

PIVOVARSTVÍ A TAXONOMIE PIVOVARSKÝCH KVASINEK

BREWING AND THE TAXONOMY OF BREWER'S YEAST

DAGMAR MATOULKOVÁ, VÚPS, a. s., Pivovarský ústav Praha, Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague 2*, e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

JAN ŠAVEL, Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice / *Budvar Brewery, natl. enterprise, Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice*

Matoulková, D. – Šavel, J.: Pivovarství a taxonomie pivovarských kvasinek. *Kvasny Prum.* 53, 2007, č. 7–8, s. 206–214.

Článek se zabývá historií, metodami a současným stavem taxonomie pivovarských kvasinek. Pro zajištění standardnosti hotového piva je důležité použití čistých kultur kvasinek při jeho výrobě. Dříve byly kvasinky klasifikovány na základě svého fenotypu metodami tzv. tradiční taxonomie, které jsou v článku stručně zmíněny. V krátkém přehledu se uvádí historie klasifikace a nomenklatury pivovarských kvasinek. Pozornost je dále věnována především molekulárně-biologickým technikám, které umožňují klasifikaci kvasinek na základě jejich fylogenetické příbuznosti. V článku jsou vysvětleny základní principy vybraných molekulárních metod a jejich vztah k taxonomii pivovarských kvasinek. Autoři doporučují vrátit se k historickému označení *Saccharomyces carlsbergensis* pro kvasinky spodního kvašení a *Saccharomyces cerevisiae* pro svrchní pivovarské kvasinky.

Matoulková, D. – Šavel, J.: Brewing and the taxonomy of brewer's yeast. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 7–8, pp. 206–214.

The review deals with the history, methods and current state of brewer's yeast taxonomy. An important factor in ensuring standard quality of finished beer is the use of pure yeast cultures in the production. Yeast used to be classified on the basis of its phenotype by the methods of traditional taxonomy, which are briefly addressed in the text. A short overview is given of the history of brewer's yeast classification and nomenclature. Particular attention is paid to molecular biological techniques that enable us to classify yeast on the basis of its phylogenetic relatedness. Basic principles of selected molecular biological methods and their use in brewer's yeast taxonomy are explained. We recommend restoring the historical name *Saccharomyces carlsbergensis* for bottom yeast and using *Saccharomyces cerevisiae* for top brewer's yeast.

Matoulková, D. – Šavel, J.: Brauwesen und Taxonomie der Brauhefe. *Kvasny Prum.* 53, 2007, Nr. 7–8, S. 206–214.

Der Artikel befasst sich mit der Geschichte, Methoden und dem gegenwärtigen Zustand der Taxonomie von Brauhefe. Für eine Sicherung des Standards vom fertigen Bier während der Herstellung ist wichtig eine Anwendung von Reinkulturbierhefen zu sichern. Früher wurden die Stämme der Bierhefe auf Grund ihres Phänotypus durch die im Artikel erwähnten Methoden einer traditionellen Taxonomie klassifiziert. Im einen kurzen Übersicht wurde die Geschichte der Klassifizierung und Nomenklatur der Bierhefe erwähnt. Weiterhin wurde eine Aufmerksamkeit der Molekular – Biologischentechnik gewidmet, weil diese Technik auf Grund der phylogenetischen Verwandtschaft der Brauhefe ihre Klassifizierung ermöglicht. Im Artikel wurden weiterhin eine Grundprinzipien der ausgewählten Molekularmethoden aufgeklärt und ihr Verhältnis zu der Taxonomie der Bierhefe. Die Verfasser empfehlen einen Rückgang zur historischen Benennung *Saccharomyces carlsbergensis* für untergärrige Hefe und *Saccharomyces cerevisiae* für obergärrige Hefe zu akzeptieren.

Матюлкова, Д. – Шавел, Я.: Пивоварение и таксономия пивоваренных дрожжей. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 7–8, стр. 206–214.

Статья занимается историей, методами и современным состоянием таксономии пивоваренных дрожжей. Для обеспечения стандартности пива является важным применение чистой культуры дрожжей во время его производства. Ранее были дрожжи классифицированы на основе фенотипа методами т. наз. традиционной таксономии, которые в статье вкратце упоминаются. В короткой перечени приводится история классификации и номенклатуры пивоваренных дрожжей. Внимание уделяется прежде всего молекулярно-биологическим техникам, позволяющим классифицировать дрожжи на основе филогенетического сродства. В статье объяснены основные начала избранных молекулярных методов и их отношение к таксономии пивоваренных дрожжей. Авторы рекомендуют вернуться к историческому обозначению *Saccharomyces carlsbergensis* для дрожжи нижнего брожения и *Saccharomyces cerevisiae* для верхнебродающие дрожжи.

Klíčová slova: taxonomie, pivovarství, kvasinky, historie, PCR, DNA

Keywords: taxonomy, brewing industry, yeast, history, PCR, DNA

1 ÚVOD

Výroba piva je jednou z nejstarších lidských činností, která od doby vzniku prodělala sice určité změny, ale zachovala svou podstatu. S vývojem lidského poznání se postupně odhalovaly příčiny průběhu jednotlivých článků výrobního procesu, praktické změny se však prosazovaly pomaleji (možná ku prospěchu věci).

Pivovarská výroba se zakládá na využití kvasinek. Kvasnice jsou skutečně surovinou zvláštní povahy [1]. Pokud se něco v pivovaru nedaří, mohou za to často dva viníci: výrobci sladu a dodavatelé kvasnic, mezi něž se ochotně zahrne mikrobiologické oddělení pivovaru v případě vlastní propagační stanice. Ve starší odborné literatuře byl dobře známý termín degenerace kvasnic, který však zjevně zahrnoval nežádoucí změny vlastností kvasnic způsobené jak genetickými změnami, tak změnami vnějších podmínek.

S podstatou kvasnic si nedovedl poradit ani původní německý Zákon o čistotě piva (Reinheitsgebot), který nemohl dobře definovat v této době ještě nedostatečně poznanou surovinu. Příčinu kvašení piva definitivně odhalil až Louis Pasteur okolo roku 1876, kdy uveřejnil svou slavnou Studii o pivu [2].

V poměrně krátké době našel Pasteurův objev praktické využití

1 INTRODUCTION

Beer production is one of the oldest human activities; since its beginning the process has undergone changes but retained its principle. With the progress in human knowledge the causes and the course of events in individual steps of the production process have gradually been elucidated but practical changes were slower to come (which can conceivably have been beneficial).

Beer brewing is based on the use of yeast, which represents a raw material of a peculiar nature [1]. If something goes wrong in the brewery, there are usually two culprits: malt producers and yeast suppliers. If the brewery has its own propagation unit, the section of microbiology of the brewery is usually readily included among the latter. Older brewing literature used the well-known term yeast degeneration, which obviously denoted undesirable changes in yeast properties caused by both genetic changes and changes in external conditions.

The nature of yeast was still an enigma for the original German Act on Beer Purity (Reinheitsgebot), since at the time of its appearance this raw material was not yet sufficiently known. The cause of beer brewing was disclosed only by Louis Pasteur around 1876, when he published his famous Study on Beer [2].

v podobě používání čistých kvasničných kultur a konstrukce první propagační stanice v roce 1883 (E.C.Hansen). V té době se také výrazně vydělují svrchní a spodní pivovarské kvasnice, které umožňovaly výrobu piva za rozdílných podmínek. Tehdejší metody však nedovedly ještě rozlišit rozdílný původ těchto kmenů.

Použití kvasnic k výrobě oblíbeného nápoje je možné i bez tohoto objevu v podobě spontánně kvašených piv s ne zcela přesně definovanou mikroflorou, zahrnující často kromě kvasinek i bakterie. Čisté kultury kvasinek našly uplatnění zejména v pivovarské velkovýrobě, kde s rostoucí výrobou bylo zapotřebí zajistit její standardnost.

Využívání čistých kmenů souviselo již od samého začátku s jejich rozlišením a specifikací. Tyto kmeny se spojovaly s výrobou určité značky piv, a staly se pro ně typické [3, 4]. Původně se používalo více kmenů v jednom pivovaru, pro potíže s jejich oddělením uchovávaním však počet kmenů klesal.

Tepře v poslední době se objevují možnosti, jak spolehlivě zajistit „odrůdovou čistotu“ kvasničných kmenů, používaných tradičně pro výrobu piva. Tyto fascinující možnosti poskytují nové metody molekulární biologie.

U mnohých pivovarských praktiků nenalezly změny v taxonomii pochopení, neboť původní rozlišení na *Saccharomyces cerevisiae* a *S. carlsbergensis* bylo narušeno jejich přezarováním k různým druhům [5]. Těžko pochopitelná byla i skutečnost, že kulturní kvasinky splývaly pojmenováním s kvasinkami dříve důsledně označovanými jako cizí, nebo divoké, např. *S. pastorianus*, *S. uvarum* a *S. logos*, popř. *S. bayanus*. Tento vývoj vyústil v uvedení dřívějšího druhu *S. carlsbergensis* pouze jako již neplatného synonyma pivovarské kvasinky *S. pastorianus*.

Tato situace také mění odpověď na otázku, co jsou kulturní a cizí pivovarské kvasinky, neboť výroba svrchních piv se postupně rozšiřuje i v České republice. V minulosti se za kulturní kvasinky považovaly v Čechách výhradně kvasinky spodního kvašení. Tyto důvody vedly k hlubšímu studiu pivovarských kvasinek zahrnujícímu i historii změn jejich názvů. Stejnému tématu se věnuje i tento článek, který se pokouší vysvětlit taxonomické změny pivovarských kvasinek na základě historie taxonomických metod.

2 TRADIČNÍ TAXONOMIE

Taxonomie je vědní obor, který se zabývá teoreticky i prakticky klasifikací organismů a jejich pojmenováním podle mezinárodně uznávaných nomenklaturních pravidel. Klasifikací rozumíme zařazování organismů do taxonomických skupin na základě jejich podobnosti a příbuznosti. Praktickou aplikací taxonomie je identifikace, tedy určování neznámých organismů. Klasifikace a identifikace jsou úzce spjaté, neboť identifikace závisí na způsobu, jakým jsou organismy klasifikovány, a klasifikační schéma by mělo ulehčovat identifikaci [6].

Základní taxonomickou jednotkou (taxonem) je druh. Druh se může definovat např. jako soubor populací odvozených od společného předka podobným způsobem a s podobnou dědičností, oddělený od ostatních druhů organismů přirozenou selekcí pod vlivem vnějších podmínek [7].

Každý druh je reprezentován typovou kulturou (typem), podle které je sestavován popis daného druhu. Typovou kulturou je většinou jeden z prvních studovaných kmenů daného druhu, bývá dobře charakterizován, ale nemusí vždy být pro daný druh nejreprezentativnější [7, 8]. V rámci druhu jsou v taxonomii kvasinek rozlišovány různé kmeny, které lze definovat jako čisté kultury izolované z jedné buňky nebo spory [7]. Kmeny jsou tedy, pomineme-li mutace, geneticky homogenními populacemi [6].

Klasifikační metody tzv. tradiční taxonomie zahrnují morfologické, biochemické a fyziologické testy – organismy jsou klasifikovány na základě velikosti a tvaru buněk, struktury buněčné stěny, způsobu vegetativního rozmnožování, existence sexuální reprodukce a jejího způsobu, schopnosti klasifikovat různé substráty, růstu v tekutém médiu a při různé teplotě, osmotickém tlaku, popř. citlivosti nebo rezistence k antibiotikům apod. Tyto metody jsou většinou pracné a časově náročné, a vzhledem ke skutečnosti, že fenotypové vlastnosti jsou ovlivněny použitím kmenem a kultivačními podmínkami, bývají výsledky těchto technik značně proměnlivé, a tedy ne zcela spolehlivé [6, 7, 9, 10].

3 HISTORIE KLASIFIKACE A NOMENKLATURY PIVOVARSKÝCH KVASINEK

Název *Saccharomyces* (latinsky “cukerná houba”) zavedl v roce

In a short time, Pasteur's discovery found its practical application in the form of the use of pure yeast cultures and the construction of the first propagation unit in 1883 (E.C. Hansen). This period also saw a clear distinction being made between top and bottom brewer's yeast, which made it possible to produce beer under different conditions. However, the methods of that time did not allow the determination of the different origin of these strains.

Yeast can be used for producing the popular drink even without this knowledge – some beers are spontaneously fermented with microflora that is not precisely defined and may include, in addition to yeast, also bacteria. Pure yeast cultures found their use mainly in large-scale beer production in which the increasing output made it necessary to ensure standard features of the process.

From the very beginning, the use of pure strains has been associated with their distinction and specification. These strains were connected with the production of a certain beer brand and became typical for the given brands [3, 4]. Originally, more strains were used in a single brewery but the problems with their separate maintenance reduced their numbers.

Only recently, new possibilities have appeared how to ensure reliably the “variety purity” of yeast strains used traditionally for beer production. These fascinating possibilities are provided by new methods of molecular biology.

Many practicing brewers have not accepted the changes in yeast taxonomy, since the original distinction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis* was obliterated by their classification to different species [5]. Another fact that was hard to accept was that cultural yeast assumed the same names as yeast species previously firmly denoted as foreign or wild, e.g. *S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. logos*, or *S. bayanus*. This situation resulted in denoting the previous species *S. carlsbergensis* as a mere no-longer-valid synonym of the brewer's yeast *S. pastorianus*.

This situation also impacts on the question of what are cultural and foreign brewer's yeasts since the production of beers with top yeast is gradually spreading also in the Czech Republic. In the past, only bottom yeast strains were considered in this country as cultural yeasts. All these reasons led to a more detailed study of brewer's yeast including the history of changes in its nomenclature. This topic is also the subject of this paper, which attempts to explain taxonomical changes of brewer's yeast on the basis of the history of taxonomical methods.

2 TRADITIONAL TAXONOMY

Taxonomy is a science branch that deals with both theoretical and practical aspects of classification of organisms and their nomenclature based on internationally accepted nomenclature rules. The term classification denotes placing organisms into taxonomical groups according to their similarity or relatedness. The practical application of taxonomy is the identification, i.e. determination, of unknown organisms. Classification and identification are closely connected since identification depends on the manner in which the organisms have been classified, and the classification scheme should facilitate identification [6].

The basic taxonomical unit, i.e. taxon, is species. Species can be defined, e.g., as a set of populations derived in a similar way and with similar heredity from a common ancestor, and distinguished from other types of organisms by natural selection under the influence of external conditions [7].

Each species is represented by a type culture (type), which serves as a paradigm for the description of given species. The type culture is mostly one of the first studied strains of the given species; it is usually well-characterized but need not be the most representative for the species [7, 8]. Within a species, yeast taxonomy distinguishes different strains, which can be defined as pure cultures isolated from a single cell or spore [7]. If one does not consider mutations, strains are therefore genetically homogeneous populations [6].

Classification methods of the so-called traditional taxonomy include morphological, biochemical and physiological tests. The organisms are classified according to the cell size and shape, cell wall structure, type of vegetative reproduction, existence of sexual reproduction and its manner, ability to utilize different substrates, growth in liquid medium and at different temperatures and osmotic pressures, susceptibility or resistance to antibiotics, etc. These methods are usually laborious and time-consuming and their results can considerably vary and may lack reliability due to the fact that the phenotypic properties are affected by the strain under investigation and by cultivation conditions [6, 7, 9, 10].

3 HISTORY OF BREWER'S YEAST CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION

The name *Saccharomyces* (“sugar fungus” in Latin) was introduced

1838 německý biolog Julius Meyen. Pojmenovány byly v té době tři druhy, *S. cerevisiae*, *S. pomorum* a *S. vini*, nazvané jednoduše podle místa svého výskytu: v pívu, kvasící ovocné šťávě a ve víně [11].

Rod *Saccharomyces* však přesně definoval až v roce 1870 německý botanik Max Reess. Podle Rainieri a kol. [9] to byl také Reess, který odlišil a pojmenoval kvasinky fermentující ovocné šťávy jako *S. ellipsoideus* a pivovarské jako *S. pastorianus*. Kocková-Kratochvílová však uvádí, že Reess používal pro pivovarské kvasinky název *S. cerevisiae*, které zavedl Meyen [7].

V osmdesátých letech 19. století vyvinul dánský botanik a mikrobiolog Emil Christian Hansen techniku izolace a udržování čistých kultur kvasinek (pojem čistá kultura znamená kultura odvozená z jediné buňky). Zavedl také jako první používání vybraných kultur v pivovarství a odlišil svrchní kvasinky (*S. cerevisiae*) od kvasinek spodního kvašení, které nazval *Saccharomyces pastorianus* [9].

Hansen rovněž pojmenoval a popsal spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* podle známého pivovaru Carlsberg v Dánsku a *S. monacensis* podle mnichovského piva [7]. Kvasinky se v této době odlišovaly hlavně na základě tvaru buněk a různého chování během fermentace [12].

První systém kvasinek byl sestaven v roce 1912 francouzským botanikem Guillermondem a zakládal se na buněčné morfologii a schopnosti kvasinek zkvašovat několik různých monosacharidů. Podle Guillermonda byly spodní pivovarské kvasinky nadále označeny jako *S. carlsbergensis* a svrchní jako *S. cerevisiae* [9].

V roce 1952 při reklasifikaci kvasinek zatím zůstávaly zachovány tyto názvy pivovarských kvasinek [13], ale během další reklasifikace v roce 1970 byly na základě biochemické podobnosti sloučeny spodní pivovarské kvasinky, do té doby nazývané *S. carlsbergensis*, s druhy *S. uvarum* a *S. logos* do společného druhu *S. uvarum*, který popsal již v roce 1898 Beijerinck [7, 12, 14].

V rámci této reklasifikace byl van der Waltem zaveden druhový komplex *Saccharomyces sensu stricto* (v úzkém slova smyslu), který zahrnoval 21 druhů kvasinek využívaných v kvasných technologiích [14]. V roce 1984 bylo všech 21 druhů tohoto komplexu zredukováno do jediného druhu *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 1). Spodní pivovarské kvasinky, do té doby označované jako *S. uvarum*, a svrchní *S. cerevisiae*, byly tedy sloučeny do společného druhu [15].

Důvodem této reklasifikace byla skutečnost, že za laboratorních podmínek bylo křížením všech 21 původních druhů komplexu *Saccharomyces sensu stricto*, a tedy i spodních a svrchních kvasinek navzájem, dosaženo produkce fertilního potomstva, což naznačovalo blízkou příbuznost a podle tehdejší definice druhu také zařazení do společného druhu [6, 12, 16]. Tento zdánlivě zjednodušující stav ovšem netrval ani tak dlouho, aby byl společný název *Saccharomyces cerevisiae* pro oba typy pivovarských kvasinek v technologii výroby piva přijat.

4 MOLEKULÁRNÍ TAXONOMIE

S nástupem tzv. molekulární taxonomie v devadesátých letech 20. století se výrazně změnila klasifikace mikroorganismů. Pivovarské kvasinky, a mikroorganismy obecně, jsou nyní klasifikovány na základě svého genetického složení (genotypu). S použitím metod molekulární biologie je studována struktura a funkce informačních biomakromolekul (DNA a RNA). V molekulách DNA jsou zakódovány informace o struktuře všech buněčných proteinů a o struktuře molekul ribonukleových kyselin (RNA), které se účastní syntézy proteinů. Nezávisle na vlivech vnějšího prostředí se informace uložené v DNA normálně nemění [10, 17, 18, 19, 20].

Jednou z nejstarších molekulárních technik je stanovení obsahu guaninu a cytosinu (% G+C) jaderné a mitochondriální DNA. Tato

in 1838 by the German biologist Julius Meyen. Three species were designated at that time – *S. cerevisiae*, *S. pomorum* and *S. vini* – each named simply according to the site of its occurrence, i.e. in beer, fermenting fruit juice and wine [11].

However, exact definition of the genus *Saccharomyces* was provided as late as in 1870 by the German botanist Max Reess. According to Rainieri et al. [9], Reess was also responsible for distinguishing and naming yeasts fermenting fruit juices as *S. ellipsoideus* and brewer's yeast as *S. pastorianus*. However, according to Kocková-Kratochvílová, Reess used for brewer's yeast the name *S. cerevisiae* introduced by Meyen [7].

In 1890s the Danish botanist and microbiologist Emil Christian Hansen developed the technique for isolation and maintenance of pure yeast cultures (the term pure culture denotes a culture derived from a single cell). He was also the first to introduce the use of selected cultures in brewing, and distinguished top fermentation yeast (*S. cerevisiae*) from bottom fermentation yeast, which he named *Saccharomyces pastorianus* [9].

Hansen also named and described bottom brewery yeast *Saccharomyces carlsbergensis* according to the well-known Carlsberg brewery in Denmark, and *S. monacensis* according to the Munich beer [7]. At that time, yeasts were distinguished mainly according to the cell shape and different behavior during the fermentation [12].

The first yeast classification system was set up in 1912 by the French botanist Guillermond; it was based on cell morphology and the ability of yeast to ferment several different monosaccharides. According to Guillermond, bottom yeast continued to be named *S. carlsbergensis* and the top one *S. cerevisiae* [9].

While the reclassification of yeast in 1952 retained these names of brewery yeasts [13], the following reclassification in 1970, on account of biochemical similarity, merged the bottom brewery yeast previously called *S. carlsbergensis* and the species *S. uvarum* and *S. logos* to form a single species *S. uvarum* that had been described in 1898 by Beijerinck [7, 12, 14].

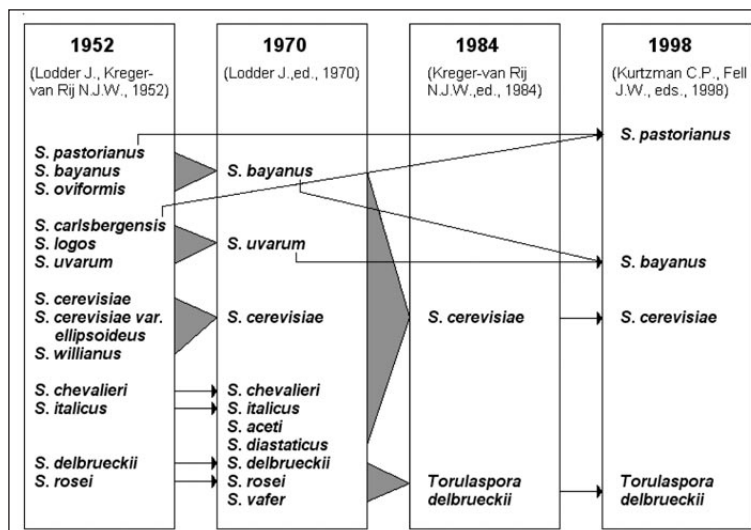
Within the framework of this reclassification, van der Walt introduced the species complex *Saccharomyces sensu stricto* (in the strict sense of the word), which included 21 yeast species used in fermentation technologies [14]. In 1984 all 21 species of this complex were embodied into a single species *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1). Bottom brewery yeast, previously named *S. uvarum*, and the top yeast *S. cerevisiae* were thus joined in a single common species [15].

The reason for this classification was the fact that crossing of all 21 original species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex including bottom and top yeast under laboratory conditions produced fertile progeny. This indicated a close relation and, according to the species definition used at that time, also classification into a common species [6, 12, 16]. However, this seemingly simplifying state did not last sufficiently long to enable the brewing industry to accept it for both types of brewery yeast.

4 MOLECULAR TAXONOMY

Following the advent of molecular taxonomy in the 1990s the classification of microorganisms has changed considerably. Brewery yeast and microorganisms in general are now being classified on the basis of their genetic setup (genotype). Molecular biology methods are used to study the structure and function of the information molecules (DNA and RNA). DNA molecules contain encoded information about the structure of all cell proteins and about the structure of ribonucleic acid molecules (RNA) that participate in protein synthesis. The information contained in DNA under normal circumstances does not change irrespective of environmental effects [10, 17, 18, 19, 20].

One of the oldest molecular techniques is the determination of the content of guanine and cytosine (% G+C) of nuclear and mitochondrial DNA. This method has its limitations,



Obr. 1 / Fig. 1 Některé taxonomické změny technologicky významných kvasinek / Some taxonomical changes of technologically important yeasts

metoda má ovšem své omezení, neboť podobný obsah G+C nemusí vždy znamenat podobnou sekvenci. Porovnání sekvencí dvou kmenů mikroorganismů lze provést pomocí jednoduché a spolehlivé metody zvané DNA/DNA hybridizace (nebo DNA/DNA-reasociace), při které se jaderná DNA obou kmenů ve směsi denaturuje (tzn. že dvoušroubovice se rozpojí na dva jednoduché řetězce) a zpětně renaturuje.

Principem této metody je různá pohyblivost vzniklých renaturovaných molekul DNA v elektroforetickém gelu. Pokud jsou kmeny odlišné, budou po elektroforéze patrné tři druhy molekul: rychle se pohybující „samy sebe párující“ řetězce, pomaleji se pohybující dokonale renaturované dvouřetězce (tzv. homoduplexy) a nejpomaleji se pohybující molekuly, u nichž nespárované (tedy nehomologické) oblasti způsobují špatnou pohyblivost ve struktuře elektroforetického gelu. Pokud jsou kmeny identické, dojde k separaci pouze dvou druhů molekul: homoduplexů a jednořetězcových molekul [17].

Velká část molekulárních technik využívá metodu polymerázové řetězové reakce (PCR; polymerase chain reaction), pomocí které lze rychle a selektivně zmnožit (amplifikovat) vybraný úsek DNA. PCR je založena na opakovaném kopírování vybraného úseku DNA-polymerasou. Syntéza DNA od 3'-konce obou primerů probíhá při teplotě přibližně 72 °C, (c) následuje znovu denaturace vzniklých dvouřetězců, přičemž v prvním cyklu vzniklé dceřiné řetězce slouží nyní také jako templátové molekuly. S rostoucím počtem cyklů se stávají dominantními krátké úseky ohraničené primery. Zbývající dlouhé molekuly DNA se po ukončení PCR ze směsi odseparují pomocí gelové elektroforézy. / *Principle of the PCR method. (a) Domain on double-strand DNA intended to be amplified is denoted by vertical bars; (b) a short heating of the reaction mixture to 95 °C causes denaturation of the DNA molecule to separate strands. Subsequent cooling to 45–65 °C enables the two primers to be joined at the beginning and end of the selected domain. DNA synthesis from the 3'-end of both primers takes place at a temperature of approximately 72 °C; (c) this step is followed by another denaturation of the resulting double strands, the daughter strands formed in the first cycle serving as template molecules. With increasing number of cycles the short segments flanked by the primers become dominant. After the termination of PCR, the remaining long DNA molecules are separated by gel electrophoresis.*

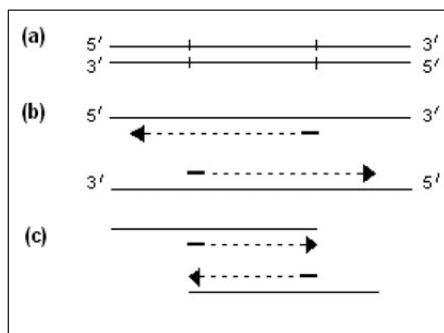
Pomocí těchto primerů nasyntetizuje DNA-polymerasa až několik miliard kopií požadovaného úseku DNA [21]. Produkty PCR-reakcí lze pak následně porovnávat, zjišťovat jejich velikost, sekvenci a např. přítomnost míst rozpoznávaných a štěpených restrikcími enzymy [10, 20, 22].

Pro účely taxonomických studií se nejčastěji amplifikují geny kódující ribozomální RNA (rRNA) a oblasti na DNA mezi geny pro rRNA, obzvláště tzv. vnitřní přepisované mezeričky (ITS; internal transcribed spacers). Ribozomy jsou spolehlivými fylogenetickými indikátory. Ve všech organismech mají stejnou funkci a jejich nukleotidová sekvence je vysoce konzervovaná [23, 24].

Na základě znalosti sekvence ribozomální DNA (rDNA) jsou sestavovány fylogenetické stromy (dendrogramy), které vyjadřují evoluční příbuznost porovnávaných organismů. Analýzou vysoce konzervovaných oblastí rRNA (např. genu pro 18S rRNA) lze účinně odlišit vzdálené příbuzné taxony, zatímco oblasti vykazující vysoký stupeň divergence (oblasti ITS) jsou vhodné pro odlišení velmi blízké příbuzných taxonů [10, 20, 25, 26]. Mnohem spolehlivější je kombinace dat získaných analýzou většího počtu genů, tzv. multi-genovou sekvenční analýzou [27, 28].

Jednou z mnoha modifikací PCR, kterou lze využít pro identifikaci a odlišení blízké příbuzných kmenů pivovarských kvasinek, je RAPD-PCR, analýza náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD; random amplified polymorphic DNA). PCR-amplifikace izolované DNA, prováděná za účasti jediného velmi krátkého primeru s náhodně zvolenou sekvencí, vede k různému počtu fragmentů, protože primer se na DNA váže na náhodných místech. Produkty PCR-reakce se separují gelovou elektroforézou a detekují. Získá se tak soubor různého počtu různě velkých úseků DNA, tzv. otisk DNA neboli DNA-fingerprint (obr. 3). Tento soubor je typický pro určitý kmen a také pro daný primer. Metoda RAPD-PCR umožňuje odlišení různých druhů kvasinek i různých kmenů v rámci jednoho druhu [6, 11, 16, 24, 29, 30, 31].

Pro odlišení, identifikaci pivovarských kvasinek a zjišťování fylogenetických vztahů mezi nimi se často využívá metoda analýzy polymorfismu délky restrikcí fragmentů (RFLP; restriction fragment



Obr. 2 / Fig. 2 Princip metody PCR. (a) oblast na dvouřetězcové molekule DNA určená k amplifikaci je znázorněna svislými čárkami, (b) po krátkém zahřátí reakční směsi na přibližně 95°C dojde k denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA na jednotlivé řetězce. Následné snížení teploty na 45–65°C umožní připojení dvojice primerů na počátek a konec vybraného úseku. Syntéza DNA od 3'-konce obou primerů probíhá při teplotě přibližně 72 °C, (c) následuje znovu denaturace vzniklých dvouřetězců, přičemž v prvním cyklu vzniklé dceřiné řetězce slouží nyní také jako templátové molekuly. S rostoucím počtem cyklů se stávají dominantními krátké úseky ohraničené primery. Zbývající dlouhé molekuly DNA se po ukončení PCR ze směsi odseparují pomocí gelové elektroforézy. / *Principle of the PCR method. (a) Domain on double-strand DNA intended to be amplified is denoted by vertical bars; (b) a short heating of the reaction mixture to 95 °C causes denaturation of the DNA molecule to separate strands. Subsequent cooling to 45–65 °C enables the two primers to be joined at the beginning and end of the selected domain. DNA synthesis from the 3'-end of both primers takes place at a temperature of approximately 72 °C; (c) this step is followed by another denaturation of the resulting double strands, the daughter strands formed in the first cycle serving as template molecules. With increasing number of cycles the short segments flanked by the primers become dominant. After the termination of PCR, the remaining long DNA molecules are separated by gel electrophoresis.*

however, since a similar content of G+C need not always reflect a similar nucleotide sequence. A comparison of the DNA sequences of two microbial strains can be done by a simple and reliable method called DNA/DNA hybridization (or DNA/DNA reassociation) in which a mixture of nuclear DNA of the two strains is denatured (i.e. the double helix dissociates into two single strands) and then again renatured. The principle of this method is the different mobility of the resulting renatured DNA molecules in a gel during electrophoresis. If the two strains are different the electrophoresis will reveal three types of molecules: high-mobility “self-pairing” strands, slower moving perfectly renatured double strands (so-called homoduplexes) and the slowest-moving molecules in which unpaired, i.e. nonhomologous domains cause their poor mobility in the gel structure. If the two strains are identical, only two types of molecules are separated – homoduplexes and single-strand molecules [17].

A large part of molecular techniques makes use of the polymerase chain reaction (PCR), which allows a rapid and selective amplification of a selected DNA segment. PCR is based on repeated copying of the selected segment by DNA-polymerase. The synthesis of the copies is governed by a pair of short oligonucleotides, primers, that pair with template DNA at the beginning and at the end of the segment – each of them with a different strand of the original double-strand molecule (Fig. 2).

By means of these primers, DNA-polymerase synthesizes up to several billions of copies of the DNA segment [21]. The products of PCR reactions can then be compared and their size, sequence and, e.g., the presence of sites recognized and cleaved by restriction enzymes can be determined [10, 20, 22].

The genes amplified most frequently for the purpose of taxonomical studies are those encoding ribosomal RNA (rRNA) and DNA domains between the rRNA-encoding genes, especially the so-called internal transcribed spacers (ITS). Ribosomes are reliable phylogenetic markers. They have the same function in all organisms and their nucleotide sequence is highly conserved [23, 24].

The knowledge of the sequence of ribosomal DNA (rDNA) then makes it possible to set up phylogenetic trees (dendrograms) that illustrate the evolutionary relatedness of compared organisms. Analysis of highly conserved rRNA regions, e.g. the gene for 18S rRNA, can then effectively distinguish remotely related taxa, whereas regions showing a high degree of divergence (ITS domains) are suitable for distinguishing very closely related taxa [10, 20, 25, 26]. A much more reliable approach is a combination of data obtained by the analysis of a large number of genes, the so-called multi-gene sequence analysis [27, 28].

One of the many modifications of PCR, which can be used for identification and differentiation between closely related strains of brewery yeast, is RAPD-PCR, i.e. analysis of randomly amplified polymorphic DNA. PCR-amplification of an isolated DNA performed under the participation of a single very short primer with randomly selected sequence gives rise to a different number of fragments since the DNA primer binds at different places. The products of the PCR reaction are separated by gel electrophoresis and detected. This procedure yields a set of DNA segments of different size, the so-called DNA-fingerprint (Fig. 3). This set is typical for a certain strain and also for a given primer. The RAPD-PCR method allows the differentiation of different yeast species as well as different strains within a single species [6, 11, 16, 24, 29, 30, 31].

The differentiation, identification of brewery yeasts and determination of phylogenetic relationships between them often makes use of the analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP). Nuclear or mitochondrial DNA extracted from the cells [32, 33] or, for instance, the ITS regions and genes encoding rRNA amplified by PCR [10, 20] are cleaved with restriction endonucleases and the ensuing fragments are

length polymorphism). Jaderná nebo mitochondriální DNA extrahovaná z buněk [32, 33] nebo např. oblasti ITS a geny pro rRNA amplifikované pomocí PCR [10, 20] jsou štěpeny restričními endonukleázami a vzniklé fragmenty se separují gelovou elektroforézou za vzniku DNA-fingerprintu. Princip této metody spočívá v tom, že různé organismy, nebo v našem případě DNA různých druhů či kmenů kvasinek, se mezi sebou liší v počtu a délce fragmentů, tedy v počtu míst na DNA rozpoznávaných a štěpených restričními enzymy (obr. 4).

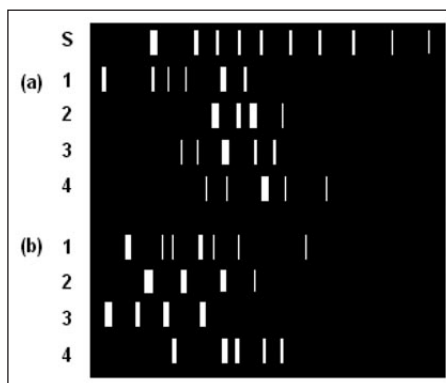
Novější molekulární metodou je analýza polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP; amplified fragment length polymorphism), založená na štěpení DNA dvěma restričními enzymy, z nichž jeden se vyznačuje průměrnou frekvencí štěpení a druhý vysokou frekvencí štěpení. Po PCR-amplifikaci a elektroforetické separaci získáme vysoce informativní DNA-fingerprint [17, 26, 34, 35].

Pro odlišení jednotlivých kmenů pivovarských kvasinek se s dobrými výsledky využívá metoda elektroforetické karyotypizace [24]. Jedná se o stanovení počtu chromozomů a jejich velikosti na základě rozdílné pohyblivosti různě velkých molekul v elektroforetickém gelu. Pivovarské kvasinky obsahují ve svém jádře 16 chromozomů, jejichž velikost se pohybuje od 230 kb (chromozom I) do 1,5 Mb (chromozom IV). Separace molekul, které se navzájem velmi liší svou velikostí, je možná pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE; pulsed field gel electrophoresis), při které se aplikují elektrická pole střídavě v různých úhlech. Molekuly putující k anodě jsou v pravidelných intervalech nuceny změnit směr svého pohybu. Čím delší je separovaná molekula, tím více času potřebuje ke změně směru (k tzv. reorientaci). Menší molekuly se v novém směru elektrického pole pohybují rychleji, narozdíl od opožděných se velkých molekul. Separace molekul je tak mnohem účinnější, než při běžné elektroforéze [17].

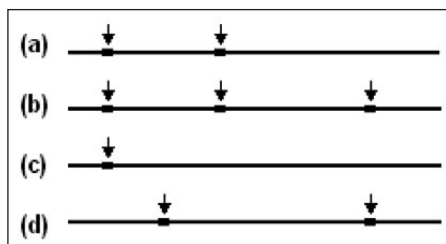
Kompletní genová sekvence *Saccharomyces cerevisiae* je známa od roku 1996 [23]. Je však nutné si uvědomit, že kmen *S. cerevisiae* S288C, použitý pro sekvencování, je kmen laboratorní, jehož předchůdce byl původně (v roce 1938) izolován z hnilých fíků [36]. Pivovarské kvasinky jsou organismy mnohem složitější a od dobře prostudovaných laboratorních kmenů kvasinek se liší především stupněm ploidie.

Ploidii určuje počet a kompletnost sad chromozomů v buněčném jádře. Laboratorní kmeny jsou většinou haploidní nebo diploidní, to znamená, že mají jednu nebo dvě sady chromozomů. Pivovarské kvasinky jsou polyploidní, mají tedy více než dvě sady chromozomů, nejčastěji tři (triploidie) nebo čtyři (tetraploidie). Počet sad však nemusí být úplným násobkem haploidního počtu chromozomů. Tento stav se nazývá aneuploidie a u pivovarských kvasinek je zcela běžný. Znamená to, že některé chromozomy jsou zastoupeny např. ve čtyřech kopiích a jiné pouze ve třech. Je také běžné, že kopie jednotlivých chromozomů nejsou zcela identické. Polyploidní a aneuploidní kmeny jen obtížně sporulují a pokud se sporulace uskuteční, spory většinou nebývají životaschopné [37].

Ještě v devadesátých letech 20. století se všeobecně akceptovalo tvrzení, že polyploidie a aneuploidie, a z nich vyplývající značná složitost genomu pivovarských kvasinek i snížená schopnost sexuálního rozmnožování, je zárukou genetické stability těchto mikroor-



Obr. 3 / Fig. 3 Příklad DNA-fingerprintů čtyř různých druhů kvasinek (1-4) získaných metodou RAPD. Pro amplifikaci byly použity dva různé primery s náhodnou sekvencí (a) a (b). Písmeno S označuje velikostní standardy DNA / Example of DNA-fingerprints of four different yeast species (1-4) obtained by the RAPD method. Two different primers with random sequence (a) and (b) were used for amplification. The letter S denotes DNA size standards.



Obr. 4 / Fig. 4 Princip metody RFLP. Vodorovné čáry představují příbuzné molekuly DNA, šipky označují místa se specifickou nukleotidovou sekvencí, která je rozpoznávána a štěpena určitou restriční endonukleázou. Pro danou endonukleasu mají molekuly (a) a (d) dvě restriční místa, ale v různé vzdálenosti od sebe. V obou případech vzniknou tři fragmenty, které se však budou lišit svou délkou. Molekula (b) má pro daný enzym tři restriční místa, molekula (c) pouze jedno. Po štěpení těchto molekul DNA a separaci fragmentů gelovou elektroforézou se získají různé otisky DNA (DNA-fingerprinty). / Principle of the RFLP method. Horizontal lines represent related DNA molecules, arrows denote sites with specific nucleotide sequence which is recognized and cleaved by a certain restriction endonuclease. Molecules (a) and (b) have two restriction sites for given endonuclease, albeit at different mutual distances. Three fragments that differ in their lengths are formed in both cases. Molecule (c) has three restriction sites for the given enzyme, molecule (d) only one. Different DNA-fingerprints are obtained after the cleavage of these DNA molecules and separation of the fragments by gel electrophoresis.

separated by gel electrophoresis, yielding DNA-fingerprints. The principle of this method consists in different organisms, or in this case the DNA of different yeast species or strains, differing in the number and length of fragments, i.e. in the number of DNA sites recognized and cleaved by restriction enzymes (Fig. 4).

A newer molecular method is the analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) based on DNA cleavage by two restriction enzymes, one of which is characterized by a mean rate of cleavage while the other exhibits a high cleavage rate. PCR-amplification and electrophoretic separation afford a highly informative DNA-fingerprint [17, 26, 34, 35].

Good results in distinguishing individual strains of brewery yeast were obtained by the method of electrophoretic karyotyping [24]. The method consists in determining the number of chromosomes and their sizes based on different mobility of differently large molecules in the electrophoretic gel. Brewery yeast contains in its nucleus 16 chromosomes whose size varies from 230 kb (chromosome I) to 1.5 Mb (chromosome IV). Separation of molecules that markedly differ in size can be accomplished by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in which electric fields are applied alternately at different angles. The molecules moving to anode are forced to change the direction of their movement at regular intervals. The longer the separated molecule, the more time it needs to change its direction, i.e. to reorientation. Smaller molecules move in the new direction of the electric field faster than the more tardy large molecules. Separation of the molecules is then much more efficient than in conventional electrophoresis [17].

The complete gene sequence of *Saccharomyces cerevisiae* has been known since 1996 [23]. It should be noted, however, that the *S. cerevisiae* S288C strain used for sequencing was a laboratory strain whose predecessor was isolated from rotting figs in 1938 [36]. Brewery yeasts are much more complex organisms and differ from the very well-studied laboratory strains especially in their degree of ploidy.

Ploidy is determined by the number and completeness of chromosomal sets in the nucleus. Laboratory strains are usually haploid or diploid, i.e. they have one or two sets of chromosomes. Brewery yeast is polyploid and has more than two sets of chromosomes – most often three (triploidy) or four (tetraploidy). It should be realized that the number of chromosomal sets need not be an integer multiple of the haploid number of chromosomes. This state is called aneuploidy and is entirely common with brewery yeast. This means that some chromosomes are present in, e.g., four copies, while others in only three. Also, quite commonly the copies of individual chromosomes are not completely identical. Polyploid and aneuploid strains sporulate only with difficulty and, if the sporulation takes place,

the spores are usually not viable [37].

The belief that polyploidy and aneuploidy and the ensuing considerable complexity of the genome of brewery yeast, and the reduced ability of sexual reproduction guarantee the genetic stability of these microorganisms was still generally accepted in 1990s. However, the technological properties of brewery yeast do change and its genetic stability should be mentioned only when compared with the much more sensitive haploid and diploid laboratory yeast strains [17, 36].

Molecular biology methods enable us to reveal the evolutionary re-

ganizmů. Ke změnám technologických vlastností pivovarských kvasinek však dochází, a je tedy vhodné zmiňovat jejich genetickou stabilitu, pouze v porovnání s mnohem citlivějšími haploidními a diploidními laboratorními kmeny kvasinek [17, 36].

Metody molekulární biologie umožňují odhalení vývojových vztahů pivovarských kvasinek a jejich klasifikaci na základě fylogenetické příbuznosti. Metody tradiční taxonomie se budou dále využívat, protože poskytují užitečné a důležité informace. Právě konfrontace výsledků metod tradiční a molekulární taxonomie poskytuje efektivní schémata pro klasifikaci mikroorganismů [8].

5 SOUČASNÝ STAV

Se zavedením molekulárních metod v taxonomii se změnila i klasifikační schémata, protože klasifikace je do značné míry určována použitými metodami. Druh, základní jednotka v taxonomii kvasinek, je nyní definován jako soubor kmenů, které vykazují zpravidla menší než 1 % odlišnost v nukleotidové sekvenci D2-domény v blízkosti 5' konce 26S rRNA [6].

V současné době jsou na základě počtu chromozomů v buněčném jádře, sekvenace ribozomální RNA a velikosti i stability mitochondriální DNA rozlišovány v rámci rodu *Saccharomyces* tři druhy skupiny:

1) Komplex *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces* v úzkém slova smyslu), který zahrnuje druhy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a *S. pastorianus*, využívané v kvasných technologiích, a druhy *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* a *S. paradoxus* izolované z přirozeného prostředí [9, 38].

Druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto* obsahují v buněčném jádře 16 chromozomů, mají podobnou organizaci genomu [36] a velikost mitochondriální DNA se pohybuje v rozmezí 64–85 kb. Typický je pro ně spontánní vznik respiračně-deficientních mutací (ztráta, změna nebo v případě spodních pivovarských kvasinek hlavně značné delece mitochondriální DNA). Ačkoliv se spontánní mutace tohoto typu vyskytují s relativně velkou četností (až 1 %), lze mutace vyvolat uměle, např. působením etidium bromidu [17].

Do druhu *S. bayanus* se řadí kmeny vinařských kvasinek spolu s kontaminanty hroznového moštu. Spodní pivovarské kvasinky (původně *S. carlsbergensis*) se nyní označují jako *S. pastorianus* a svrchní jako *S. cerevisiae*. Druh *S. cerevisiae* zahrnuje dále pekařské a lihovarské kvasinky, některé vinařské a kmeny využívané pro výrobu sáke [39]. Druhy *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* a *S. pastorianus* lze od sebe navzájem spolehlivě odlišit pouze metodou DNA/DNA-reasociace, popř. jinou metodou analýzy nukleových kyselin [6, 40].

2) Komplex *Saccharomyces sensu lato* (*Saccharomyces* v širším slova smyslu) je značně různorodou skupinou druhů lišících se vzájemně počtem chromozomů (7–16) a velikostí genomu. Velikost mitochondriální DNA je 23–48 kb, respirační mutace se tvoří spontánně, jejich četnost však nelze působením etidumbromidu výrazně zvýšit. Tento komplex obsahuje druhy *S. dairensis*, *S. castelli*, *S. exiguus*, *S. servazzii* a *S. unisporus*, které nemají význam pro fermentační technologie [17, 36].

3) Skupina tvořená jediným druhem, *S. kluyveri*, který je v rámci rodu *Saccharomyces* nejvíce divergentním druhem. V buněčném jádře je obsaženo pouze 5–7 chromozomů, a ke vzniku mutací mitochondriální DNA nedochází ani spontánně, ani po působení mutagenů [17].

6 HYBRIDNÍ PŮVOD SPODNÍCH PIVOVARSKÝCH KVASINEK

Svrchní a spodní pivovarské kvasinky se geneticky a fyziologicky podstatně liší. Genom *S. pastorianus* je přibližně o 50 % větší než genom svrchních pivovarských kvasinek *S. cerevisiae* [9, 36]. Už v roce 1985 bylo zjištěno, že spodní pivovarské kvasinky jsou allopolyploidní, což znamená, že obsahují genetický materiál pocházející z různých skupin kvasinek. Analýza homologie DNA prokázala, že genom *S. pastorianus* se ze 72 % shoduje s genomem *S. bayanus* a z 53 % se *S. cerevisiae*. Spodní pivovarské kvasinky *S. pastorianus* tedy vznikly přirozenou hybridizací mezi *S. cerevisiae* a pravděpodobně *S. bayanus* [9, 36, 41]. Hybridní původ se totiž předpokládá i v případě některých kmenů *S. bayanus*, včetně typového kmene *S. bayanus* CBS380^T [16, 42].

Jiní autoři uvádějí, že existují značné rozdíly mezi hybridy *S. pastorianus*, dokonce i mezi typovými kmeny *S. pastorianus* uchovávanými v různých sbírkách kvasinek [9, 43]. Lze se domnívat, že různé hybridní kmeny *S. pastorianus* vznikly v různé době křížením mezi *S. cerevisiae* a předchůdcem *S. bayanus* [18].

lationship between brewery yeasts and classify them on the basis of the phylogenetic relatedness. The methods of traditional taxonomy will be further used since they provide useful and important information. A confrontation of the results of traditional and molecular biological approaches is suitable for providing an effective scheme for the classification of microorganisms [8].

5 CURRENT STATE

Introduction of molecular biological methods into taxonomy brought about changes in the classification schemes since classification is largely defined by the methods used. The species, the basic unit in yeast taxonomy, is now defined as a set of strains exhibiting as a rule less than 1 % dissimilarity in the nucleotide sequence of the D2-domain in the vicinity of the 5' end of 26S rRNA [6].

Today, three species groups are distinguished within the *Saccharomyces* genus based on the number of chromosomes in the nucleus, sequence of ribosomal RNA and the size and stability of mitochondrial DNA:

1) The *Saccharomyces sensu stricto* complex includes the species *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* used in fermentation technologies, and the species *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* and *S. paradoxus* isolated from natural environment [9, 38].

The species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex contain in the cell nucleus 16 chromosomes, have a similar genome organization [36] and the size of mitochondrial DNA is in the range of 64–85 kb. A typical feature of these species is the appearance of respiration-deficient mutations (loss, change or – in the case of bottom brewery yeast – large deletions of mitochondrial DNA). Although spontaneous mutations of this type take place with a relatively large frequency (up to 1 %), they can be evoked artificially, e.g., through the action of ethidium bromide [17].

The species *S. bayanus* includes strains of wine-making yeast along with grape must contaminants. Bottom brewery yeast (originally *S. carlsbergensis*) is now denoted *S. pastorianus*, top yeast is *S. cerevisiae*. The species *S. cerevisiae* includes also baker's and distillery yeast, some wine yeast strains and strains used for the production of sake [39]. The species *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* and *S. pastorianus* can be reliably distinguished only by using DNA/DNA reassociation or another method of nucleic acid analysis [6, 40].

2) The *Saccharomyces sensu lato* complex (*Saccharomyces* in the broader sense of the word) is a markedly heterogeneous group of species differing in the number of chromosomes (7–16) and the size of the genome. The size of mitochondrial DNA is 23–48 kb, respiration-deficient mutations are formed spontaneously but their frequency cannot be appreciably increased by using ethidium bromide. The complex contains the species *S. dairensis*, *S. castelli*, *S. exiguus*, *S. servazzii* and *S. unisporus*, which have no relevance for fermentation technologies [17, 36].

3) A group formed by a single species, *S. kluyveri*, which is the most divergent species within the genus *Saccharomyces*. The cell nucleus contains mere 5–7 chromosomes and mutations of mitochondrial DNA arise neither spontaneously, nor by the action of mutagens [17].

6 THE HYBRID ORIGIN OF BOTTOM BREWERY YEAST

Top and bottom brewery yeasts substantially differ in both genetics and physiology. The *S. pastorianus* genome is about 50 % larger than the top yeast *S. cerevisiae* genome [9, 36]. As found in 1985, bottom brewery yeast is allopolyploid, i.e. it contains genetic material arriving from different yeast groups. Analysis of DNA homology showed that the genome of *S. pastorianus* is 72 % identical with that of *S. bayanus* and 53 % identical with *S. cerevisiae* genome. Bottom brewery yeast *S. pastorianus* thus arose by a natural hybridization between *S. cerevisiae* and probably *S. bayanus* [9, 36, 41]. Some *S. bayanus* strains including the type strain *S. bayanus* CBS380^T are in fact also assumed to be of hybrid origin [16, 42].

According to other authors, substantial differences exist among *S. pastorianus* hybrids and even among type strains of *S. pastorianus* deposited in different yeast collections [9, 43]. It can be assumed that different hybrid strains of *S. pastorianus* arose at different times by crossing between *S. cerevisiae* and a predecessor of *S. bayanus* [18].

According to one hypothesis bottom brewery yeast is the result of a multiple inter-species hybridization [39]. The hybrid origin of bottom brewery yeast was confirmed in 2006 on the basis of preliminary results of genome sequencing of *S. pastorianus* W34/70 from the Weihenstephan collection in Germany [36].

Existuje i hypotéza, že spodní pivovarské kvasinky jsou výsledkem několikanásobné mezdruhově hybridizace [39]. V roce 2006 byl hybridní původ spodních pivovarských kvasinek potvrzen na základě předběžných výsledků sekvenování genomu *S. pastorianus* W34/70 ze sbírky Weiheinstephan v Německu [36].

7 ZÁVĚR

V českých zemích se změny v pěstování kvasnic prosazovaly poměrně pomalu. V historii to bylo např. pomalé zavádění propagačních stanic, v současnosti pomalé pronikání novějšího, tzv. asimilačního způsobu pomnožování kvasnic, jehož výhody se však již prokázaly i ve větším měřítku [44].

Vstup nových technologií a změny surovin si často vynutily nasazování nových kmenů kvasnic. Tradiční výrobci se snažili zachovat původní kmeny pocházející z doby vzniku pivovaru, málokterý pivovar si však mohl dovolit udržet původní kvasničný kmen. Tyto kmeny se deponovaly ve vlastních a posléze i veřejných sbírkách. Popis jejich vlastností se zakládal na morfologických, fyziologických i biochemických vlastnostech kvasinek.

Klasická taxonomie se dlouho opírala o fenotypické projevy kvasinek v průběhu kvašení, což v pivovarství vedlo k tzv. technologické typizaci kvasnic podle technologicky významných vlastností [45]. I při znalosti původu pivovarského kvasničního kmene a s použitím jednoduchých testů zaměřených na měření jeho vitality však nelze dostatečně přesně předvídat průběh hlavního kvašení [46].

Na druhé straně metody obecné taxonomie tuto technologickou rozdílnost produkčních kmenů nebraly v úvahu, což nakonec vedlo k zařazení spodních i svrchních kvasinek pod jeden druh *Saccharomyces cerevisiae*, kam také ovšem patřily kvasinky používané i v jiných potravinářských výrobcích.

Kromě toho pivovarské technology zmátlo zařazení *S. carlsbergensis* pod *Saccharomyces uvarum* a ještě později spolu se svrchními kvasinkami pod jediný druh *S. cerevisiae*. Než stačili tuto situaci akceptovat, označily se nově kvasinky spodního kvašení jako *S. pastorianus*. Původní označení spodních pivovarských kvasinek *Saccharomyces pastorianus* podle Maxe Reesse bylo v Čechách málo známé v porovnání s názvem *S. carlsbergensis*. Naštěstí se posléze prokázalo, že existují podstatné rozdíly mezi spodními i svrchními kvasinkami, které opodstatňují pro oba tyto typy kvasinek rozdílné druhotné zařazení. S novými metodami bylo možné zmapovat i jejich původ a příbuznost. Současně bylo možné odpovědět i na otázku jejich stability a proměn v průběhu jejich vývoje. Je nutné si připomenout, že jako poměrně složité eukaryotické organismy se kvasinky ve srovnání s vyššími organismy vyznačují velmi krátkou dobou reprodukce, a tím mnohonásobně vyšším počtem generací.

Správné uchovávání kvasničných kmenů a testování jejich identity má význam i pro domácí výrobu piva (homebrewing), které se snaží obnovit a rozšířit výrobu tradičních piv, jejichž výstav sice zůstal v souvislosti s přicházející velkovýrobou omezený, ale nyní prodává určitou renesanci. Pionýrskou práci v tomto ohledu vykonali nadšenci z různých mini- a mikropivovarů [47]. Podrobné informace lze nalézt na serveru www.svetpiva.cz. Pivovarské kvasnice se získávají od známých dodavatelů sušených i tekutých kvasnic (www.wyeastlab.com, www.whitelabs.com). Zdrojem čistých produkčních kultur pivovarských kvasinek pro české i zahraniční pivovary je Sběrka pivovarských kvasinek VÚPS, jejíž podstatnou část tvoří kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces pastorianus*, pocházející z existujících i již zaniklých převážně evropských pivovarských provozů. Ve sbírce jsou dále deponovány svrchní pivovarské kvasinky *S. cerevisiae* a divoké kvasinky izolované jako kontaminanty pivovarské výroby. Čisté kultury pivovarských kvasinek lze nalézt i v dalších mezinárodních sbírkách, např. www.ncyc.co.uk, www.atcc.org, www.cbs.knaw.nl, www.phaffcollection.org nebo www.inra.fr/club.

V katalozích některých sbírek lze objevit kmeny pocházející zaručeně ze známých pivovarů, aniž by se uváděla jejich historie. Bamforth zmiňuje, že nejlepší způsob, jak tyto kmeny získat, je ukrást je přímo na místě a uvádí, že jeho bývalý kolega navštívil český pivovar s otevřenými kádemi, setřel z nich kroužky a z nich izoloval tradiční kmeny kvasnic [1].

Nelze pochybovat o tom, že geneticky kódované vlastnosti kvasnic určují chování kvasnic ve výrobě a vlastnosti hotového piva, pokud se průběh výroby nenaruší z jiných příčin. V poslední době se prokazuje, že kvasnice mohou určovat i rychlost stárnutí vyrobeného piva.

Tyto poznatky se mohou uplatnit i v řízených změnách genomu

7 CONCLUSION

In the Czech lands, changes in yeast cultivation have always been relatively slow to be accepted. In the past, this tardiness concerned, e.g., the slow introduction of propagation stations, today it is the slow spreading of the new, so-called assimilation type of yeast propagation whose advantages have already been shown on a large scale [44].

The introduction of new technologies and changes in raw materials has often necessitated the use of new yeast strains. Traditional producers tried to preserve the original strains that had been in use since the founding of the brewery but only a few breweries could afford to maintain their original yeast strains. These strains were therefore deposited in their own and later in public collections. The description of their properties was based on morphological, physiological and biochemical features.

Classical taxonomy has long relied on the phenotypic features of the yeast in the course of fermentation; in the brewing industry this led to the so-called technological typing of yeasts according to technologically important properties [45]. Even when the origin of a brewery yeast strain is known and simple tests are used to measure its vitality, the course of the main fermentation cannot be predicted with sufficient precision [46].

On the other hand, the methods of general taxonomy did not take into account this technological variability of production strains; this led ultimately to both bottom and top yeast being incorporated into a single species *Saccharomyces cerevisiae*, which at the same time accommodated also other yeast types used in other food industries.

In addition, brewery technologists were confused by the fact that *S. carlsbergensis* was placed under *Saccharomyces uvarum* and later, along with top yeast, under the single species *S. cerevisiae*. Before this situation could be accepted, the bottom yeast received still another name, viz. *S. pastorianus*. The original designation of bottom brewery yeast, *Saccharomyces pastorianus*, introduced by Max Reess, was little known in Bohemia in comparison with *S. carlsbergensis*. Fortunately, substantial differences were later shown to exist between bottom and top yeast that warrant a different species classification for these two yeast types. New methods made it possible to map their stability and changes during their evolution. It should be kept in mind that yeasts, in spite of being relatively complex eukaryotic organisms, are characterized by very short time of reproduction and thus a considerably higher number of generations within a certain time period when compared with higher organisms.

The correct maintenance of yeast strains and testing of their identity is important for homebrewing, which aims at restoring and extending the production of traditional beers whose output, which has declined with the advent of large-scale production, is witnessing a certain renaissance. The pioneering work in this field has been done by enthusiasts and fans operating various mini- and microbreweries [47]. Detailed information can be found on www.svetpiva.cz. Brewery yeasts are obtained from well-known suppliers of both dried and liquid yeast (www.wyeastlab.com, www.whitelabs.com). A source of pure production cultures of brewery yeast for Czech and foreign breweries is the Brewery Yeast Collection of the Research Institute of Brewing and Malting; a substantial part of the collection is represented by bottom yeast *Saccharomyces pastorianus* obtained from existing as well as defunct, mostly European, breweries. The collection also houses top brewery yeast *S. cerevisiae* and wild yeast isolated as contaminants in beer production. Pure cultures of brewery yeast can also be found in other international collections, e.g. www.ncyc.co.uk, www.atcc.org, www.cbs.knaw.nl, www.phaffcollection.org or www.inra.fr/club.

The catalogues of some collections feature strains that come undoubtedly from well-known breweries, without mentioning their history. According to Bamforth the best way to obtain these strains is to steal them on site from the brewery; he mentions that one of his former colleagues visited a Czech brewery with open vats, smeared off the heads and isolated from them traditional yeast strains [1].

There is no doubt that genetically encoded properties of yeast determine the behavior of yeast cells in the production as well as the properties of finished beer, provided the course of the production is not disturbed by other influences. As has recently been shown, yeast can also affect the rate of aging of finished beer. This knowledge can be utilized in directed changes of the yeast genome that can then lead to the construction of genetically modified organisms. The attitude of the consumers to these changes is not always positive and it can be expected that the prevailing trend will be to abstain from any changes of production strains. Fortunately, these processes have not as yet found a broader support in brewing despite the great hopes vested in them.

Until recently, top-fermented beers were not found in the Czech

kvasinek, které pak mohou vést až k tzv. geneticky modifikovaným organismům. Postoj spotřebitelů k těmto změnám nebývá vždy pozitivní, a proto lze předpokládat spíše přání neměnit vlastnosti produkčních kmenů. Naštěstí se tyto postupy v pivovarství dosud příliš nerozšířily, přes velké naděje do nich vkládané.

Svrchně kvašená piva se do nedávné doby v českých zemích nevyskytovala, ačkoliv ve vzdálenější minulosti v Čechách jejich výroba převládala [48]. Zajímavým problémem je tvorba 4-vinylguajakolu u některých svrchních piv, přičemž se uvádí, že tato sloučenina, udílající svrchnímu pivu typickou příjemnou vůni po hřebíčku, vzniká z kyseliny ferulové, přítomné v pšeničném sladu. Tuto sloučeninu tvoří jen některé svrchní kvasinky, i když je kyselina ferulová přítomná i v ječném sladu [49]. Proč nemohou spodní kvasinky tuto sloučeninu tvořit, není dosud známo. Některé zdroje dokonce uvádějí, že 4-vinylguajakol může vznikat pouze činností rodu *Torulaspora delbrueckii* [http://en.wikipedia.org/wiki/Torulaspora_delbrueckii].

Nauka o pivovarských kvasinkách a jejich vlastnostech se v Čechách vždy těšila velké pozornosti, věnované objevům a pracím českých autorů. Namátkou lze připomenout objev redukovaných forem kvasinek ve sdělení Kruise a Šatavy z roku 1918, nazvaném „O vývoji a klíčení spór jakož i sexualitě kvasinek“, dále výborné knihy o pivovarských kvasnicích od Hlaváčka, Bendové a Kahlera i vynikající studie Kockové-Kratochvílové [7, 45, 50].

Tyto práce zdůrazňovaly klasický význam kvasničného kmene pro výrobu piva, ale technologicky významné vlastnosti se nyní počínají studovat i na molekulární úrovni a nalézají se cesty k jejich cíleným změnám.

Pivovarské kvasinky spodního kvašení už „vystřídaly“ několik názvů: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae* subsp. *uvarum*, *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis* a nyní opět *S. pastorianus*. Ze všech uvedených názvů nejvíce vystihuje spodní pivovarské kvasinky pojmenování *S. carlsbergensis*, které zavedl E.C. Hansen pro kvasinky, které se používaly ve střední Evropě na výrobu ležáckých piv [7].

Současný platný název pro spodní pivovarské kvasinky je *Saccharomyces pastorianus* a jako neplatná synonyma se uvádějí *S. carlsbergensis* a *S. monacensis* [51]. Protože však problematika nomenklatury spodních pivovarských kvasinek není zcela dořešena, a je možné, že druh *S. pastorianus* bude převeden spíše na druhový komplex [39], doporučujeme prozatím zachovat v technologii zažité a srozumitelné pojmenování spodních kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis*. Tím by se opět obnovilo tradiční pojmenování pivovarských kvasinek, srozumitelné pivovarským technologům a umožňující jednoznačné rozlišení mezi svrchními a spodními kvasinkami. Toto označení by se mohlo používat v odborné literatuře do doby legislativní změny dosud platného označení pivovarských kvasinek podle Zákona č. 100/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích.

lands although in the more distant past they were prevalent [48]. An interesting problem is the formation of 4-vinylguaiacol in some top-fermented beers; this compound, which gives the top beer its typical pleasant clove flavor, has been asserted to be formed from ferulic acid present also in wheat malt. The compound is formed by only some top yeast although ferulic acid is present also in barley malt [49]. It is not yet known why bottom yeast does not produce this compound. According to some sources 4-vinylguaiacol can arise only through the activity of the species *Torulaspora delbrueckii* [http://en.wikipedia.org/wiki/Torulaspora_delbrueckii].

In Bohemia, learning and natural history of brewery yeast and its properties, and the discoveries and work of Czech authors in the field has, have always been the subject of lively attention. Among the discoveries is, e.g. the discovery of reduced yeast forms published by Kruis and Šatava in 1918 in the paper titled “On the development and germination of spores and on yeast sexuality”; among other valuable publications are the excellent books on brewery yeast by Hlaváček, Bendová and Kahler, and the outstanding studies by Kocková-Kratochvílová [7, 45, 50].

These studies stressed the classical importance of the yeast strain for beer production; at present, the technologically significant properties are being studied also on molecular level and ways are being found to their directed changes.

Bottom brewery yeast has changed its name a number of times: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae* subsp. *uvarum*, *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*, and now again *S. pastorianus*. To our mind, the most fitting name of bottom brewery yeast is *S. carlsbergensis*, the name given by E.C. Hansen to the yeast that was used in Europe for producing lager beers [7].

The current name of the bottom brewery yeast is *Saccharomyces pastorianus*, *S. carlsbergensis* and *S. monacensis* being considered invalid synonyms [51]. However, since the nomenclature of bottom brewery yeast has not yet been conclusively established and it is possible that *S. pastorianus* will be converted into a species complex [39], we recommend retaining the name that is commonly accepted by and understandable to technologists, i.e. *Saccharomyces carlsbergensis*. This would restore the traditional name of brewery yeast that is familiar and clearly understandable to brewery technologists and, at the same time, permit a clear distinction to be made between top and bottom brewery yeast. This name could be used in the brewery literature at least until a legislature change of the currently valid denomination of brewery yeast according to the Act 100/1997, Coll. Acts, on Food and Tobacco Products takes place.

Translated by Dr. Karel Sigler

Literatura / Literature

- Bamforth, C.W.: Rising to the challenge. *Brewers' Guard*, **132**, 2003, 24–27.
- Anderson, R.G.: Louis Pasteur (1882–1895): An assesment of his impact on the brewing industry. *Proc. Eur. Brew. Conv. Brussels*, 1995, *Contr.* 2, 13–23.
- Basařová, G.: Hlaváček, I.: České pivo. 2.vyd., Nuga, Pacov, 1999.
- Jackson, M.: Great beer guide. 1st. ed., Dorling Kindersley, London, 2000.
- Šavel, J.: Jak nazývat pivovarské kvasinky. *Pivovarský kalendář* 1998, VÚPS, Praha, 1997, 106–112.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D.: *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, England, 2000.
- Kocková-Kratochvílová A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1.vyd., ALFA, Bratislava, 1990.
- Vaughan-Martini A.: Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *Int. Microbiol.* **6**, 2003, 175–182.
- Rainieri S., Zambonelli C., Kaneko Y.: *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetics diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 2003, 1–9.
- Možina S.S., Dlačich D., Deak T., Raspor P.: Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspora* yeasts by PCR ribotyping. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 1997, 311–315.
- Barnett J.A.: A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* **21**, 2004, 1141–1193.
- Campbell I.: *Systematics of yeasts*. *Brewing Microbiology*. (eds Priest F.G., Campbell I.), 1st edition, Elsevier Applied Science Publishers, England, 1987.
- Lodder J., Kreger van-Rij N.J.W.: *The yeasts, a taxonomic study*. 1st edition, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952.
- Lodder J. (ed.): *The yeasts, a taxonomic study*. 2nd edition, North Holland Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, 1970.
- Kreger-van Rij N.J.W. (ed.): *The yeasts, a taxonomic study*. 3rd edition, Elsevier-North-Holland, Amsterdam, Netherlands, 1984.
- Fernández-Espinar M.T., Barrio E., Querol A.: Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **20**, 2003, 1213–1226.
- Boulton C., Quain D.: *Brewing yeast and fermentation*. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England, 2001.
- Casaregola S., Nguyen H.-V., Lapathitis G., Kotyk A., Gaillardin C.: Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2001, 1607–1618.
- Edwards-Ingram L.C., Gent M.E., Hoyle D.C., Hayes A., Stateva L.I., Oliver S.G.: Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res.* **14**, 2004, 1043–1051.
- James S.A., Cai J., Roberts I.N., Collins M.D.: A phylogenetic ana-

- lysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: Description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 1997, 453–460.
21. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Základy buněčné biologie. 1. vyd., Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
 22. de Barros Lopes M., Soden A., Martens A.L., Henschke P.A., Langridge P.: Differentiation and species identification of yeasts using PCR. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 1998, 279–286.
 23. Piškur J., Langkjær R.B.: Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. Mol. Microbiol. **53**, 2004, 381–389.
 24. Tornai-Lehoczkí J., Dlačný D.: Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. Int. J. Food Microbiol. **62**, 2000, 37–45.
 25. Montrocher R., Verner M.C., Briolay J., Gautier C., Marmeisse R.: Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 1998, 295–303.
 26. Azumi M., Goto-Yamamoto N.: AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. Yeast **18**, 2001, 1145–1154.
 27. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Phylogenetic relationship among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res. **3**, 2003, 417–432.
 28. Kurtzman C.P.: Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. FEMS Yeast Res. **4**, 2003, 233–245.
 29. Laidlaw L., Tompkins T.A., Savard L., Dowhanick T.M.: Identification and differentiation of brewing yeasts using specific and RAPD polymerase chain reaction. J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, 97–102.
 30. Barszczewski W., Robak M.: PCR-based differentiation and homology of brewing and type strains of the genus *Saccharomyces*. J. Inst. Brew. **112**, 2006, 165–172.
 31. Gomes L.H., Duarte K.M.R., Argueso J.L., Echeverrigaray S., Tavares F.C.A.: Methods for yeast characterization from industrial products. Food Microbiol. **17**, 2000, 217–223.
 32. Piškur J., Smole Možina S., Stenderup J., Pedersen M.B.: A mitochondrial molecular marker, *ori-rep-tra*, for differentiation of yeast species. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 1995, 2780–2782.
 33. Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A.: Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacer. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**, 1999, 329–337.
 34. Perpète P., Van Cutsem P., Boutte C., Colson-Corbisier A.-M., Collin S.: Amplified fragment-length polymorphism, a new method for the analysis of brewer's yeast DNA polymorphism. J. Am. Soc. Brew. Chem. **59**, 2001, 195–200.
 35. de Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P.A., Langridge P.: AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**, 1999, 915–924.
 36. Quain D.E. Yeast genetics in brewing: new insights and opportunities. Brewing: New technologies (ed. Bamforth C.W.), 1st edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2006.
 37. Polaina J., Brewer's yeast: genetics and biotechnology. Appl. Mycol. Biotechnol. **2**, 2002, 1–17.
 38. Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts I.N.: Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**, 2000, 1931–1942.
 39. Rainieri S., Kodama Y., Kaneko Y., Mikata K., Nakao Y., Ashikari T.: Pure and mixed lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. Appl. Environ. Microbiol. **72**, 2006, 3968–3974.
 40. Ramos J.P., Valente P., de Souza R.A., Rosa C.A., Leoncini O.: Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. Lett. Appl. Microbiol. **33**, 2001, 206–210.
 41. Sato M., Kishimoto M., Watari J., Takashio M.: Breeding of brewer's yeast by hybridization between a top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a cryophilic yeast *Saccharomyces bayanus*. J. Biosci. Bioeng. **93**, 2002, 509–511.
 42. Querol A., Belloch C., Fernandez-Espinar M.T., Barrio E.: Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. Int. Microbiol. **6**, 2003, 201–205.
 43. Storgards E., Haikara A., Juvonen R.: Brewing control systems: microbiological analysis. Brewing: New technologies. (ed. by Bamforth C.W.), 1st edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2006.
 44. Steenberg, J., Gubiš, J., Melicharová, E., Šimek, V., Goldmann, R.: Dynamický sběr kvasnic z CKT a jejich asimilace před zakvašováním – kvasničné hospodářství Gambrinus. Kvasny Prum. **49**, 2003, 30–34.
 45. Bendová, O., Kahler, M.: Pivovarské kvasinky. 1.vyd., SNTL, Praha, 1981.
 46. Košin, P., Šavel, J., Kolouchová, I., Brož, A.: Viabilita a vitalita kvasnic v provozním kvašení. Kvasny Prum. **53**, 2007, 30–34.
 47. Čapková, V., Janík, P., Potěšil, V.: Restaurační minipivovary v České republice. 1.vyd., VÚPS, Praha, 1999.
 48. Šurán, J.: Pšenice a pivo. Pivař 2006 (1; 7/8), 17–18.
 49. Narziss, L., Miedaner, H., Nitzsche, F.: Ein Beitrag zur Bildung von 4-Vinyl-Guajakol bei der Herstellung von bayerische Weizenbier. Monatsschr. Brauwiss. **43**, 1990, 96–100.
 50. Hlaváček, F. A., a kol.: Pivovarské kvasnice. 1. vyd., SNTL, Praha, 1958.
 51. Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds.): The yeasts, a taxonomic study. 4th edition. Elsevier, Amsterdam, 1998.

Do redakce došlo 13. března 2007

NABÍDKA ANALÝZ JEČMENE

!!! všem výrobcům, nákupcům a zpracovatelům sladovnického ječmene !!!

Nabízíme expresní analýzy NIR – stanovení obsahu vody, škrobu a veškerých dusíkatých látek v ječmeni ze sklizně 2007.

Příjmová laboratoř VÚPS, a. s., Sladařský ústav Brno, na adrese Mostecká 7, Brno, je v období **10. 7.–15. 9. 2007** otevřena v pracovní dny od **6.30 do 18 h**, po dohodě i jinak.

Výsledky budou sděleny na počkání, protokol bude odeslán následujícího dne v elektronické podobě.

Bližší informace na tel. 545 214 110, 545 578 703, RNDr. Votava, Ing. Prokeš
www.beerresearch.cz

Nabídková cena: 350 Kč bez DPH