

Povrchové vlastnosti a taxonomie pivovarských kvasinek

Surface Characteristics and Taxonomy of Brewing Yeasts

Jana KOPECKÁ¹, Dagmar MATOULKOVÁ², Miroslav NĚMEC¹

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno / *Institut of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37, Brno, Czech Republic*

² 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*
e-mail: 223187@mail.muni.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Povrchové vlastnosti a taxonomie pivovarských kvasinek. Kvasny Prum. 60, 2014, č. 7–8, s. 182–190

Článek je rešerší zabývající se taxonomií pivovarských kvasinek, metodami jejich klasifikace a identifikace; zdůrazněna je hybridní povaha pivovarských kvasinek včetně souvisejících obtíží při jejich klasifikaci. Při klasifikaci pivovarských kvasinek se využívají zejména metody molekulární biologie, které sledují odlišnosti v chromozomové a mitochondriální DNA – genotypové metody. Na kombinaci těchto metod s fenotypovými a chemotaxonomickými metodami je založena polyfázová taxonomie kvasinek. Důležitým rysem pivovarských kvasinek jsou vlastnosti jejich povrchu, které mohou výrazně ovlivňovat flokulaci kvasinek. V článku jsou vysvětleny pojmy „flokulace“, „hydrofobicita“ a popsány faktory, které ovlivňují flokulaci kvasinek, a je podán přehled o metodách polyfázového přístupu v taxonomii pivovarských kvasinek.

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Surface characteristics and taxonomy of brewing yeasts. Kvasny Prum. 60, 2014, No. 7–8, pp. 182–190

This study deals with the taxonomy of brewing yeasts, methods of their classification and identification. The hybrid character of brewing yeasts is highlighted, along with related problems in their classification. Molecular biology methods mostly used for the classification of brewing yeasts focus on the differences in chromosomal and mitochondrial DNA, i.e. genotyping. Polyphasic taxonomy of yeasts is based on a combination of genotypic, phenotypic and chemotaxonomic methods. An important feature of brewing yeasts is their cell surface characteristics, which could strongly affect yeast flocculation. The terms “flocculation” and “hydrophobicity” are elucidated, factors affecting flocculation are described and methods of the polyphasic approach in brewing yeast taxonomy are summarized.

Kopecká, J. – Matoulková, D. – Němec, M.: Oberflächeneigenschaften und Taxonomie von Bierhefe. Kvasny Prum. 60, 2014, Nr. 7–8, S. 182–190

Der Artikel befasst sich mit der Taxonomie der Bierhefe und Methoden ihrer Klassifizierung und Identifizierung. Die hybride Natur der Bierhefe wird betont, einschließlich der damit verbundenen Schwierigkeiten in ihrer Klassifikation. Bei der Klassifizierung Bierhefe werden hauptsächlich genotypische Verfahren, d.h. molekularbiologische Methoden, die Unterschiede in Chromosom und mitochondrialer DNA beobachten, ausgenutzt. Die polyphasische Taxonomie von Hefen basiert auf der Kombination dieser Verfahren mit den phänotypischen und chemotaxonomischen Verfahren. Ein wichtiges Merkmal der Bierhefe sind die Eigenschaften ihrer Oberflächen, die das Ausflocken von Hefe wesentlich beeinflussen können. Der Artikel erklärt die Konzepte der „Flockung“, „Hydrophobizität“, beschreibt die Faktoren, die das Ausflocken von Hefe beeinflussen, und bietet eine Zusammenfassung der Methoden polyphasischer Taxonomie der Bierhefe.

Klíčová slova: pivovarské kvasinky, flokulace, hydrofobicita, polyfázová taxonomie, *Saccharomyces*

Keywords: brewing yeasts, flocculation, hydrophobicity, polyphasic taxonomy, *Saccharomyces*

1 ÚVOD

Průmyslová i domácí výroba piva se opírá o cílené využívání kvasinek, převážně rodu *Saccharomyces*. Jako pivovarské kvasinky jsou označovány kulturní kvasinky, které se používají k produkci spodně či svrchně kvašených piv. Základním rysem standardních produkčních kvasinek jsou dobře definované vlastnosti, které by se měly měnit pouze minimálně, a to i při opakovaném nasazení.

Rozlišení kvasinek na spodně a svrchně kvasící je založeno zejména na jejich flokulačních vlastnostech. Jako spodní kvasinky jsou označovány zástupci druhu *S. pastorianus*, kteří se používají k výrobě piva typu ležák. Při použití spodních kvasinek probíhá hlavní kvašení v teplotním rozmezí 7–15 °C. V konečné fázi kvašení se kvasinky shlukují ve vločky a sedimentují na dně kvasné nádoby. Svrchní kvasinky, *S. cerevisiae*, jsou naopak po shluknutí vynášeny na hladinu, kde tvoří hustou „pěnu“. Teplotní rozmezí hlavního kvašení se pohybuje v širokém rozmezí teplot okolo 18–22 °C, jde o výrobu piva typu Ale, Porter, pšeničného piva, atd. (Basařová et al., 2010). Mezi další odlišnosti mezi spodními a svrchními kvasinkami patří např. drobné rozdíly v genetické informaci, různé chemické složení buněčné stěny, vyšší maximální teplota růstu u svrchních kvasinek, produkce různého spektra senzorycky aktivních látek (vedlejších produktů metabolismu), atd.

1 INTRODUCTION

Industrial production of beer and homebrewing are based on directed application of yeasts, mostly of the genus *Saccharomyces*. Brewing yeasts are defined as culture yeasts producing bottom and top fermented beers. An important feature of standard production yeasts is production stability, i.e. well defined properties with minimum changes, even in the process of serial repitching.

Differentiation of the yeasts to bottom and top fermenting is based mainly on their ability to flocculate. The representatives of species *S. pastorianus* are designated as bottom fermenting yeasts producing a lager type of beer. Fermentation performed with bottom fermenting yeast takes place in the temperature interval of 7–15 °C. Yeast cells form clumps and sediment at the bottom of the fermentation vessel at the end of fermentation. Top fermenting yeast, *S. cerevisiae*, rises after flocculation to medium surface and forms dense foam. Fermentation with top fermenting yeast takes place at 18–22 °C, and produces beers such as Ale, Porter, wheat beer, etc. (Basařová et al., 2010). Further differences between bottom and top fermenting yeasts include, e.g., small distinctions in genetic setup, chemical composition of the cell wall, higher maximum temperature of growth of top fermenting yeast, production of different spectra of sensorially active compounds (secondary products of metabolism), etc.

2 FLOKULACE

Důležitou vlastností produkčních kmenů kvasinek je flokulace, protože usnadňuje účinně odstraňovat buňky kvasinek spolu s balastními látkami z fermentačního média a ulehčuje tak následné výrobní fáze, dokvašování a filtraci (Boulton a Quain, 2001). Flokulace je reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se a následně se rychle usazovat nebo stoupat k povrchu média. K flokulaci dochází obvykle na konci hlavního kvašení v pozdní logaritmické a stacionární fázi růstu (Miki et al., 1982; Stewart, 2009).

Základní mechanismus flokulace je interakce buněčných stěn kvasinek. V současné době je uznávána tzv. lektinová hypotéza, kdy se zymolektiny (též flokuliny) na povrchu buněčné stěny váží na cukernaté zbytky na buněčné stěně druhé buňky (Miki et al., 1982; Speers et al., 1998). Vápenaté ionty jsou s největší pravděpodobností přímo zapojeny v uhlovodíkové vazbě a neslouží k udržení správné konformace zymolektinů, jak se dříve předpokládalo (Veelders et al., 2010). Rozmanitost pivovarských kvasinek má ovšem za následek různé mechanismy flokulace, které závisí nejen na jednotlivém kmeni kvasinek, ale také na podmínkách prostředí (Speers et al., 1993).

Proces shlukování je ovlivněn celou řadou biologických, chemických i fyzikálních faktorů (obr. 1): genetická výbava kmene kvasinek, složení živného média, růstové podmínky, způsob kultivace, atd. Kategorie faktorů se dělí dle způsobů jejich působení, některé faktory mohou působit více než jedním mechanismem (Verstrepen et al., 2003).

Flokulace může být považována za jistý způsob sociálního chování, strategii dlouhodobého přežívání a ochranného mechanismu, který chrání buňky před nepříznivým vnějším prostředím (Querol a Bond, 2009). Buňky jsou ve shlucích „namačkány“ těsně u sebe s minimálním mezibuněčným prostorem (obr. 2). Takže buňky uvnitř „floků“ jsou chráněny před působením chemických látek v médiu vnější vrstvou buněk (Smukalla et al., 2008).

2.1 Hydrofobicita

Hydrofobicita buněčného povrchu je považována za jeden z klíčových faktorů flokulace kvasinek (Jin a Speers, 1998). Zvýšení počtu karboxylových skupin na povrchu buňky vede ke vzrůstu hydrofobicity až k limitní koncentraci, což má za následek nástup flo-

2 FLOCCULATION

Flocculation is an important property of production brewing yeast strains, because it effectively facilitates elimination of the cells together with ballast compounds from the fermentation medium and thereby also the downstream processes, secondary fermentation and filtration (Boulton and Quain, 2001). Flocculation is the reversible ability of the yeast cells to adhere in clumps, and then sediment rapidly at the bottom of the fermentation medium or rise to its surface. It appears spontaneously at the end of fermentation in late exponential or early stationary phase of growth (Miki et al., 1982; Stewart, 2009).

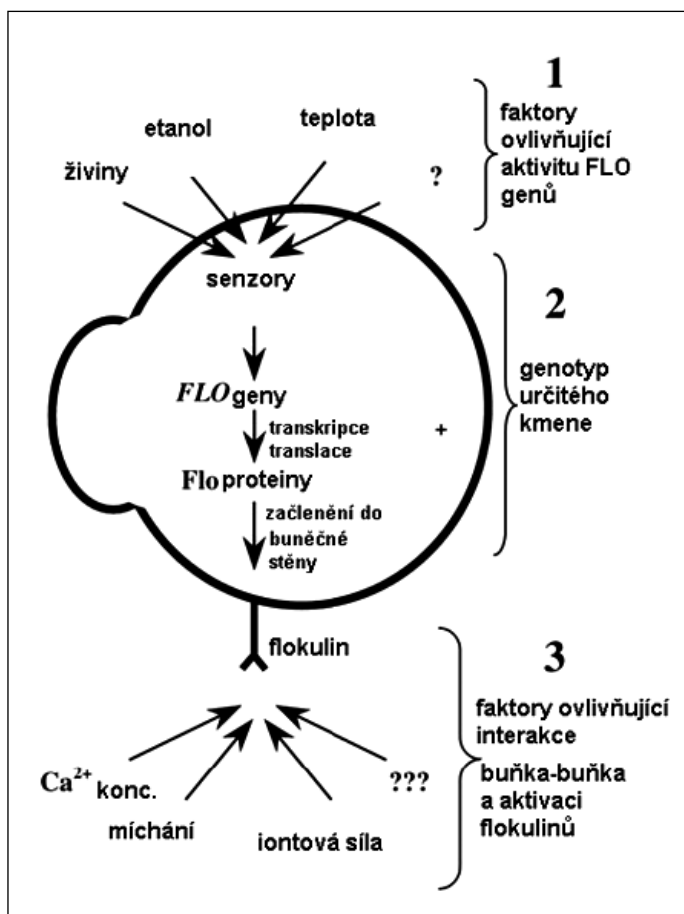
The basic mechanism of flocculation is based on the interaction between yeast cell walls. The currently accepted explanation is the so-called lectin hypothesis according to which zymolectins (flocculins) on cell wall surface bind the sugar residues on surface cell walls of neighbouring cells (Miki et al., 1982; Speers et al., 1998). Calcium ions participate most likely directly in the carbon-carbon bond and do not serve to maintain the correct conformation of zymolectins, as formerly proposed (Veelders et al., 2010). The diversity of brewing yeasts has resulted in different mechanisms of flocculation that depend on individual yeast strain, but also on environment conditions (Speers et al., 1993).

The process of flocculation is affected by many biological, chemical and physical factors (Fig. 1): genetic equipment of yeast strain, composition of nutrient medium, growth conditions, type of cultivation, etc. The factors are divided according to their effects; some factors can act through more than one mechanism (Verstrepen et al., 2003).

Flocculation can be considered as an indication of social behaviour, strategy of long-term survival or a protective mechanism that protects cells from stressful environments (Querol and Bond, 2009). The flocs have a thick structure with little intercellular space (Fig. 2). Cells inside the floc are protected against chemicals in the medium by the outer layer of cells (Smukalla et al., 2008).

2.1 Hydrophobicity

Cell surface hydrophobicity (CSH) is considered one of the most important factors in yeast flocculation (Jin and Speers, 1998). Increase in the number of carboxyl groups on cell sur-



Obr. 1 Faktory ovlivňující flokulaci (Verstrepen et al., 2003, upraveno)

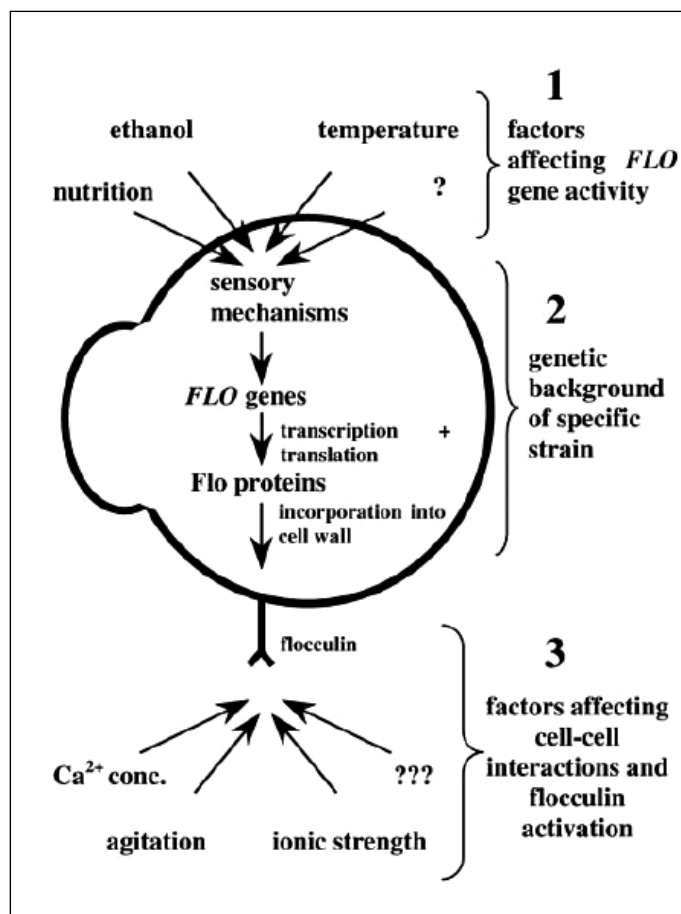


Fig. 1 Factors affecting flocculation (Verstrepen et al., 2003, modified)

kulace (Straver a Kijne, 1996). Staré buňky s větším množstvím zárodečných jizev jsou více hydrofobní než mladé buňky stejného kmene (Akiyama-Jibiki et al., 1997). Svrchní a spodní kvasinky vykazují různé vlastnosti povrchu buněk; svrchní kmeny jsou obecně více hydrofobní než spodní kmeny díky vyšší koncentraci proteinů na povrchu buňky (Dengis a Rouxhet, 1997). Jednou z možných funkcí hydrofobicity je podpora aktivní konformace zymolektinů vedoucí ke flokulaci (Jin a Speers, 1998). Na druhé straně však nebyly v některých případech zaznamenány významné rozdíly v hydrofobitě mezi flokulujícími a neflokulujícími buňkami nebo dokonce mezi exponenciální a stacionární fází růstu jedné kultury. Tyto zjištěné zdánlivé rozpory mohou vést k závěru, že vliv hydrofobicity buněk na flokulaci je pravděpodobně kmenově specifický (Lo a Dranginis, 1996).

3 POLYFÁZOVÝ PŘÍSTUP V TAXONOMII KVASINEK

Taxonomie je vědním oborem, který se týká klasifikace, tzn. charakterizace a uspořádání definovaných jednotek (taxonů), nomenklatury a identifikace těchto jednotek na základě daného klasifikačního schématu (Brenner et al., 2005). Taxonomie tedy pokrývá jak oblast klasifikace, tak i identifikace organismů.

Polyfázová taxonomie je založena na kombinaci různých metod, využívajících genotypových, chemotaxonomických a fenotypových informací o daném mikroorganismu za účelem jeho správné klasifikace (Prakash et al., 2007). Vzhledem k zavádění a používání nových instrumentálně a technologicky vyspělejších metod je polyfázová taxonomie dynamický obor, který se neustále vyvíjí (Kämpfer, 2012).

Genotypové metody v taxonomii kvasinek se zaměřují na odlišnosti ve struktuře nukleových kyselin a zahrnují DNA-typizační metody, např. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; polymorfismus délky restrikčních fragmentů), ribotypizace, profilování plazmidů, stanovení procentuálního poměru G+C, DNA-DNA hybridizace, metody založené na porovnávání ITS (Internal Transcribed Spacer; vnitřní přepisovaný mezerník) či NTS (NonTranscribed Spacer; nepřepisovaný mezerník) sekvenace, pulzní gelová elektroforéza.

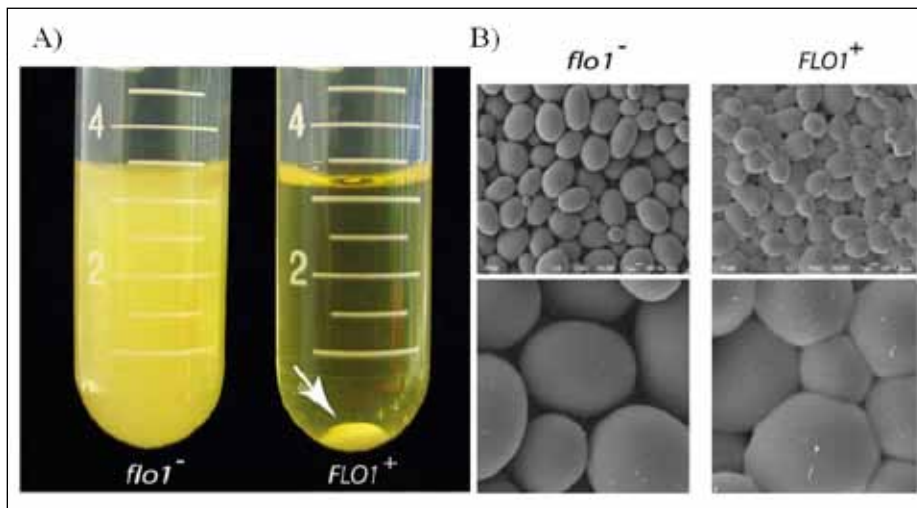
Pro identifikaci lze u kvasinek využít i mitochondriální DNA (mtDNA), její následná restrikční analýza, či PCR (Polymerase Chain Reaction; polymerázová řetězová reakce) a sekvenace jednotlivých mitochondriálních genů.

Fenotypové metody zahrnují např. maximální teplotu růstu, využití různých zdrojů uhlíku a dusíku, citlivost k antimikrobiálním látkám, produkci plynu, růst na selektivních či selektivně diagnostických půdách.

Chemotaxonomie je založena na stabilní lokalizaci různých chemických látek v jednotlivých částech buňky mezi různými taxony nebo skupinami taxonů; složení buněčné stěny, přítomnost chitinu v buněčné stěně, poměr mastných kyselin, atd. (Prakash et al., 2007).

3.1 Taxonomie kvasinek rodu *Saccharomyces*

Rod je obvykle dobře definovaná skupina taxonů, která je jasně odlišitelná od jiných rodů. Rod se skládá z jednoho či více druhů, případně poddruhů či variet. Jako druh je definována jasně vymezená skupina navzájem příbuzných kmenů, zahrnujících typový kmen, které sdílejí 70% a vyšší DNA-DNA homologii komplementárních párů bází, vykazují (až na výjimky) shodné fenotypové znaky a současně se odlišují některými znaky od jiných skupin. Označení poddruh se používá pro geneticky příbuzné organismy, které nejsou rozlišitelné na základě DNA, ale pouze fenotypově. Varieta označuje vnitrodruhové členění založené pouze na vybraných znacích, které nejsou prokazatelné pomocí příbuznosti DNA.



Obr. 2 Flokulace *S. cerevisiae*. A) Gen *FLO1* neflokulujícího laboratorního kmene S288C je pod transkripční kontrolou indukibilního promotoru *GAL1* (KV210). Pokud tento kmen roste v YPGal médiu, je *FLO1* přepisován do formy proteinu (*FLO1+*) a vykazuje silnou flokulaci. Kontrolní kmen (KV22) obsahuje stejný gen, ale ne promotor, tedy gen přepisován není (*flo1-*), neflokuluje. B) Skenovací elektronová mikroskopie centrifugovaných peletů neflokulujících a flokulujících buněk ukazuje, že flokulující buňky drží u sebe a tvoří hustou 3D strukturu s minimem intercelulárního prostoru, naproti tomu neflokulující buňky tvoří nezávislé vrstvy s mezerami mezi buňkami (Smukalla et al., 2008, upraveno) / Fig. 2 Flocculation of *S. cerevisiae*. A) The *FLO1* gene of the nonflocculent laboratory strain S288C was brought under the transcriptional control of the inducible *GAL1* promoter (KV210). When this strain is grown in YPGal medium, *FLO1* is expressed (*FLO1+*), resulting in strong flocculation. A control strain (KV22) containing the same marker gene, but not the promoter (*flo1-*), does not show flocculation. B) Scanning electron microscopy of centrifuged pellets of nonflocculent and flocculent cells show that the flocculent cells stick together to form a densely packed 3D structure with little intercellular space. By contrast, the nonflocculent cells behave as stacked independent spheres with clear gaps between the cells (Smukalla et al., 2008 modified)

face, i.e. increase of hydrophobicity, to a threshold concentration leads to the onset of flocculation (Straver and Kijne, 1996). Old cells with a larger number of budding scars tend to be more hydrophobic than younger cells of the same strain (Akiyama-Jibiki et al., 1997). Top and bottom fermenting yeast strains show different surface properties; ale (top fermenting) strains have been reported to be generally more hydrophobic than lager (bottom fermenting) strains due to higher surface protein concentrations (Dengis and Rouxhet, 1997). One of the possible functions of cell surface hydrophobicity is to support the active conformation of zymolectins leading to flocculation (Jin and Speers, 1998). However, there is also evidence of an only insignificant difference in CSH between flocculating and non-flocculating cells or between cells in exponential and stationary phase of growth. The impact of the CSH on flocculation is probably strain specific (Lo and Dranginis, 1996).

3 POLYPHASIC APPROACH IN YEAST TAXONOMY

Taxonomy is a scientific discipline that includes classification, characterisation and organisation of defined units (taxons), nomenclature and identification of these units according to the classification scheme (Brenner et al., 2005). Taxonomy covers also both the area of classification, and identification of organisms.

Polyphasic taxonomy of microorganisms is based on a combination of different methods using genotypic, chemotaxonomical and phenotypic information about a specific microorganism for its correct classification (Prakash et al., 2007). Polyphasic taxonomy is a dynamic discipline with continual progress involving a continuous introduction and use of new and advanced instrumental and technological methods (Kämpfer, 2012).

The genotypic methods of yeast taxonomy are focused on differences in the structure of nucleic acids and include DNA-typing methods, i.e. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ribotyping, plasmid profiles, determination of percent G+C content, DNA-DNA hybridisation, methods based on comparing ITS (Internal Transcribed Spacer) or NTS (NonTranscribed Spacer), sequencing and pulse field gel electrophoresis.

Tab. 1 Klasifikace rodu *Saccharomyces* / Table 1 Classification of the genus *Saccharomyces*

Doména/Domain	Eukarya
Říše/Kingdom	Fungi
Oddělení/Phylum	Ascomycota
Pododdělení/Subphylum	Saccharomycotina
Třída/Class	Saccharomycetes
Řád/Order	Saccharomycetales
Čeleď/Family	Saccharomycetaceae
Rod/Genus	<i>Saccharomyces</i>

Tab. 2 Druhy rodu *Saccharomyces* a jejich výskyt v prostředí / Table 2 Species of genus *Saccharomyces* and their occurrence

Druh / Species	Výskyt / Occurrence
<i>S. arboricolus</i>	Kůra stromů čeledi Fagaceae / Bark of species Fagaceae
<i>S. paradoxus</i>	Spojen s rodem <i>Drosophila</i> , exudáty stromů, fermentovaný nápoj z agáve v Mexiku / Associated with <i>Drosophila</i> species, tree exudates, fermented drink from agave in Mexico
<i>S. cerevisiae</i>	Přírodní prostředí, prostředí průmyslové fermentace, svrchní pivovarská kvasinka, pekařská kvasinka, lihovarská kvasinka, vinařská kvasinka, kvasinky pro výrobu cideru / Natural environments, artificial fermentation environments, top fermenting yeast, baker's yeast, distiller's yeast, wine yeast, cider yeast
<i>S. mikatae</i>	Přírodní prostředí (půda, tlející listy) v Japonsku / Natural environments (soil, decaying leaves) in Japan
<i>S. kudriavzevii</i>	Přírodní prostředí v Japonsku a Portugalsku, průmyslové prostředí na Novém Zélandu a v Evropě / Natural environments in Japan and in Portugal, industrial environments in New Zealand and in Europe
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>	Prostředí produkce alkoholických nápojů, vinařská kvasinka, kvasinky pro výrobu cideru; nespecifikovaná oblast ve východní Asii / Habitats associated with the production of alcoholic beverages, wine yeast, cider yeast; unspecified natural habitat in East Asia
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvurum</i>	
<i>S. eubayanus</i>	Prostředí pabukových (<i>Nothofagus</i>) lesů v Patagonii / Environments of Southern beech (<i>Nothofagus</i>) forest in Patagonia
<i>S. pastorianus</i>	Prostředí pivovaru, spodní pivovarská kvasinka / Brewery environment, bottom fermenting brewing yeast

Taxonomie kvasinek rodu *Saccharomyces* (tab. 1) prošla v nedávném období mnoha změnami, což má nyní za následek často nesprávné používání druhových jmen. V současné době zahrnuje rod *Saccharomyces* 9 druhů (tab. 2) (Kurtzman et al., 2011). V roce 2011 byl nově popsán druh *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011) a druh *S. cariocanus* byl zařazen do druhu *S. paradoxus* jako jeho americká varieta (Muir et al., 2011). Stále se vedou spory o označení a klasifikaci druhu *S. bayanus* var. *uvurum*. Podle některých závěrů by *S. bayanus* var. *uvurum* neměl mít pouze označení variety, ale měl by to být samostatný druh *S. uvurum* (Libkind et al., 2011; Muir et al., 2011; Scannell et al., 2011).

Mezi technologicky významné kvasinky patří především druhy *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *S. bayanus* (tab. 2).

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

První osekvenovaný eukaryotický organizmus byla kvasinka *S. cerevisiae*, která bývá zřídka izolována i z volné přírody (Kurtzman et al., 2011). Genom, tzn. veškerá genetická informace uložená v DNA, která se udává v jednotkách bp (base pair; páry bází), popřípadě kb či Mb (kilo či mega bp) laboratorního kmene S288C, se skládá z 12 Mb a na 16 chromozomech obsahuje necelých 6000 genů (Goffeau et al., 1996).

Druhový komplex *S. cerevisiae* zahrnuje geneticky odlišný soubor přírodních izolátů i domestikované kmeny, které se používají pro speciální průmyslové aplikace (Borneman et al., 2011). Až 10 % kmenů klasifikovaných ve sbírkách jako *S. cerevisiae* může mít hybridní charakter, což znamená, že došlo ke křížení mezi *S. cerevisiae* a některým z příbuzných kmenů (Nguyen et al., 2011). Svrchní kvasinky jsou řazeny do druhu *S. cerevisiae*. Některé z nich mohou mít rovněž hybridní charakter. Nejčastěji se uvádějí hybridy mezi *S. cerevisiae* a *S. kudriavzevii* (González et al., 2008), ty se pak převážně vyznačují polyploidii (Smart, 2007).

Mitochondriální DNA (mtDNA), its subsequent restriction analysis, or PCR (Polymerase Chain Reaction) and sequencing of individual mitochondrial genes can be used for yeast identification.

Phenotypic methods include, e.g., maximum temperature of growth, utilisation of different carbon or nitrogen sources, sensitivity/resistance to antimicrobial compounds, gas production, or growth on selective or selective-diagnostic media.

Chemotaxonomy is based on a stable localization of different chemical compounds in individual parts of the cell characteristic for different taxons or groups of taxons – cell wall composition, the presence of chitin in cell wall, ratio of individual fatty acids, etc. (Prakash et al., 2007).

3.1 Taxonomy of genus *Saccharomyces*

Genus is usually a well-defined group of taxons, which is clearly distinguishable from other genera. Genus is comprised of one or more species, or alternatively of subspecies or varieties. Species is considered as a clearly defined group of mutually related strains, including type strains, which share 70% and higher DNA-DNA homology of complementary base pairs and show, with a few exceptions, identical phenotypic characteristics that differ from those of other genera. The designation subspecies is used for genetically related organisms which cannot be differentiated on the DNA level, but only on the phenotype level. Variety denotes an interspecies classification based only on selected characteristics, not established by DNA relationship.

The taxonomy of yeast genus *Saccharomyces* (Table 1) has undergone many changes in recent times, and that is also the reason for the frequent use of wrong nomenclature of individual species. Currently, the genus *Saccharomyces* comprises 9 species (Table 2) (Kurtzman et al., 2011). A new species *S. eubayanus* was described in 2011 (Libkind et al., 2011) and *S. cariocanus* was reclassified into *S. paradoxus* as its American variety (Muir et al., 2011). Controversy is still alive about the nomenclature and classification of the species *S. bayanus* var. *uvurum*. According to some results, *S. bayanus* var. *uvurum* should not be classified as a mere variety, but should be classified as an individual species *S. uvurum* (Libkind et al., 2011; Muir et al., 2011; Scannell et al., 2011).

The species *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* and *S. bayanus* belong among industrially important yeasts (Table 2).

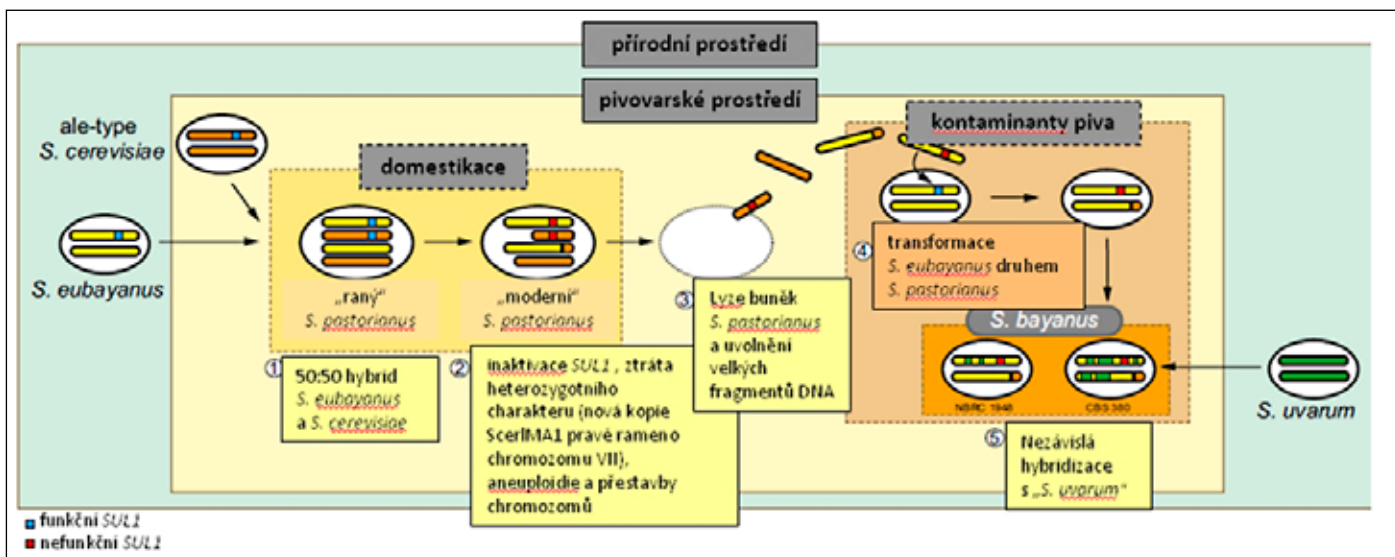
3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae was the first eukaryotic organism with decoded complete genome sequence, and is rarely isolated from natural habitats (Kurtzman et al., 2011). The genome of the laboratory strain S288C, i.e. the complete genetic information contained in DNA and expressed in bp (base pair) units or in kb or Mb (kilo or mega bp), comprises 12 Mb and contains almost 6.000 genes in 16 chromosomes (Goffeau et al., 1996).

The species complex of *S. cerevisiae* includes a genetically different set of natural isolates and domesticated strains used for special industrial applications (Borneman et al., 2011). Almost 10% of strains classified in collections as *S. cerevisiae* could have a hybrid character, being produced by crossing *S. cerevisiae* with another related species (Nguyen et al., 2011). Top fermenting yeast is classified as *S. cerevisiae*. Some of the strains could also have a hybrid character. The hybrids described most frequently are those between *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* (González et al., 2008); they are characterized by polyploidy (Smart, 2007).

3.1.2 *Saccharomyces pastorianus*

Because of its hybrid origin, the species *S. pastorianus* should be designated rather as a complex of species (Querol and Bond, 2009;



Obr. 3 Model utváření hybridních druhů *S. pastorianus* a *S. bayanus*. 1. divoký kmen *S. eubayanus* a svrchní kmen (ale-type) *S. cerevisiae* daly vznik allotetraploidnímu *S. pastorianus*; 2. domestikace způsobila silný selektivní tlak na kmeny s nejvhodnějšími vlastnostmi pro pivovarské prostředí; 3. v kvasných nádobách s vysokou hustotou buněk *S. pastorianus*, uvolňovaly buňky velké fragmenty DNA pro nahodilou transformaci; 4. Protože nebyly techniky pro izolaci čistých kultur, figurovaly divoké kmeny *S. eubayanus* jako kontaminace; 5. mnohonásobná hybridizace s divokými kmeny „*S. uvarum*“ daly vznik kmenu CBS 380T a NBRC 1948. *SUL1*, gen pro sulfát permeasu, účastní se metabolismu sulfátů. Tento model nevylučuje dřívější nebo paralelní zapojení „*S. uvarum*“ jako kontaminanty v pivovarském prostředí (Libkind et al., 2011, upraveno).

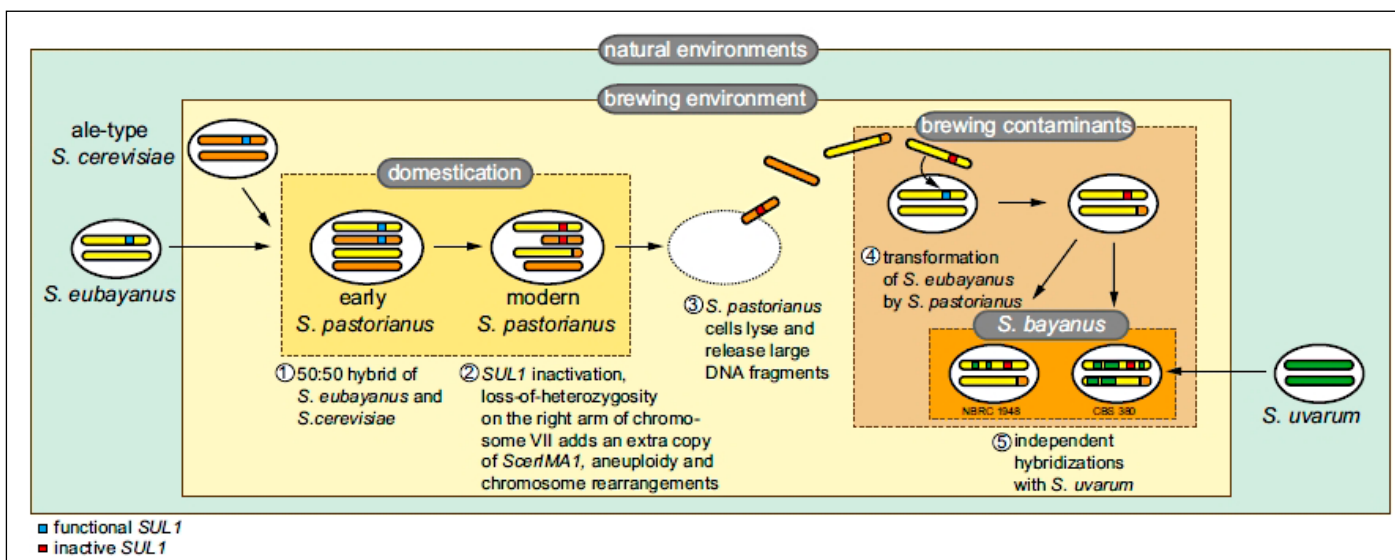


Fig. 3 A model of the formation of the hybrid strains of *S. pastorianus* and *S. bayanus*. 1. wild *S. eubayanus* and ale-type *S. cerevisiae* hybridized to form an allotetraploid that gave rise to *S. pastorianus*; 2. domestication imposed strong selective pressure for strains with the most desirable brewing properties; 3. in the brewing vats with high densities of *S. pastorianus*, cell lysis releases large DNA fragments that occasionally transform; 4. contaminating wild strains of *S. eubayanus* because of the lack of pure culture techniques; 5. multiple hybridization events with wild strains of “*S. uvarum*” gave rise to CBS 380T and NBRC 1948. *SUL1*, gene of the sulphate permease, participate in sulphate metabolism. This model does not exclude prior or parallel involvement of “*S. uvarum*” in brewing or contamination (Libkind et al., 2011, modified).

3.1.2 *Saccharomyces pastorianus*

Druh *S. pastorianus* by pro svou hybridní povahu genomu mohl být označován spíše jako komplex druhů (Querol a Bond, 2009; Kurtzman et al., 2011). Vznikl pravděpodobně vícenásobným křížením mezi druhy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a kryptotolerantním druhem *S. eubayanus* nedávno objeveným v Patagonii (Libkind et al., 2011; Pengelly a Wheals, 2013; Rainieri et al., 2006). Díky hybridnímu původu je genom této kvasinky často polyploidní nebo alopolyploidní (neobsahují stejný počet jednotlivých chromozomů). Pivovarské kvasinky jsou nejčastěji tri- či tetraploidní (Matzke et al., 1999). Dosud nebyla zaznamenána izolace *S. pastorianus* z volné přírody.

Kompletně osekvenovaný průmyslový kmen Weihenstephan W34/70 obsahuje 25 Mb na 36 chromozomech a skládá se z 1 mitochondriálního genomu non-*Saccharomyces* typu a 2 subgenomů, přičemž 9 chromozomů obsahuje translokace mezi těmito subgenomy, tzv. mozaikové chromozomy (Nakao et al., 2009).

3.1.3 Hybridní původ *Saccharomyces pastorianus*

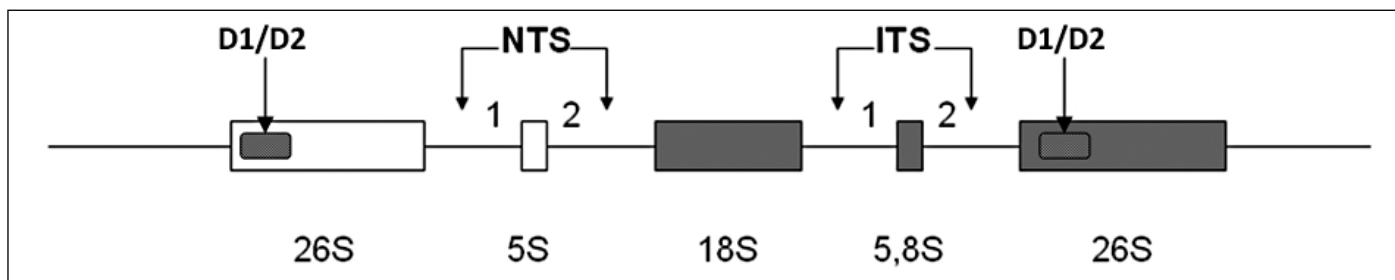
Většina kvasinek, které jsou izolovány ze současného pivovarského prostředí, má hybridní genom, který se skládá ze *S. cerevisiae*,

Kurtzman et al., 2011). Multiple crossing among the species *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and cryptotolerant species *S. eubayanus*, recently discovered in Patagonia, has obviously led to its formation (Libkind et al., 2011; Pengelly and Wheals, 2013; Rainieri et al., 2006). Due to its hybrid origin the genome of *S. pastorianus* is frequently polyploid or allopolyploid (it does not contain an equal number of individual chromosomes). Brewing yeast is frequently tri- or tetraploid (Matzke et al., 1999). The isolation of *S. pastorianus* from natural environment has not yet been recorded.

The genome of the lager strain Weihenstephan W34/70, which has been completely sequenced, comprises 25 Mb in 36 chromosomes and contains 1 mitochondrial genome (non-*Saccharomyces* type) and 2 subgenomes; 9 chromosomes, so-called mosaic chromosomes, contain translocation between these subgenomes (Nakao et al., 2009).

3.1.3 Hybrid origin of *Saccharomyces pastorianus*

Most yeast strains isolated from the current brewery environment have a hybrid genome comprising *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and sequences of “lager type” (Rainieri et al., 2006). At least two hybridisa-



Obr. 4 Schematické znázornění struktury ITS, NTS a D1/D2 regionu (Giudici a Pulvirenti, 2002, upraveno) / Fig. 4 Schematic representation of the structure of ITS, NTS and D1/D2 region (Giudici a Pulvirenti, 2002, modified)

S. bayanus a sekvencí „ležáckého typu“ (Rainieri et al., 2006). Předpokládá se, že pro vznik spodních kvasinek musely proběhnout dvě nebo více křížení a do genomu přispěly druhy *S. cerevisiae* a minimálně dva druhy tzv. non-*S. cerevisiae* (Dunn a Gavin, 2008). Druh, který poskytl tzv. ležácké sekvence, je pravděpodobně nedávno popsáný *S. eubayanus*. K tomuto předpokladu vede zjištění, že jeho genomové sekvence se shodují s non-*S. cerevisiae* sekvencemi *S. pastorianus* z 99,5 % a také nesou geny (metabolismus cukrů a siřičitanů), které byly zásadní pro domestikaci (obr. 3) spodních pivovarských kvasinek (Libkind et al., 2011).

Spodní pivovarské kvasinky se dělí do dvou skupin kmenů dle vlastností jejich genomu: Saaz a Froberg, které rovněž částečně odrážejí i geografické rozložení. Do skupiny typu Saaz patří kmeny používané v České republice a v Dánsku (Carlsberg). Tyto kmeny ztratily významné množství genomu *S. cerevisiae* díky chromozomové aneuploidii, ale ponechaly si většinu genomu *S. bayanus*. Skupinu typu Froberg tvoří kmeny z Holandska (Heineken, Oranjeboom a jiné pivovary), z Dánska (kromě pivovaru Carlsberg) a Severní Ameriky. Tyto kmeny si ponechaly většinu genetického materiálu obou kmenů. Genom *S. bayanus* zůstává více konzervativní oproti genomu *S. cerevisiae* ve smyslu ploidie a celkových změn (Dunn a Sherlock, 2008).

Hybridní kmeny jsou zvýhodněny díky lepší adaptaci na měnící se podmínky prostředí (např. nízká teplota) než rodičovské kmeny (González et al., 2008).

3.2 Metody využívané pro rozlišení rodu *Saccharomyces*

Klasické metody pro identifikaci kvasinek jsou založeny na mikroskopickém pozorování – kde je to možné na morfologii buněk, případně sexuální reprodukci a na fyziologických vlastnostech (biochemické testy). Průmyslově využívané kmeny kvasinek ovšem většinou nejsou schopny sporulace – sexuálního rozmnožování, morfologie buněk je velmi podobná a biochemické reakce v rámci druhu naopak variabilní. Tím se stává identifikace jednotlivých kmenů značně obtížná, a proto jsou dnes převážně využívány metody molekulární biologie.

3.2.1 Fenotypové metody

Pro rozlišení kvasinek na základě fenotypových vlastností se nejčastěji využívá maximální teplota růstu, využitelnost substrátů a růst na obohacených půdách. Svrchní kvasinky jsou schopny růstu při teplotě až 39,4 °C, zatímco spodní nikoli (max. 34 °C). Pro rozlišení svrchních a spodních kvasinek se využívá např. půda WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient) s bromkrezolovou zelení, stupeň zkvašování rafinózy, atd. Výsledky těchto testů mohou být ovšem v některých případech variabilní (Basařová et al., 2010; Matoulková et al., 2013).

3.2.2 Genotypové metody

Pulzní gelová elektroforéza umožňuje separovat a zobrazit intaktní chromozomy podle jejich velikosti, tzv. karyotyp. Pro karyotypizaci lze rovněž využít restriční endonukleázy s nízkou frekvencí štěpení, a tak získat makrorestriční karyotyp (Alcoba-Flórez et al., 2007). Díky této technice je možné rozlišit jednotlivé druhy, případně kmeny v rámci téhož druhu. Např. pro *S. cerevisiae* jsou typické 3 proužky (bandy) v oblasti 225 až 365 kb, zatímco pro „*S. uvarum*“ pouze 2 (Giudici a Pulvirenti, 2002). Celkový počet proužků (bandů) pro *S. cerevisiae* bývá 12–13, pro *S. paradoxus* 14, pro *S. bayanus* 15 nebo 17 a pro *S. pastorianus* 17 (Guillamón et al., 1994).

Pro identifikaci na úrovni kmene se využívají specifické oblasti DNA, které by měly mít vysoký mezidruhový a zároveň nízký nebo žádný vnitrodruhový polymorfismus. V současné době se převážně využívají oblasti rDNA – ribozomální DNA (obr. 4) – ITS, NTS a D1/D2 region (Giudici a Pulvirenti, 2002). Fylogenetické studie blízce

tion events had to been realized to lead to the formation of bottom fermenting yeast, *S. cerevisiae* and at least two non-*S. cerevisiae* species contributing to the genome (Dunn and Gavin, 2008). The species with the „lager sequences“ is probably the recently described *S. eubayanus*. Genome sequences of *S. eubayanus* are 99.5 % identical with those in the genome of *S. pastorianus* (i.e. non-*S. cerevisiae* sequences) and also contain genes (metabolism of sugars and sulphites) important for the domestication (Fig. 3) of bottom fermenting yeast (Libkind et al., 2011).

Bottom fermenting yeast is divided into two groups of strains according to their genome characteristics: Saaz and Froberg type, which partially reflect the geographic distribution. Strains used in the Czech Republic and in Denmark (Carlsberg) belong to the Saaz group. Strains of Saaz type lost a significant amount of the *S. cerevisiae* genome because of chromosome aneuploidy, but kept an almost complete *S. bayanus* genome. The Froberg type group consists of strains from Holland (Heineken, Oranjeboom and other breweries), from Denmark (except for Carlsberg brewery) and from Nord America. Strains of Froberg type kept nearly complete genetic information of both strains. The genome of *S. bayanus* is more conservative compared to *S. cerevisiae* in terms of ploidy and general changes (Dunn and Sherlock, 2008).

Compared to the parent strains, hybrid strains have the advantage of being better adapted to changing environmental conditions (e.g. low temperature) (González et al., 2008).

3.2 Methods used for differentiation of the genus *Saccharomyces*

When it is possible, classical methods of yeast identification are based on microscopic observation of cell morphology, on sexual reproduction and on physiological characteristics (biochemical tests). Most strains of industrially important yeast are not able to sporulate, i.e. perform sexual reproduction, cell morphology is very similar while biochemical reactions within the species are variable. Identification of individual strains is thus considerably difficult and the methods of molecular biology are therefore currently much preferred.

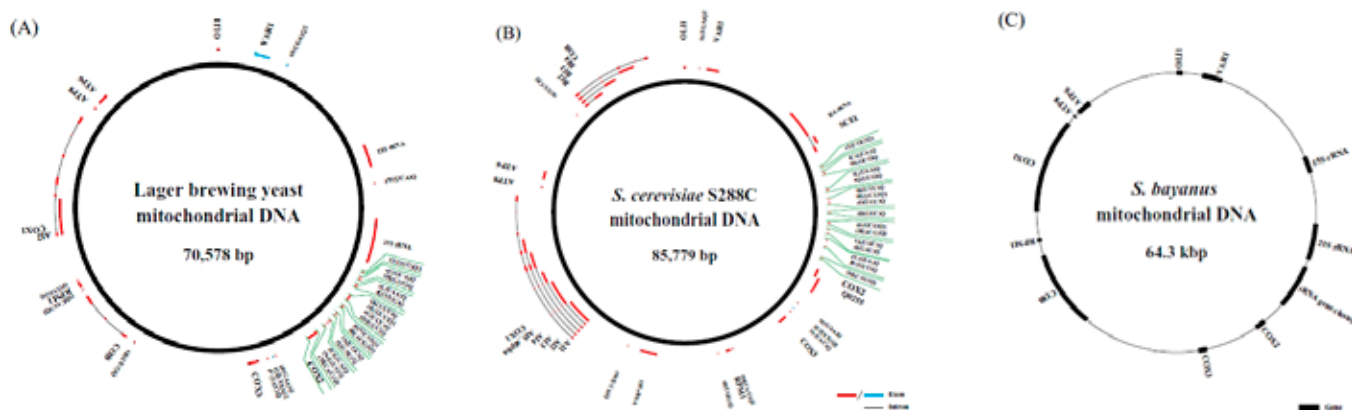
3.2.1 Phenotypic methods

Maximum temperature of growth, utilisation of substrates and growth on enriched media are mainly used to differentiate yeasts in terms of phenotypic characteristics. Top fermenting yeast is capable of growing at temperatures up to 39.4 °C, while bottom fermenting yeast cannot grow at temperatures beyond 34 °C. Commercial WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient) medium with bromocresol green, the degree of fermentation of raffinose, etc., are employed to differentiate bottom and top fermenting yeast. In some cases the results of the tests can be variable (Basařová et al., 2010; Matoulková et al., 2013).

3.2.2 Genotypic methods

Pulse field gel electrophoresis makes it possible to separate and display intact chromosomes distributed according to their size, i.e. the so-called karyotype. Restriction endonucleases with low frequency of cleavage can be used for karyotyping to obtain a macrorestriction karyotype (Alcoba-Flórez et al., 2007). This technique allows the differentiation of individual species, or strains within species. The karyotype of *S. cerevisiae* contains typical 3 bands in the region of 225 to 365 kb, whereas „*S. uvarum*“ displays in this region only 2 bands (Giudici and Pulvirenti, 2002). The total number of bands for *S. cerevisiae* is 12–13, for *S. paradoxus* 14, for *S. bayanus* 15 or 17 and for *S. pastorianus* 17 (Guillamón et al., 1994).

Specific DNA regions can be used to identify given yeast to the strain level. The regions should have high interspecific and low or no intraspecific polymorphism at the same time. The ribosomal DNA regions mostly



Obr. 5 Struktura a velikost mitochondriálního genomu A) spodní pivovarská kvasinka; B) *S. cerevisiae* S288C; C) *S. bayanus* / Fig. 5 Structure and size of the mitochondrial genome A) bottom fermenting yeast; B) *S. cerevisiae* S288C; C) *S. bayanus* (Nakao et al., 2009, upraveno/modified)

příbuzných hub nejčastěji porovnávají ITS oblasti, které se nachází mezi geny pro 18S, 5.8S a 26S rDNA. Tyto geny jsou v genomu přítomné v mnoha kopiích a jsou uspořádány v tandemu (James et al., 1996). Jeden primerový pár amplifikuje ITS region až u 500 druhů askomycet v rozmezí velikosti 300–1 000 bp. Tento produkt může být následně využit pro restriční analýzu, nejčastěji pak s těmito enzymy: *NdeI*, *HinfI*, *HaeIII*, *RsaI* (James et al., 1996; Valente et al., 1996). U některých kmenů byl ovšem nalezen více než jeden typ ITS sekvence (James et al., 2009).

K druhové identifikaci rodu *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* lze použít i restriční analýzu NTS regionu a sekvenaci D1/D2 regionu, což je zhruba 600 bp podjednotky 26S rDNA (Giudici a Pulvirenti, 2002; Nardi et al., 2006), nebo analýzu translačního elongačního faktoru 1- α , LSU rRNA (Large SubUnit; velká podjednotka), SSU rRNA (Small SubUnit; malá podjednotka) a RNA polymerázy II (Kurtzman, 2006; Kurtzman a Robnett, 2013).

Identifikaci na úrovni kmene umožňuje analýza malých fragmentů DNA náhodně rozmístěných na okraji chromozomu, tzv. inter- δ oblasti. Delta elementy tvoří okraje retrotranspozonů TY1 a TY2, ale mohou se v genomu nacházet rovněž samostatně. V genomu *S. cerevisiae* S288C je popsáno zhruba 300 delta elementů (Legras a Karst, 2003). Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; náhodná amplifikace polymorfní DNA) umožňuje amplifikaci krátkých úseků, které jsou náhodně rozmístěny po celém genomu pomocí jednoho primeru v délce zhruba 10 nukleotidů a zároveň jeho nízké teploty nasedání. Takto je možné charakterizovat a identifikovat kvasinky na úrovni rodu a druhu a v některých případech až na úrovni kmene (Fernández-Espinar et al., 2003).

K rozlišení typových, pivovarských a vinařských kvasinek lze využít i technik PCR, PCR-RFLP či multiplex-PCR jednotlivých oblastí či samostatných genů (López et al., 2003; Torriani et al., 2004). Bohužel tyto postupy nejsou vždy průkazné u průmyslově využívaných kmenů. Jako vhodná se jeví metoda MLST (MultiLocus Sequence Typing; multilokusová sekvencní typizace), při které dochází k amplifikaci a sekvenaci 6–8 provozních genů (tzv. housekeeping genů, nutných pro život buňky) či oblastí zároveň. Na rozdíl od prokaryot se u kvasinek ve větší míře volí jiné geny než provozní. Tato metoda je ale drahá, pracná, zdlouhavá a pro běžné použití prakticky nepoužitelná (Ivey a Phister, 2011; Munoz et al., 2009). Pro podrobnější taxonomickou analýzu hybridních kmenů lze využít techniky čipů, které umožňují identifikaci a detailnější charakterizaci na úrovni druhů a mezidruhových hybridů (Muller a McCusker, 2009).

V současnosti je k dispozici set primerů (multiplex PCR) pro všechny platné druhy v rámci rodu *Saccharomyces*, kromě hybridního druhu *S. pastorianus* (Muir et al., 2011; Pengelly a Wheals, 2013).

3.2.3 Mitochondrie a jejich identifikace

V haploidní buňce *S. cerevisiae* se nachází zhruba 7–17 mitochondrií, v diploidní 15–29, některé zdroje uvádějí až 50 organel na buňku v závislosti na fyziologickém stavu (Berger a Yaffe, 2000; Kocková-Kratochvílová, 1982; Piškur, 1994).

Velikost mtDNA a pořadí genů je druhově závislé (obr. 5). Vždy však má cirkulární uspořádání, stejný karyotyp v rámci kmene, nižší hustotu genů a vysoký obsah bází A+T oproti chromozomové DNA. Pořadí genů v mtDNA je u *S. pastorianus* a *S. bayanus* téměř identické. Intergenní regiony a introny zabírají zhruba 2/3 mitochondriálního genomu (Groth et al., 2000; Rainieri et al., 2008; Solieri, 2010).

used (Fig. 4) include ITS, NTS and D1/D2 region (Giudici and Pulvirenti, 2002). Phylogenetic studies of closely related fungi compare most frequently ITS regions (the region between genes coding for 18S, 5.8S and 26S rDNA). In the genome, the genes are present in many copies and are organized in tandems (James et al., 1996). One primer pair amplifies the ITS region of as many as 500 species of ascomycetes in the size interval of 300–1 000 bp. This product can be subsequently used for restriction analysis, mostly with the enzymes *NdeI*, *HinfI*, *HaeIII*, or *RsaI* (James et al., 1996; Valente et al., 1996). Some strains contain more than one type of the ITS sequence (James et al., 2009).

Restriction analysis of the NTS region and sequencing of D1/D2 region (about 600 bp of 26S rDNA subunit) could be used for the species identification of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* (Giudici and Pulvirenti, 2002; Nardi et al., 2006), or for analysis of elongation factor 1- α , LSU rRNA (Large SubUnit), SSU rRNA (Small SubUnit) and RNA polymerase II (Kurtzman, 2006; Kurtzman and Robnett, 2013).

Analysis of the small fragments of DNA randomly localized at the ends of chromosomes, inter- δ regions, facilitates identification to the strain level. Delta elements constitute the peripheries of the retrotransposons TY1 and TY2, but can be also localized individually in the genome. About 300 delta elements are described in the genome of *S. cerevisiae* S288C (Legras and Karst, 2003). The RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA) allows the amplification of short regions randomly distributed in the whole genome using one primer about 10 nucleotides in length and low temperature of annealing. Yeast could be characterized and identified by RAPD to the genus, species and in some cases to the strain level (Fernández-Espinar et al., 2003).

PCR, PCR-RFLP or multiplex-PCR techniques of individual regions or genes are used to differentiate type, brewing and wine yeast (López et al., 2003; Torriani et al., 2004). The techniques do not always yield conclusive results in industrially important strains. The method of MLST (MultiLocus Sequence Typing) seems to be appropriate when 6–8 housekeeping genes or regions are amplified and sequenced at the same time. In comparison to bacteria, genes other than housekeeping ones are targeted in yeast. The MLST method is unfortunately expensive, laborious, time-intensive and not suitable for common use (Ivey and Phister, 2011; Munoz et al., 2009). Techniques using chips can be used for detailed taxonomic analysis of hybrid strains. The chips facilitate identification and detailed characterisation to the strain and interspecies hybrid level (Muller and McCusker, 2009).

Nowadays, a set of primers (multiplex-PCR) is available for all of the valid species of the genus *Saccharomyces* except for the hybrid species *S. pastorianus* (Muir et al., 2011; Pengelly and Wheals, 2013).

3.2.3 Mitochondria and their identification

A haploid cell of *S. cerevisiae* contains some 7–17 mitochondria, diploid cell 15–29; some sources state up to 50 organelles per cell depending on physiological conditions (Berger and Yaffe, 2000; Kocková-Kratochvílová, 1982; Piškur, 1994).

The size of mtDNA and the gene order is species specific (Fig. 5). It has always a circular organisation, the same karyotype in one strain, low gene density and a high amount of the A+T bases in comparison with chromosomal DNA. In *S. pastorianus* and *S. bayanus* the gene order in mtDNA is almost identical. Intergenic regions and introns occupy about 2/3 of the mitochondrial genome (Groth et al., 2000; Rain-

Mitochondriální genom obsahuje geny pro cytochromoxidázu c, ATP syntázu, apocytochrom b, ribozomální proteiny a některé „intron-related“ otevřené čtecí rámce (Alcoba-Florez et al., 2007; Foury et al., 1998). Při křížení a vzniku hybridů mitochondrie přecházejí do dceřiné buňky vždy pouze od jedné mateřské buňky (Solieri et al., 2008). Bylo zjištěno, že spodní pivovarské kvasinky neobsahují mitochondrie typu *S. cerevisiae* (Rainieri et al., 2008).

Pro restriční analýzu mtDNA se vybírají takové enzymy, které rozpoznávají a štěpí velké množství míst v jaderné DNA, ale pouze málo míst v mitochondriální díky jinému obsahu G+C (Lopéz et al., 2001; Naumova et al., 2010). Pro fylogenetické analýzy bývá nejčastěji srovnávána sekvence genu pro podjednotku cytochromoxidázy c, *COXII* či *COXI* (Meadows, 2010; Rainieri et al., 2008).

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla podpořena z finančních prostředků Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (FRVS 424/2013), Specifického výzkumu Masarykovy univerzity (MUNI/A/0884/2013) a s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS (Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin, RO1914).

LITERATURA / REFERENCES

- Akiyama-Jibiki, M., Ishbiki, T., Yamashita, H., Eto, M., 1997: A rapid and simple assay to measure flocculation in brewer's yeast. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 34: 278–281.
- Alcoba-Flórez, J., Arévalo-Morales, M.del P., Pérez-Roth, E., Laich, F., Rivero-Pérez, B., Méndez-Álvarez, S., 2007: Yeast molecular identification and typing. In *Communicating Current Research and Educational topics and Trends in applied microbiology*. Formatex: 535–546.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha. ISBN 978-80-7080-734-7.
- Berger, K.H., Yaffe, M.P., 2000: Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol.*, 8: 508–513.
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., Chambers, P.J., 2011: Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* 7: e1001287.
- Boulton, Ch., Quain, D., 2001: *Brewing yeast & fermentation*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. ISBN 0-632-05475-1.
- Brenner, D.J., Staley, J.T., Krieg, N.R., 2001: Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. Garrity GM (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1, 2nd edn. Springer, New York. ISBN 978-0-387-21609-6.
- Dengis, P.B., Rouxhet, P.G., 1997: Flocculation mechanisms of top and bottom fermenting brewing yeast. *J. Inst. Brew.*, 103: 257–261.
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.*, 18: 1610–1623.
- Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., Querol, A., 2003: Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*. 20: 1213–1226.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B., 1998: The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces*. *FEBS Lett.*, 440: 325–331.
- Giudici, P., Pulvirenti, A., 2002: Molecular methods for identification of wine yeasts in Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts. *Research Signpost*, Kerala, India. ISBN 81-7736-120-1.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996: Life with 6000 genes. *Science*, 274: 546–567.
- González, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2008: Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 2314–2320.
- Groth, C., Petersen, R.F., Piškur, J., 2000: Diversity in organization and the origin of gene orders in the mitochondrial DNA molecules of the genus *Saccharomyces*. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1833–1841.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A., 1994: Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 708–714.

ieri et al., 2008; Solieri, 2010). Mitochondrial genome contains genes encoding cytochrome oxidase c, ATP synthase, apocytochrome b, ribosomal proteins and some intron-related open reading frames (Alcoba-Florez et al., 2007; Foury et al., 1998). During crossing, mitochondria are always inherited by daughter cells solely from the mother cell (Solieri et al., 2008). Bottom fermenting yeast does not contain mitochondria of the *S. cerevisiae* type (Rainieri et al., 2008).

The mtDNA contains a significantly different amount of G+C bases from the chromosomal DNA. Enzymes with a low frequency of cleavage in mtDNA but with a high frequency in nuclear DNA are therefore used for restriction analysis of mtDNA (Lopéz et al., 2001; Naumova et al., 2010). The sequence of the gene coding for the subunit of cytochrome oxidase c, *COXII* or *COXI*, is most often compared in phylogenetic analyses (Meadows, 2010; Rainieri et al., 2008).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (FRVS 424/2013), by the Specific Research of the Masaryk University (MUNI/A/0884/2013) and by Institutional Support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for a long-term strategic development of the RIBM (RO1914).

- Ivey, M.L., Phister, T.G., 2011: Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 1619–1634.
- James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N., 1996: Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *J. Syst. Bacteriol.*, 46: 189–194.
- James, S.A., O'Kelly, M.J.T., Carter, D.M., Davey, R.P., van Oudenaarden, A., Roberts, I.N., 2009: Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome Res.*, 19: 626–635.
- Jin, Y.L., Speers, R.A., 1998: Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.*, 31: 421–440.
- Kämpfer, P., 2012: Systematic of prokaryotes: the state of the art. *Antonie Leeween.*, 101: 3–11.
- Kocková-Kratochvílová, A., 1982: *Kvasinky a kvasinkovitě mikroorganismy*. Alfa, Bratislava. ISBN 63-154-82.
- Kurtzman, C.P., 2006: Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*, 47: 65–71.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011: *The Yeast, a taxonomic study*. Elsevier, Burlington, USA. ISBN 978-0-444-52149-1.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2013: Relationships among genera of the (Ascomycota) from multigenic phylogenetic analysis of the type species. *FEMS Yeast Res.*, 13: 23–33.
- Legras, J.-L., Karst, F., 2003: Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221: 249–255.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Goncalves, C., Dover, J., Johnston, M., Goncalves, P., Sampaio, J.P., 2011: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS*, 108: 14539–14544.
- Lo, W.S., Dranginis, A.M., 1996: FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.*, 178: 7144–7151.
- López, V., Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., Ramón, D., Querol, A., 2003: A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 81: 63–71.
- Lopéz, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, M.T., 2001: A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 68: 75–81.
- Matouliková, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., 2013: Mikrobiologie pivovarské výroby – Divoké kvasinky a metody jejich detekce. *Kvasny Prum.*, 59: 246–257.
- Matzke, M.A., Scheid, O.M., Matzke, A.J.M., 1999: Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *Bioessays*, 21: 761–767.
- Meadows, R., 2010: Genetic mismatches between nuclei and mitochondria make yeast hybrids sterile. *PLOS Biol.* 8: e1000433.
- Miki, B.L.A., Hung Poon N., James, A.P., Seligy, V.L., 1982: Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 150: 878–889.

- Muir, A., Harrison, E., Wheals, A., 2011: A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. FEMS Yeast Res., 11: 552–563.
- Muller, L.A.H., McCusker, J.H., 2009: A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res., 9: 143–152.
- Munoz, R., Gómez, A., Robles, V., Rodríguez, P., Cebollero, E., Tabera, L., Carrascosa, V., Gonzalez, R., 2009: Multilocus sequence typing of oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains. Food Microbiol., 26: 841–846.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., Ashikari, T., 2009: Genome sequence of lager brewing yeast, an interspecies hybrid. DNA Res., 16: 115–129.
- Nardi, T., Carlot, M., De Bortoli, E., Corich, V., Giacomini, A., 2006: A rapid method for differentiation *Saccharomyces sensu stricto* strains from other yeast species in an enological environment. FEMS Microbiol. Lett., 264: 168–173.
- Naumova, E.S., Naumov, G.I., Barrio, E., Querol, A., 2010: Mitochondrial DNA polymorphism of the yeast *Saccharomyces bayanus var. uvarum*. Microbiol., 79: 520–527.
- Nguyen, H.-V., Legras, J.-L., Neuveglise, C., Gaillardin, C., 2011: Deciphering the hybridisation history leading to the lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 a CBS 380^T. PLOS ONE 6: e25821.
- Pengelly, R.J., Wheals, A.E., 2013: Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. FEMS Yeast Res., 13: 156–161.
- Piškur, J., 1994: Inheritance of the yeast mitochondrial genome. Plasmid, 31: 229–241.
- Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M., Lal, R., 2007: Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. Indian J. Microbiol., 47: 98–108.
- Querol, A., Bond, U., 2009: The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. FEMS Microbiol. Lett., 293: 1–10.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., 2006: Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. Appl. Environ. Microbiol., 72: 3968–3974.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Nakao, Y., Pulvirenti, A., Giudici, P., 2008: The inheritance of mtDNA in lager brewing strains. FEMS Yeast Res., 8: 586–596.
- Scannell, D.R., Zill, O.A., Rokas, A., Payen, C., Dunham, M.J., Eisen, M.B., Rine, J., Johnston, M., Hittinger, C.T., 2011: The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* genus. G3 Genes, Genomes, Genetics, 1: 1–25.
- Smart, K.A., 2007: Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. Yeast, 24: 993–1013.
- Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Chen Yan, Vincens, M.D., Jansen, A., Prevost, M.Ch., Latgé, J., Fink, G.R., Foster, K.R., Verstrepen, K.J., 2008: FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. Cell., 135: 726–737.
- Solieri, L., 2010: Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. Trends Microbiol., 18: 521–530.
- Solieri, L., Antúez, O., Pérez-Ortín, J.E., Barrio, E., Giudici, P., 2008: Mitochondrial inheritance and fermentative: oxidative balance in hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum*. Yeast, 25: 485–500.
- Speers, R.A., Durance, T.D., Tung, M.A., Tou, J., 1993: Colloidal properties of flocculent and nonflocculent brewing yeast suspensions. Biotechnol. Prog., 9: 267–272.
- Speers, R.A., Smart, K., Steward, R., 2009: Zymoclectins in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Inst. Brew., 104: 298.
- Stewart, G.G., 2009: The Horace Brown Medal Lecture: Forty years of brewing research. J. Inst. Brew., 115: 3–29.
- Straver, M.H., Kijne, J. W., 1996: A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. Yeast, 12: 207–213.
- Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G., Dellaglio, F., 2004: Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. Lett. Appl. Microbiol., 38: 239–244.
- Valente, P., Gouveia, F.C., de Lemos, G.A., Pimentel, D., van Elsas, J.D., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N., 1996: PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. FEMS Microbiol. Lett., 137: 253–256.
- Veelders, M., Brückner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mösch, H.U., Essen, L.O., 2010: Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. P. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 22511–22516.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R., 2003: Yeast flocculation: What brewers should know. Appl. Microbiol. Biotechnol., 61: 197–205.

Do redakce došlo / Manuscript received: 16. 5. 2014
Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 6. 2014

PIVOVARSKÝ KALENDÁŘ 2014

cena 200 Kč včetně DPH

CHMELAŘSKÁ ROČENKA 2014

cena 200 Kč včetně DPH

JEČMENÁŘSKÁ ROČENKA 2014

cena 200 Kč včetně DPH

Objednávky: Irena Boudová, boudova@beerresearch.cz, tel. 224 900 146

Množstevní slevy na obě ročenky