

DOI: 10.18832/kp2016025

**Kvasinky non-Saccharomyces a jejich význam v pivovarském průmyslu. II. část***Non-Saccharomyces yeasts and their importance in the brewing industry. Part II*Tatiana KOCHLÁŇOVÁ<sup>1</sup>, David KIJ<sup>1</sup>, Jana KOPECKÁ<sup>1</sup>, Petra KUBIZNIAKOVÁ<sup>2</sup>, Dagmar MATOULKOVÁ<sup>2</sup><sup>1</sup>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<sup>2</sup>Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lipová 15, 120 44 Prague

e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz, matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

**Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Kvasinky non-Saccharomyces a jejich význam v pivovarském průmyslu. II. část. Kvasny Prum., 62(7–8), s. 206–214**

Non-Saccharomyces kvasinky (*Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*) mohou být použity k výrobě nealkoholických a nízkoalkoholických piv a přispívat ke vzniku zajímavých chuťových atributů. Kvasinky rodů *Pichia*, *Meyerozyma*, *Geotrichum* nebo *Wickerhamomyces* se mohou využít k biologické kontrole plísní při sladování a skladování sladu. V článku je uvedena charakteristika a taxonomické zařazení kvasinek rodů *Torulaspora* a *Kluyveromyces*. Popsáno je i využití dalších non-Saccharomyces kvasinek v pivovarském průmyslu, např. při degradaci chmelových látek z odpadního chmele a ochucování piva.

**Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Non-Saccharomyces yeasts and their importance in the brewing industry. Part II. Kvasny Prum., 62(7–8), pp. 206–214**

Non-Saccharomyces yeast (*Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*) can be used for non-alcoholic and low-alcohol beers and production may contribute to the formation of interesting flavor attributes. Yeast belonging to the genera *Pichia*, *Meyerozyma*, *Geotrichum* or *Wickerhamomyces* can be applied for the biocontrol of molds during the malting process and storage of malt. The article gives the characteristics and taxonomy of *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma* and other non-Saccharomyces yeast. It also describes the use of non-Saccharomyces yeast for degradation of hop bitter compounds in hops wastes or beer flavoring.

**Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Die nicht-Saccharomyces Hefe und ihre Bedeutung in der Brauindustrie. II. Teil. Kvasny Prum., 62(7–8), S. 206–214**

Zur Herstellung vom alkoholfreien oder alkoholarmen Bier ist es möglich, auch die Nicht-Saccharomyces Hefe angewandt zu werden, wozu diese Hefe zur Entstehung von interessanten Geschmackseigenschaften des Bieres beitragen kann. Die Hefestämme *Pichia*, *Meyerozyma*, *Geotrichum* und *Wickerhamomyces* können zur biologischen Kontrolle von Pilzen beim Malz- oder Malzlagerungsprozess angewandt werden. Im Artikel werden die Charakteristik und eine taxonomische Einordnung von Stämmen *Torulaspora* a *Kluyveromyces* angeführt. Weiter wird die Anwendung der anderen Nicht-Saccharomyces Hefe in der Brauindustrie beschrieben, z.B. die Hopfenstoffdegradation aus dem Abfallhopfen oder das Würzen des Bieres.

**Klíčová slova:** *Kluyveromyces*, nealkoholické pivo, nízkoalkoholické pivo, non-Saccharomyces, *Pichia*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces***Keywords:** *Kluyveromyces*, nonalcoholic beer, low-alcohol beer, non-Saccharomyces, *Pichia*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces***1 ÚVOD**

Kvasinky non-Saccharomyces nacházejí uplatnění v různých oblastech průmyslové výroby. V pivovarství, mimo výrobu piva lambik a gueuze, kde je využíváno spontánní fermentace mladiny, s hlavním podílem kvasinek *Brettanomyces*, mohou být některé non-Saccharomyces kvasinky využívány např. při výrobě nízkoalkoholických nebo nealkoholických piv (Johnson, 2013).

Nealkoholické pivo se vyrábí dvěma základními přístupy – buď je alkohol odstraňován fyzikálními metodami z hotového piva, nebo jsou uplatněny speciální, biologické postupy kvašení, při kterých se mění podmínky kvašení a další faktory (Kosař a Procházka, 2000). Fyzikální metody se vyznačují změnou senzorických vlastností výsledného produktu způsobenou ztrátou vyšších alkoholů a esterů, které se musí později doplnit (Brányik et al., 2012). Technologie přímé výroby nealkoholického piva zahrnují použití mladiny s nižším obsahem jednoduchých cukrů, předčasné zastavení fermentace, snížení teploty kvašení nebo omezení metabolismu imobilizací kvasinek. Používají se speciální kmeny kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* a *Zygosaccharomyces rouxii*), které mají omezenou schopnost fermentovat přítomné cukry a vytvoří méně alkoholu (Sohrabvandi et al., 2011). Bylo popsáno i použití kvasinek rodu *Pichia*, *Candida shehatae* (De Francesco, 2014) a *Torulaspora delbrueckii* (Canonica et al., 2016). Takto vyrobená piva mohou chutnat po mladíně, bývají sladší a ovocnější než piva alkoholická, vyrobená tradičním způsobem nebo zbavená alkoholu fyzikálními metodami.

Dalšími oblastmi pivovarství, kde mohou být využity non-Saccharomyces kvasinky, je např. biologická kontrola plísní při výro-

**1 INTRODUCTION**

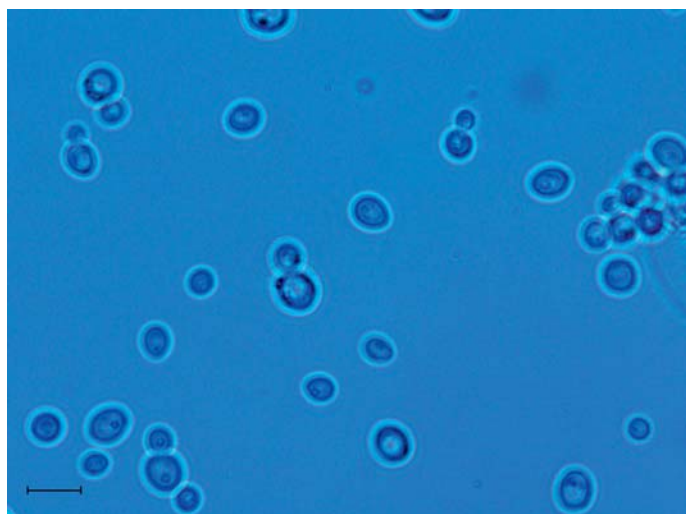
Non-Saccharomyces yeasts are utilized in various industrial areas. In brewing spontaneous fermentation of wort is used for lambic and gueuze production, with the main contribution of *Brettanomyces* yeast. Beside this some non-Saccharomyces may be used for non-alcoholic and low-alcohol beer production (Johnson, 2013).

Alcohol-free beers are made by several procedures, which can be divided into two categories. Either physical methods are used to remove the alcohol from the final beer or special biological methods of fermentation process are used (Kosař and Procházka, 2000).

The physical methods are characterized by changing sensorial qualities of the final product caused by losing higher alcohols and esters, which must be refilled later (Brányik et al., 2012).

Direct technologies of producing alcohol-free beers are based on using malt with lower content of simple sugars, early ending of fermentation, lower temperature of fermentation or lower metabolism activity caused by immobilization of the yeasts. The special phyla of yeasts used in the fermentation process (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii*) are limited to fermenting present sugars and produce less alcohol (Sohrabvandi et al., 2011). The yeasts *Pichia*, *Candida shehatae* (De Francesco, 2014) and *Torulaspora delbrueckii* were described and used (Canonica et al., 2016). The beers made in this way could taste like malt, could be sweeter and fruitier than alcoholic beers made in the traditional way or by physical methods.

Other ways to utilize non-Saccharomyces yeasts in the brewing industry include biological control of molds during the malt produc-



Obr. 1 Buňky *Torulaspora delbrueckii* RIBM Td4 / Fig. 1 Cells of *Torulaspora delbrueckii* RIBM Td4

bě a skladování sladu, ochucování piva jeho refermentací nebo při degradaci hořkých látek z odpadního chmele. Mezi technologicky využitelné non-Saccharomyces kvasinky patří rody *Brettanomyces* a *Dekkera*, kterým je věnován první díl článku o non-Saccharomyces kvasinkách. Ve zmíněném článku je zároveň uvedeno jejich taxonomické zařazení (Kochláňová et al., 2016).

## 2 PŘEHLED NON-SACCHAROMYCES KVASINEK VYUŽÍVANÝCH V PIVOVARSTVÍ

### 2.1 *Torulaspora delbrueckii*

Kvasinky *Torulaspora* se nepohlavně rozmnožují multilaterálním pučením nebo vytváří pseudohyfy. Buňky jsou sférické až oválné (obr. 1). Přirozeně se vyskytují v půdě, na rostlinách, v ovocných šťávách, vínu a pivu (Kurtzman et al., 2011).

Díky nízké produkci alkoholu a nežádoucích vedlejších produktů má kvasinka *Torulaspora delbrueckii* velký potenciál při výrobě nízkoalkoholických fermentovaných nápojů (Renault et al., 2009). Některé kmeny se využívají ve vinařství a při výrobě tradičního německého pšeničného piva Hefeweizen (Tataridis et al., 2013). *Torulaspora delbrueckii* je schopna fermentovat glukosu, některé kmeny také maltosu, maltotriosu a sacharosu. Fermentace v porovnání s klasickými vinařskými a pivovarskými kvasinkami probíhá pomaleji, produkováno je méně ethanolu, octové kyseliny, ethylacetátu, propanolu, isobutanolu a dalších vyšších alkoholů, naopak více acetaldehydu (Canonico et al., 2016).

*Torulaspora delbrueckii* vykazuje toleranci k ethanolu (až 5 % obj.) a k chmelovým látkám. Není schopna dekarboxylovat kyseliny kumarovou, skořicovou a ferulovou. Pivo vyrobené pomocí *T. delbrueckii* proto nebude obsahovat produkty této reakce (4-vinylfenol, 4-vinylbenzol a 4-vinylguajakol). Kmeny *T. delbrueckii* schopné fermentace maltosu a maltotriosu mohou být použity k přípravě piva s koncentrací ethanolu kolem 4 % obj., s vysokým obsahem vyšších alkoholů a dalších požadovaných senzoryckých látek. Kmeny neschopné fermentovat maltosu mají potenciál pro výrobu nízkoalkoholických piv s obsahem alkoholu pod 1 % obj. Piva vyrobená pomocí *T. delbrueckii* mohou vykazovat velkou variaci ovocných chutí (švestky, broskve, citrusy atd.). Dalším možným využitím je prefermentace mladiny pomocí *T. delbrueckii* a následná fermentace kvasinkami *Saccharomyces* (Michel et al., 2016).

Při fermentaci za použití směsi *S. cerevisiae* a *T. delbrueckii* byl zjištěn zvýšený podíl fenylethylacetátu, ethylkapronátu a ethylkaprylátu, které dodávají pivu zajímavé senzorycké vlastnosti (Canonico et al., 2016). Při použití *T. delbrueckii* k výrobě pšeničného piva měl výsledný produkt podobné vlastnosti jako při použití tradičních pivovarských kmenů, rozdílem bylo mírné zvýšení esterových vůní (růže, banán, žvýkačka) a naopak nižší intenzita fenolového aroma (Tataridis et al., 2013).

*T. delbrueckii* dokáže během fermentace transformovat monoterpeny. Jedná se o látky rostlinného původu obsažené mimo jiné v chmelu. Jejich množství má vliv na vlastnosti piva, například lina-

tion and storage, flavoring of beer by refermentation or during the degradation of hop bitter compounds from the hops wastes. Potentially technologically useful non-Saccharomyces yeasts include genera *Brettanomyces* and *Dekkera*, that are described in first part of this article, including also classification of the yeasts (Kochláňová et al., 2016).

## 2 THE OVERVIEW OF NON-SACCHAROMYCES YEASTS USED IN BREWING INDUSTRY

### 2.1 *Torulaspora delbrueckii*

*Torulaspora* cells asexually reproduce by multilateral budding or form pseudohyphas. Cells are spherical or oval (Fig. 1). They naturally occurs in soil, on plants, in fruit juices, wine and beer (Kurtzman et al., 2011).

The potential of *T. delbrueckii* to produce low-alcoholic fermented beverages is based on making alcohol in low concentrations and undesirable secondary products (Renault et al., 2009). Some strains are used in winemaking industry and for the production of traditional German Hefeweizen wheat beer (Tataridis et al., 2013). The yeast *Torulaspora delbrueckii* ferments glucose, some strains ferment also maltose, maltotriose and sucrose. The fermentation process in the brewing industry differs from fermentation in winemaking industry in slower fermentation, production of less ethanol, acetic acid, ethyl acetate, propanol, isobutanol and other higher alcohols, but produce more acetaldehyde (Canonico et al., 2016).

The yeasts *T. delbrueckii* are tolerant to ethanol (5 % vol.) and hop compounds. They are not capable of decarboxylating coumaric acid, cinnamic acid and ferulic acid. For this reason beer fermented by *T. delbrueckii* does not contain products of this reaction (4-vinylphenol, 4-vinylbenzol and 4-vinylguajakol), which are mostly undesirable. Some strains fermenting maltose and maltotriose could be used to produce beer with ethanol concentration about 4 % vol., high concentrations of higher alcohols and other required sensorial substances. The strains unable to ferment maltose have a potential for making low-alcoholic beers with alcohol concentration below 1 % (v/v). Beer produced by *T. delbrueckii* shows various fruity aromas (plum, peach, citrus etc.). Another utilization of *T. delbrueckii* is in a prefermentation process which is followed by fermentation of *Saccharomyces* yeasts (Michel et al., 2016).

The fermentation process realized by a mixture of *S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* cultures provides a higher amount of phenyl acetate, ethylcapronate and ethylcaprylate, which impart the beer with interesting sensorial quality (Canonico et al., 2016). The final product of wheat beer fermented by *T. delbrueckii* has quality similar to the beer produced by other brewing strains, but the difference was in a slightly higher concentration of ester aromas (rose, banana, bubblegum) and a lower concentration of phenolic aroma (Tataridis et al., 2013).

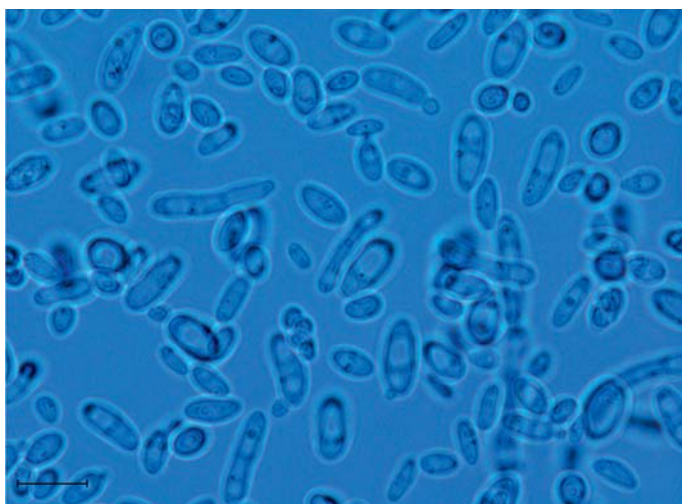
The yeast *Torulaspora delbrueckii* is able to transform monoterpenes during the fermentation process. Monoterpenes are substances contained in plants and also in hops. Their amounts influence the characters of beer; for example linalool provides flowery aroma of hops. During fermentation, *T. delbrueckii* transforms monoterpenes from hops. Nerol is isomerized to geraniol, linalool and  $\alpha$ -terpineol, geraniol to linalool, and linalool to  $\alpha$ -terpineol (King and Dickinson, 2000).

### 2.2 *Kluyveromyces*

Thermotolerance, ability to utilize various substrates (including xylose) and production of aroma compounds are the main characteristics of *Kluyveromyces marxianus*, that can be potentially applied in brewing (Jeong et al., 2012; Lee et al., 2012; Medeiros et al., 2001). Cells of *Kluyveromyces* are ovoid, ellipsoidal or cylindrical (Fig. 2). Colonies may be creamy or light brown, with smooth or wrinkled surface (Fig. 3). They asexually reproduce by multilateral budding on the narrow side of the cell and may produce pseudohyphas (Kurtzman et al., 2011).

The genome of *K. marxianus* contains numbers of genes responsible for processing various saccharides, for example xylulose (genes *XYL1*, *XYL2*, *XKS1*), mannose (gene *PMI40*), galactose (genes *GAL1*, *GAL2*), arabinose, raffinose and others. The aromatic compounds have a positive or negative influence on the aroma of final fermented products. These compounds include higher alcohols, esters and vicinal diketones. The most important commercial compound is 2-phenylethanol, which provides rose, honey and flower





Obr. 2 Buňky *Kluyveromyces marxianus* RIBM Km / Fig. 2 Cells of *Kluyveromyces marxianus* RIBM Km



Obr. 3 Kolonie *Kluyveromyces marxianus* RIBM Km na sladinném agaru s  $\text{CuSO}_4$  / Fig. 3 Colonies *Kluyveromyces marxianus* RIBM Km on wort agar with  $\text{CuSO}_4$

lul je spojován s květinovým aroma chmele. Nerol je isomerován na geraniol, linalool a  $\alpha$ -terpineol, geraniol na linalool, linalool na  $\alpha$ -terpineol (King a Dickinson, 2000).

## 2.2 *Kluyveromyces*

Termotolerance, schopnost růstu na různých substrátech (včetně xylosy) a produkce aromatických sloučenin jsou charakteristiky *K. marxianus*, kvasinky potenciálně aplikovatelné v pivovarství (Jeong et al., 2012; Lee et al., 2012; Medeiros et al., 2001). Buňky *Kluyveromyces* jsou ovoidní, elipsoidní nebo cylindrické (obr. 2). Kolonie mohou být krémové až světle hnědé, s hladkým nebo vrásčitým povrchem (obr. 3). Vegetativně se množí multilaterálním pučením na užší straně, může produkovat pseudohyfy (Kurtzman et al., 2011).

Genom *K. marxianus* obsahuje velké množství genů zodpovědných za zpracování různých cukrů, např. xylulose (geny *XYL1*, *XYL2*, *XKS1*), manose (*PMI40*), galaktose (*GAL1*, *GAL7*), arabinose, rafinose atd. Na výsledný produkt fermentace má velký vliv tvorba aromatických sloučenin, které mohou mít pozitivní, ale i nežádoucí účinek na aroma. Zahrnujeme mezi ně vyšší alkoholy, estery a vicinální diketony. Komerčně nejdůležitější sloučeninou je 2-fenylethanol zodpovědný za aroma po růžích, medu, květech (Cordente et al., 2012; Lertwattanasakul et al., 2015; Pires et al., 2014). *K. marxianus* je hlavní non-*Saccharomyces* kvasinkou v čadském pivu bili bili, kde se podílí na jeho okyselování (Maoura et al., 2005).

Druh *Kluyveromyces lactis* ve svém genomu obsahuje gen *KIATf*, díky kterému je schopna produkce acetyltransferasy k syntéze aromatických esterů. Expres tohoto genu u *Saccharomyces cerevisiae* může vést k novým senzoryckým vlastnostem mléčných výrobků, vína a piva (Van Laere et al., 2008). *Kluyveromyces lactis* dokáže

aroma (Cordente et al., 2012; Lertwattanasakul et al., 2015; Pires et al., 2014).

*K. marxianus* is the main yeast in the Tchad beer bili bili and is responsible for its acidification (Maoura et al., 2005).

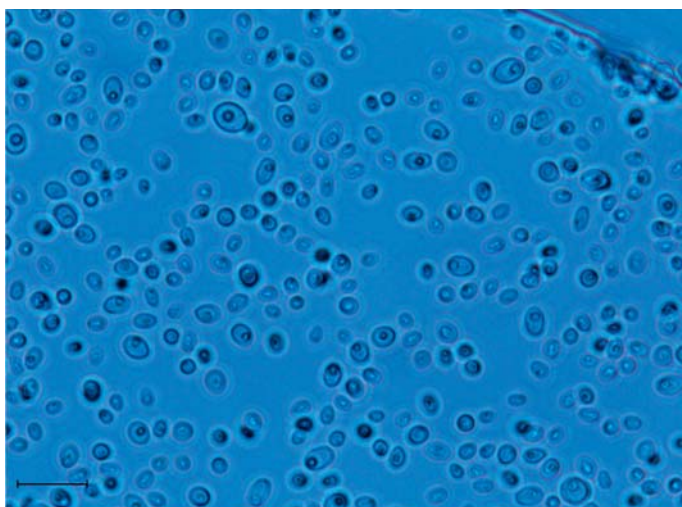
The species *Kluyveromyces lactis* contains gene *KIATf* encoding the enzyme acetyltransferase that is responsible for production of aromatic esters. Expression of this gene in *Saccharomyces cerevisiae* may lead to the formation of new sensorial characters of milk products, wine and beer (Van Laere et al., 2008). *K. lactis* is capable of transforming monoterpenes nerol and geraniol to linalool, -terpineol and citronellol (King and Dickinson, 2000).

*Kluyveromyces wickerhamii* is a producer of the kwkt killer toxin that can be used against *Dekkera/Brettanomyces* yeast (Comitini et al., 2004).

## 2.3 *Zygosaccharomyces*

Cells of the yeast *Zygosaccharomyces* are spherical to ovoid (Fig. 4), they asexually reproduce by multilateral budding, sometimes they form pseudohyphas. Colonies are white to cream, mostly with smooth surface (Fig. 5). They are osmotolerant, resistant to salts, ferment glucose and to a lesser extent also sucrose and maltose. Some strains are not able to ferment maltose (Kurtzman et al., 2011). *Zygosaccharomyces* can be found as contaminant in food and beverages, *Z. bailii* and *Z. bisporus* were isolated from beer (Bokulich et al., 2013).

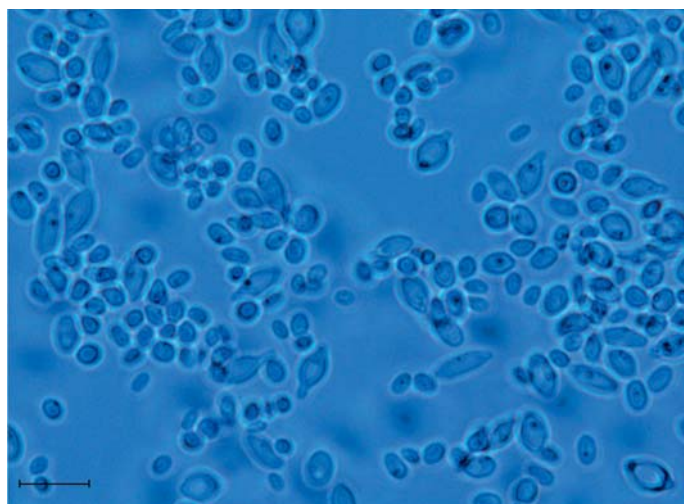
*Z. rouxii* can be potentially used as a producer of low-alcohol beer (Sohrabvandi et al., 2011). It forms high amounts of higher alcohols such as propanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-butanol, esters and acetaldehyde that have a positive effect on beer qual-



Obr. 4 Buňky *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8324 / Fig. 4 Cells of *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8324



Obr. 5 Kolonie *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8324 na WLN agaru / Fig. 5 Colonies of *Zygosaccharomyces rouxii* CCM 8324 on WLN agar



Obr. 6 Buňky *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4 / Fig. 6 Cells of *Hanseniaspora uvarum* RIBM A4



Obr. 7 Kolonie *Hanseniaspora uvarum* RIBM Spk 91 na sladinném agaru / Fig. 7 Colonies of *Hanseniaspora uvarum* RIBM Spk 91 on wort agar

transformovat monoterpeny nerol a geratinol na linalool,  $\alpha$ -terpineol a citronellol (King a Dickinson, 2000).

*Kluyveromyces wickerhamii* produkuje killer toxin kwkt, který lze využít proti kvasinkám *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini et al., 2004).

### 2.3 Zygosaccharomyces

Vegetativní buňky kvasinky *Zygosaccharomyces* jsou sférické až ovoidní (obr. 4), nepohyblivě se rozmnožují multilaterálním pučením, zřídka tvoří pseudohyfy. Kolonie mohou být bílé až krémové, většinou s hladkým povrchem (obr. 5). Jsou osmotolerantní a rezistentní vůči solím, zkvašují glukosu a v menší míře sacharosu a maltosu. Některé kmeny schopnost využívat maltosu postrádají (Kurtzman et al., 2011). Vyskytují se jako kontaminanty v potravinách a nápojích, *Z. bailii* a *Z. bisporus* byly izolovány z piva (Bokulich et al., 2013).

*Z. rouxii* může být použita jako potenciální producent nízkoalkoholického piva (Sohrabvandi et al., 2011). Vytváří velké množství vyšších alkoholů jako propanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-2-butanol, esterů a acetaldehydu, které působí pozitivně na chuť piva. Naopak velké množství diacetylu, 2-methylbutanalu a furfuraldehydu na kvalitu piva působí negativně (De Francesco et al., 2014).

### 2.4 Hanseniaspora uvarum

Kvasinky *Hanseniaspora* se nepohyblivě množí bipolárním pučením nebo mohou vytvářet pseudohyfy, které většinou nejsou vyvinuté, buňky jsou citronovité nebo ovoidní (obr. 6). Kolonie jsou bílé až krémové, většinou ploché s hladkým povrchem (obr. 7). Anamorfním rodem je *Kloeckera* (Kurtzman et al., 2011). *Hanseniaspora uvarum* (anamorfova je *Kloeckera apiculata*) z cukrů fermentuje pouze glukosu. Je schopna produkovat značné množství octové kyseliny, ethylacetátu a acetoinu (Cabranes et al., 1997; Romano et al., 2008). Nachází se v první fázi spontánního kvašení piva lambik. Po přibližně 3 týdnech, kdy koncentrace alkoholu dosáhne 3–4 %, je její růst zastaven a je nahrazena *Saccharomyces* spp. (Van Oevelen et al., 1977).

### 2.5 Saccharomycodes ludwigii

Vegetativní buňky *Saccharomycodes* mají citronovitý tvar (obr. 8), nepohyblivě se množí bipolárním pučením na široké základně, pseudomycelium nevytváří nebo je málo vyvinuté. Kolonie jsou bílé až krémové, s hladkým povrchem (obr. 9). Vyskytují se běžně v půdě, na ovoci, izolovány byly z vína (Němec a Matoulková, 2015). *S. ludwigii* zkvašuje glukosu, sacharosu a rafinosu (Kurtzman et al., 2011). Protože nedokáže fermentovat maltosu a maltotriosu, může být potenciálně využita k výrobě nízkoalkoholických piv. Fermentace probíhá velice pomalu i za teploty okolo 20 °C (Brányik et al., 2012). Při kvašení mladiny pomocí *S. ludwigii* vznikají piva s obsahem ethanolu pod 1 % obj. Některé kmeny *S. ludwigii* produkují v porovnání s kulturními kvasinkami vyšší množství esterů, vyšších alkoholů a zároveň jen zanedbatelné množství diacetylu a dalších nežádoucích látek (De Francesco et al., 2014).

ity. However, high concentrations of diacetyl, 2-methylbutanal and furfuraldehyde are not desirable in beer (De Francesco et al., 2014).

### 2.4 Hanseniaspora uvarum

*Hanseniaspora* yeasts asexually reproduce by bipolar budding or may form pseudohyphae. Cells are lemon-like or ovoid (Fig. 6). Colonies are white to cream, mostly flat with smooth surface (Fig. 7). Anamorph stage of *Hanseniaspora* is *Kloeckera* (Kurtzman et al., 2011). *Hanseniaspora uvarum* (anamorph *Kloeckera apiculata*) can ferment only glucose. It is able to produce considerable amounts of acetic acids, ethyl acetate and acetoin (Cabranes et al., 1997; Romano et al., 2008). *H. uvarum* occurs in the first phase of lambic fermentation. After approximately 3 weeks, when the alcohol content reaches 3–4 %, its growth ends and is replaced by *Saccharomyces* spp. (Van Oevelen et al., 1977).

### 2.5 Saccharomycodes ludwigii

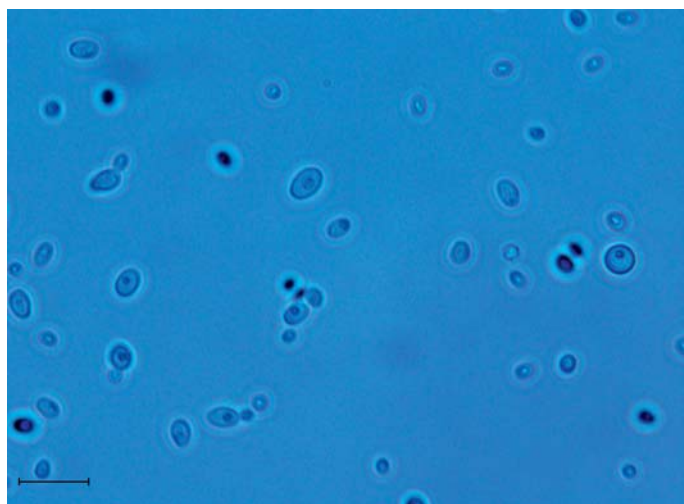
Vegetative cells of *Saccharomycodes* have a lemon-like shape (Fig. 8) and they asexually reproduce by bipolar budding on the broad base. They either do not form pseudomycelium or it is poorly developed. Colonies are white to cream, with smooth surface (Fig. 9). They occur in soil, on fruits and were isolated from wine (Němec and Matoulková, 2015). *S. ludwigii* ferments glucose, sucrose and raffinose (Kurtzman et al., 2011). Since this yeast does not ferment maltose and maltotriose, it can be potentially used for low-alcohol beer production. Fermentation proceeds very slowly even at temperatures around 20 °C (Brányik et al., 2012). Fermentation of wort by *S. ludwigii* gives rise to beers with ethanol content below 1 % (v/v). In comparison to brewer's yeast some strains of *S. ludwigii* produce higher amounts of esters, higher alcohols and negligible concentrations of diacetyl and other undesired compounds (De Francesco et al., 2014).

### 2.6 Galactomyces candidus

Anamorph stage of *Galactomyces* is *Geotrichum*. The cells asexually reproduce by binary fission, form true hyphae with rounded terminal cells (Kurtzman et al., 2011). *Galactomyces candidus* (anamorph *Geotrichum candidum*) can be used in the biocontrol of microbes (especially *Fusarium*) during malting of barley. *G. candidus* naturally occurs in germinating barley and malt and has no negative effect on the processes. Inoculation of malting barley by *G. candidus* leads to the inhibition of growth of *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus*, thus reducing the presence of mycotoxins and gushing (Boivin and Malanda, 1999).

Molds can produce toxins during malting of barley. The most common food toxins are aflatoxins, ochratoxins, zearalenones, fumosins and trichothecenes. Trichothecenes include toxins like T-2 toxins, H2 toxins, nivalenol and others. T-2 toxin induces fragmentation of DNA and inhibits protein synthesis. *Galactomyces* can decrease the concentration of T-2 toxin by 10 % and partially inhibit the growth of the mold (*Fusarium langsethiae*). There are two proposed mechanisms





Obr. 8 Buňky *Saccharomycodes ludwigii* DSM 3437 / Fig. 8 Cells of *Saccharomycodes ludwigii* DSM 3437



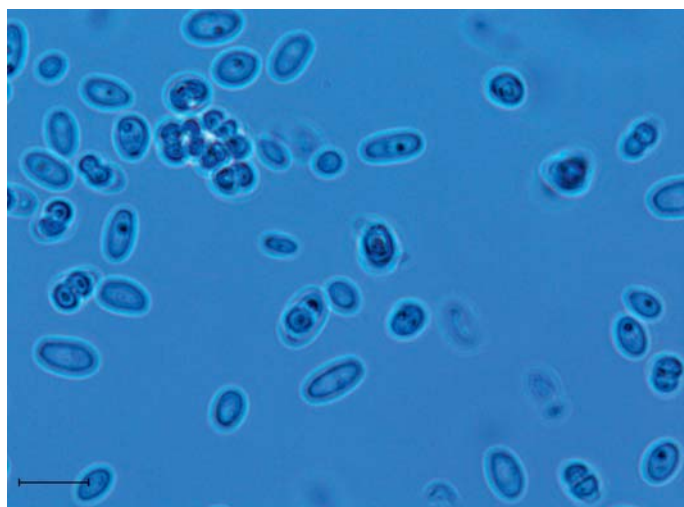
Obr. 9 Kolonie *Saccharomycodes ludwigii* DSM 3437 na lysinovém agaru / Fig. 9 Colonies of *Saccharomycodes ludwigii* DSM 3437 on lysine agar

## 2.6 *Galactomyces candidus*

Anamorfním rodem *Galactomyces* je *Geotrichum*. Nepohlavně se nemnoží pučením ale příčným dělením, vytváří pravé hyfy se zakulacenými koncovými buňkami (Kurtzman et al., 2011). *Galactomyces candidus* (anamorfa *Geotrichum candidum*) může být použita k bio-kontrolu mikroorganismů při sladování ječmene, především plísně *Fusarium*. *G. candidus* se v klíčícím ječmenu a sladu vyskytuje přirozeně a nemá negativní efekt na průběh sladování. Inokulace sladového ječmene kulturou *G. candidus* má za následek inhibici růstu plísni rodu *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus*, a tím omezení výskytu mykotoxinů a přepěňování piva (Boivin a Malanda, 1999). Plísně představují problém při sladování z důvodu tvorby toxinů v ječmeni. Nejběžnější potravinářské toxiny jsou aflatoxiny, ochratoxiny, zearalenony, fumosiny a trichotheceny. Trichotheceny zahrnují toxiny jako T-2 toxin, H2-toxin, nivalenol a jiné. T-2 toxin indukuje fragmentaci DNA a inhibuje proteosyntesu. Právě kvasinka rodu *Geotrichum* snižuje koncentraci T-2 toxinu o 10% a částečně inhibuje růst plísně (*Fusarium langsethiae*). Předpokládají se dva mechanismy inhibice: 1. degradace toxinu po jeho produkci plísní, 2. inhibice produkce toxinu. Přesný mechanismus však není doposud známý (Boivin, 2005; Gastélum – Martínez et al., 2012).

## 2.7 *Pichia*

Do rodu *Pichia* se dříve řadilo přes 100 druhů kvasinek, většina byla později přeřazena do jiných rodů. V současné době má rod *Pichia* asi 20 druhů. Buňky jsou kulaté, ovoidní až elipsoidní (obr. 10 a 11). Kolonie jsou bílé, krémové nebo světle hnědé, s různě členěným povrchem (obr. 12 a 13). Z cukrů fermentují pouze glukosu (Kurtzman et al., 2011).



Obr. 10 Buňky *Pichia norwengensis* KS 2 / Fig. 10 Cells of *Pichia norwengensis* KS 2

of inhibition: 1. degradation of toxin after its production by the mold, 2. inhibition of toxin production, but the exact mechanism is not yet known (Boivin, 2005; Gastélum – Martínez et al., 2012).

## 2.7 *Pichia*

The genus *Pichia* formerly contained more than 100 species; most of them were later transferred to different genera. At present the genus *Pichia* contains ca. 20 species. Cells of *Pichia* are round, ovoid or ellipsoidal (Fig. 10 and 11). Colonies are white, creamy or light brown, with various surface (Fig. 12 and 13). They can ferment only glucose (Kurtzman et al., 2011).

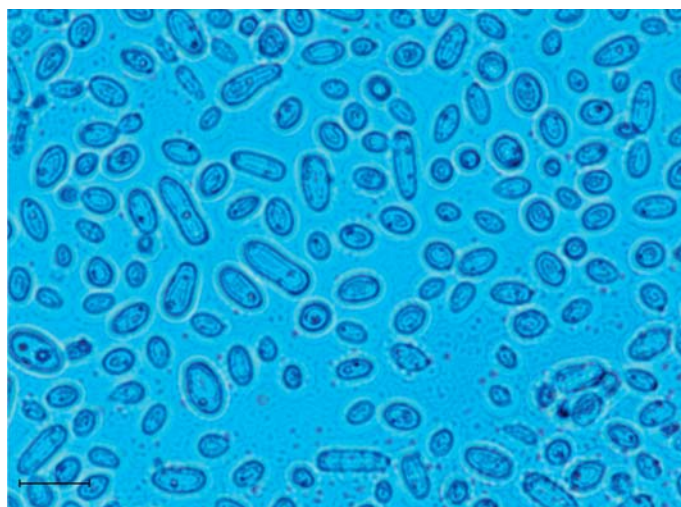
*P. fermentans* (anamorph *Candida lambica*) occurs as a contaminant of beer (van der Aa Kühle a Jespersen, 1998) and was also isolated from the spontaneous fermentation of Belgian and American beers (Bokulich et al., 2012; Spitaels et al., 2015).

*P. membranifaciens* (anamorph *Candida valida*) forms PMKT and PMKT2 toxins that can be used in biocontrol of wild yeasts (e.g. *D. bruxellensis*) during production of fermented beverages (Santos et al., 2008). It produces acetaldehyde, ethyl acetate, isoamylacetate and 4-ethylphenol (Saez et al., 2011).

*P. kudriavzevii* (anamorph *Candida krusei*) occurs during spontaneous fermentation of the Ikigage beer in Rwanda and Kaffir in South Africa (Lyumugabe et al., 2012). It contributes to the overall aroma by production of caprinic acid, butyric acid, ethyl butyrate, ethylcaprylate, isobutyrate and phenylalcohols (Lyumugabe et al., 2014).

## 2.8 *Wickerhamomyces anomalus*

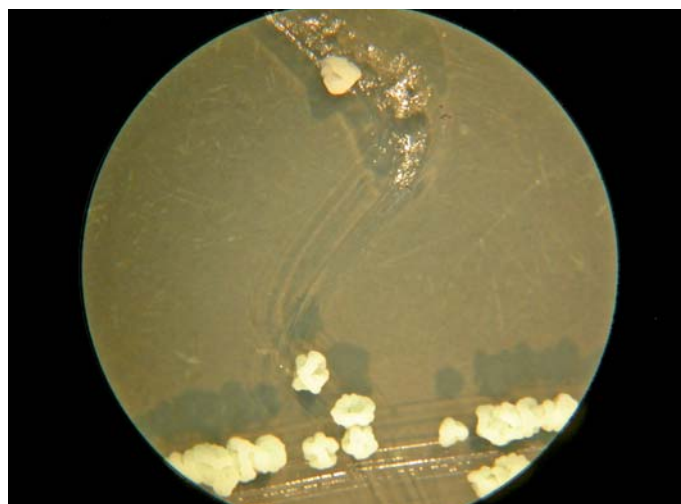
Cells of the yeast *Wickerhamomyces* are round, elongated or ovoid (Fig. 14). They asexually reproduce by multilateral budding



Obr. 11 Buňky *Pichia membranifaciens* RIBM Spk 25 / Fig. 11 Cells of *Pichia membranifaciens* RIBM Spk 25



Obr. 12 Kolonie *Pichia norwengensis* KS 2 na sladinném agaru / Fig. 12 Colonies of *Pichia norwengensis* KS 2 on wort agar



Obr. 13 Kolonie *Pichia membranifaciens* RIBM Spk 25 na WLN agaru / Fig. 13 Colonies of *Pichia membranifaciens* RIBM Spk 25 on WLN agar

*Pichia fermentans* (anamorfa *Candida lambica*) se vyskytuje jako kontaminant piva při řízeném kvašení (van der Aa Kühle a Jespersen, 1998), zároveň byla izolována ze spontánně kvašeného belgického a amerického piva (Bokulich et al., 2012; Spitaels et al., 2015).

*Pichia membranifaciens* (anamorfa *Candida valida*) vylučuje toxiny PMKT a PMKT2, které mohou být využity ke kontrole divokých kvasinek (např. *D. bruxellensis*) při výrobě fermentovaných nápojů (Santos et al., 2008). Produkuje acetaldehyd, ethylacetát, isoamylacetát a 4-ethylfenol (Saez et al., 2011).

*Pichia kudriavzevii* (anamorfa *Candida krusei*) se vyskytuje při spontánní fermentaci piva Ikigage z Rwandy a Kaffir z Jižní Afriky (Lyumugabe et al., 2012). Přispívá k celkovému aroma produkci kyseliny kaprinové, máselné, esterů ethylbutyrátu, ethylkaprylátu, isobutylbutyrátu a fenylalkoholů (Lyumugabe et al., 2014).

## 2.8 *Wickerhamomyces anomalus*

Buňky kvasinky *Wickerhamomyces* jsou kulaté, prodloužené nebo ovoidní (obr. 14). Vegetativně se množí multilaterálním pučením na úzké straně. Některé druhy vytvářejí pseudohyfy i pravé hyfy (Kurtzman et al., 2011). Kolonie jsou bílé až krémové, s různě členěným povrchem (obr. 15).

*Wickerhamomyces anomalus* (synonymum *Pichia anomala*; anamorfa *Candida pelliculosa*) dobře snáší kyselé a slané prostředí, dokáže růst i v anaerobních podmínkách, při nízké vodní aktivitě a vysokém osmotickém tlaku (Passoth et al., 2006). Fermentuje glukosu, galaktosu, maltosu a sacharosu. Vyskytuje se v půdě, na rostlinách, způsobuje kažení ovoce, mléčných výrobků a pečiva (Kurtzman et al., 2011). Vytváří velké množství ethylacetátu. Ethylacetát v podmínkách *in vitro* způsobuje aneuploidii u kvasinky *Saccharomyces*

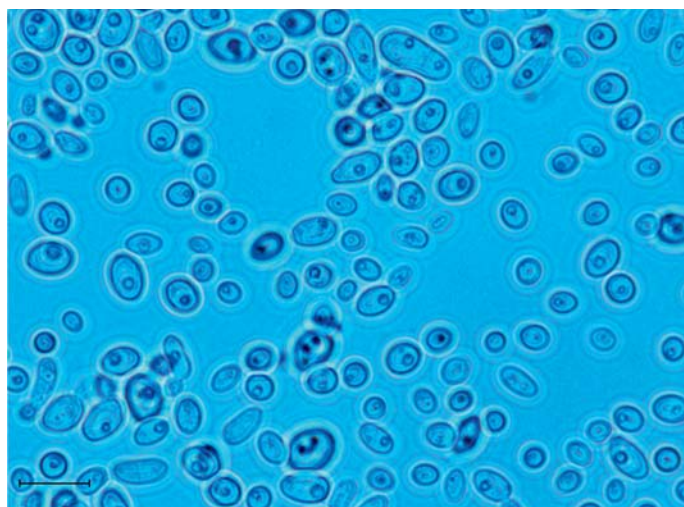
on the narrow base. Some species may form pseudohyphas or true hyphas (Kurtzman et al., 2011). Colonies are white or creamy with various surface (Fig. 15).

*Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*; anamorpha *Candida pelliculosa*) is resistant to acidic and salty environments can grow in anaerobic conditions, at low water activity and high osmotic pressure (Passoth et al., 2006). It ferments glucose, galactose, maltose and sucrose. *W. anomalus* occurs in soil, on plants and may cause spoilage of fruits, and dairy and bakery products (Kurtzman et al., 2011). It produces high amount of ethyl acetate. Under *in vitro* conditions ethyl acetate causes aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. The mechanism of the effect is damage to the dividing spindle (Zimmermann et al., 1985).

*Wickerhamomyces anomalus* is used for biocontrol of molds *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* and *Rhizopus* during storage of grains. Antifungal activity of genus *Wickerhamomyces* is based on the production of ethyl acetate and CO<sub>2</sub> and consumption of oxygen (Druvefors et al., 2005; Fredlund et al., 2004).

Inoculation of *W. anomalus* into the malting process has no negative impact on natural bacterial microflora of malting barley and does not affect germination of grains. During the malting process *W. anomalus* inhibits the growth of molds by forming film on the surface of grains, preventing the adhesion of the mold to the grains. At the same time *W. anomalus* can produce chitinase that disturbs the cell envelope of molds (Laitila et al., 2007, 2011).

Killer factors produced by *W. anomalus* disturb the integrity of cell envelope in target cells of *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis* (Druvefors, 2004) and *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini et al., 2004).



Obr. 14 Buňky *Wickerhamomyces anomalus* RIBM BP8 / Fig. 14 Cells of *Wickerhamomyces anomalus* RIBM BP8



Obr. 15 Kolonie *Wickerhamomyces anomalus* RIBM BP8 na lysinovém agaru / Fig. 15 Colonies of *Wickerhamomyces anomalus* RIBM BP8 on lysine agar



*cerevisiae*. Mechanismem účinku je narušení dělicího vřeténka (Zimmermann et al., 1985).

Kvasinka *W. anomalus* se používá k biologické kontrole plísní *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* a *Rhizopus* během skladování obilí. Antifungální aktivita rodu *Wickerhamomyces* spočívá v tvorbě ethylacetátu, zvýšené produkci CO<sub>2</sub> a spotřebě kyslíku (Druvefors et al., 2005; Fredlund et al., 2004). Přidání *W. anomalus* do procesu sladování nemá nežádoucí efekt na přirozenou bakteriální mikroflóru ve sladovaném ječmeni a zároveň nemá vliv na klíčení zrn. Během sladování ječmene omezuje *W. anomalus* růst plísní tím, že tvoří povlak na vnější straně zrna a brání plísni v přichycení. Zároveň může produkovat chitinázu degradující buněčnou stěnu plísně (Laitila et al., 2007, 2011).

Killer faktory produkované *W. anomalus* narušují integritu buněčné stěny cílových buněk kvasinek *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *M. pachydermatis* (Druvefors, 2004) a *Dekkera/Brettanomyces* (Comitini et al., 2004).

### 2.9 *Schizosaccharomyces pombe*

Vegetativní stádia kvasinek rodu *Schizosaccharomyces* se na rozdíl od většiny kvasinek nerozmnožují pučením, ale příčným dělením (tzv. poltivé kvasinky). Dokáží fermentovat glukosu a další sacharidy, vyskytují se v prostředí s vysokým obsahem cukrů (Kurtzman et al., 2011). Druh *Schizosaccharomyces pombe* byl poprvé izolován z afrického piva vyráběného z prosa – „pombe“ je svahilský výraz pro pivo (Forsburg, 2005). Může se vyskytovat při spontánní fermentaci některých druhů piv (Liumugabe et al., 2011), ale ve větší míře nemá pro výrobu piva uplatnění. Podílí se na fermentaci nápoje kombucha (Teoh et al., 2004) a lze ji využít ke zlepšení sensorických vlastností červeného vína (Loira et al., 2015).

### 2.10 *Candida*

Buňky rodu *Candida* jsou kulaté, cylindrické, oválné, mohou mít tvar trojúhelníku nebo půlměsíce. Množí se holoblastickým pučením, mohou tvořit pseudohyfy i pravé segmentované hyfy. Vyskytují se v půdě, na tělech živočichů a člověka jako komenzálové nebo oportunní patogeny, jsou izolovány z potravin a nápojů (Kurtzman et al., 2011).

*Candida tropicalis* fermentuje glukosu, galaktosu a maltosu, produkuje mléčnou kyselinu, další organické kyseliny a 2-butanon. Směsná kultura *C. tropicalis* a *S. cerevisiae* může být použita jako startovací kultura při fermentaci čirokového piva Tchapalo. Smíšená kultura podporuje produkci ethanolu (N'Guessan et al., 2010). Tato směs může být lyofilizována a uchovávána po delší dobu, což zajišťuje lepší kvalitu výroby tradičních afrických piv (N'Guessan et al., 2016).

*Candida shehatae* nefermentuje maltosu a maltotriosu, a proto může být použita k výrobě piva s obsahem alkoholu pod 0,5% obj. Výsledné pivo obsahuje nízkou koncentraci diacetylu, vysokou koncentraci esterů a má chuť srovnatelnou s nízkoalkoholickými pivy vyrobenými za použití jiných metod. Díky použití mladiny s nižší koncentrací cukrů není výsledný produkt výrazně sladký ani nechutná po mladině (Li et al., 2011).

### 2.9 *Schizosaccharomyces pombe*

Vegetative stages of the *Schizosaccharomyces* yeast reproduce by binary fission (so-called fission yeast). They can ferment glucose and other saccharides and occur in environments with high concentration of sugars (Kurtzman et al., 2011).

*Schizosaccharomyces pombe* was isolated for the first time from African beer fermented from millet – „pombe“ is the Swahili term for beer (Forsburg, 2005). *S. pombe* participates during spontaneous fermentation of some beers (Liumugabe et al., 2011), but has no potential for beer production on a large scale. It occurs in the kombucha beverage (Teoh et al., 2004) and can potentially be used for improvement of sensorial characteristics of red wine (Loira et al., 2015).

### 2.10 *Candida*

*Candida* cells are rounded, cylindrical, oval, triangular or half-moon-like. They asexually reproduce by holoblastic budding, may form pseudohyphae or true segmented hyphae. They occur in soil, on the surface of animals and humans as commensal or opportunistic pathogens. They are commonly isolated from food and beverages (Kurtzman et al., 2011).

*Candida tropicalis* ferments glucose, galactose and maltose, forming lactic acid and some other organic acids and 2-butanone. A mixture of *C. tropicalis* and *S. cerevisiae* may be used as a starter culture for fermentation of Tchapalo sorghum beer. The mixed culture supports ethanol production (N'Guessan et al., 2010). The mixture can also be lyophilized and stored for a longer period, thus ensuring better quality of traditional African beers (N'Guessan et al., 2016).

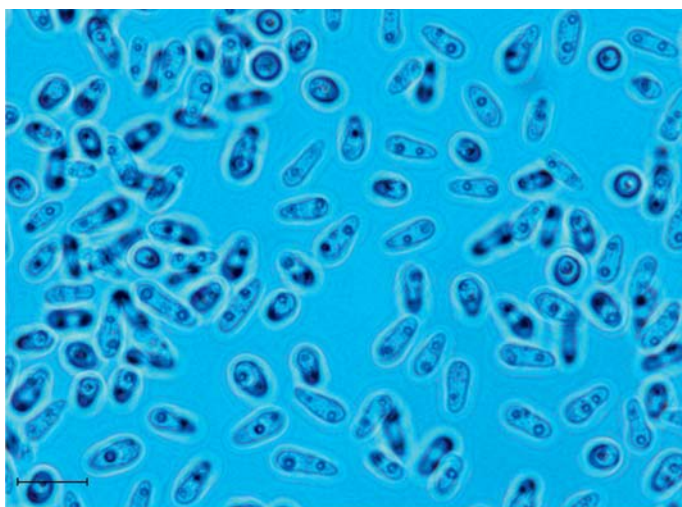
*Candida shehatae* does not ferment maltose and maltotriose and can thus be used for production of beer with alcohol level below 0.5% (v/v). The product then contains a low amount of diacetyl and a high concentration of esters with taste comparable to usual low-alcohol beers. By using wort with a lower concentration of sugars the resulting product is not appreciably sweet or taste after wort (Li et al., 2011).

*Candida parapsilosis* is able to degrade hop bitter compounds (humulone, lupulone) in hops. After removal of bitterness the processed hops can be used as feed for farm animals (Huszcz et al., 2008).

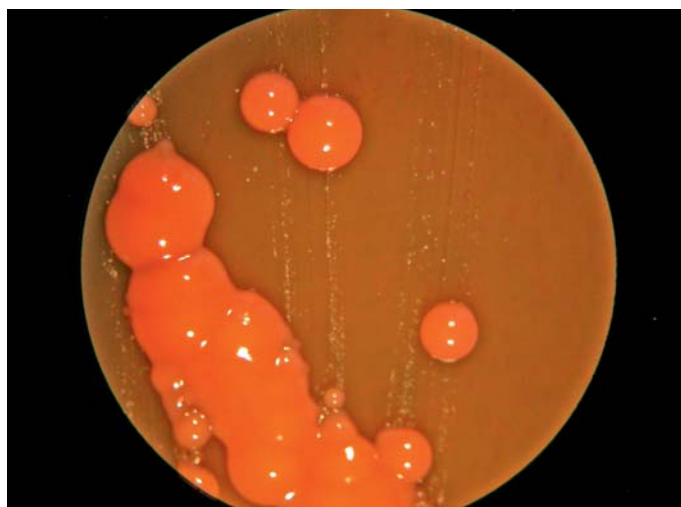
### 2.11 *Rhodotorula glutinis*

The yeast *Rhodotorula* belongs to Basidiomycota. The cells are spherical, ovoid or ellipsoidal (Fig. 16). They reproduce by budding. True hyphae or pseudohyphae may be formed. Sexual reproduction is not known. Colonies are pink or red, mostly with mucilaginous surface (Fig. 17). *Rhodotorula* lacks the ability to ferment sugars. The cells may produce carotenoids, high amounts of lipids, urease, acetic acid and acetaldehyde (Kurtzman et al., 2011). Some species were isolated from spontaneously fermented lambic beer (Bokulich et al., 2012).

*Rhodotorula glutinis* can be used to biocontrol *Penicillium* and *Botrytis* fungi (Kurtzman et al., 2011) or for the production of carotenoid pigments in the food industry (Hernández-Almanza et al., 2014). The use of *R. glutinis* for beer production has not been de-



Obr. 16 Buňky *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403 / Fig. 16 Cells of *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403



Obr. 17 Kolonie *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403 na sladivém agaru / Fig. 17 Colonies of *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403 on wort agar

*Candida parapsilosis* může v pivovarském průmyslu najít využití pro svou schopnost rozkládat hořké kyseliny (humulon, lupulon) z chmele. Chmel použitý při vaření piva se po zbavení hořkosti může využít jako krmivo pro hospodářská zvířata (Huszcza et al., 2008).

### 2.11 *Rhodotorula glutinis*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* patří mezi Basidiomycota. Jsou sférické, ovoidní nebo elipsoidní (obr. 16). Množí se pučením. Mohou vytvářet pravé i nepravé hyfy. Pohlavní reprodukce není známa. Kolonie jsou zbarvené růžové až červeně, povrch je většinou slizovitý (obr. 17). Postrádají schopnost fermentovat cukry. Mohou produkovat karotenoidy, velké množství lipidů, ureázu, kyselinu octovou a acetaldehyd (Kurtzman et al., 2011). Některé druhy byly izolovány ze spontánně kvašeného piva (Bokulich et al., 2012).

*Rhodotorula glutinis* může být použita k biokontrolě plísní rodu *Penicillium* a *Botrytis* (Kurtzman et al., 2011) nebo k výrobě karotenoidových pigmentů v potravinářství (Hernández-Almanza et al., 2014). Dosud nebylo popsáno využití *R. glutinis* pro výrobu piva. Může být využita podobně jako *C. parapsilosis* pro degradaci hořkých látek v chmelu (Huszcza a Bartmańska, 2008).

### 2.12 Ostatní non-Saccharomyces kvasinky

Non-Saccharomyces kvasinky mohou být také využity k ochucování piva. Kvasinka *Ogataea minuta* (čeleď Saccharomycetaceae) přeměňuje při refermentaci piva glukozid salicin na salicylalkohol a na salicylacetát, který dodává pivu mandlovou příchutí (Vanderhaegen et al., 2003).

*Schwanniomyces occidentalis* (čeleď Debaryomycetaceae) produkuje killer toxin proti citlivým kmenům *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al., 2000). Dokáže rozkládat škrob. Termolabilní  $\alpha$ -amylasa a amyloglukosidasa mohou být využity k produkci nízkokalorických piv (Dowhanick et al., 1990; Stewart a Sills, 1984).

*Meyerozyma guilliemondii* (čeleď Debaryomycetaceae) dokáže inhibovat růst plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* nebo *Botrytis*. Využívá se k ochraně plodin proti plísni při skladování (Petersson a Schnürer, 1995) nebo pro ochranu sladu proti plísni *Fusarium* (Laitila et al., 2007).

### PODĚKOVÁNÍ

Článek byl zpracován s podporou Specifického výzkumu Masarykovy univerzity (MUNI/A/1013/2015) a projektu Výzkumné senzorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

### LITERATURA / REFERENCES

- Boivin, P., 2005: Emergent mycotoxins in malting barley. Proceedings of the Congress – European Brewery Convention. Fachverlag Hans Carl.
- Boivin, P., Malanda, M., 1999: Inoculation by *Geotrichum candidum* during malting of cereals or other plants. US Patent 5955070 A.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., Mills, D.A., 2012: Brew-house-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American Coolship Ale. PLoS ONE 7(4): e35507. DOI: 10.1371/journal.pone.0035507.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., 2013: The microbiology of malting and brewing. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77: 157–172. DOI: 10.1128/MMBR.00060-12.
- Brányik, T., Silva, D.P., Basczyński, M., Lehnert, R., Almeida, de Silva, J.B., 2012: A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. J. Food. Eng. 108: 493–506.
- Cabranes, C., Mangas, J. J., Blanco, D., 1997: Selection and biochemical characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* isolated from Spanish cider. J. Inst. Brew. 103: 165–169.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., Ciani, M., 2016: *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. Food Microbiol. 56: 45–51.
- Chen, W.B., Han, Y.F., Jong, S.C., Chang, S.C., 2000: Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5348–5352.
- Comitini, F., De Ingeniis, J., Pepe, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2004: *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 238: 235–240.
- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., et al., 2012: Flavour-active wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 96: 601–618.
- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., 2014: Screening of new strains of *Saccharomycodes ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. J. Inst. Brew., 121: 113–121.
- Dowhanick, T.M., Russell, I., Scherer, S.W., Stewart, G.G., Seligy, V.L., 1990: Expression and regulation of glucoamylase from the yeast *Schwanniomyces castellii*. J. Bacteriol., p. 2360–2366.
- Druvefors, U.Å., 2004: Yeast biocontrol of grain spoilage moulds – Mode of action of *Pichia anomala*. Dizertační práce, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 44s. ISBN 91-576-6493-5.
- Forsburg, S.L., 2005: The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. Gravit. Space. Biol. Bull. 18: 3–9.
- Fredlund, E., Druvefors, U.Å., Olstorp, M.N., Passoth, V., Schnürer, J., 2004: Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. FEMS Microbiol. Lett. 238: 133–137, doi:10.1016/j.femsle.2004.07.027.
- Gastelum-Martinez, E., Compant, S., Taillandier, P., Mathieu, F., 2012: Control of t-2 toxin in *Fusarium langsethiae* and *Geotrichum candidum* co-culture. Arh. Hig. Rada. Toksikol., 63: 447–456, doi:10.2478/10004-1254-63-2012-2206.
- Hernández-Almanza, A., Montañez, J.C., Aguilar-González, M.A., Martínez-Ávila, C., Rodríguez-Herrea, R., Aguilar, C.N., 2014: *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. Food Biosci. 5: 64–72.
- Huszcza, E., Bartmańska, A., 2008: The implication of yeast in debittering of spent hops. Enzyme Microbiol. Tech. 42: 421–425.
- Huszcza, E., Bartmańska, A., Anioł, M., Maczka, W., Zolnierczyk, A., Wawrzęńczyk, C., 2008: Degradation of hop bitter acids by fungi. Waste Manag. 28: 1406–1410.
- Jeong, H., Lee, D.H., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, K., Song, J.Y., Kim, B.K., Sung, B.H., Park, J.C.H., Sohn, J.H., Koo, H.M., Kima, J.,

scribed. It can be used like *C. parapsilosis* for the degradation of the bitter substances in hops (Huszcza and Bartmańska, 2008).

### 2.12 Other non-Saccharomyces yeasts

Non-Saccharomyces yeasts can be used for beer flavoring. Refermentation of beer by *Ogataea minuta* (family Saccharomycetaceae) is accompanied by the transformation of the glucoside salicin to salicyl alcohol and salicylate that give rise to almond aroma (Vanderhaegen et al., 2003).

*Schwanniomyces occidentalis* (family Debaryomycetaceae) produces killer toxin against sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al., 2000).  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase enzymes may be used for low-caloric beer production (Dowhanick et al., 1990; Stewart a Sills, 1984).

*Meyerozyma guilliemondii* (family Debaryomycetaceae) inhibits the growth of genera *Aspergillus*, *Penicillium* or *Botrytis*. It is used for the protection of crop plants during storage (Petersson and Schnürer, 1995) and may be used for the protection of malt against *Fusarium* (Laitila et al., 2007).

### ACKNOWLEDGEMENTS

The article was prepared with the support of Specific research at Masaryk University (MUNI/ A1013/2015) and the project Research Sensory Center in Prague and Research and Development Brewery – Sustainability and Development (LO1312).



- 2012: Genome sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555. Eukaryot. Cell 11(12), 1584–1585, doi:10.1128/EC.00260-12.
- Johnson, E.A., 2013: Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97: 503–517, doi: 10.1007/s00253-012-4497-y.
- King, A., Dickinson, J.R., 2000: Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. Yeast, 16: 499–506.
- Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Kvasinky non-Saccharomyces a jejich význam v pivovarském průmyslu – I. část – *Brettanomyces* (Dekkera). Kvasny Prum. 62(7-8): 198. doi: 10.18832/kp2016024
- Kosař, K., Procházka, S., 2000: Technologie výroby sladu a piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha, 398 s., ISBN 80-902658-6-3.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011: The Yeast, a taxonomic study, 5th edition, Elsevier, Burlington, USA, 2384 s. ISBN: 978-0-444-52149-1.
- Laitila, A., Sarlin, T., Kotaviita, E., Huttunen, T., Home, S., Wilhelmsen, A., 2007: Yeasts isolated from industrial maltings can suppress *Fusarium* growth and formation of gushing factors. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34: 701–713.
- Laitila, A., Sarlin, T., Raulio, M., Wilhelmsen, A., Kotaviita, E., Huttunen, T., Juvonen, R., 2011: Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). Antonie van Leeuwenhoek 99: 75–84.
- Lee, K.S., Kim, J.S., Heo, P., et al., 2013: Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* promoters for heterologous gene expression in *Kluyveromyces marxianus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97: 2029–2041, doi:10.1007/s00253-012-4306-7.
- Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodru-samee, N., Matsutani, M., Murata, M., Fujimoto, N., Tsuchikane, K., Limtong, S., Fujita, N., Yamada, M., 2015: Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. Biotechnol. Biofuels. 8:47.
- Li, H., Liu, Y., Zhang, W., 2011: Method for preparing nonalcoholic beer by *Candida shehatae*, China Patent 102220198.
- Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M.J., González, C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., 2015: Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. Food Res. Int. 76: 325–333.
- Lyumugabe, F., Gros, J., Nzungize, J., Bajyana, E., Thornart, P., 2012: Characteristics of African traditional beers brewed with sorghum malt: a review. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 16: 509–530.
- Lyumugabe, F., Uydenga, J.P., Songa, E.B., Thonart, P., 2014: Production of traditional sorghum beer “Ikigage” using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and *Issatckenkia orientalis* as starter cultures. Food Nutr. Sci. 5: 507–515.
- Maoura, N., Mbaiguinam, M., Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Pourquie, J., 2005: Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. Afr. J. Biotechnol. 4: 646–656.
- Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Christen, P., Fontoura, P.S.G., de Freitas, R.J.S., Soccol, C.R., 2001: Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. World. J. Microbiol. Biotechnol., 17: 767–771.
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., Hutzler, M., 2016: Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. Yeast 33: 129–144.
- Němec, M., Matoulková, D., 2015: Základy obecné mikrobiologie, 1. vyd., Masarykova univerzita, Brno, 256 s. ISBN 978-80-210-7923-6.
- N'Guessan, F.K., N'Dri, D.Y., Camara, F., Djè, K.M., 2010: *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 693–699.
- N'guessan, F.K., Brou, K., Jacques, N., Casaregola, S., Dje, K.M., 2011: Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. Antonie Van Leeuwenhoek. 99: 855–864.
- N'Guessan, F.K., Coulibaly, H.W., Alloue-Borand, M.W.A., Cot, M., Djè, K.M., 2016: Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. Food Sci. Nutr. 4: 34–41.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.A., Schnürer, J., 2006: Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. FEMS Yeast Res. 6: 3–13.
- Petersson, S., Schnürer, J., 1995: Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1027–1032.
- Pires, E.J., Teixeira J., Brányik, T., Vicente, A., 2014: Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol., 98: 1937–1949, doi: 10.1007/s00253-013-5470-0.
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009: Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 13: 201–210.
- Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008: Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. J. Appl. Microbiol. 104: 1577–1585.
- Saez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E., Sangorrín, M., 2011: Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. Food Microbiol. 28: 503–509.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009: PMKT2, a newkiller toxin from, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. Microbiology 155: 624–634. doi:10.1099/mic.0.023663-0.
- Sohrabvandi, S., Razavi, A.H., Mousavi, M., Mortazavian, A.M., 2011: Characteristics of different brewer's yeast strains used for non-alcoholic beverage fermentation in media containing different fermentable sugars. Iran. J. Biotechnol. 8: 178–185.
- Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Van Landschoot, A., Del Vuyst, L., Vandamme, P., 2015: The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. Food Microbiol. 49: 23–32.
- Stewart, G.G., Sills, A.M., 1984: *Schwanniomyces castellii* strains and brewing proces. European Patent 0125615 A2.
- Tataridis, P., Kanellis, A., Logothetis, S., Nerantzis, E., 2013: Use of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewingour. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad, 124: 415–426.
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J., 2004: Yeast ecology of Kombucha fermentation. Int. J. Food Microbiol. 95: 119–126.
- Van der Aa Kühle, A., Jespersen, L., 1998: Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. Int. J. Food Microbiol. 43: 205–213.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., 2003: Bioflavoring and beer refermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 140–150.
- Van Laere, S.D., Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008: Flavour formation in fungi: characterisation of KIAf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 783–792.
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P., Verachtert, H., 1977: Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. J. Inst. Brew. 83: 356–360.
- Zimmermann, F.K., Mayer, V.W., Scheel, I., Resnick, M.A., 1985: Acetone, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, acetonitrile and other polar aprotic solvents are strong inducers of aneuploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res. 149: 339–351.