

VITALITA A VIABILITA NÁŠADNÍCH KVASNIC: METODY POSUZOVÁNÍ A VLIV BUNĚČNÝCH SYSTÉMŮ PRO STRESOVOU REZISTENCI

VITALITY AND VIABILITY OF PITCHING YEAST: METHODS OF ASSESSMENT AND THE EFFECT OF CELLULAR STRESS RESISTANCE SYSTEMS

IDA HOLLEROVÁ¹, KAREL SIGLER², JARMILA KADLECOVÁ¹, JIŘÍ ŠROGL¹

¹Výzkumný 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, e-mail: hollerova@beerresearch.cz

²Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 / Institute of Microbiology CAS, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, e-mail: sigler@biomed.cas.cz

Hollerová, I. – Sigler, K. – Kadlecová, J. – Šrogl, J.: Vitalita a viabilita nášadních kvasnic: metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou rezistenci. Kvasny Prum. 51, 2005, č. 1, s. 3–7.

Článek je věnován dvěma hlavním tématům: 1. posuzování životaschopnosti a metabolické kompetence kvasinek pomocí testu acidifikační schopnosti (AP test), biochemického zázemí této metody, podmínkám využití a postupnému vývoji od jejího zavedení, a 2. tomu, jak metabolická kompetence kvasinek v provozu, a tedy i výsledky AP testu, mohou být ovlivněny např. růstovou fází buněk a stavem systémů mnohočetné rezistence vůči xenobiotikům (multidrug resistance, MDR), které podmiňují schopnost kvasinek vyrovnávat se s chemickým stresem.

AP test vyvinutý a patentovaný Opekarovou a Siglerem, použitý poprvé ke stanovení metabolické kompetence pivovarských kvasinek opakovaně nasazovaných v provozu, je založen na znalosti řady membránových pochodů probíhajících v kvasinkách metabolizujících acidogenní i exogenní substráty. Hlavní pochod podílející se na acidifikační schopnosti kvasinek, tj. činnost H⁺-ATPasy, závisí nejen na stavu buněk (čerstvé buňky, buňky po skladování, praní atd.), ale velmi silně i na růstové fázi. Během diauxického přechodu a těsně po něm se aktivita H⁺-ATPasy u *S. cerevisiae* prudce snižuje a zůstává nízká během post-diauxické a stacionární fáze. To souvisí s přechodem buněk na energeticky úsporný režim, při němž je minimalizován provoz energeticky náročných pochodů zahrnujících vysokou spotřebu ATP. Podobnou závislost aktivity na růstové fázi vykazují i transportéry systémů MDR.

Hollerová, I. – Sigler, K. – Kadlecová, J. – Šrogl, J.: Vitality and viability of pitching yeast: methods of assessment and the effect of cellular stress resistance systems. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 1, p. 3–7.

The article concerns two main topics: 1. Assessment of viability and metabolic competence of yeast by the acidification power test (AP test), its biochemical background, conditions of its use and its development since its introduction, and 2. The way in which the metabolic competence of pitching yeast, and hence the results of the AP test, can be affected by, e.g., the yeast growth phase and the status of the multidrug resistance system (MDR) which underlies the ability of cells to cope with chemical stress caused by xenobiotics.

The AP test developed and patented by Opekarová and Sigler, and used by them for the first time to assess the metabolic competence repeatedly pitched in the brewing process, is based on the knowledge of membrane processes taking place in yeast cells metabolizing endogenous and exogenous substrates. The main process contributing to the acidification power of yeast, i.e. the activity of the H⁺-ATPase, depends not only on cell condition (fresh cells, cells after storage, washing, etc.) but very strongly also on the growth phase. During and closely after the diauxic shift the activity of H⁺-ATPase in *S. cerevisiae* sharply drops and remains low during the post-diauxic and stationary phases. This is due to the transition of the cells to an energy saving regime in which energetically demanding processes involving high ATP consumption are downregulated. The MDR transporters exhibit a similar activity pattern.

Hollerová, I. – Sigler, K. – Kadlecová, J. – Šrogl, J.: Vitalität und Viabilität der Brauereianstellhefe: Beurteilungsmethoden und der Einfluss der Zellsysteme für Stressresistenz. Kvasny Prum. 51, 2005, Nr. 1, S. 3–7.

Zwei Hauptthemen werden behandelt: 1) die Beurteilung der Lebensfähigkeit und Stoffwechselkompetenz der Hefe mittels des Ansäuerungskrafttests (acidification power test, AP test), der biochemische Grund dieser Methode, ihre Anwendungsmöglichkeiten und Weiterentwicklung seit ihrer Einführung, und 2) die Art auf welche die Stoffwechselkompetenz der Brauereihefe im Betrieb, als auch die Ergebnisse des AP-Tests, durch die Wachstumsphase und den Zustand der Systeme der Fremdstoffresistenz (multidrug resistance, MDR), die den Zellen ermöglichen mit dem chemischen Stress zurechtzukommen, beeinflusst werden.

Der AP-Test, von Opekarová und Sigler entwickelt, patentiert und erstmals zur Bestimmung der Stoffwechselkompetenz mehrmals im Betrieb angestellter Hefe benutzt, basiert auf Kenntnissen der Membranprozesse, die in Hefezellen, die endogene als auch exogene Substrate verstoffwechseln, verlaufen. Der Hauptbestandteil des Ansäuerungsprozesses, d.h. die Tätigkeit der H⁺-ATPase, hängt nicht nur von dem Zellzustand (frische Zellen, Zellen nach Bewahrung, Waschen, usw.) sondern auch sehr stark von der Wachstumsphase ab. Während des diauxischen Übergangs und gleich danach sinkt die Aktivität der H⁺-ATPase von *S. cerevisiae* schnell und bleibt niedrig während der postdiauxischen und stationären Phase aufgrund eines Zellübergangs auf ein energetisch sparsames Regime, unter dem energetisch anspruchsvolle Prozesse mit hohem ATP-Verbrauch minimalisiert sind. Eine ähnliche Aktivitätsabhängigkeit von der Wachstumsphase weisen auch die MDR-Systeme auf.

Голлерова, И. – Сиглер, К. – Кадлцова, Й. – Шрогл, Й.: Виталита и виабилита задаточных дрожжей: методы обсуждения и влияние клеточных систем на устойчивость от стресса. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 1, стр. 3–7.

В статье рассматриваются две основные темы: 1) Обсуждение жизнеспособности и метаболизма дрожжей при помощи AP-теста, биохимические принципы настоящего метода, условия использования и постепенного развития теста с момента его введения на практику и 2) Каким образом могут на способность обмена веществ (метаболизм) в дрожжах и производственных условиях и на результаты AP-теста повлиять напр. фаза размножения клеток и состояние системы спектра устойчивости (multidrug resistance – MDR) от ксенобиотиков, что обуславливает способность дрожжей компенсировать химический стресс.

Настоящий AP-тест, разработанный и запатентованный авторами Опекарова-Сиглер, использованный в первый раз для определения силы метаболизма пивных дрожжей повторно задаваемых на пивзаводе, основан на знании процессов протекающих в мембранах клеток дрожжей, выполняющих обмен эндогенных и экзогенных субстратов. Главный процесс, участвующий в способности acidификации дрожжей, т.е. активность H⁺-ATP-азы, зависит не только от состояния клеток (свежие клетки, клетки после хранения, промывки и т.п.), но и на фазе размножения клеток. В течение диауксического перехода и после него активность H⁺-ATP-азы в случае *S. cerevisiae* резко понижается и остается низкой в течение постдиауксической и стационарной фаз. Это связано с переходом клеток к энергетически экономичному режиму, при котором минимизируется протекание энергетически требовательных процессов, включающих высокое потребление ATP. Аналогичная зависимость активности от фазы размножения имеется также у транспортеров систем MDR.

Klíčová slova: *násadní kvasnice, acidifikační schopnost, stresová rezistence, viabilita, vitalita*

Keywords: *pitching yeasts, acidification power, stress resistance, viability, vitality*

1 ÚVOD

Jedním z faktorů ovlivňujících zásadním způsobem kvalitu konečného produktu při výrobě piva je fyziologický stav a metabolická kompetence násadních kvasnic. Viabilita (tj. počet živých a mrtvých buněk v kultuře) a vitalita (fermentační a obecně metabolická schopnost buněk) kvasnic hrají tedy při výrobě piva důležitou úlohu. Vitalita se snižuje u buněk stárnoucích či starých nebo buněk vystavených stresu. Nové druhy stresu mohou vznikat např. při zavádění moderních technologií (vysoký hydrostatický tlak v CKT) nebo nových surovin (surogáty či koncentráty obsahující látky působící chemický stres). Na stanovení viability a vitality kvasnic byla vyvinuta řada metod, které lze rozdělit na metody založené na vitálním barvení, schopnosti buněk se rozmnožovat, měření obsahu důležitých látek v buňce, měření aktivity důležitých enzymů v buňkách, a konečně na měření rychlosti metabolismu a energetického stavu buněk. Všechny tyto metody mají své výhody a svá omezení a optimální stanovení „kondice“ buněk násadních kvasnic jak během propagace, tak během fermentace a skladování, a – což je velmi důležité – předpověď jejich chování během následujících fermentací zahrnuje současné použití několika technik. To ovšem vyžaduje pestré a často poměrně nákladné přístrojové vybavení.

Metody založené na vitálním barvení reprezentují v podstatě stanovení integrity plazmatické membrány kvasničných buněk, neboť barviva používaná při této technice pronikají pouze do mrtvých buněk. Často používanými barvivy jsou např. methylenová modř, methylenová violet, fluorescein diacetát nebo ANS – 1-anilino-8-naftalensulfonát (McCaig 1990 [1] a další). Výhodou této metody je její jednoduchost a skutečnost, že výsledky jsou získány prakticky okamžitě. Nevýhodou je, že korelace výsledků vitálního barvení s výsledky jiných metod stanovení buněčné viability (např. plotnových metod) je nízká. Ve své klasické formě je výsledek barvení závislý na subjektivním hodnocení obarvení buněk. Tato subjektivita je odstraněna u moderních objektivizujících optických metod, např. proudové cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie spojené s analýzou obrazu.

Stanovení reprodukční schopnosti buněk vyhodnocuje schopnost buněk tvořit kolonie. Plotnové výsevy na agaru mají výhodu v tom, že přímo stanovují proliferaci kvasničných buněk, nevýhodou je zdlouhavost stanovení (2–3 dny) a skutečnost, že u silně flokulujících buněk mohou být výsledky výsevu zkresleny. Metoda používající mikroskopických podložních sklíček do určité míry odstraňuje dlouhou kultivační dobu.

Měření obsahu důležitých látek je založeno na předpokladu, že obsah dané látky v buňkách (glykogen, nenasycené mastné kyseliny a steroly, ATP) podstatně ovlivní následující fermentaci. Jak ukazuje např. Imai [2], důležitost obsahu těchto látek jako parametrů vitality buněk závisí často na obsahu dalších látek v živném médiu (kyslík, glukosa), na teplotě a dalších faktorech.

Stanovení aktivity důležitých enzymů (maltasa, pyruvátdehydrogenasa, pyruvátdekarboxylasa, alkoholdehydrogenasa) [3] se provádí unifikovanými spektrofotometrickými metodami a poměrně dobře odpovídá fyziologickému stavu buněk.

Výsledky **stanovení metabolické rychlosti buněk**, tj. klasických měření produkce CO₂, příp. spotřeby kyslíku jsou v přímé korelaci s fermentativní schopností buněk, nepodávají však informaci o růstu buněk. Byla také nalezena korelace mezi fermentativní schopností a spotřebou kyslíku u kvasinek se sníženou viabilitou [2].

Stanovení energetického stavu buněk využívá velmi úzkého vztahu mezi energizací buněčné membrány, procesy na membráně probíhajícími a celkovým fyziologickým stavem a metabolickou kompetencí buněk. Test acidifikační schopnosti (AP test) vyvinutý a poprvé použitý Siglerem a spol. [4, 5] ke stanovení metabolické kompetence pivovarských kvasinek opakovaně nasazovaných v provozu (Plzeňský Prazdroj) je dobře použitelný pro předpověď fermentační potence násadních kvasnic v následující fermentaci na základě znalosti řady membránových pochodů probíhajících v kvasinkách metabolizujících endogenní i exogenní substráty [6]. Tyto membránové pochody, které vyústí v pokles pH vnějšího prostředí, zahrnují činnost membránové H⁺-ATPasy, výstup řady slabých kyselin vznikajících během metabolických pochodů, a transmembránové pohyby iontů. V pozdějších modifikacích AP testu není měřením parametrem extracelulární pH, ale přímo titrimetricky zjištěné množství protonů vypuzených z buněk (cumulative acidification power (CAP) či

1 INTRODUCTION

One of the key factors profoundly affecting the quality of the final product in beer production is the physiological state and metabolic competence of pitching yeast. Hence, yeast viability (i.e. the number of live and dead cells in the culture) and vitality (fermentative and, in general, metabolic ability of cells) play an important role in beer production. Vitality decreases in aging and/or stress-exposed cells. New types of stress may arise when introducing new technologies (high hydrostatic pressure in CCT) or new raw materials (surrogates or concentrates containing substances that cause chemical stress). A number of methods have been developed for assessing yeast viability and vitality; in general, they can be divided to methods based on vital staining, on cell replication, measurement of the content of important substances in the cell, measurement of activity of important enzymes in the cell, and methods based on determining the metabolic rate and energetic state of the cells. All these methods have their merits and shortcomings and an optimum determination of the „health condition“ of pitching yeast during propagation, during fermentation and storing, and – very importantly – prediction of their performance during subsequent fermentations should involve a simultaneous use of several techniques. This however requires sufficient, and sometimes rather expensive, instrumentation.

Methods based on vital staining determine in principle the integrity of the plasma membrane since the dyes used for staining penetrate, as a rule, only into dead cells. Frequently used dyes are methylene blue, methylene violet, fluorescein diacetate, ANS (1-anilino-8-naphthalene sulphonate) [1] and others. The advantage of this method is its simplicity and the results are obtained practically immediately. A disadvantage is the poor correlation of its results with the data obtained by other methods of viability assessment, e.g. plating tests. In its classical form, the result of the staining depends on the subjective evaluation by the experimenter; this subjective factor has been eliminated in modern optical methods providing objective information, e.g. flow cytometry or fluorescence microscopy with image analysis.

Methods based on cell replication determine the ability of cells to form colonies. The plating test on agar determines directly the proliferation of yeast cells but it is relatively time-consuming (2–3 days) and its results can be distorted when employed with strongly flocculating cells. The slide plating method shortens the long cultivation time to about 18 hours.

Measurement of the content of important substances in the cells is based on the assumption that the content of the given substance (glycogen, unsaturated fatty acids and sterols, ATP) markedly affects the subsequent fermentation. As shown by, e.g., [2], the applicability of the content of these substances as parameter of cell vitality depends often on the content of other substances in the nutrient medium (oxygen, glucose), on temperature and other factors.

Determination of activity of important enzymes (maltase, pyruvate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, alcohol dehydrogenase) [3] is usually done by using standardized spectrophotometric methods and corresponds relatively well with the physiological state of the cells.

The results of **determination of metabolic rate**, i.e. classical measurement of CO₂ production or oxygen consumption, are in direct correlation with the fermentative ability of cells but provide no information on cell growth. A correlation was found between the fermentative ability and oxygen consumption in yeast with lowered viability [2].

Determination of the cell energy state makes use of the close relationship between cell membrane energization, processes taking place on the membrane and the overall physiological state and metabolic competence of the cells. The acidification power test (AP test) developed by Sigler and coworkers [5, 6] and used for assessing the metabolic competence of brewery yeast used repeatedly in wort fermentation (Pilsner Urquell) can be conveniently used to predict the fermentation potency of pitching yeast in subsequent fermentation. It is based on the knowledge of a number of membrane processes taking place in yeast cells metabolizing both endogenous and exogenous substrates [6]. These membrane-sited processes, which result in an acidification of external medium, include the activity of the membrane H⁺-ATPase, efflux of a number of weak acids produced during metabolism, and transmembrane movements of ions. The parameter

titrated acidification power (TAP) [7, 8]) nebo čas nutný k dosažení normálního pH po alkalizaci buněčné suspenze (tzv. vitální titrace) [9]. Metodou navazující na tyto techniky založené na aktivní tvorbě a udržování protonového gradientu buňkami je stanovení vnitrobuněčného pH (tzv. ICP) pomocí některých fluorescenčních barviv [10].

Je třeba si uvědomit, že hlavní pochod podílející se na acidifikační schopnosti kvasinek, tj. činnost H^+ -ATPasy, závisí nejen na stavu buněk z různých fází pivovarského provozu (propagace, počty nasazení, praní atd.), ale že závisí i během fermentace velmi silně také na růstové fázi. Během diauxického přechodu a těsně po něm se aktivita H^+ -ATPasy u *S. cerevisiae* prudce snižuje a zůstává nízká během post-diauxické a stacionární fáze [11].

Podstatným krokem při posuzování výsledků AP testu je stanovení hranice, pod kterou hodnoty AP ukazují na nedostatečnou vitalitu buněk. Tato hranice se může měnit podle kmene a provozních podmínek. Je tedy výhodné stanovit referenční podmínky, ke kterým je možno výsledky získané s jednotlivými kmeny, druhy mladiny a fermentačními podmínkami vztáhnout. V rámci Výzkumného úkolu 8 „Zjišťování vlivu fyziologického stavu kvasnic na tvorbu zákalů v pivo“ jsme testovali použití standardní sušené mladiny produkované ve VÚPS jako referenčního acidifikačního substrátu. Za předpokladu, že mladina VÚPS bude nadále vykazovat vysoké a dobře reprodukovatelné hodnoty AP pro jednotlivé kmeny, lze k těmto hodnotám vztahovat hodnoty naměřené za jiných podmínek (různé kmeny, různé složení mladiny, různé obsahové látky chmele, sladu, atd.) jako ke standardu. S tímto cílem jsme stanovovali hodnoty acidifikační schopnosti u tří nejpoužívanějších kmenů spodních pivovarských kvasnic za použití glukosy, maltosy, směsi glukosy a maltosy a standardní sušené mladiny z VÚPS jako exogenních acidifikačních substrátů.

2 METODIKA

2.1 Použité kultury

Kmeny č. 2, 7 a 95 sbírky VÚPS (tab. 1) a provozní kmen č. 95 ze stejného pivovaru po 1. a 3. nasazení (tab. 2).

2.2 Příprava suspenze

Kvasničné buňky byly ze šikmého agaru přeneseny do 50 ml mladiny ve Freudenreichově baňce a kultivovány 48 h při 25 °C. Po sklizení a promytí byly kvasnice zředěny na OD cca 30 (měřeno na Shimadzu UV-1202 při 600 nm) fyziologickým roztokem. V některých případech byl pro srovnání koncentrace stanoven také počet buněk v přesně naředěné suspenzi v Bürkerově komůrce. V další fázi, při stanovování závislosti hodnoty AP na počtu nasazení, byly použity prané provozní kvasnice č. 95 (ze stejného pivovaru) po 1. a 3. nasazení.

2.3 Postup

Suspenze byla temperována na 25 °C, počáteční pH nastaveno na 6,3 a měřením jeho poklesu v časových odstupech stanoveny hodnoty AP [5] při použití různých substrátů. Ve druhé sadě pokusů se ředily získané buněčné suspenze rovněž na OD cca 30, další postup byl stejný.

3 VÝSLEDKY

Acidifikační schopnost 3 pivovarských kmenů s různými substráty. Výsledky v tab. 1 ukazují, že při použití glukosy jako substrátu jsou naměřené hodnoty AP vyšší než při použití maltosy a směsi maltosy a glukosy, a rozdíly mezi kmeny jsou zanedbatelné. S maltosou byly hodnoty AP podstatně nižší, měly mnohem větší rozptyl a objevily se markantní rozdíly mezi jednotlivými kmeny dané zřejmě rozdíly v efektivitě transportu a/nebo metabolismu maltosy. S výjimkou kmene 7 nemělo přidání glukosy k maltose očekávaný vliv na zvýšení hodnot AP, pouze podstatně

měřeno v later modifications of the AP test is not the extracellular pH but the titrimetrically determined amount of protons extruded from the cells (cumulative acidification power (CAP) or titrated acidification power (TAP) [7, 8]), or the time needed for alkalized yeast suspension to return to normal pH value (the so-called vital titration) [9]. A method related to these techniques based on the generation and maintenance of the transmembrane proton gradient is the determination of intracellular pH (ICP) by some fluorescent dyes [10].

It should be noted that the main process participating in the acidification power of yeast, i.e. the activity of the membrane H^+ -ATPase, depends not only on the status of cells in different steps of the brewing process (fresh cells, cells after storage, washing, etc.) but that, during the fermentation, it depends very strongly on the growth phase. During and after the diauxic shift the activity of the H^+ -ATPase in *S. cerevisiae* drops markedly and remains low during the post-diauxic and stationary phase [11].

An important step in evaluating the results of the AP test is the definition of the threshold below which the AP values indicate insufficient yeast vitality. This threshold may change depending on the strain and fermentation conditions. It is therefore convenient to define reference conditions to which the AP results obtained with different strains, wort lots and fermentation conditions can be referred. As part of the Research task 8 „Determination of the effect of yeast physiological state on haze formation in beer“, we tested the use of the standard RIBM wort as a reference acidification substrate. Provided the RIBM wort meets the requirements (high and highly reproducible AP values obtained with different strains) it could be used as a reference standard for AP values obtained under other conditions (different strains, different wort composition, different hops and malt components, etc.). With this aim in mind, we determined the AP values in three most frequently used strains of bottom brewery yeast with glucose, maltose, a glucose-maltose mixture and the standard RIBM wort as exogenous acidification substrates.

2 METHODS

2.1 Cultures

Strains no. 2, 7 and 95 from the RIBM collection (Table 1) and strain 95 from the same brewery after 1st and 3rd pitching (Table 2).

2.2 Suspension preparation

Yeast cells were transferred from agar slants into 50 ml wort in Freudenreich flask and cultivated for 48 h at 25 °C. Harvested and washed yeast was resuspended to OD ca 30 (measured on Shimadzu UV-1202 at 600 nm) in physiological saline. In some cases, cell counts were determined for comparison in exactly diluted suspensions in a Bürker chamber. Determination of AP value in dependence on the number of pitchings was done with washed brewery yeast no. 95 (from the same brewery) after 1st and 3rd pitching.

2.3 Procedure

The suspension was kept at 25 °C, pH was adjusted to 6.3 and AP values were determined with different substrates by measuring pH drop at intervals according to [5]. In the other set of experiments, yeast suspensions were again diluted to OD ca 30 and the subsequent procedure was the same.

3 RESULTS

Acidification power of 3 brewery strains with different substrates. The results in Table 1 show that the AP values obtained with glucose as acidification substrate are higher than with maltose or a maltose/glucose mixture and the differences between the strains were negligible. On the other hand, with maltose the AP values were much lower, their scatter was much larger and marked differences appeared among individual strains obviously due to differences in the efficacy of maltose transport and/or metabolism. With the exception

Tab. 1 / Table 1 Srovnání acidifikační schopnosti 3 kmenů v České republice běžně používaných pivovarských spodních kvasnic při použití různých substrátů / Comparison of acidification power of 3 strains of brewery bottom yeast with different substrates

Glukosa / <i>Glucose</i>			Maltosa / <i>Maltose</i>			Maltosa + glukosa/ <i>Maltose + glucose</i> 7:1			Standardní mladina VÚPS / <i>Standard</i> <i>RIBM hopped wort</i>		
					Kmen / <i>Strain</i>						
2	7	95	2	7	95	2	7	95	2	7	95
0,8 ± 0,18	0,81 ± 0,12	0,8 ± 0,16	0,64 ± 0,38	0,47 ± 0,29	0,32 ± 0,15	0,39 ± 0,11	0,54 ± 0,04	0,40 ± 0,09	1,19 ± 0,24	1,08 ± 0,21	0,96 ± 0,15
100	101	100	100	73	50	100	139	103	100	91	81

Údaje jsou uvedeny jako průměr ± SD, n = 6 pro kmeny 2 a 7, n = 7 pro kmen 95. Poslední řádek v tabulce uvádí údaje v procentech vzhledem ke kmenu 2. / The data are means ± SD, n = 6 for strains 2 and 7, n = 7 for strain 95. The bottom line shows the per cent data relative to strain 2.

snížilo rozptýl mezi jednotlivými měřeními, a výsledky byly tedy statisticky spolehlivější. Nejvyšší hodnoty AP byly naměřeny u všech kmenů při použití standardní sušené mladiny běžně vyráběné ve VÚPS [11], přičemž relativní chyba stanovení byla 15–20 %.

Zvýšení AP u třetího nasazení vzhledem k prvnímu bylo pozorováno pouze u glukosy jako substrátu. Charakteristickým rysem byla opět nejvyšší hodnota AP naměřená s mladinou VÚPS, s konzistentně nejmenší relativní chybou stanovení mezi všemi substráty (≤ 14 %). Výsledky těchto pokusů ukazují, že standardní mladina VÚPS vyhovuje nárokům na referenční acidifikační substrát.

4 DISKUSE

Z výsledků v tab. 1 a 2 plyne, že mladina VÚPS obsahuje látky příznivě ovlivňující vitalitu kvasnic měřenou pomocí AP testu. To nemusí platit u všech mladin a za všech fermentačních podmínek – např. hořké chmelové látky či taniny mohou snižovat hodnotu AP, a tedy negativně ovlivňovat vitalitu násadních kvasnic [13]. Na obranu proti škodlivému působení chemického stresu způsobeného některými látkami v prostředí jsou kvasničné buňky vybaveny systémy tzv. mnohočetné rezistence vůči xenobiotikům (multidrug resistance, MDR) [14].

Tyto systémy jsou vlastně speciální membránové transportní bílkoviny s velmi širokou substrátovou specifikou, které jsou intenzivně studovány u laboratorních kmenů, zatímco u průmyslových kmenů jim byla zatím věnována velmi malá pozornost. Ty podstatně zvyšují rezistenci buněk vůči chemickému stresu tím, že aktivně vypuzují z buněk široké spektrum cizorodých látek i toxických produktů buněčného metabolismu. Mezi látky vypuzované z exponenčních buněk patří např. fenolické látky, aminy a kvarterní amoniové sloučeniny, těžké kovy atd. MDR transportéry jsou rovněž zodpovědné za aktivní export oxidativně poškozených buněčných komponent.

5 ZÁVĚR

Aktivita MDR transportérů u kvasinek v post-diauxické fázi růstu klesá podobně jako u H^+ -ATPasy [15]. I když jsou post-diauxické buňky obecně podstatně odolnější vůči oxidativnímu a chemickému stresu než aktivně se dělící buňky exponenciální, silný pokles činnosti MDR pump během diauxického přechodu a po něm může způsobit jejich zvýšenou citlivost např. na některé součásti mladiny, surrogáty atd. Nejnovější výzkumy na laboratorních kmech *S. cerevisiae* ukazují, že aktivita MDR transportérů může být podstatně ovlivněna také složením vyčerpaného média kvasničné kultury; u provozních pivovarských kmenů tedy nelze vyloučit, že vitalita buněk bude ovlivněna složením fermentované mladiny.

Práce byla řešena v rámci Výzkumného úkolu VÚ–8: „Zjišťování vlivu fyziologického stavu kvasnic na tvorbu zákalů v pivu“.

Tab.2 / Table 2 Srovnání acidifikační schopnosti kmene č. 95 pivovarských spodních kvasnic z provozu při použití různých substrátů po prvním a třetím nasazení / Comparison of the acidification power of strain 95 of brewery bottom yeast with different substrates after the first and third pitching

Glukosa / Glucose		Maltosa / Maltose		Standardní mladina VÚPS / Standard RIBM hopped wort	
1.	3.	1.	3.	1.	3.
0,67 ± 0,16	0,71 ± 0,11	0,44 ± 0,14	0,40 ± 0,09	1,05 ± 0,15	1,05 ± 0,15
100	106	100	91	100	100

1. kvasnice po prvním nasazení / yeast after first pitching

3. kvasnice po třetím nasazení / yeast after third pitching

Údaje jsou uvedeny jako průměr ± SD, n = 10. Poslední řádek v tabulce uvádí údaje v procentech vzhledem k prvnímu nasazení. / The data are given as means ± SD, n = 10. The bottom line shows the per cent data relative to the first pitching.

of strain 7, addition of glucose to maltose did not have the expected effect of increasing the AP values but merely considerably suppressed the scatter of AP values, making the results statistically more reliable. The highest AP values were determined in all strains when using the RIBM standard dried wort [12], the relative error being 15–20 %.

Another test concerned the determination of the AP value in strain 95 on the number of yeast pitchings (Table 2). AP increase in the third pitching relative to the first one was observed only with glucose as substrate. A characteristic feature was again the highest AP value measured with RIBM wort, with the systematic

ally lowest relative error of AP assay among all substrates (≤ 14 %). The results of these tests show that the standard RIBM wort meets the demands for a reference acidification substrate.

4 DISCUSSION

The results in Tables 1 and 2 indicate that the RIBM wort contains substances that positively affect yeast vitality measured by the AP test. This, however, need not hold for all worts and all fermentation conditions – e.g. some hop substances, tannins, etc. may lower the AP value and thus negatively affect the pitching yeast vitality [13]. Yeast cells are protected against the chemical stress caused by some substances present in the wort by systems ensuring the so-called multidrug resistance (MDR) [14].

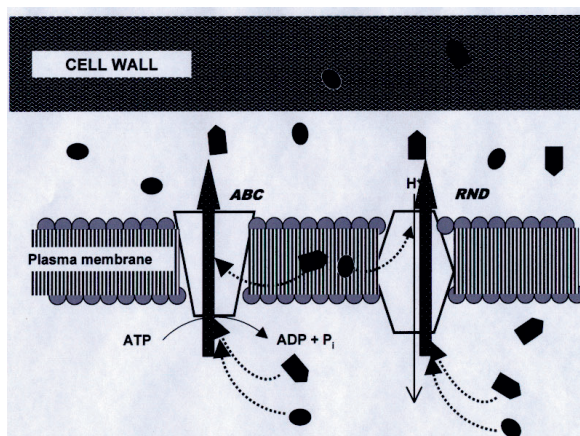
These systems are in fact particular membrane transport proteins with very broad substrate specificity, which have been very intensively studied in laboratory strains whereas very little is known about their features in industrial strains. These proteins dramatically increase cell resistance to chemical stress by actively exporting from the cells a broad spectrum of foreign substances and also toxic products of cell metabolism. Among the substances exported from exponential

cells are, e.g., phenolic substances, amines and quaternary ammonium compounds, heavy metals, etc. MDR transporters are also responsible for active extrusion of oxidatively damaged cell components.

5 CONCLUSION

The activity of MDR transporters in yeast in the post-diauxic growth phase drops similarly to the H^+ -ATPase [15]. Although post-diauxic cells are in general much more resistant to oxidative and chemical stress than actively dividing exponential cells, the strong drop in the activity of MDR pumps during and after the diauxic shift may bring about increased cell sensitivity to, e.g., some wort components, surrogates, etc. The recent data on laboratory *S. cerevisiae* strains also show that the activity of the MDR transporters may be markedly affected by the composition of the spent yeast culture medium. In brewery strains, yeast vitality can be affected by the wort composition towards the end of fermentation.

The work was supported by the Research task 8 of RIBM „Determination of the effect of yeast physiological state on haze formation in beer“.



Obr. 1 / Fig. 1 Vliv systémů zajišťujících buněčnou rezistenci vůči chemickému stresu na vitalitu kvasnic. MDR pumpy v plasmatické membráně kvasinek. ABC – MDR pumpa typu ATPasy, RND – jedna z MDR pump závislých na protonovém gradientu. Cizorodé látky, např. složky mladiny (černé útvary), které pronikají do buňky, mohou být vypuzovány na účet hydrolýzy ATP (ABC) nebo protonového gradientu (RND). / Effect of systems ensuring cellular resistance to chemical stress on yeast vitality.

MDR pumps in the yeast plasma membrane. ABC – ATPase type MDR pump, RND – one of proton gradient-dependent MDR pumps. Foreign substances, e.g. wort components (black shapes), that penetrate into the cells can be exported from the membrane lipid matrix or from cell interior at the expense of ATP hydrolysis (ABC) or H^+ gradient (RND).

Literatura / References

- [1] McCaig, R.: Evaluation of the fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid for yeast viability determination. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **48**, 1990, 22–25.
- [2] Imai, T.: The assessment of yeast vitality – the past and the future. *Brewer's Guardian*, 1999, 20–27.
- [3] Wellhoener, U., Geiger, E.: Definition of the physiological condition of a brewers yeast by means of enzyme activity measurements during propagation and fermentation. *Proc. 29th Int. Congress Eur. Brew. Conv., Contribution 55*, Dublin, Ireland, 2003.
- [4] Opekarová, M., Sigler, K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **27**, 1982, 395–403.
- [5] Šusta, J., Hodaň, J., Opekarová, M., Sigler, K.: A simple method for determining the metabolic activity of brewer's yeast during the brewing process. *Food Microbiol.* **1**, 1984, 169–171.
- [6] Sigler, K., Höfer, M.: Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 1991, 375–391.
- [7] Iserentant, D., Geenens, W., Verachttert, A.J.: Titrated acidification power: A simple and sensitive method to measure yeast vitality and its relation to other vitality measurements. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 110–114.
- [8] Patino, H., Edelen, C., Miller, J.: Alternative measures of yeast vitality: Use of cumulative acidification power and conductance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **51**, 1993, 128–132.
- [9] Rodrigues, P.G., Barros, A.A., Rodrigues, J.A., Ferreira, A.A., Goncalves, C., Hammond, J.R.M.: Yeast quality control in industrial brewing process using vital titration, a new method for vitality determination. *Proc. 29th Int. Congress Eur. Brew. Conv., Contribution 57*, Dublin, Ireland, 2003.
- [10] Imai, T., Nakajima, I., Ohno, T.: Development of a new method for evaluation of yeast vitality by measuring intracellular pH. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **30**, 1993, 109–113.
- [11] Nso, E., Goffeau, A., Dufour, J.P.: Fluctuations during growth of the plasma membrane H(+)-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiol.* **47**, 2002, 401–406.
- [12] Hrdina, P., Šmejkalová, Z., Dvořák, P., Doležel, L., Štichauer, J., Zoufalý, T.: patent č. 280844, 1996.
- [13] Mathieu, Ch., van den Berg, L., Iserentant, D.: Prediction of yeast fermentation performance using the acidification power test. *Proc. Eur. Brew. Conv.* **23**, 1991, 273–278.
- [14] Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S., Goffeau, A.: In vivo characterization of the drug resistance profile of the major MDR transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**, 1998, 143–158.
- [15] Čadek, R., Chládková, K., Sigler, K., Gášková, D.: Impact of the growth phase on membrane potential and activity of MDR-pumps of *S. cerevisiae*: effect of pump overproduction and carbon source. *Biochim. Biophys. Acta* **1665**, 2004, 111–117.

Článek byl zpracován na základě přednášky
na 32. Pivovarsko-sladařském semináři
13.–14. října 2004 v Plzni.

Based on a lecture presented
at the Brewery and Maltery Symposium,
13–14th October 2004, Pilsen.

Do redakce došlo 29. 11. 2004

Prodej a servis měřicí a regulační techniky,
vybavení laboratoří od renomovaných světových firem

STEINFURTH
Elektromechanische Mess-Systeme

PFEUFFER
Mess- und Prüfgeräte

DR. KERNCHEN
Optik · Elektronik · Automation

BÜCHI

LAUDA

Endress+Hauser

berson
UV-technik

METTLER TOLEDO

rheotec

BINDER
Best conditions for your success

odparky
termostaty
váhy
vakuové pumpy
refraktometry
viskozimetry
sušárny
UV lampy
autoklávy
kryostaty
průtokoměry
bodotávky
extrakční systémy
...

centec

je tu pro Vás

Centec automatika, spol. s r.o.

Pekařská 8, 155 00 Praha 5

Tel.: +420-257 084 111

Fax: +420-235 518 701

E-mail: prodej@centec.cz

www.centec.cz

... a další