

Charakterizace technologicky využívaných kvasinek rodu *Saccharomyces*

Characterization of Technologically Utilized Saccharomyces Yeast

Katarína KRESCANKOVÁ¹, Jana KOPECKÁ¹, Miroslav NĚMEC¹, Dagmar MATOULKOVÁ²

¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita / *Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno*
e-mail: 376098@mail.muni.cz, 223187@mail.muni.cz, nemec@sci.muni.cz

² Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / *Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague*
e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed Paper*

Krescanková, K. – Kopecká, J. – Němec, M. – Matoulková, D.: Charakterizace technologicky využívaných kvasinek rodu *Saccharomyces*. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 6, s. 174–185.

Kvasinky rodu *Saccharomyces* se využívají v procesech výroby různých kvašených nápojů a potravin po několik tisíc let. Mnohé z technologických kmenů mají hybridní původ – jejich identifikace je pak často komplikovaná. Tento článek vychází z diplomové práce, která byla zaměřena na charakterizaci 40 vybraných komerčně dostupných technologických (pivovarských, vinařských, pekařských, lihovarských) a typových kmenů kvasinek pomocí molekulárně-biologických a fenotypových metod. Cílem této studie byl výběr metody pro druhovou identifikaci kvasinek a rozlišení kmenů na základě jejich technologického zařazení. Dvě ze zvolených genotypových metod umožnily identifikaci kvasinek do úrovně druhu. U jednoho vzorku sušených kvasinek určených pro výrobu piva typu ležák bylo prokázáno zařazení mezi kvasinky svrchně kvasící. U všech kmenů byla dále testována schopnost růstu při různých teplotách a využívání vybraných cukrů za aerobních a anaerobních podmínek. Schopnost růstu na vybraných cukrech potvrdila značnou variabilitu mezi druhy rodu *Saccharomyces*. Žádná z metod neumožnila rozřazení kmenů na základě jejich technologického využití.

Krescanková, K. – Kopecká, J. – Němec, M. – Matoulková, D.: Characterization of technologically utilized *Saccharomyces* yeast. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 6, pp. 174–185.

Saccharomyces yeasts have been used for several thousand years in production of various fermented beverages and foods. Many of the technological strains have a hybrid origin and their identification is often complicated. This article is based on a diploma thesis that focused on the characterization of 40 selected commercially available technological (brewer's, wine, baker's, distillery) and type yeast strains using molecular biological and phenotypic methods. The aim of this study was to select a method for species-specific identification of yeast and discrimination of yeast strains according to their technological classification. Two of the methods enabled the identification of yeast on the species-level. One sample of dried yeast intended for lager beer production was identified as top-fermenting yeast. All strains were further tested for the ability to grow at various temperatures and utilization of selected saccharides under aerobic and anaerobic conditions. The ability to grow on selected sugars confirmed the considerable variability among species of the genus *Saccharomyces*. None of the methods under study enabled us to discriminate the yeast strains on the basis of their technological group.

Krescanková, K. – Kopecká, J. – Němec, M. – Matoulková, D.: Die Charakterisierung der technologisch angewandter Hefe der Art *Saccharomyces*. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 6, S. 174–185.

Im Zeitraum von mehreren tausend Jahren werden in den Produktionsprozessen der verschiedenen gegorenen Getränken und Lebensmitteln die Hefe der Art *Saccharomyces* angewandt. Viele von diesen technologischen Stämmen haben einen Hybridursprung – ihre Identifikation ist oft kompliziert. Dieser Artikel ist auf Basis einer Diplomarbeit, die auf Charakterisierung von 40 ausgewählten, kommerziell erhältlich technologischen Hefestämmen (Brau-, Wein-, Bäckerei-, Brennerhefe) und Hefestämmen Typen mittels molekularbiologischer und phänotypischer Methoden orientiert wurde, verfasst worden. Das Ziel der in dem Artikel abgedruckten Studien wurde eine Auswahl an Sortenidentifikation der Hefe und Auseinanderhalten von Stämmen auf Grund ihrer technologischen Klassifizierung. Zwei aus den ausgewählten Genotypenmethoden erlaubten die Hefeidentifikation bis zum Artniveau. Bei einem Muster der getrockneten Hefe, bestimmten für die Herstellung des Lagerbieres, wurde eine Klassifizierung unter obergärige Hefe nachgewiesen. Bei allen Stämmen wurde bei verschiedenen Temperaturen und unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Wachstumsfähigkeit und Ausbeutung von ausgesuchten Zuckern getestet. Die Wachstumsfähigkeit auf den ausgesuchten Zuckern hat eine beträchtliche Variabilität unter Arten der Gattung *Saccharomyces* bestätigt. Keine aus den Methoden hat auf Basis der technologischen Ausnutzung die Profilieren der Stämme ermöglicht.

Klíčová slova: identifikace, pivovarské kvasinky, lihovarské kvasinky, pekařské kvasinky, *Saccharomyces*, vinařské kvasinky

Keywords: identification, brewer's yeast, distiller's yeast, baker's yeast, *Saccharomyces*, wine yeasts

1 ÚVOD

Technologické kmeny kvasinek (zejména *Saccharomyces cerevisiae*) mají nezastupitelný význam – jsou využívány v potravinářském průmyslu (výroba kynutého pečiva, alkoholických nápojů, potravinářské a krmné biomasy), ve farmacii, v některých oblastech vědy a výzkumu (např. jako modelové systémy pro studium obecných regulací metabolismu a genetiky eukaryotických buněk), při produkci biologicky aktivních látek, organických kyselin, vitaminů) atd.

Již v dávných dobách si lidé všimli, že při dlouhodobém skladování různých ovocných šťáv dochází k jejich změně na alkoholické nápoje. Jednalo o spontánní fermentace způsobené přirozeně se vyskytujícími bakteriemi a kvasinkami. Později bylo pozorováno, že

1 INTRODUCTION

Technological strains of yeast (especially *Saccharomyces cerevisiae*) are indispensable for human population – they are used in food industry (production of leavened pastries, alcoholic beverages, food and feed biomass), pharmaceuticals, in some areas of science and research (e.g. as model systems for the study of general regulation of metabolism and genetics of eukaryotic cells), production of biologically active substances, organic acids, vitamins, etc.

Already in ancient times people noticed that long-term storage of various fruit juices leads to their conversion to alcohol. This was due to spontaneous fermentation caused by naturally occurring bacteria and yeast. Later it was observed that the speed and quality of the

rychlost a kvalitu kvasného procesu lze zvýšit přidáním malé dávky produktu předchozí fermentace (Steensels a Verstrepen, 2014). Proces kvašení byl nazván fermentace podle latinského slova „fervere“, což znamená „vařit“ – toto pojmenování vzniklo z pozorování bublin v sudech obsahujících kvasící hrozny (Alba-Lois a Segal-Kischinevzky, 2010).

V roce 1680 kvasinky mikroskopicky pozoroval Antonie van Leeuwenhoek (Barnett, 1998). V 19. století formuloval Louis Pasteur základní reakce procesu kvašení a v knihách „Études sur la Bière“ a „Études sur la vin“ popsal nemoci piva a vína (Polaina, 2002). Koncem 19. století vypracoval Emil Christian Hansen několik technik izolace čisté kvasničné kultury a v roce 1883 jednu z nich (*Saccharomyces carlsbergensis*, dnes přejmenovaná na *S. pastorianus*) začala používat firma Old Carlsber Brewery na výrobu piva typu ležák (Steensels a Verstrepen, 2014; Polaina, 2002). Pravděpodobně první, kdo získal čistou kulturu pro výrobu svrchně kvašeného piva, byl v roce 1888 Belgičan August Joseph François de Bavay (Parsons, 1981), v roce 1890 pak Müller-Thurgau použil čistou kulturu kvasinek v procesu výroby vína (Pretorius, 2000).

Pivovarské kvasinky jsou řazeny do dvou druhů – *Saccharomyces pastorianus* na výrobu piva spodním kvašením a *Saccharomyces cerevisiae* pro svrchně kvašená piva. Pivovarské kmeny jsou typické polyploidii (výskyt tří a více chromozomových sad v buňce), nejčastěji tetraploidii nebo aneuploidii (ne všechny chromosomy jsou zastoupeny ve stejném počtu) (Legras et al., 2007; Matoulková a Šavel, 2007). Kmeny *S. pastorianus* se na základě molekulárně-genetických analýz dělí do dvou skupin: Saaz a Froberg (Dunn a Sherlock, 2008). Skupina Saaz zahrnuje kvasinky používané k výrobě pilsenského typu piva (Česká republika) a kmeny pivovaru Carlsberg (Dánsko). Do skupiny Froberg patří holandské kmeny (Heineken), dánské kmeny (kromě těch ze skupiny Saaz) a např. kmen Weiherstephan W34/70. Jsou přizpůsobené podmínkám kvašení při nižších teplotách (8–14 °C) a využívají cukr melibiosu. Pro kvasinky druhu *S. cerevisiae*, které se používají na výrobu piva svrchním kvašením (např. piva pšeničná, ale, altbier, stout, at.), je typická fermentace při vyšších teplotách (18–24 °C) a na rozdíl od spodních kvasinek melibiosu nevyužívají (Lodolo et al., 2008).

Tradiční výroba vína je založená na kvašení hroznového moštu mikroflórou přirozeně se vyskytující na bobulích. V průběhu kvašení se dynamika výskytu aktivity různých druhů kvasinek mění – na začátku fermentace převládají kvasinky rodu *Kloeckera*, *Hanseniaspora* a *Candida*, v konečných fázích dominuje druh *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000). Oproti pivovarským kvasinkám jsou vinařské odolnější k alkoholu a do moštu se dostávají buď s povrchu bobulí (spontánní kvašení) nebo přidáním čisté kultury ušlechtilých kvasinek (čistě kvašení). Kulturní vinařské kvasinky patří do druhů *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Vhodný typ kvasinky se vybírá např. na základě geografické oblasti, klimatu, typu hrozna a požadovaných vlastností vína. Čisté kultury jsou využívány také

fermentací procesu lze zvýšit přidáním malé dávky produktu z předchozí fermentace (Steensels a Verstrepen, 2014). The process was named fermentation after the Latin word “fervere” which means “to cook” – this name originated from the observation of bubbles in vats containing fermenting grapes (Alba-Lois and Segal-Kischinevzky, 2010).

In 1680, Antonie van Leeuwenhoek observed yeast microscopically (Barnett, 1998). In the 19th century, Louis Pasteur formulated the basic reactions of fermentation and described the diseases of beer and wine in the books “Études sur la Bière” and “Études sur la vin” (Polaina, 2002). In the late 19th century, Emil Christian Hansen developed several techniques for isolation of pure yeast cultures, and in 1883 one of them (*Saccharomyces carlsbergensis*, now renamed *S. pastorianus*) began to be used by the Old Carlsber Brewery company for producing lager type beer (Steensels and Verstrepen, 2014; Polaina, 2002). Probably the first to produce a pure culture for the production of top-fermented beer was the Belgian François Joseph de Bavay in August 1888 (Parsons, 1981). Then in 1890 Müller-Thurgau used pure yeast culture in a wine-making process (Pretorius, 2000).

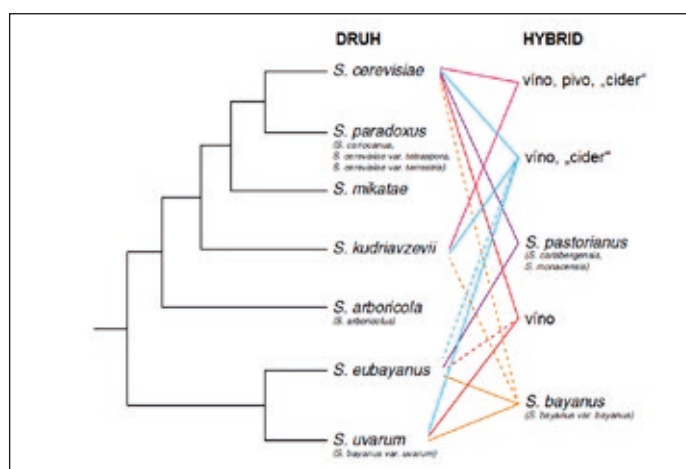
Brewer's yeast is classified into two species – *Saccharomyces pastorianus* for bottom beer fermentation and *Saccharomyces cerevisiae* for the top-fermented beer. Brewer's strains are typical by their polyploidy (the presence of three or more sets of chromosomes in the cell) and are mostly tetraploid or aneuploid (not all chromosomes are represented in equal numbers) (Legras et al., 2007; Matoulková a Šavel, 2007). On the basis of molecular genetic analyses, strains of *S. pastorianus*, have been divided into two groups: Saaz and Froberg (Dunn and Sherlock, 2008). The Saaz group includes yeast used to produce Pilsner-type beer (Czech Republic) and the strains of the Carlsberg brewery (Denmark). Froberg includes a group of Dutch strains (Heineken), Danish strains (except for those from Saaz) and e.g. Weiherstephan strain W34/70. Species *S. pastorianus* is adapted to the conditions of fermentation at lower temperatures (8–14 °C) and to utilizing the sugar melibiose. Typical for yeast of the species *S. cerevisiae*, which is used for top beer fermentation (e.g. wheat beer, ale, Altbier, stout, etc.), is fermentation at higher temperatures (18–24 °C), and, unlike the bottom yeast, it does not utilize melibiose (Lodolo et al., 2008).

Traditional wine production is based on the fermentation of grape must by the microflora naturally occurring on the berries. The dynamics of occurrence and activity of various types of yeast varies during fermentation – species *Kloeckera*, *Hanseniaspora* and *Candida* are prevalent at the beginning of fermentation and *Saccharomyces cerevisiae* dominates in the final stages (Pretorius, 2000). Compared to brewing, wine yeasts are more resistant to alcohol and come into the must either from the surface of berries (spontaneous fermentation) or by adding a pure culture of noble yeast (pure fermentation). Cultural wine yeast belong to the species *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. A suitable type of yeast is chosen, e.g., based on a geographic area, climate, type of grape and the desired characteristics of the wine. Pure cultures are also used for specific fermentation in bottles in the production of sparkling wines (Bekatorou et al., 2006).

Strains of *S. cerevisiae* are used also as distillery yeast. Distillery yeast is characterized by a high tolerance to ethanol (and stress factors in general), high fermentation rate, high yield per unit of substrate consumed and a small amount of side products such as esters, fatty acids, etc. (Bekatorou et al., 2006).

Baker's yeast strains of *S. cerevisiae* transform sugars present in the dough to carbon dioxide and a limited amount of ethanol. Compared to brewing or distillery yeast, baker's yeast strains are not selected for the production of alcohol, but for the production of carbon dioxide that leavens the pastry (Šilhánková, 2002).

The genus *Saccharomyces* currently contains nine species: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus*, *S. uvarum* and two hybrid species *S. pastorianus* and *S. bayanus* (Fig. 1). *S. bayanus* and *S. pastorianus* are able to grow at lower temperatures, and unlike other *Saccharomyces* species they do not grow at temperatures above 37 °C (Rainieri et al., 2003). The genus *Saccharomyces* is capable of interspecific hybridization; depending on what type of hybridization occurs, genetic information is also shared in the form of chromosomal and mitochondrial DNA (Marinoni et al., 1999). Interspecific hybridization occurs naturally between *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* and between *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. One of the possible causes is taken to be an evolutionary adaptation to different environments – the resulting hybrids acquire beneficial properties from the parent cells (Belloch et al., 2008; Lopandic et al., 2007; Masneuf et al., 1998; Matzke et al., 1999).



Obr. 1 Schematický kladogram zobrazující fylogenetický vztah mezi druhy rodu *Saccharomyces* a často izolovanými hybridy. Přerušované čáry představují přenos 1/4 až 1/3 genetické informace z druhu do hybridu (Boynton a Greig, 2014, upraveno) / Fig. 1 Schematic cladogram showing phylogenetic relationships between species of the genus *Saccharomyces* and often isolated hybrids. Dashed lines represent transmission of 1/4 to 1/3 of the genetic information from the species to the hybrid (Boynton and Greig, 2014, modified)

na specifické fermentace v lahvích při výrobě šumivých vín (Bekatorou et al., 2006).

Jako lihovarské kvasinky jsou používány kmeny *S. cerevisiae*. Pro lihovarské kvasinky je typická vysoká tolerance k ethanolu (a stresovým faktorům obecně), vysoká rychlost kvašení, vysoký výtěžek na jednotku spotřebovaného substrátu a malé množství vedlejších produktů jako jsou estery, mastné kyseliny atd. (Bekatorou et al., 2006).

Pekařské kvasinky *S. cerevisiae* přeměňují cukry přítomné v těstě na oxid uhličitý a v omezené míře na ethanol. Oproti pivovarským či lihovarským kvasinkám, se pekařské kmeny nevybírají kvůli produkci alkoholu, ale na základě tvorby oxidu uhličitého, aby pečivo vykynulo (Silhánková, 2002).

V současnosti je v rámci rodu *Saccharomyces* platných 9 druhů: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus*, *S. uvarum* a dva hybridní druhy *S. pastorianus* a *S. bayanus* (obr. 1). *Saccharomyces bayanus* a *S. pastorianus* jsou schopny růst při nižších teplotách, oproti ostatním druhům rodu *Saccharomyces* nerostou při teplotách nad 37 °C (Rainieri et al., 2003). U rodu *Saccharomyces* může docházet k mezidruhové hybridizaci – podle toho, k jakému typu hybridizace dojde, dochází i k odevzdávání genetické informace v podobě chromosomální a mitochondriální DNA (Marinoni et al., 1999). K mezidruhové hybridizaci přirozeně dochází mezi *S. cerevisiae* a *S. kudriavzevii* a mezi *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Za jednu z možných příčin se považuje evoluční adaptace na různá prostředí – vzniklé hybridy získávají od rodičovských buněk výhodné vlastnosti (Belloch et al., 2008; Lopandic et al., 2007; Masneuf et al., 1998; Matzke et al., 1999).

Druhy v rámci rodu *Saccharomyces* jsou si blíže příbuzné, a tím často velmi těžko odlišitelné. Morfologické a fyziologické testy neposkytují dostatečné rozlišení – limitací těchto technik je nestabilní morfologie kvasinkové buňky, která se mění v závislosti na podmínkách prostředí. Rozdílnost mezi dvěma taxony je navíc někdy založená na malém počtu fyziologických vlastností – mutace i jen jediného genu tak může vést k nesprávné identifikaci. Výsledky biochemických testů, zejména těch založených na rozdílech ve využívaní cukrů, jsou u jednotlivých druhů kvasinek často variabilní (Kurtzman et al., 2011; Rainieri et al., 2003). Genotypové metody v taxonomii kvasinek se zaměřují na odlišnosti ve struktuře nukleových kyselin a některé z nich umožňují diskriminaci až na úroveň kmene. Nejčastěji se využívají geny rRNA, např. variabilní doména 1 a 2 (D1, D2) nebo vnitřní prepisovaná oblast (ITS). Ribosomy mají společný evoluční původ – mezi variabilními sekvencemi se nachází vysoce konzervované oblasti. Mezi běžně používané identifikační techniky patří např. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; polymorfismus délky restrikčních fragmentů), ribotypizace, profilování plasmidů, stanovení procentuálního poměru G+C, DNA-DNA hybridizace, analýza mitochondriální DNA, denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), pulzní gelová elektroforéza atd. (Kopecká et al., 2014a).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Mikroorganismy

Kmeny pivovarských kvasinek, které byly použity v této práci, pochází od různých výrobců sušených kvasnic, kmeny pekařských kvasinek byly získány izolací z pekařského droždí, tři kmeny poskytl Technická univerzita v Mnichově (TUM), jeden kmen pochází z Národní sbírky kvasinkových kultur (NCYC). Typové kmeny pochází z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ). Seznam kmenů, jejich označení a bližší specifikace jsou uvedeny v tab. 1. Použito bylo 11 kmenů svrchního kvašení *S. cerevisiae*, 4 kmeny spodních pivovarských kvasinek *S. pastorianus*, 8 kmenů vinařských, 9 lihovarských a 5 kmenů pekařských kvasinek druhu *S. cerevisiae* a typové kmeny *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* a *S. bayanus* (tab. 1).

2.2 Izolace a kultivace čistých kultur

Sušené pivovarské, vinařské, lihovarské a pekařské kvasinky, a čerstvé pekařské droždí (vždy po 1 gramu) byly inkubovány v 10 ml 2% sladidového bujónu (20 g sladidového extraktu, 1000 ml destilované vody) 24 hodin při teplotě 25 °C. Následně bylo 100 µl kultury převedeno na Petriho misku s 2% sladidovým agarem (20 g sladidového extraktu, 20 g agar, 1000 ml destilované vody) a inkubováno 24 hodin při teplotě 25 °C. Po kultivaci byla křížovým roztěrem vyizolovaná kultura až do jednotlivých kolonií – postup přeočkování křížovým roztěrem byl opakován třikrát, vždy z jedné kolonie. Přechystěné kmeny byly uchovávány při teplotě 2–4 °C a přeočkovávány každých 5–6 týdnů na čerstvé médium.

The species within the genus *Saccharomyces* are closely related and they are often very difficult to distinguish. Morphological and physiological tests do not provide sufficient resolution – the limitation of these techniques is unstable yeast cell morphology, which varies depending on environmental conditions. Differentiation between two taxa is also sometimes based on a small number of physiological properties – even a mutation of a single gene can lead to misidentification. The results of biochemical assays, particularly those based on differences in the utilization of sugars by individual yeast species, are often variable (Kurtzman et al., 2011; Rainieri et al., 2003). Genotypic methods in yeast taxonomy focus on differences in the structure of nucleic acids and some of them permit discrimination to the level of strain. The most commonly used are rRNA genes, e.g. the variable domain 1 and 2 (D1, D2) or the internal transcribed region (ITS). Ribosomes have a common evolutionary origin, highly conserved regions occurring between the variable sequences. The commonly used identification techniques include, e.g., RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ribotyping, plasmid profiling, determination of the percentage of G + C ratio, DNA-DNA hybridization, mitochondrial DNA analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), pulse field gel electrophoresis, etc. (Kopecká et al., 2014a).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganisms

Brewer's yeast strains that have been used in this work come from different manufacturers of dried yeast, baker's yeast strains were obtained by isolation from baker's yeast, three strains were provided by the Technical University of Munich (TUM), one strain comes from the National Collection of Yeast Cultures (NCYC). Type strains come from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). The strains, their designation and further specifications are listed in Table 1. We used 11 top-fermenting brewer's strains of *S. cerevisiae*, 4 strains of bottom brewing yeast *S. pastorianus*, 8 strains of wine, 9 distillery strains and 5 strains of baker's yeast species *S. cerevisiae*, and type strains *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* and *S. bayanus* (Tab. 1).

2.2 Isolation and culturing of pure cultures

Dried brewer's, wine, distillery and baker's yeast and fresh baker's yeast (in all cases 1 gram) were incubated in 10 ml of 2% malt wort broth (20 g of malt wort extract, 1000 ml distilled water) for 24 hours at 25 °C. Subsequently, 100 µl of the culture was transferred to a Petri dish with 2% malt agar (20 g malt wort extract, 20 g agar, 1000 ml distilled water) and incubated for 24 hours at 25 °C. After culturing, cross plating was used to isolate cultures down to individual colonies. The cross plating procedure was repeated three times, always from a single colony. Purified strains were stored at 2–4 °C and subcultured every 5–6 weeks onto fresh medium.

2.3 DNA isolation

Cultures for DNA isolation were prepared by inoculating 1 colony into 5 ml of YPD medium (10 g yeast extract, 20 g peptone, 20 g glucose, 1000 ml distilled water), and culturing for 24 hours at 25 °C with shaking at a frequency of 100 rpm. Yeast DNA was isolated by phenol-chloroform extraction according to Kopecká et al. (2014b).

2.4 PCR of ITS and HIS4 gene

PCR was performed in a volume of 25 µl of a reaction mixture in a LabCycler thermocycler (Sensoquest Labcycler, Germany). Primers were supplied by KRD (Czech Republic). The sequences of the primers used and references are given in Table 2. The PCR mixture contained 12 µl of PPP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 11 µl of the PCR water, 0.5 µl of each primer (i.e. ITS1 and ITS4 for detection of the ITS area and HIS4-U, and HIS4-L for the detection of gene HIS4) and 1 µl of a template DNA. PCR parameters for ITS: i) 95 °C / 3 min; ii) 33 cycles: 95 °C / 45 s, 55 °C / 30 s, 72 °C / 45 sec; iii) 72 °C / 7 min. Parameters for PCR HIS4: i) 94 °C / 4 min; ii) 30 cycles of: 94 °C / 30 s, 54 °C / 30 s, 72 °C / 2.5 min; iii) 72 °C / 7 min. PCR products were separated by gel electrophoresis in 1% agarose gel with 0.5M TBE buffer (5.4 g Tris, 2.45 g boric acid, 2 ml of 0.5M EDTA, 1000 ml distilled water). The gel wells were supplied with 5 µl of the PCR product and 5 µl of DNA marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, USA), electrophoresis was carried out for 180 min/50 V. Ethidium bromide staining (1 mg/l / 60 min) was carried out after the electrophoresis. Visualization was performed by the photodokumentation device Transilluminator G: Box F3 (Syngene, USA).

Tab. 1 Použité kmeny kvasinek / Table 1 Yeast strains used in the study

Druh (dle výrobce) / Species (according to the supplier)	Technologické zařazení / Technological classification	Kmen / Strain
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Cabernet UC331 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Sauvignon LWO7 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Merlot 4882 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Chardonnay LWO5 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Syrah LW 07 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Collection Cépage Pinot LW 06 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské / wine	Fermivin 7013 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	vinařské (sektové) / wine (sparkling wine)	TUM S1
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Belle Saison Ale Yeast (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Nottingham Ale Yeast (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Munich Wheat Beer Yeast (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Windsor British Ale Yeast (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Safale US-05 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Safale S-04 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Safbrew WB-06 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (sekundární kvašení v lahvích a sudech) / brewing (secondary fermentation in bottles and casks)	Safbrew F-2 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Safbrew S-33 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Safbrew T-58 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (svrchní) / brewing (ale)	Altbier Yeast TUM 308
<i>S. pastorianus</i>	pivovarské (spodní) / brewing (lager)	NCYC 396 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (spodní) / brewing (lager)	Saflager W-34/70 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (spodní) / brewing (lager)	Saflager S-23 (Fermentis)
<i>S. cerevisiae</i>	pivovarské (spodní) / brewing (lager)	Brewferm Lager (Brouwland)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Coobra 6 Magnum (CBF DRINKIT AB)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Mini Turbo Alcohol Yeast (Gert Strand AB)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Batch Turbo Yeast 14% (Gert Strand AB)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Rum Turbo (Gert Strand AB)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Fermiol ^a
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	DistilaMax GW (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	DistilaMax SR (Lallemand)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	Spirifer (Erbslöh Geisenheim)
<i>S. cerevisiae</i>	lihovarské / distillery	TUM D2 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	pekařské / baker's	čerstvé droždí / fresh leaven (Uniferm)
<i>S. cerevisiae</i>	pekařské / baker's	čerstvé droždí / fresh leaven (Fala)
<i>S. cerevisiae</i>	pekařské / baker's	sušené droždí / dried leaven (Labeta)
<i>S. cerevisiae</i>	pekařské / baker's	sušené droždí / dried leaven (Tesco)
<i>S. cerevisiae</i>	pekařské / baker's	sušené droždí / dried leaven (Dr.Oetker)
<i>S. cerevisiae</i>	typový kmen / type strain	DSM 70449 ^{T d}
<i>S. pastorianus</i>	typový kmen / type strain	DSM 6580 ^{T d}
<i>S. bayanus</i>	typový kmen / type strain	DSM 70412 ^{T d}

^aOK SERVIS BioPro Collection, s.r.o., Praha, Česká republika; ^bTUM – Technická universita v Mnichově / Technische Universität München, Germany; ^cNCYC – Národní sbírka kvasinkových kultur / National Collection of Yeast Cultures, Norwich, United Kingdom; ^dDSMZ – Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur / German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany

Tab. 2 Použité primery / Table 2 Primers used in the study

Primer	Sekvence (5' – 3')	Reference
HIS4-U HIS4-L	ACT CTA ATA GTG ACT CCG AAC TTG GGA GTC AAT ACC	Casaregola et al. (2001)
ITS1 ITS4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT TGC	Valente et al. (1996)
primer 21	GCT CGT CGC T	Tornai-Lehoczki a Dlauchy (2000)
Sbay F1 Sbay R1 Scer F2 Scer R2 Seub F3 Seub R2	GCT GAC TGC TGC TGC TGC CCC CG TGT TAT GAG TAC TTG GTT TGT CG GCG CTT TAC ATT CAG ATC CCG AG TAA GTT GGT TGT CAG CAA GAT TG GTC CCT GTA CCA ATT TAA TAT TGC GC TTT CAC ATC TCT TAG TCT TTT CCA GAC G	Pengelly a Wheals (2013)

2.3 Izolace DNA

Kultury pro izolaci DNA byly připraveny naočkováním 1 kolonie do 5 ml YPD média (10 g kvasničného extraktu, 20 g peptonu, 20 g glukosy, 1000 ml destilované vody) a kultivací 24 hodin při teplotě 25 °C, za třepání s frekvencí 100 kvů za minutu. Kvasničná DNA byla izolována pomocí fenol-chloroformové extrakce podle Kopecké et al. (2014b).

2.4 PCR oblasti ITS a genu *HIS4*

PCR probíhala v objemu 25 µl reakční směsi, v termocykleru Lab-Cycler (Sensoquest Labcycler, Německo). Primery byly dodány firmou KRD (Česká republika). Sekvence použitých primerů a referenční jsou uvedeny v tab. 2. PCR směsi obsahovaly 12 µl PPP Master Mixu (Top-Bio, Česká republika), 11 µl PCR vody, 0,5 µl každého z primerů (tedy ITS1 a ITS4 pro detekci oblasti ITS a *HIS4*-U a *HIS4*-L pro detekci genu *HIS4*) a 1 µl templátové DNA. Parametry PCR pro ITS: i) 95 °C / 3 min; ii) 33 cyklů: 95 °C / 45 s, 55 °C / 30 s, 72 °C / 45 s; a iii) 72 °C / 7 min. Parametry PCR pro *HIS4*: i) 94 °C / 4 min; ii) 30 cyklů: 94 °C / 30 s, 54 °C / 30 s, 72 °C / 2,5 min; a iii) 72 °C / 7 min. PCR produkty byly separovány gelovou elektroforezou v 1% agarosovém gelu s 0,5M TBE puřem (5,4 g Tris, 2,45 g kyseliny borité, 2 ml 0,5M EDTA, 1000 ml destilované vody). Do jamek na gelu bylo nanášeno 5 µl produktu PCR a 5 µl DNA markeru (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, USA), elektroforesa probíhala 180 min / 50 V. Barvení ethidium bromidem (1 mg/l / 60 min) proběhlo po ukončení elektroforesy. Vizualizace proběhla pomocí fotodokumentačního zařízení Transluminátor G:Box F3 (Syngene, USA).

2.5 Štěpení PCR produktů restrikčními endonukleasami

PCR produkty byly štěpeny restrikčními endonukleasami – produkt reakce *HIS4* byl štěpen enzymy *EcoRV* a *HindIII*, produkt amplifikace oblasti ITS enzymem *HaeIII* (Fermentas, USA). Místa štěpení enzymů: *HaeIII* GG/CC, *HindIII* A/AGCTT, *EcoRV* GAT/ATC. Štěpení PCR produktů jednotlivými enzymy probíhalo v separátních reakcích. Složení reakčních směsí: 8,5 µl sterilní vody, 2 µl puřru pro enzym, 8,5 µl PCR produktu, 1 µl enzymu. Takto připravené reakční směsi byly inkubovány minimálně 2–3 hodiny v termostatu při 37 °C. Produkt štěpení byl ověřen gelovou elektroforezou s 2% agarosovým gelem. Do jamek na gelu bylo nanášeno 10 µl produktu štěpení a 5 µl DNA markeru.

2.6 RAPD-PCR

PCR směs obsahovala 12 µl PPP Master Mixu (Top-Bio, Česká republika), 11,5 µl PCR vody, 0,5 µl primeru p21 a 1 µl templátové DNA. Parametry PCR: i) 93 °C / 3 min; ii) 35 cyklů: 93 °C / 60 s, 38 °C / 60 s, 72 °C / 2 min; a iii) 72 °C / 5 min. PCR produkty byly separovány a vizualizovány stejně jako při detekci oblasti ITS a genu *HIS4*.

2.7 Multiplex PCR

PCR směs obsahovala 12 µl PPP Master Mixu (Top-Bio, Česká republika), 9 µl PCR vody, 0,5 µl každého z primerů (Sbay F1, Sbay R1, Scer F2, Scer R2, Saub F3, Seub R2) a 1 µl templátové DNA. Parametry PCR: i) 94 °C / 5 min; ii) 35 cyklů: 94 °C / 60 s, 55 °C / 60 s, 72 °C / 60 s; a iii) 72 °C / 2 min. PCR produkty byly separovány a vizualizovány stejně jako při detekci oblasti ITS a genu *HIS4*.

2.8 Test využívání vybraných cukrů a růstu při různých teplotách

Kmeny kvasinek byly testovány na využívání vybraných cukrů (galaktosa, maltosa, melibiosa, sacharosa a trehalosa) za aerobních a anerobních podmínek podle Kurtzman et al. (2011). Nárůst byl odečítán po 7 dnech inkubace v průběhu následujících 3 týdnů (aerobně), 4 týdnů (anaerobně) při teplotě 25 °C. Kmeny kvasinek byly dále charakterizovány na základě svého růstu při různých teplotách (25, 34 a 37 °C). Inkubace probíhala na 2% sladinovém agaru po dobu max. 96 hodin.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

PCR amplifikace oblasti ITS potvrdila zařazení všech testovaných kmenů do rodu *Saccharomyces*. Fragment s velikostí 855 bp se vytvořil u všech kmenů (tab. 3). Molina et al. (1992) zjistili, že velikost PCR produktu s primery komplementárními k ITS oblasti je u druhů *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a *S. pastorianus* přibližně 850 bp, zatímco *S. kluyveri* (nyní *Lachancea kluyveri*) poskytuje fragment o velikosti 700 bp. Pro rozlišení mezi druhy se využívá restrikční analýza ITS regionu pomocí enzymů (Valente et al., 1996; Pham et al., 2011). Štěpení PCR produktu enzymem *HaeIII* umožňuje rozlišení druhů

2.5 Digestion of PCR products with restriction endonucleases

PCR products were digested with restriction endonucleases – *HIS4* reaction product was digested with the enzymes *EcoRV* and *HindIII*, the product of amplification of the ITS region by the *HaeIII* enzyme (Fermentas, USA). Cleavage sites of enzymes: *HaeIII* GG/CC, *HindIII* A/AGCTT, *EcoRV* GAT/ATC. Digestion of the PCR products was carried out by individual enzymes in separate reactions. Composition of reaction mixture: 8.5 µl of sterile water, 2 µl of enzyme buffer, 8.5 µl of PCR product, 1 µl of enzyme. The reaction mixtures were incubated for at least 2 to 3 hours in a thermostat at 37 °C. Cleavage product was verified by gel electrophoresis in 2% agarose gel. Gel wells were supplied with 10 µl of digestion products and 5 µl DNA marker.

2.6 RAPD-PCR

The PCR mixture contained 12 µl of PPP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 11.5 µl PCR water, 0.5 µl of p21 primer and 1 µl of template DNA. PCR Parameters: i) 93 °C / 3 min; ii) 35 cycles of: 93 °C / 60 s, 38 °C / 60 s, 72 °C / 2 min; iii) 72 °C / 5 min. PCR products were separated and visualized as in the detection of ITS region and the *HIS4* gene.

2.7 Multiplex PCR

The PCR mixture contained 12 µl of PPP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 9 µl of PCR water, 0.5 µl of each primer (Sbay F1, Sbay R1, Scer F2, Scer R2, Saub F3, Seub R2) and 1 µl of a template DNA. PCR parameters: i) 94 °C / 5 min; ii) 35 cycles of: 94 °C / 60 s, 55 °C / 60 s, 72 °C / 60 sec; iii) 72 °C / 2 min. PCR products were separated and visualized as in the detection of ITS region and the *HIS4* gene.

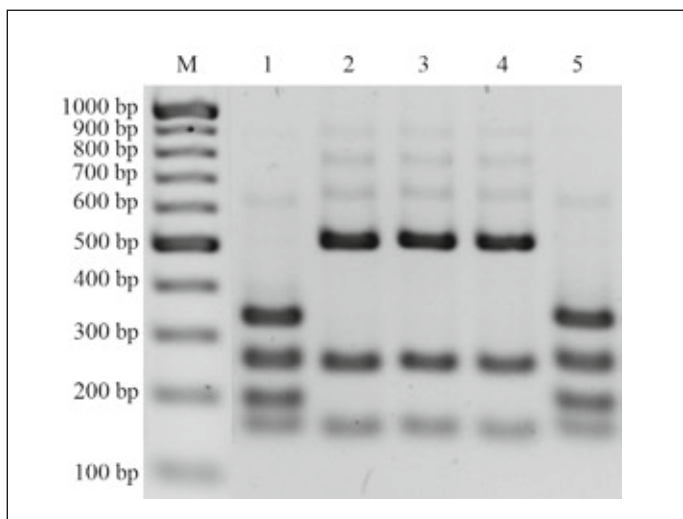
2.8 Test of the utilization of selected sugars and growth at different temperatures

Yeast strains were tested for the utilization of selected sugars (galactose, maltose, melibiose, sucrose and trehalose) under aerobic and anaerobic conditions according to Kurtzman et al. (2011). The growth was measured after 7 days of incubation over the next 3 weeks (aerobically) or 4 weeks (anaerobically) at 25 °C. Yeast strains were further characterized on the basis of their growth at various temperatures (25, 34 and 37 °C). Incubation was carried out on 2% malt agar for a maximum of 96 hours.

3 RESULTS AND DISCUSSION

PCR amplification of ITS region confirmed the inclusion of all tested strains into the genus *Saccharomyces*. A fragment with the size of 855 bp was formed in all strains (Table 3). Molina et al. (1992) found that the size of the PCR product with primers complementary to the ITS region in the species *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* is approximately 850 bp, while the *S. kluyveri* (currently *Lachancea kluyveri*) provides a fragment of about 700 bp. Restriction analysis of the ITS region using enzymes has been performed to distinguish between species (Valente et al., 1996; Pham et al., 2011). Digestion of the PCR product by the *HaeIII* enzyme makes it possible to distinguish species within the genus *Saccharomyces*, but not between *S. pastorianus* and *S. bayanus* (McCullough et al., 1998). As assumed, the type strains of *S. pastorianus* and *S. bayanus* exhibited the same restriction pattern with three fragments (Fig. 2). In wine, baker's, distillery, and top brewing yeast strains and the type strain of *S. cerevisiae*, the cleavage led to the formation of four fragments, which are according to McCullough et al. (1998) typical for the species *S. cerevisiae*. Only one strain of bottom brewer's yeast (NCYC 396) showed the same restriction profile as the type *S. pastorianus* strain, the remaining three strains having the same restriction pattern as *S. cerevisiae*. Digestion of the PCR product by the *HaeIII* enzyme was found to be unsuitable for identification of technological *Saccharomyces* yeasts at the species level.

Using restriction analysis of the *HIS4* gene one can determine the presence of alleles specific for either *S. cerevisiae* or *S. bayanus*; the presence of both specific alleles points to the hybrid strain of *S. pastorianus* (Casaregola et al., 2001). Amplification of *HIS4* gene of the genus *Saccharomyces* gives rise to a fragment of 2.1 kb which, after cleavage with *EcoRV*, partitions in *S. bayanus* into two fragments sized 1700 bp and 500 bp. The region of the *HIS4* gene in *Saccharomyces cerevisiae* contains a cleavage site for this enzyme, the product therefore remains in its original size. The bottom brewing yeast Saflager W-34/70, S-23 Saflager and NCYC 396 and



Obr. 2 Výsledky štěpení PCR produktu (oblast ITS) enzymem *HaeIII* / Fig. 2 Results of digestion of the PCR product (ITS region) by *HaeIII* enzyme

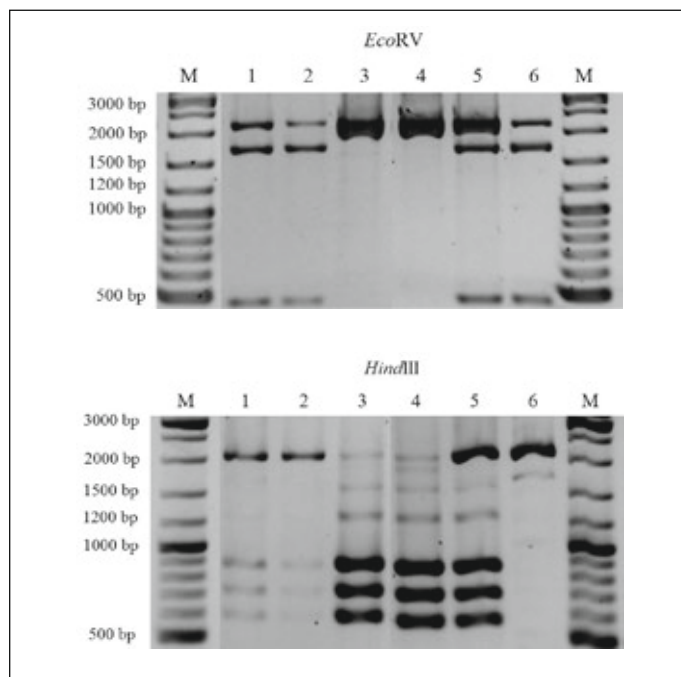
1 – *S. cerevisiae* DSM 70449^T; 2 – *S. pastorianus* DSM 6580^T; 3 – *S. bayanus* DSM 70412^T; 4 – *S. pastorianus* NCYC 396; 5 – *S. cerevisiae* TUM 308; M – DNA marker.

v rámci rodu *Saccharomyces*, nikoliv však druhů *S. pastorianus* a *S. bayanus* navzájem (McCullough et al., 1998). Typové kmeny *S. pastorianus* a *S. bayanus* dle předpokladu vykazovaly stejný restriční profil se 3 fragmenty (obr. 3). U kmenů vinařských, pekařských, lihovarských, svrchních pivovarských kvasinek a typového kmene *S. cerevisiae*, došlo po štěpení ke vzniku 4 fragmentů (obr. 2), které jsou podle McCullougha et al. (1998) typické pro druh *S. cerevisiae*. Pouze jeden kmen spodních pivovarských kvasinek (NCYC 396) vykazoval stejný restriční profil jako typový *S. pastorianus*, zbylé tři kmeny měly stejný restriční profil jako *S. cerevisiae*. Štěpení PCR produktu enzymem *HaeIII* se k identifikaci technologických kvasinek rodu *Saccharomyces* do úrovně druhu ukázalo jako nevhodné.

Pomocí restriční analýzy genu *HIS4* lze zjistit přítomnost alel specifických buď pro *S. cerevisiae* nebo *S. bayanus*, v případě přítomnosti obou specifických alel se jedná o hybridní kmen *S. pastorianus* (Casaregola et al., 2001). Amplifikační oblasti genu *HIS4* vzniká u rodu *Saccharomyces* fragment o velikosti 2,1 kb, který se po štěpení enzymem *EcoRV* rozdělí u druhu *S. bayanus* na dva fragmenty o velikosti 1700 a 500 bp. Oblast genu *HIS4* u *Saccharomyces cerevisiae* neobsahuje místo štěpení pro tento enzym, produkt tedy zůstává v původní velikosti. U spodních pivovarských kvasinek Saflager W-34/70, Saflager S-23 a NCYC 396 a typových kmenů *S. pastorianus* a *S. bayanus* došlo ke štěpení PCR produktu enzymem *EcoRV* (obr. 3A), ale zároveň část PCR produktu zůstala nštěpena. Tyto kmeny obsahují více typů alel, což je pro hybridní kmeny charakteristický znak. Dle nejnovějších poznatků je druh *S. bayanus*, stejně jako *S. pastorianus*, označován jako hybridní (Boynton a Greig, 2014), přítomnost více typů alel genu *HIS4* tomuto tvrzení odpovídá. U ostatních kmenů kvasinek ke štěpení nedošlo a po štěpení zůstal pouze fragment o velikosti 2,1 kb, což je typické pro *S. cerevisiae*. U kmenů *S. cerevisiae* (Merlot 4882, Syrah LW 07 a Belle Saison Ale) byly po štěpení detekovány kromě výrazného 2,1 kb fragmentu ještě 4 menší nespecifické fragmenty. To může značit přítomnost dalších alel genu *HIS4* nebo mutace v dané oblasti genu.

Enzym *HindIII* neshtěpí PCR produkt u druhu *S. bayanus*, naopak u *S. cerevisiae* vznikají 3 fragmenty o velikosti 800, 700 a 600 bp (Casaregola et al., 2001). Ke štěpení enzymem *HindIII* nedošlo u PCR produktu typového kmene *S. bayanus* (obr. 3B). U spodních pivovarských kvasinek Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 a typového kmene *S. pastorianus* byl pozorován výrazný fragment (2,1 kb), ale i fragmenty typické pro *S. cerevisiae* (obr. 3B). Produkty PCR reakce ostatních kmenů byly štěpeny na 3 fragmenty (800, 700 a 600 bp) typické pro *S. cerevisiae*. U některých kmenů, stejně jako v případě štěpení enzymem *EcoRV*, byly rovněž pozorovány nespecifické fragmenty. Výsledky štěpení obou enzymů se shodovaly v druhovém zařazení u všech použitých kmenů.

V současné době je k dispozici sada primerů (multiplex-PCR) pro aktuálně platné druhy rodu *Saccharomyces*, kromě hybridního



Obr. 3 Výsledky štěpení PCR produktu (gen *HIS4*) enzymem *EcoRV* (A) a *HindIII* (B) / Fig. 3. Results of digestion of the PCR product (gene *HIS4*) with *EcoRV* (A) and *HindIII* (B)

1 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager W-34/70; 2 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager S-23; 3 – svrchní pivovarské kvasinky / top brewer's yeast Saflager WB-06; 4 – *S. cerevisiae* DSM 70449^T; 5 – *S. pastorianus* DSM 6580^T; 6 – *S. bayanus* DSM 70412^T; M – DNA marker.

type strains of *S. pastorianus* and *S. bayanus* exhibited a cleavage of the PCR product with *EcoRV* (Fig. 3A), but part of the PCR product remained undigested. These strains contain multiple types of alleles, which is characteristic for hybrid strains. According to the latest findings the species *S. bayanus*, as well as *S. pastorianus*, is known as a hybrid (Boynton and Greig, 2014), which is consistent with the presence of multiple types of *HIS4* alleles. In other yeast strains the digestion did not occur and only a fragment of 2.1 kb remained after cleavage, which is typical for *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* strains (Merlot 4882, Syrah LW 07 and Belle Saison Ale) produced after digestion 4 smaller nonspecific fragments in addition to the prominent 2.1 kb fragment. This may indicate the presence of another allele of the *HIS4* gene or mutations in a given gene region.

The enzyme *HindIII* did not cleave the PCR product in the species *S. bayanus*, but in *S. cerevisiae* three fragments of 800, 700 and 600 bp were formed (Casaregola et al., 2001). *HindIII* did not cleave the PCR product of the type strain of *S. bayanus* (Fig. 3B). In the bottom brewing yeast strains Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 and the type strain of *S. pastorianus*, we observed a significant fragment (2.1 kb), but also fragments characteristic for *S. cerevisiae* (Fig. 3B). PCR products of the other strains were digested to yield three fragments (800, 700 and 600 bp) specific for *S. cerevisiae*. Nonspecific fragments were also observed in some strains as well as in case of digestion with *EcoRV*. The results of cleavage by both enzymes were consistent with the generic classification of all strains.

A primer set (multiplex-PCR) is currently available for the currently valid species of the genus *Saccharomyces*, in addition to the hybrid species *S. pastorianus* (Pengelly and Wheals, 2013). The size of the PCR products for the various types is as follows: 150 bp for *S. cerevisiae*, 275 bp for *S. bayanus* and 228 bp for *S. eubayanus*. A fragment characteristic for *S. eubayanus* can be amplified in hybrid strains of *S. pastorianus* and *S. bayanus* containing *FSY1* target gene, (Pengelly and Wheals, 2013). Amplification of two fragments specific to *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* (150 and 228 bp) occurred in the bottom brewing yeast strains Saflager W-34/70, S-23 and also in the wine yeast LWO7 (Fig. 4). These results suggest that they are hybrid strains of *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*. The hybrid origin of bottom brewing and wine yeast is often described in the literature (Bing et al., 2014; Libkind et al., 2011; Sipiczki, 2008). The type strain of *S. pastorianus* and *S. pastorianus* NCYC 396 underwent

Tab. 3 Výsledky molekulárně-biologických metod typizace technologických kmenů kvasinek / Table 3 Results of the molecular-biological methods of technological yeast typing

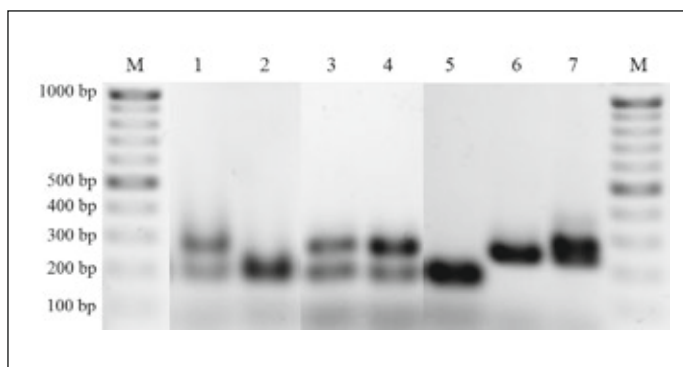
	Kmen / Strain	ITS	ITS	Multiplex	HIS4		RAPD p21
			HaeIII		EcoRV	HindIII	
vinařské / wine	<i>S. cerevisiae</i> Cabernet UC331	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Sauvignon LWO7	+	SC	SC + SE	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Merlot 4882	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Chardonnay LWO5	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Syrah LW 07	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Pinot LW 06	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Fermivin 7013	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> TUM S1	+	SC	SC	SC	SC	SC
pivovarské / brewing	svrchní / ale	<i>S. cerevisiae</i> Belle Saison Ale Yeast	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Nottingham Ale Yeast	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Munich Wheat Beer Yeast	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Windsor British Ale Yeast	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safale US-05	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safale S-04	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew WB-06	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew F-2	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew S-33	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew T-58	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Altbier Yeast TUM 308	+	SC	SC	SC	SC
	spodní / lager	<i>S. pastorianus</i> NCYC 396	+	SB/SP	SE	SB/SP	SB/SP
		<i>S. cerevisiae</i> Saflager W-34/70	+	SC	SC + SE	SB/SP	SB/SP
		<i>S. cerevisiae</i> Saflager S-23	+	SC	SC + SE	SB/SP	SB/SP
		<i>S. cerevisiae</i> Brewferm Lager	+	SC	SC	SC	SC
		<i>S. cerevisiae</i> Coobra 6 Magnum	+	SC	SC	SC	SC
lihovarské / distillery	<i>S. cerevisiae</i> Mini Turbo Alcohol Yeast	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Batch Turbo Yeast 14%	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Rum Turbo	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Fermiol	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> DistilaMax GW	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> DistilaMax SR	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> Spiriferm	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> TUM D2	+	SC	SC	SC	SC	SC
pekařské / baker's	<i>S. cerevisiae</i> (Uniferm)	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> (Fala)	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> (Labeta)	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> (Tesco)	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. cerevisiae</i> (Dr.Oetker)	+	SC	SC	SC	SC	SC
typové / type	<i>S. cerevisiae</i> DSM 70449 ^T	+	SC	SC	SC	SC	SC
	<i>S. pastorianus</i> DSM 6580 ^T	+	SB/SP	SE	SB/SP	SB/SP	SB/SP
	<i>S. bayanus</i> DSM 70412 ^T	+	SB/SP	SE + SB	SB/SP	SB/SP	SB

SC – *Saccharomyces cerevisiae*; SP – *S. pastorianus*; SB – *S. bayanus*; SE – *S. eubayanus*

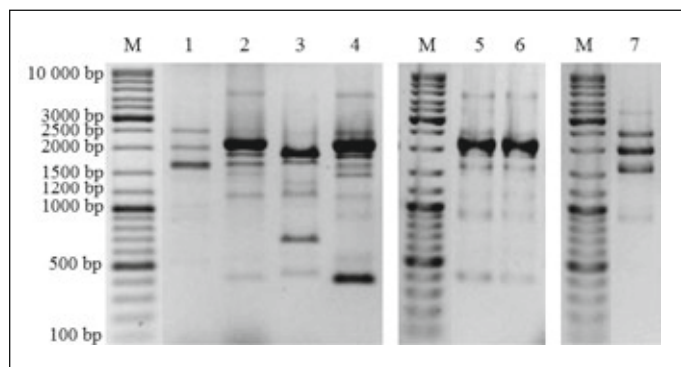
druhu *S. pastorianus* (Pengelly a Wheals, 2013). Velikost PCR produktů pro jednotlivé druhy je následující: 150 bp pro *S. cerevisiae*, 275 bp pro *S. bayanus* a 228 bp pro *S. eubayanus*. U hybridních kmenů *S. pastorianus* a *S. bayanus*, které obsahují cílový gen *FSY1*, se může amplifikovat fragment typický pro *S. eubayanus* (Pengelly a Wheals, 2013). K amplifikaci 2 fragmentů typických pro *S. cerevisiae* a *S. eubayanus* (150 a 228 bp) došlo u spodních pivovarských kvasinek Saflager W-34/70, S-23 a také u vinařských kvasinek LWO7 (obr. 4). Tyto výsledky naznačují, že se jedná o hybridní kmeny druhů *S. cerevisiae* a *S. eubayanus*. Hybridní původ spodních pivovarských a vinařských kvasinek je v literatuře často popisován (Bing et al., 2014; Libkind et al., 2011; Sipiczski, 2008). U typového kmene *S. pastorianus* a *S. pastorianus* NCYC 396 došlo k amplifikaci pouze fragmentu o velikosti 228 bp, který je charakteristický pro *S. eubayanus*. U typového kmene *S. bayanus* DSM 70412^T došlo k amplifikaci 2 fragmentů o velikosti 228 a 275 bp (obr. 4). Amplifikace alely charakteristické pro *S. eubayanus* potvrzuje hybridní charakter dru-

hu pouze amplifikací fragmentu o velikosti 228 bp, který je charakteristický pro *S. eubayanus*. The type strain of *S. bayanus* DSM 70412^T featured amplification of two fragments of 228 and 275 bp (Fig. 4). Amplification of an allele characteristic for *S. eubayanus* confirms the hybrid character of *S. bayanus*. Only a fragment of 150 bp, which is typical for *S. cerevisiae*, was amplified in the other strains.

Fingerprint methods often use only one primer or numerous and relatively variable sites on the genome to distinguish the individual yeast strains. (Tornau-Lehoczki and Dlačny, 2000; Legras and Karst, 2003). Using primer 21 according to Tornau-Lehoczki and Dlačny (2000), RAPD-PCR showed different fingerprints in strains of *S. cerevisiae* and *S. pastorianus*, where several distinct fragments were present. A similar fingerprint was exhibited by the bottom brewing yeast strains Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 and the type strain of *S. pastorianus* (Fig. 5). Unique DNA fingerprint was provided by the type strain of *S. bayanus*. The fingerprint of the top brewing yeast T-58 was similar to the other 34 strains



Obr. 4 Výsledky multiplexní PCR / Fig. 4 The results of multiplex PCR
1 – vinařské kvasinky / wine yeast LWO7; 2 – vinařské kvasinky / wine yeast 4882; 3 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager W-34/70; 4 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager S-23; 5 – *S. cerevisiae* DSM 70449^T; 6 – *S. pastorianus* DSM 6580^T; 7 – *S. bayanus* DSM 70412^T; M – DNA marker



Obr. 5 Výsledky RAPD-PCR / Fig. 5 The results of RAPD-PCR
1 – *S. cerevisiae* DSM 70449^T; 2 – *S. pastorianus* DSM 6580^T; 3 – *S. bayanus* DSM 70412^T; 4 – *S. pastorianus* NCYC 396; 5 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager W-34/70; 6 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Saflager S-23; 7 – spodní pivovarské kvasinky / bottom brewer's yeast Brewferm Lager; M – DNA marker

hu *S. bayanus*. U ostatních kmenů byl amplifikován pouze fragment o velikosti 150 bp, který je typický pro *S. cerevisiae*.

Pro odlišení jednotlivých kmenů kvasinek se často používají tzv. fingerprintové metody, které využívají pouze jeden primer či početná a poměrně variabilní místa na genomu (Tornai-Lehoczki a Dlauchy, 2000; Legras a Karst, 2003). RAPD-PCR s použitím primeru 21 dle Tornai-Lehoczki a Dlauchy (2000) vykazovala odlišné fingerprinty u kmenů *S. cerevisiae* a *S. pastorianus*, kde bylo přítomno několik výrazných fragmentů. Podobný fingerprint vykazovaly spodní pivovarské kvasinky Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 spolu s typovým kmenem *S. pastorianus* (obr. 5). Jedinečný otisk DNA vykazoval typový kmen *S. bayanus*. Fingerprint svrchních pivovarských kvasinek T-58 se podobá ostatním 34 kmenům s fingerprintem typickým pro *S. cerevisiae*, avšak má výraznější amplifikované fragmenty. Kvasinky Brewferm Lager, dodavatelem označené jako spodní kvasící pivovarský kmen, vykazovaly profil typický pro svrchní kvasinky *S. cerevisiae* (obr. 5). Nepřesné označení kmene ale nelze považovat za chybu vzhledem k tomu, že při klasifikaci kvasinek jsou povoleny tzv. technologické názvy, které nemusí být ve shodě s taxonomickým zařazením z důvodu běžného výskytu hybridních kmenů a častým změnám v klasifikaci kvasinek.

Výsledky RAPD-PCR byly dále zpracovány v programu BioNumerics 7.5 (Applied Maths, Belgie), byl vytvořen dendrogram (obr. 6) s použitím Pearsonova koeficientu, metody UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) a optimalizací 0,5%. Typový kmen *S. bayanus* a svrchní pivovarské kvasinky Saflager T-58 se od ostatních kmenů výrazně lišily (obr. 6, zelená elipsa) s podobností sekvencí pod 60%. Společnou skupinu blízké příbuzných kmenů s podobností nad 80% vytvořily spodní pivovarské kvasinky Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 s typovým kmenem *S. pastorianus* (obr. 6, červená elipsa). Podobnost nad 90% byla zaznamenána u lihovarských kvasinek Coobra 6 Magnum, typového kmene *S. cerevisiae* a vinařských kvasinek LW 06 (obr. 6, žlutá elipsa). Svrchní pivovarské kvasinky Nottingham a TUM 308 vytvořily dvě samostatné fylogenetické větve. Kmeny s podobností sekvencí nad 90% vytvořily dvě větší fylogenetické skupiny. V první skupině (obr. 6, modrá elipsa) byly řazeny pekařské kvasinky Fala, vinařské LW 06 a 4 kmeny svrchních pivovarských kvasinek (Munich, Windsor, Safale US-05, Safale S-04). Druhá skupina (obr. 6, fialová elipsa) obsahovala 23 pivovarských, vinařských, pekařských a lihovarských kmenů, které se od sebe navzájem výrazně nelišily.

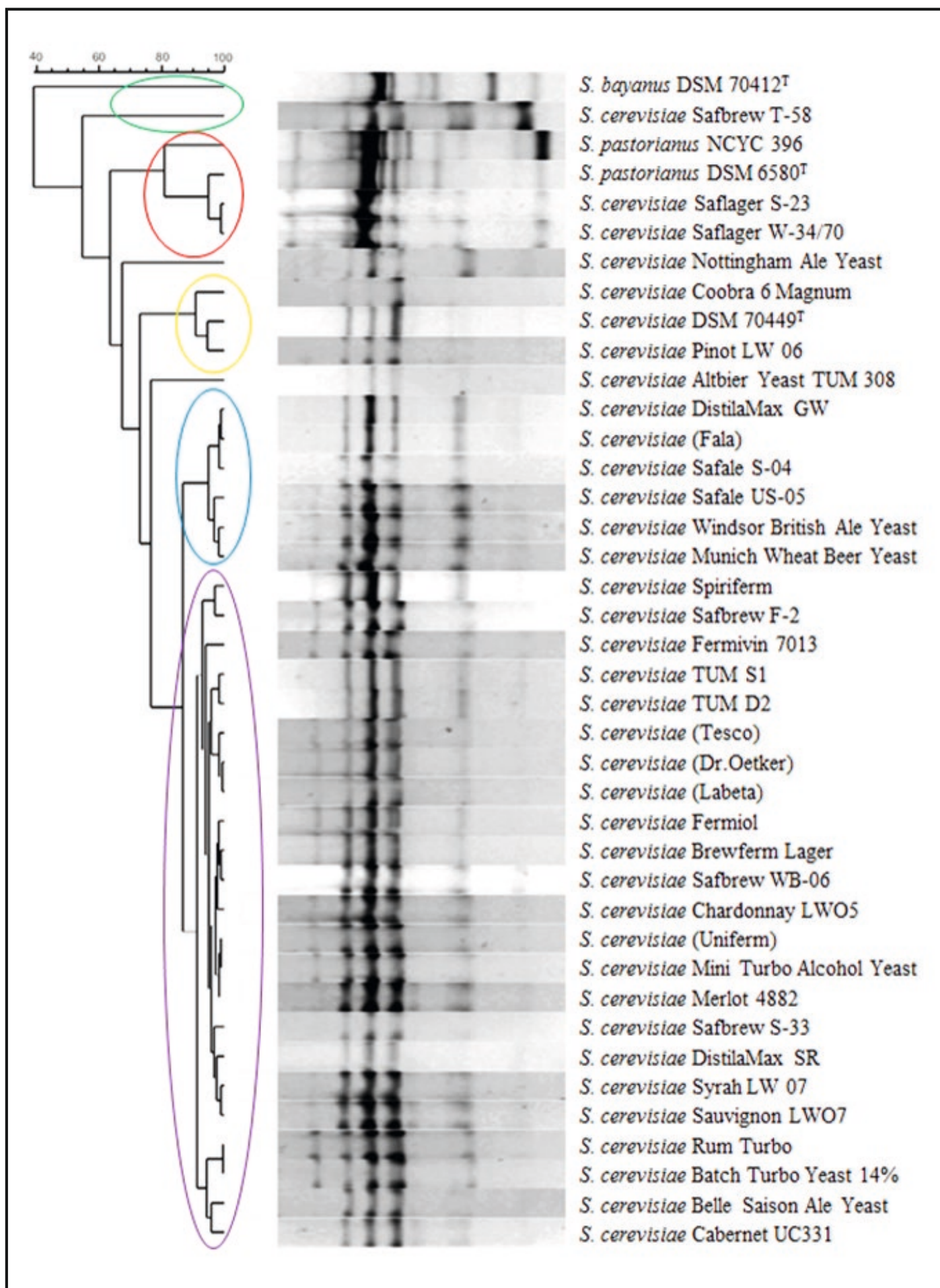
Z výsledků genotypových metod vyplývá, že spodní pivovarské kvasinky Saflager W-34/70 a S-23, s technologickým označením *S. cerevisiae*, taxonomicky patří do druhu *S. pastorianus*. Vinařské kvasinky LWO7 jsou pravděpodobně hybridním kmenem druhů *S. cerevisiae* a *S. eubayanus*. Zařazení tohoto kmene do druhu *S. cerevisiae* lze považovat za správné, neboť podle Nguyen et al. (2011) až 10% kmenů klasifikovaných jako *S. cerevisiae* může mít hybridní původ mezi *S. cerevisiae* a některým z příbuzných druhů. Výsledky analýz pro spodní pivovarské kvasinky Brewferm Lager se shodovaly s výsledky typickými pro svrchní pivovarské kvasinky. Pravděpodobně se tedy jedná o svrchně kvasící kmen, jehož použití může vést k příchuti svrchně kvašeného piva a ne typického ležáku.

with fingerprints characteristic for *S. cerevisiae* but had significantly more amplified fragments. The Brewferm Lager yeast, identified by the supplier as bottom fermenting brewing strain, showed a profile typical for top brewing *S. cerevisiae* (Fig. 5). However, the inaccurate classification of the strain need not be erroneous due to the fact that in the classification of yeast are permitted so-called technological names which may not be consistent with taxonomic classification because of a common incidence of hybrid strains and frequent changes in the classification of yeast.

RAPD-PCR results were further processed by BioNumerics 7.5 software (Applied Maths, Belgium) and a dendrogram was created (Fig. 6) using the Pearson coefficient, the UPGMA method (unweighted pair group method using arithmetic average) and 0.5% optimization. Type strain of *S. bayanus* and top brewing strain Saflager T-58 significantly differed from the other strains (Fig. 7, green ellipse) with sequence similarity to below 60%. A common group of closely related strains with similarities of over 80% included bottom brewing yeast strains Saflager W-34/70, S-23, NCYC 396 and the *S. pastorianus* type strain (Fig. 6, red ellipse). Similarity of over 90% was observed in distillery yeast Coobra 6 Magnum, type strain of *S. cerevisiae*, and wine yeast LW 06 (Fig. 6, yellow ellipse). Top ale yeasts Nottingham and TUM 308 formed two separate phylogenetic branches. Strains with sequence similarity of over 90% formed two major phylogenetic groups. In the first group (Fig. 6, blue ellipse) were classified baker's strain Fala, wine yeast LW 06 and four top brewing yeast strains (Munich, Windsor, Safale US-05, Safale S-04). The second group (Fig. 6, violet ellipse) consisted of 23 brewer's, wine, bakery and distillery strains that did not differ from each other significantly.

The results of the genotyping methods show that the bottom brewing yeast strains Saflager W-34/70 and S-23, with the technological name *S. cerevisiae*, belong taxonomically to *S. pastorianus*. Wine strain LWO7 is probably a hybrid strain of *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*. Inclusion of this strain to the species *S. cerevisiae* can be considered correct since, according to Nguyen et al. (2011), as much as 10% strains classified as *S. cerevisiae* may be hybrids of *S. cerevisiae* with some of the related species. The results of analyses for the Brewferm Lager bottom brewing yeast coincide with the results for a typical top brewer's yeast.

Yeast strains were further characterized on the basis of their growth at various temperatures (25, 34 and 37 °C). The temperature of 25 °C has been shown to be optimal for the growth of most yeasts of the genus *Saccharomyces* (Kurtzman et al., 2011), which was confirmed by the growth of all yeast strains used in this study. Strains of bottom brewing yeast *S. pastorianus* NCYC 396, Saflager S-23 and type strains *S. pastorianus* DSM 6580^T and *S. bayanus* DSM 70412^T did not grow at 34 °C. The same strains and bottom brewing yeast strain Saflager W-34/70 were unable to grow at 37 °C. The results are consistent with the characteristics of the species *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* and *S. bayanus* (Kurtzman et al., 2011). The strain Brewferm Lager, declared by the manufacturer as bottom fermenting, grew at higher temperatures and, along with the results of genotypic methods, this supports the assumption that it is a top-fermenting strain.



Obr. 6 Dendrogram sestavený na základě metody RAPD-PCR s primerem 21 (Pearsonův koeficient, UPGMA) / Fig. 6 Dendrogram of tested yeast strains compiled based on RAPD-PCR method with primer 21 (Person coefficient, UPGMA)

Kmeny kvasinek byly dále charakterizovány na základě svého růstu při různých teplotách (25, 34 a 37 °C). Teplota 25 °C je uváděna jako optimální pro růst většiny kvasinek rodu *Saccharomyces* (Kurtzman et al., 2011), což bylo potvrzeno nárůstem všech kmenů kvasinek použitých v této studii. Při teplotě 34 °C nerostly kmeny spodních pivovarských kvasinek *S. pastorianus* NCYC 396, Saflager S-23 a typové kmeny *S. pastorianus* DSM 6580^T a *S. ba-*

The utilization of the sugars galactose, maltose, melibiose, sucrose and trehalose under aerobic and anaerobic conditions was based on the methodology of Kurtzman et al. (2011). These sugars were selected on the basis of the general characteristics of species of the genus *Saccharomyces*. Species of *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* and *S. bayanus* show considerable variability in the utilization of sugars. The basic characteristics of brewer's yeast include, among others,

Tab. 4 Výsledky využívání vybraných cukrů za aerobních a anaerobních podmínek / Table 4 Results of utilisation of target sugars in aerobic and anaerobic conditions

		Kmen / Strain	Galaktosa		Maltosa		Melibiosa		Sacharosa		Trehalosa	
			A	AN	A	AN	A	AN	A	AN	A	AN
vinařské / wine		<i>S. cerevisiae</i> Cabernet UC331	+	-	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Sauvignon LWO7	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Merlot 4882	+	+	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Chardonnay LWO5	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Syrah LW 07	+	w	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Pinot LW 06	+	+	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Fermivin 7013	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> TUM S1	+	-	+	+	-	-	+	+	+	s
pivovarské / brewing	svrchní / ale	<i>S. cerevisiae</i> Belle Saison Ale Yeast	+	+	+	+	-	-	+	s	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Nottingham Ale Yeast	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Munich Wheat Beer Yeast	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Windsor British Ale Yeast	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Safale US-05	+	+	+	+	-	-	+	+	+	s
		<i>S. cerevisiae</i> Safale S-04	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew WB-06	+	+	+	+	-	-	+	s	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew F-2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew S-33	+	+	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Safbrew T-58	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>S. cerevisiae</i> Altbier Yeast TUM 308	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
	spodní /lager	<i>S. pastorianus</i> NCYC 396	+	w	+	+	+	s	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Saflager W-34/70	+	+	+	+	-	-	+	7	+	s
		<i>S. cerevisiae</i> Saflager S-23	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
		<i>S. cerevisiae</i> Brewferm Lager	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
lihovarské / distillery		<i>S. cerevisiae</i> Coobra 6 Magnum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Mini Turbo Alcohol Yeast	+	+	+	+	-	-	+	7	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Batch Turbo Yeast 14%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Rum Turbo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Fermiol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> DistilaMax GW	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> DistilaMax SR	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> Spiriferm	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> TUM D2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
pekařské / baker's		<i>S. cerevisiae</i> (Uniferm)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> (Fala)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> (Labeta)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> (Tesco)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
		<i>S. cerevisiae</i> (Dr.Oetker)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
typové / type		<i>S. cerevisiae</i> DSM 70449 ^T	+	+	+	+	-	-	+	+	+	s
		<i>S. pastorianus</i> DSM 6580 ^T	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
		<i>S. bayanus</i> DSM 70412 ^T	-	-	+	+	-	-	+	+	+	s

A – aerobní využívání / aerobic utilisation; AN – anaerobní využívání / an aerobic utilisation; +, pozitivní / positive; -, negativní / negative; w, slabě pozitivní / weak positive; 7 – pozitivní po 7 dnech inkubace („opožděně pozitivní“) / positive after 7 days of incubation („late positive“); s – pozitivní po 7 dnech inkubace – slabá fermentace / positive after 7 days of incubation – weak fermentation

yanus DSM 70412^T. Tytéž kmeny a spodní pivovarské kvasinky Saflager W-34/70 nebyly schopny růstu při 37 °C. Výsledky se shodují s charakteristikou druhů *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *S. bayanus* (Kurtzman et al., 2011). Kmen Brewferm Lager, deklarovaný výrobcem jako spodně kvasící, rostl při vyšších teplotách a spolu s výsledky genotypových metod to potvrzuje domněnku, že jde o svrchně kvasící kmen.

Využívání cukrů galaktosy, maltosy, melibiosy, sacharosy a trehalosy za aerobních a anaerobních podmínek proběhlo podle metodiky Kurtzman et al. (2011). Tyto cukry byly vybrány na základě všeobecných charakteristik druhů rodu *Saccharomyces*. Druhy *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* a *S. bayanus* vykazují značnou variabilitu při využívání těchto cukrů. Mezi základní charakteristiky pivovarských kvasinek patří mimo jiné i využívání cukru melibiosy – spodní kvasinky melibiosu využívají a svrchně kvasící kmeny ji využívat neumí (Lodolo et al., 2008). Předpoklad, že kmeny, které byly genotypovými metodami určeny jakodruh *S. pastorianus*, budou využívat melibiosu, se nepotvrdil (tab. 4). Spodní kvasinky Saflager S-23 a NCYC 396 melibiosu využívaly aerobně i anaerobně, ale kmeny Saflager W-34/70, Brewferm Lager a typový kmen *S. pastorianus* DSM 6580^T na melibiose nerostly vůbec. Z ostatních technologických skupin kvasinek využívaly melibiosu pouze tři kmeny lihovarských kvasinek.

Galaktosa byla aerobně využívána všemi kmeny kvasinek kromě *S. bayanus* DSM 70412^T, anaerobně ji nevyužíval *S. bayanus* DSM 70412^T a dva vinařské kmeny. Maltosa byla využívána aerobně i anaerobně všemi kmeny. Variabilních výsledků bylo dosaženo se sacharosou – aerobně byla využívána všemi kmeny kvasinek, anaerobně nebyl zjištěn nárůst u dvou kmenů (vinařský a pivovarský spodně kvasící) a u několika kmenů (nezávisle na technologickém zařazení) byla nutná prodloužená inkubace. Variabilní využívání bylo zjištěno také v případě cukru trehalosy (viz tab. 4).

4 ZÁVĚR

Cílem této studie byla charakterizace 40 kmenů kvasinek rodu *Saccharomyces* ze čtyř technologických skupin pomocí genotypových a fenotypových metod. Kvasinky byly analyzovány pomocí PCR ITS regionu, genu *HIS4* (a jejich štěpením restrikčními endonukleasami), multiplexní PCR a technikou RAPD, sledován byl růst při různých teplotách a využívání vybraných cukrů za aerobních a anaerobních podmínek. PCR amplifikace oblasti ITS potvrdila zařazení všech testovaných kmenů do rodu *Saccharomyces*. Dva vzorky komerčně dostupných sušených pivovarských kvasinek byly výrobcem označeny jako *Saccharomyces cerevisiae*, avšak podle získaných výsledků a samotného popisu od výrobce se jedná o druh *S. pastorianus*. Jde tedy o nepřesné označení druhu. U jednoho vzorku sušených kvasinek, deklarovaného výrobcem jako spodně kvasící kmen, však bylo prokázáno zařazení mezi kvasinky svrchně kvasící.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že pro zařazení kvasinek do rodu *Saccharomyces* lze využít metodu amplifikace ITS regionu. Pro rozlišení jednotlivých druhů je ale vhodnější štěpení genu *HIS4* nebo multiplex PCR, která dokáže odhalit i hybridní povahu jednotlivých kmenů. Dobrých výsledků bylo dosaženo pomocí metody RAPD, která odlišila druh *S. bayanus* a kmeny spodních kvasinek zařadila do blízké příbuzné skupiny. Bohužel ani touto metodou nebyly kmeny rozřazeny na základě svého technologického využití. Kvasinky *S. cerevisiae* byly schopné růst při 37 °C narozdíl od kmenů *S. pastorianus* a *S. bayanus*. Schopnost růstu na vybraných cukrech potvrdila značnou variabilitu mezi druhy rodu *Saccharomyces*. Ani při využití vybraných cukrů nebyla zaznamenána shoda mezi technologickými skupinami kvasinek.

PODĚKOVÁNÍ

Článek byl zpracován na základě výsledků diplomové práce K. Krescanková: Charakteristika kvasinek rodu *Saccharomyces* využívaných v technologiích (studijní program Biologie, obor Obecná biologie, směr Mikrobiologie a molekulární biotechnologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 2015). Diplomová práce a článek byly podpořeny z finančních prostředků Specifického výzkumu Masarykovy univerzity (MUNI/A/0884/2013), s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství České republiky na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS (Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin, RO1914) a projektu Výzkumné senzorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

the utilization of melibiose – bottom yeast strains utilize melibiose while top fermenting strains cannot utilize it (Lodolo et al., 2008). The assumption that strains that were designed as *S. pastorianus* by genotypic methods will use melibiose was confirmed (Table 4). Bottom strains Saflager S-23 and NCYC 396 utilized melibiose both aerobically and anaerobically while the strains Saflager W-34/70, Brewferm Lager and the type strain *S. pastorianus* DSM 6580^T did not grow on melibiose at all. Among other technological groups of yeast only three strains of distillery yeast utilized melibiose.

Galactose was aerobically utilized by all yeast strains except *S. bayanus* DSM 70412^T whereas anaerobically it was not utilized by *S. bayanus* DSM 70412^T and two wine strains. Maltose was utilized both aerobically and anaerobically by all strains. Variable results were obtained with sucrose – it was utilized aerobically by all yeast strains, anaerobic growth was not found in two strains (wine and bottom brewing); several strains (regardless of the technological classification) required prolonged incubation. Variable utilization was found in the case of trehalose (see Table 4).

4 CONCLUSIONS

The aim of this study was to characterize 40 yeast strains of the genus *Saccharomyces* from four technological groups using phenotypic and genotypic methods. Yeast cells were analyzed by PCR of the ITS region, *HIS4* gene (and their restriction endonuclease digestion), multiplex PCR and by the RAPD technique, and growth at various temperatures and utilization of selected carbohydrates under aerobic and anaerobic conditions was monitored. PCR amplification of ITS confirmed the inclusion of all tested strains in the genus *Saccharomyces*. Two samples of commercially available dried brewer's yeast have been identified by the manufacturer as *Saccharomyces cerevisiae*, but based on our results and on the actual description by the manufacturer they belong to the species *S. pastorianus*. The designation of the species is thus inaccurate. One sample of dried yeast, declared by the manufacturer as a bottom-fermenting strain, has now been shown to be a top fermenting strain.

Based on our results it can be stated that the method of amplification of ITS region can be used for inclusion of yeast into the genus *Saccharomyces*. However, more suitable for distinguishing the various species is the cleavage *HIS4* gene or multiplex PCR, which can detect even the hybrid nature of the various strains. Satisfactory results were obtained using the RAPD method, which distinguished the species *S. bayanus* and aided in grouping together strains of bottom yeast. Unfortunately, even this method could not categorize the strains according to their technological applications. *S. cerevisiae* strains were able to grow at 37 °C, unlike the strains of *S. pastorianus* and *S. bayanus*. The ability to grow on selected sugars confirmed the considerable variability among species of the genus *Saccharomyces*. Even with the use of selected sugars no match was recorded between the technological groups of yeast.

ACKNOWLEDGEMENTS

The article was based on the results of the diploma thesis by K. Krescanková: Characteristics of *Saccharomyces* yeasts used in technology (Biology degree program, majoring in General Biology, specialization Microbiology and Molecular Biotechnology, Faculty of Science, Masaryk University in Brno, 2015). This thesis and the article were supported by funds from the Specific Research of Masaryk University (MUNI / A / 0884/2013), using the institutional support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic of a long-term conceptual development of RIBM (Research into the quality and processing of malting and brewing raw materials, RO1914) and the projects Sensory Research Center in Prague and the Research and Development Brewhouse – Sustainability and Development (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Alba-Lois, L., Segal-Kischinevsky, C., 2010: Beer & wine makers. Nat. Educ., 3: 17.
- Barnett, J.A., 1998: A history of research on yeasts 1: work my chemists and biologists 1789-1850. Yeast, 14: 1439-1451. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., 2006: Production of food grade yeasts. Food Technol. Biotech., 44(3): 407-415.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., 2008: Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Int. J. Food Microbiol., 122: 188-195. DOI: 10.1016/j.jfoodmicro.2007.11.083.
- Bing, J., Han, P. J., Liu, W. Q., Wang, Q. M., Bai, F. Y., 2014: Evidence for Far East Asian origin of lager beer yeast. Curr. Biol., 24(10): R380-381. DOI: 10.1016/j.cub.2014.04.031.
- Boynton, P., Greig, D., 2014: The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. Yeast, 31: 449-462. DOI: 10.1002/yea.3040.
- Casaregola, S., Nguyen, H. V., Lapathitis, G., Kotyk, A., Gaillardin, C., 2001: Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. Int. J. Syst. Evol. Micr., 51: 1607-1618.
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. Genome Res., 18(10): 1610-1623. DOI: 10.1101/gr.076075.108.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M., 2014a: Surface characteristics and taxonomy of brewing yeasts. Kvasný Prům., 60(7-8): 182-190.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M., Jelínková, M., Felsberg, J., 2014b: Comparison of DNA extraction methods in terms of yield, purity, long-term storage and downstream manipulation with brewer's yeast chromosomal DNA. J. Am. Soc. Brew. Chem., 72:1-5.
- Kurtzman, C., P., Fell, J. W., Boekhout, T., 2011: The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier Burlington, USA. ISBN 978-0-123-84708-9.
- Légras, J. L., Karst, F., 2003: Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiol. Lett., 221: 249-255. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00205-2.
- Légras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., Karst, F., 2007: Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Mol. Ecol., 16(10): 2091-2102. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J. P., 2011: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. P. Natl. Acad. Sci. USA., 108(35): 14539-14544. DOI: 10.1073/pnas.1105430108.
- Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C., Brooks, M., 2008: The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. FEMS Yeast Res., 8(7): 1018-1036. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x.
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tscheik, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N., Breitenbach, M., Prillinger, H., Tiefenbrunner, W., 2007: Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. FEMS Yeast Res., 7(6): 953-965. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2007.00240.x.
- Marinoni, G., Manuel, M., Petersen, R. F., Hvidtfeldt, J., Sulo, P., Piškur, J., 1999: Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. J. Bacteriol., 181(20): 6488-6496.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D., 1998: New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Appl. Environ. Microb., 64(10): 3887-3892.
- Matoulková, D., Šavel, J., 2007: Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. Kvasný Prům., 53: 206-214.
- Matzke, M. A., Scheid, O. M., Matzke, A. J. M., 1999: Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. BioEssays, 21(9): 761-767.
- McCullough, M. J., Clemons, K. V., McCusker, J. H., Stevens, D. A., 1998: Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. J. Clin. Microbiol., 36(4): 1035-1038.
- Molina, F. I., Inoue, T., Jong, S. C., 1992: Restriction polymorphisms in the internal transcribed spacers and 5.8s rDNA of *Saccharomyces*. Cur. Microbiol., 25(5): 251-255.
- Nguyen, H. V., Légras, J. L., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., 2011: Deciphering the hybridisation history leading to the lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380^T. PLoS ONE, 6(10): 1-19. DOI: 10.1371/journal.pone.0025821.
- Parsons, G., 1981: de Bavay, Auguste Joseph François. In: Nairn B., Serle G. (eds.), Australian Dictionary of Biography Volume 8: 1891-1939, Cl-Gib, 262-264, Melbourne University Publishing, Australia.
- Pengelly, R. J., Wheals, A. E., 2013: Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. FEMS Yeast Res., 13(2): 156-161. DOI: 10.1111/1567-1364.12018.
- Pham, T., Wimalasena, T., Box, W. G., Koivuranta, K., Stogards, E., Smart, K. A., Gibson, B. R., 2011: Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. J. Inst. Brew., 117: 556-568.
- Polaina, J., 2002: Brewer's yeast: genetics and biotechnology. Appl. Mycol. Biotechnol., 2: 1-17.
- Pretorius, I. S., 2000: Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16(8): 675-729.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003: *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. J. Biosci. Bioeng., 96(1): 1-9.
- Sipiczki, M., 2008: Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. FEMS Yeast Res., 8(7): 996-1007. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00369.x.
- Steensels, J., Verstrepen, K. J., 2014: Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. Annu. Rev. Microbiol., 68: 61-68. DOI: 10.1146/annurev-micro-091213-113025.
- Šilhánková, L., 2002: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii. Academia, Praha. ISBN 978-80-200-1703-1.
- Tornai-Lehoczi, J., Dlačny, D., 2000: Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. Int. J. Food Microbiol., 62(1-2): 37-45.
- Valente, P., Gouveina, 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(2-3): 253-256.

Do redakce došlo / Manuscript received: 10. 4. 2015
Přijato k publikování / Accepted for publication: 7. 5. 2015

Šestý ročník soutěže CEREVISIA SPECIALIS – PIVNÍ SPECIÁL ROKU 2015 vyhlášen

Soutěž speciálních a neobvyklých piv vyrobených komerčními pivovary v České republice se vyhlašuje ve čtyřech soutěžních kategoriích: světlá speciální piva, polotmavá a tmavá speciální piva, míchaná piva (beercoology) a neobvyklá piva. Jde např. svrchně kvašená piva, ochucená, piva vyráběná v našich podmínkách neobvyklou technologií, míchané nápoje na bázi nealkoholického piva. V této kategorii přihlašovatel může uvést parametr, kterým se pivo odlišuje, a komise k němu při hodnocení přihlíží.



Soutěž proběhne počátkem října a vyhodnocení přihlášených piv provede dvacetičlenná hodnotitelská komise rozdělená na dvě subkomise, odbornou a laickou. Přihlášky spolu se soutěžními podmínkami budou pivovárům rozeslány na počátku srpna.

Vyhlašovatelem soutěže je společnost PORT spol. s r. o., odborným garantem je Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.