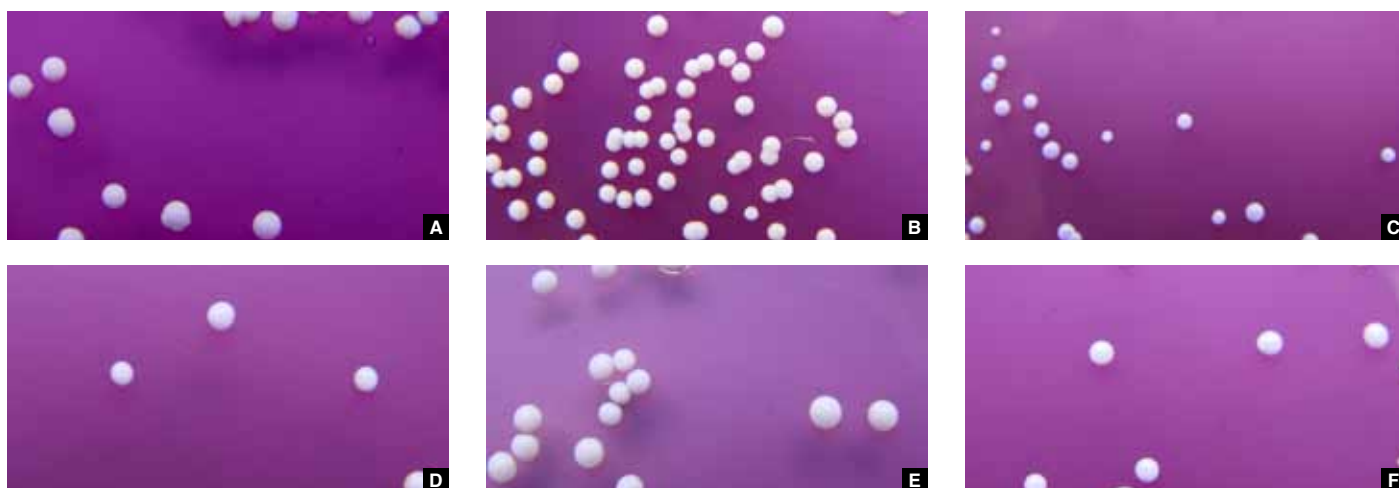
(Tab. 2). Cultivation in the presence of this concentration of actidione has been recommended for the detection of some wild yeasts, e.g. *H. uvarum* (Campbell, 2003b; Ingledew and Casey (1982). However, different yeasts obviously differ in their sensitivity to this antibiotic and it is therefore more suitable to use another method of detection of contaminants.

Tab. 2 also summarizes the results of incubation of yeast on MYGP agar at 37 °C. The growth of bottom brewer's yeast was completely inhibited while top brewer's yeast and wine yeast formed at this temperature colonies of normal size. Among contaminants, most strains were able to grow at 37 °C with the exception of *P. membranifaciens* RIBM Spk 25 and *S. cerevisiae* RIBM Spk 2. The method has been recommended for distinguishing top and bottom brewer's yeast (Anonymous, 1994) and for the detection of wild yeast in breweries using bottom yeast. However, e.g. Kopecká et al. (2012) found that the growth of some top fermenting yeasts at 37 °C was suppressed.



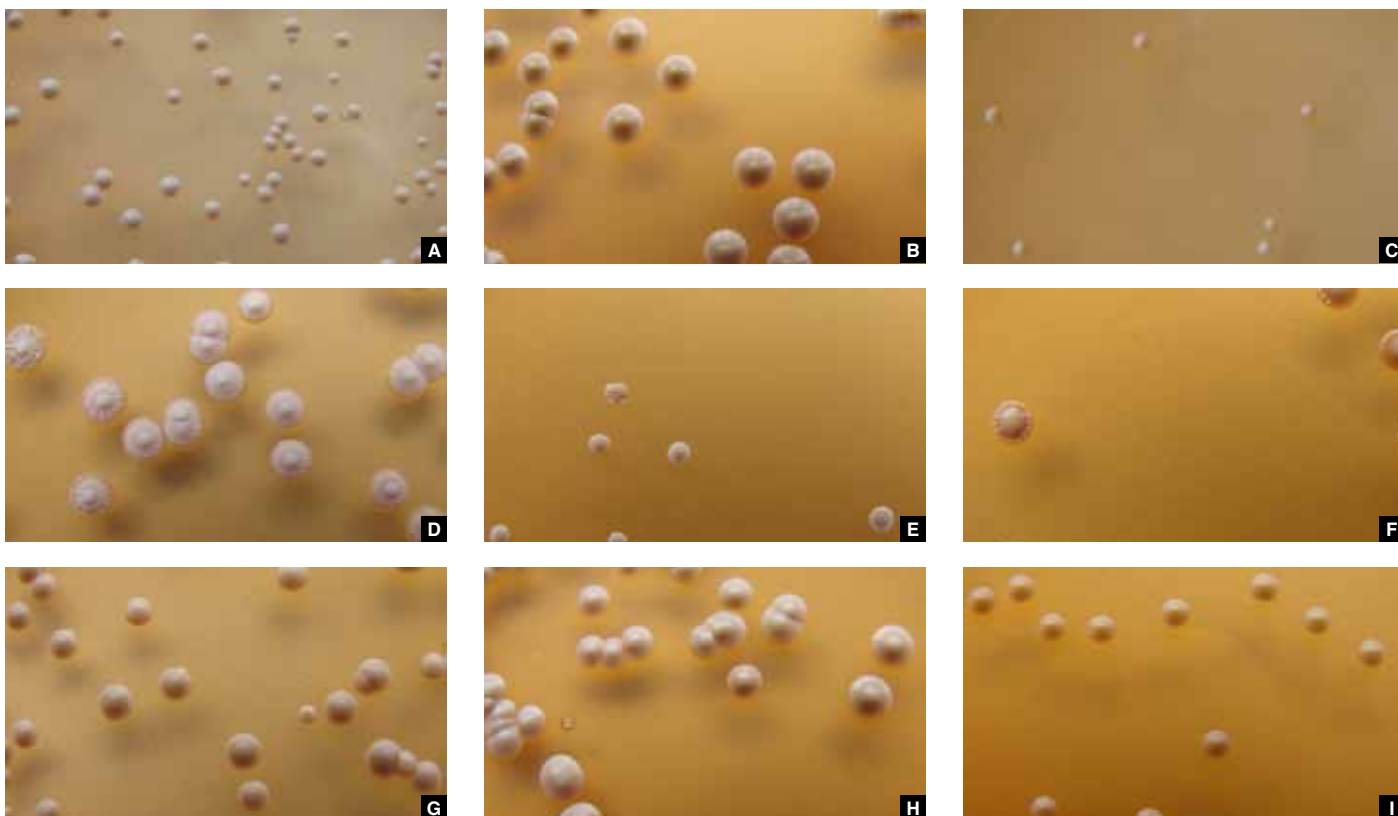
Obr. 5 Vzhled kolonií kvasinek na lyzinovém agaru / Obr. 5 Yeast colonies on lysine agar

A – *S. cerevisiae* DSM 70449<sup>T</sup>; B – *S. cerevisiae* RIBM V7; C – *S. pastorianus* RIBM 95; D – *H. uvarum* RIBM Spk 91; E – *P. anomala* RIBM C5; F – *P. membranifaciens* RIBM Spk 25; G – *P. guilliermondii* CCM 8321; H – *S. cerevisiae* RIBM Spk 2; I – *Z. rouxii* CCM 8224. Pozn. fotografie byly pořizovány na tmavém pozadí – lyzinový agar je ve skutečnosti mléčně bílý / Note: Photographs were made on dark background – lysine agar is in fact milky white



Obr. 6 Vzhled kolonií kvasinek na mladinovém agaru s krystalovou violetí / Fig. 6 Yeast colonies on wort agar with crystal violet

A – *S. cerevisiae* RIBM 139; B – *S. cerevisiae* RIBM 154; C – *S. cerevisiae* RIBM V7; D – *S. diastaticus* RIBM Spk 4; E – *S. cerevisiae* RIBM Spk 79; F – *T. delbrueckii* RIBM T2

Obr. 7 Vzhled kolonií kvasinek na mladinovém agaru s  $\text{CuSO}_4$  / Fig. 7 Yeast colonies on wort agar with  $\text{CuSO}_4$ 

A – *S. cerevisiae* RIBM 154; B – *S. cerevisiae* RIBM V7; C – *H. uvarum* RIBM Spk 91; D – *P. anomala* RIBM C5; E – *P. membranifaciens* RIBM Spk 25; F – *P. guilliermondii* CCM 8321; G – *S. cerevisiae* RIBM Spk 79; H – *T. delbrueckii* RIBM T2; I – *Z. rouxii* CCM 8224

#### 4 ZÁVĚR

Cílem naší práce byl literární přehled problematiky detekce divokých kvasinek a fotodokumentace vzhledu kolonií vybraných kmenů kulturních a divokých kvasinek na různých ztužených půdách. Pro tyto účely jsme vybrali kultivační půdy, které jsou snadno dostupné pro běžnou pivovarskou mikrobiologickou laboratoř, a to jak půdy dodávané komerčně v sestavě k okamžitému použití (např. lysinový agar), tak půdy, které lze snadno připravit (půda s  $\text{CuSO}_4$ , s krystalovou violetí). Linovo médium (Lin, 1974), ani jeho modifikace (Longley et al., 1980), a půda podle Nakagawy (Ingledew a Casey, 1982) nebyly do testování zařazeny pro obsah toxického fuchsinu. Půdy CLEN (Martin a Siebert, 1992) a XMACS (De Angelo a Siebert, 1987) a sporulační zkouška byly vynechány pro finanční a/nebo časovou náročnost přípravy. Podobně nebyly do studie zahrnuty půdy, jejichž použití je v literatuře diskutováno jako nespolehlivé (SDM, půda s kyselinou skořicovou), nebo u nichž je doporučována dlouhá doba inkubace (křídový agar).

Na některých diskutovaných půdách (sladinový a mladinový agar, WLN atd.) mohou růst i bakterie. Pro jejich inhibici se běžně využívá tetracyklin (Šavel, 1980). V naší studii jsme pracovali s čistými kulturami kvasinek, a média proto tetracyklin neobsahovala. Při přípravě půd pro detekci divokých kvasinek v reálných vzorcích je přídavek tetracyklinu nutný.

Testovali jsme celkem 6 různých půd pro detekci divokých kvasinek a/nebo jejich odlišení od kulturních spodních či svrchních pivovarských kvasinek. Při použití mladinového agaru s kyselinou monoiodoctovou (KJO agar) byly detekovány pouze kvasinky skupiny non-*Saccharomyces*. Lysinový agar postihuje ještě o něco užší spektrum divokých kvasinek nežli KJO agar. Půda s krystalovou violetí (koncentrace 0,02 g/l) umožní detekci některých kulturních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a kvasinek *Torulaspora*, za současného potlačení růstu spodních pivovarských kvasinek a většiny divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces*. Největšího zachytu divokých kvasinek skupiny non-*Saccharomyces* bylo dosaženo s použitím půdy obsahující síran měďnatý. Na této půdě (a podobně i na půdě s krystalovou violetí) rostou i některé svrchní pivovarské kvasinky, a lze tedy říci, že v provozech, které používají spodní pivovarské kvasinky, je půda se síranem měďnatým nejvhodnějším médiem pro detekci divokých kvasinek. Spolehlivé odlišení spodních a svrchních pivovarských kvasinek je stále problematické.

#### 4 CONCLUSION

This study aimed at performing a literature survey of detection of wild yeasts and a providing photographic documentation of the appearance of colonies of selected strains of culture and wild yeast on different agar media. For this purpose we selected cultivation media that are readily available for common brewery laboratories, including media supplied commercially in a set for immediate use (e.g. lysine agar) as well as media that can be easily prepared (medium with  $\text{CuSO}_4$  or with crystal violet). Lin's medium (Lin, 1974) and its modification (Longley et al., 1980), as well as the medium according to Nakagawa (Ingledew and Casey, 1982) were not included in the testing because of their content of the toxic fuchsin. The media CLEN (Martin and Siebert, 1992) and XMACS (De Angelo and Siebert, 1987) and sporulation test were also not included because their preparation is financially or time-demanding. The study also does not include media which are considered unreliable in the literature (SDM, medium with cinnamic acid), or require long incubation periods (chalk agar).

Some media (wort and hopped-wort agar, WLN, etc.) can also support the growth of bacteria. Their growth is commonly inhibited by tetracycline (Šavel, 1980). We worked with pure yeast cultures and the media therefore did not contain tetracycline. However, when preparing media for the detection of wild yeast in brewery samples the addition of tetracycline is necessary.

We tested a total of 6 media for the detection of wild yeasts and/or their differentiation from culture bottom or top brewer's yeast. When using wort agar with monoiodoacetic acid (KJO agar) we detected only non-*Saccharomyces* yeasts. The spectrum of wild yeasts detected by lysine agar is still narrower than that revealed on KJO agar. The medium with 0.02 g/l crystal violet permits the detection of some culture *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as well as *Torulaspora* and suppresses the growth of bottom brewer's yeast and most non-*Saccharomyces* wild yeasts. The broadest detection of wild non-*Saccharomyces* yeasts was achieved by using the medium containing copper sulphate. This medium, and similarly also the medium with crystal violet support also the growth of some top brewer's yeast and it can thus be said that the medium with copper sulphate is the medium of choice for detection of wild yeasts in breweries using bottom brewer's yeast. However, a reliable differentiation between top and bottom brewer's yeast still represents a problem.



Naším zájmem byla prezentace různých kultivačních metod stanovení divokých kvasinek s přihlédnutím na jejich reálnou využitelnost v provozní pivovarské laboratoři. Studie byla provedena na souboru 19 kulturních a divokých kvasinek. Na tuto publikaci bude navazovat doplňková studie zahrnující větší počet kulturních i divokých kmenů kvasinek a zároveň porovnání vybraných půd z hlediska srovnatelnosti kvantitativních výsledků na jednotlivých půdách.

#### Poděkování

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS.

#### LITERATURA / REFERENCES

De Angelo, J., Siebert, K. J., 1987: A new medium for the detection of wild yeast in brewing culture yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 45: 135–140.

Anonymous, 1985: Report of Subcommittee on Microbiology. *J. American Society of Brewing Chemists* 43: 161–163.

Anonymous, 1992: Report of Subcommittee on Copper media for wild yeast detection. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 50: 153–157.

Anonymous, 1994: Report of Subcommittee on Differentiation of Ale and Lager Yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 184–186.

Bendiak, D.S., 1991: A modified copper medium for wild yeast identification. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49: 38–39.

Boulton, C., Quain, D., 2001: *Brewing yeast and fermentation*. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England.

Brenner, M.W., Karpiscak, M., Stern, H., Hsu, W.P., 1970: A differential medium for detection of wild yeast in the brewery. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* pp. 79–88.

Campbell, I., Msongo, H.S., 1991: Growth of aerobic wild yeasts. *J. Inst. Brew.* 97: 279–282.

Campbell, I., 2003a: Wild yeast in brewing and distilling, In: *Brewing microbiology*, 3rd edition. Ed.: Priest, F.G., Campbell, I., New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Campbell, I., 2003b: Microbiological methods in brewing analysis. In: *Brewing microbiology*, 3rd edition. Ed.: Priest, F.G., Campbell, I., New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers.

Fernandez, S., Almaguer, L.M., Sierra, J.A., 1989: Detection of mixtures of lager strains by the use of selective inhibitors in solid media. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 47: 73–76.

Goodey, A.R., Tubb, R.S., 1982: Genetic and biochemical analysis of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acids. *Microbiol.* 128: 2615–2620.

Haikara, A., Enari, T.M., 1975: The detection of wild yeast contaminants by the immunofluorescence technique. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, pp. 363–375.

Hall, J.F., 1970: The use of Difco WLN agar for (a) The detection of wild yeast in the presence of *Sacch. cerevisiae* (b) Demonstration of the instability of strains of *Sacch. carlsbergensis*. *J. Inst. Brew.* 76: 522–523.

Hall, J.F., 1971: Detection of wild yeasts in the brewery. *J. Inst. Brew.* 77: 513–516.

Hammond, J.R.M. In: Priest, F.G., Campbell, I.: *Brewing microbiology*, 3rd edition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

Hammond, J.R.M., Eckersley, K.W., 1984: Fermentation problems of brewing yeast with killer character. *J. Inst. Brew.* 90: 167–177.

Harris, J.O., Watson, W., 1968: The use of controlled levels of actidione for brewing and non-brewing yeast strain differentiation. *J. Inst. Brew.* 74: 286–290.

Hope, C.F.A., 1987: Cinnamic acid as the basis of a medium for the detection of wild yeasts. *J. Inst. Brew.* 93: 213–215.

Ingledew, W.M., Casey, G.P., 1982: The use and understanding of media used in brewing microbiology. I. Media for wild yeast. *Brew. Dig.* 57: 18–22.

Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.

Jespersen, L., van der Aa Kühle, A., Peterson, K.M., 2000: Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 43–53.

Kato, S., 1967: A new measurement of infectious wild yeasts in beer by means of crystal violet medium. *Bull. Brew. Sci.* 13: 19–24.

Kopecká, J., Matoulová, D., Němec, M., Jelínková, M., Felsberg, J.: Problematika identifikace průmyslových kmenů kvasinek. 36. Pivovarsko-sladařský seminář, Plzeň 2012.

Kot, E.J., Helbert, J.R., 1977: Two verdant types of *Saccharomyces uvarum*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 35: 26–28.

Our work was focused on surveying different cultivation methods for the detection of wild yeasts, with special reference to their practical utilizability in brewery laboratories. The study was performed with a set of 19 culture and wild yeasts. It will be followed by a supplementary study including a higher number of culture and wild yeast strains and concentrating on comparison of selected media in terms of the comparability of quantitative results on individual media.

#### Acknowledgements

The work was funded by the Institutional Support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for a long-term development of RIBM.

Kreger-van Rij, N. J. W. (ed.), 1984: *The yeasts, a taxonomic study*. 3rd edition, Elsevier-North-Holland, Amsterdam, Netherlands.

Lawrence, D. R., 1983: Yeast differentiation and identification. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, London, IRL Press: Oxford, pp. 449–456.

Lin, Y., 1973: Detection of wild yeasts in the brewery: A new criterion. *Brew. Dig.* 48: 64–66.

Lin, Y., 1974: Detection of wild yeasts in the brewery: A new differential medium. *J. Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* pp. 69–76.

Lin, Y., 1981: Formulating and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. *J. Inst. Brew.* 87: 151–154.

Longley, R.P., Edwards, G.R., Mathews, S.A., 1980: Improved detection of wild *Saccharomyces*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 38: 18–22.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997: Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 369–400.

Martin, C.P., Siebert, K.J., 1992: Evaluation of nitrogen source media for wild yeast detection in brewing culture yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 50: 134–138.

Matoulová, D., Šavel, J., 2007: Brewing and the taxonomy of brewer's yeast. *Kvasny Prum.* 53 (7–8): 206–214.

Maule, A.P., Thomas, P.D., 1973: Strains of yeast lethal to brewery yeasts. *J. Inst. Brew.* 79: 137–141.

Polaina, J., 2002: Brewer's yeast: genetics and biotechnology. *Appl. Mycol. Biotechnol.* 2: 1–17.

Röcken, W., 1983: Fremdhefennachweis in der obergarigen Brauerei mit dem Pantothenat-Agar. *Monatsschr. Brau.* 36: 65–69.

Röcken, W., Schulte, S., 1986: Nachweis von Fremdhefen. *Brauwelt* 41: 1921–1927.

Ryder, D.S., Murray, J.P., Stewart, M., 1978: Phenolic off-flavour problems caused by *Saccharomyces* wild yeast. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 15(2): 79–86.

Šavel, J., 1980: *Mikrobiologická kontrola v pivovarech*. 1. vyd. Praha: SNTL, 184 s.

Šilhánková, L., 1962: A new method of quantitative determination of contamination of baker's yeast by wild yeasts or by dissociation forms of the production culture. *Folia Microbiol.* 7: 255–256.

Šilhánková, L., Moštek, J., Šavel, J., Solinova, H., 1970a: Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. II. Technological properties of some RD mutants. *J. Inst. Brew.* 76: 289–295.

Šilhánková, L., Šavel, J., Moštek, J., 1970b: Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. 1. Frequencies and type of mutant in various strains. *J. Inst. Brew.* 76: 280–288.

Taylor, G.T., Marsh, A.S., 1984: MYGP + copper, a medium that detects both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wild yeast in the presence of culture yeast. *J. Inst. Brew.* 90: 134–145.

van der Aa Kühle, A., Jespersen, L., 1998: Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 205–213.

Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. *J. Inst. Brew.* 111 (4): 355–371.

Walsh, R.M., Martin, P.A., 1977: Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brew.* 83: 169–172.

Walters, L.S., Thiselton, M.R., 1953: Utilization of lysine by yeasts. *J. Inst. Brew.* 59: 401–404.

Yamauchi, H., Yamamoto, H., Shibano, Y., Amaya, N., Saeki, T., 1998: Rapid methods for detecting *Saccharomyces diastaticus*, a beer spoilage yeast, using the polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56: 58–63.