Kvasinky a stres: z laboratorních podmínek do pivovaru

Yeast and stress: from the laboratory to the brewery

KAREL SIGLER[1], DAGMAR MATOULKOVÁ[2], PETR GABRIEL[3], MIROSLAV DIENSTBIER[2], DANA GÁŠKOVÁ[3]
[1]Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. / *Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*
[2]Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s. / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague 2*
[3]Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta / *Charles University, Faculty of Mathematics and Physics, Ke Karlovu 3, 121 16 Prague 2*
e-mail: sigler@biomed.cas.cz

Sigler, K. – Matoulková, D. – Gabriel, P. – Dienstbier, M. – Gášková, D.: Kvasinky a stres: z laboratorních podmínek do pivovaru. Kvasny Prum. **56**, 2010, č. 2, s. 100–104.

Náš výzkum je zaměřený na různé typy technologických stresů (oxidativní, osmotický a chemický stres vyvolaný xenobiotiky) a účinnost procesů, kterými se kvasničné buňky mohou před nimi chránit. Stresové faktory mohou ovlivnit buněčné metabolické procesy, energetiku, a strukturu a funkce buněčných membrán pivovarských kvasinek. Účinky stresů a odpovědi kvasinek na tyto stresy mohou mít velký vliv na technologické procesy a kvalitu hotového výrobku. Naše studie byly prováděny s laboratorními i průmyslovými kmeny pivovarských kvasinek. U laboratorních kmenů lze jednotlivé typy odpovědí na stresy snadno interpretovat a vytvořit vhodný model pro procesy pozorované u produkčních kmenů pivovarských kvasinek. Pokusy s průmyslovými kmeny byly prováděny v laboratorních (kvasné testy) a v reálných provozních pivovarských podmínkách, které přímo poukazují na problémy způsobené moderní pivovarskou technologií.

Sigler, K. – Matoulková, D. – Gabriel, P. – Dienstbier, M. – Gášková, D.: Yeast and stress: from the laboratory to the brewery. Kvasny Prum. **56**, 2010, No. 2, p. 100–104.

Our research concerns the effects of various types of exogenously applied stress (oxidative, osmolarity and xenobiotic-induced) that can be encountered by yeast cells in the brewery on cell metabolic processes, energetics, membrane functions and structure and the function and efficacy of processes protecting the cells against the stress. These effects, and the response of cells to the stresses, can have a major influence on the technological processes and the quality of the final product. The experiments were performed both on laboratory strains in which individual types of response are easy to interpret and form a suitable basis for the processes observed in brewery yeast, and on brewery strains in laboratory (brewing trials) and actual brewery setting that directly point to the problems caused by modern brewing technology.

Sigler, K. – Matoulková, D. – Gabriel, P. – Dienstbier, M. – Gášková, D.: Hefe und Stress: Aus den Laborbedingungen in die Brauerei Kvasny Prum. **56**, 2010, Nr. 2, S. 100–104.

Unsere Forschung ist auf die verschiedene Type von technologischen Stressen (oxidativer, osmotischer und chemischer Stress, durch Xenobiotics verursacht) und auf die Auswirkungen von Prozessen, mit welchen die Hefezellen sich verteidigen können, gezielt. Die Stressfaktoren können die Zell – metabolische Prozesse, Energetik, Struktur und Funktion von Zellmembranen der Brauhefe beeinflussen. Unsere Studien wurden mit den Labor- und Industriestämmen von Brauhefen durchgeführt. Die einzelnen Typen von Antworten auf Stress sind leicht bei den Laborstämmen zu interpretieren und ein geeignetes Modell für die bei den Produktionsstämmen der Brauhefe beobachtete Prozesse zu bilden. Versuche mit den Industriestämmen wurden unter Laborbedingungen (Gärtests) und unter Betriebsbedingungen in den Brauereien durchgeführt. Die Betriebsbedingungen haben direkt die durch moderne Brautechnologie verursachten Probleme gezeigt.

Klíčová slova: *kvasnice, pivovarský provoz, stres, vitalita, acidifikační síla, výroba piva*

Keywords: *yeast, brewery, stress, vitality, acidification power, beer brewing*

1 ÚVOD

Současný trend v intenzifikaci a používání nových technologií v pivovarském procesu s sebou přináší mnoho typů stresů, které působí na pivovarské kvasinky. Příkladem je vysoký hydrostatický tlak, kterému jsou kvasinky vystaveny při kvašení v cylindrokónických tancích (CKT). Během propagace musí kvasinky čelit oxidativnímu stresu, před opakovaným zakvašením mohou být vystaveny kyselému stresu (odstraňování bakteriální kontaminace kyselým promýváním). Chemický stres je způsoben některými látkami obsaženými v chmelu a sladu, a hromaděním toxických vedlejších produktů kvašení. Některé pivovary používají centrifugaci pro shromáždění neflokulentních kvasinek a vystavují je tak mechanickému stresu. Chladový šok prodělávají kvasinky na konci kvašení. Všechny tyto stresy ovlivňují metabolickou a reprodukční schopnost kvasinek a odrážejí se také v morfologických změnách. Používáním vysoce koncentrovaných mladin (technologie HGB; high gravity brewing) jsou kvasinky vystaveny působení vysokého osmotického tlaku, změnám v míře aerace (oxidativní šok), etanolovému stresu a dalším faktorům, které mají na buňky nepříznivý vliv. Studovali jsme odpovědi kvasinek na některé z těchto stresů, jak u kmenů laboratorních sloužících jako modelové orga-

1 INTRODUCTION

The current intensification and use of new technologies in the brewing process bring about many types of stress for yeast cells. For instance, beer brewing in cylindro-conical tanks (CCT) exposes cells to high hydrostatic pressures. During propagation, yeast undergoes oxidative stress, before repitching it may be exposed to acid stress to remove bacterial contaminants, chemical stress may derive from some of the substances contained in hops and malt, as well as from the accumulation of toxic fermentation byproducts, some breweries use centrifugation for cropping of nonflocculent yeast (mechanical stress), towards the end of fermentation the yeast experiences cold shock, etc. All these stresses affect yeast metabolic and reproductive ability and are also reflected in a number of morphological changes. The use of high gravity (HG) worts exposes yeast cells to high osmotic pressures and to changes in the rate of aeration that may cause oxidative stress, to high ethanol levels and other factors that may have an adverse effect on yeast. We studied several of these stresses in terms of the response of yeast cells both on laboratory strains serving as models, and on actual brewery yeast under conditions of beer production.

nizmy, tak u pivovarských kvasinek v reálných podmínkách výroby piva.

2 ODPOVĚDI KVASINEK NA STRES V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

Modelové pokusy s laboratorními kmeny byly zaměřeny na tři hlavní body – odpověď kvasinek na oxidativní stres, účinky oxidativního stresu na H^+-ATPasu (EC 3.6.3.6), hlavní enzym zodpovědný za buněčnou energetiku kvasinek, a aktivitu membránových proteinů zodpovědných za ochranu buněk proti cizím – potenciálně škodlivým – látkám, které mohou být obsaženy v nových substrátech používaných v současné technologii.

Oxidativní stres

Přestože obsahují obecně málo vícenásobně nenasycených mastných kyselin náchylných k oxidaci, podléhají membránové lipidy *Saccharomyces cerevisiae* oxidačně-indukované a antioxidačně-suprimované peroxidaci [1,2]. V tucích rozpustné antioxidanty, jako jsou vitamíny A a E, mohou hrát významnou roli ve struktuře membrány. Zmírňují například kyslíkem indukované růstové defekty pozorované u mutantů kvasinek, které postrádají důležité antioxidační enzymy Cu,Zn-superoxiddismutasu (Cu,Zn-SOD) a Mn-superoxiddismutasu (Mn-SOD), EC 1.15.1.1. Cytosolická Cu,Zn-SOD i mitochondriální Mn-SOD slouží buňkám *S. cerevisiae* jako ochrana proti superoxidovým radikálům. Naše práce ukázala, že na rozdíl od Cu,Zn-SOD, jejíž hlavní rolí je ochrana proti oxidativnímu stresu, se Mn-SOD podílí na ochraně buněk proti dalším typům stresu – vysoké osmolaritě, teplotnímu šoku a stresu způsobenému metaloidy (arsen) [3].

Účinky stresu na enzymy zodpovědné za energizaci membrány

Membránová H^+-ATPasa vytváří transmembránový protonový gradient, který pohání transport živin do buněk. H^+-ATPasa je citlivá na oxidativní poškození indukované kovy (např. železem), které mohou být přítomny v pivovarské vodě a jinde v prostředí [4,5]. Inaktivovaný enzym má nižší schopnost generovat protonový gradient [6,7]. H^+-ATPasa je inaktivována rovněž látkami, které narušují buněčné vakuoly [8]. Na druhou stranu může být aktivována sacharidy (např. glukosou).

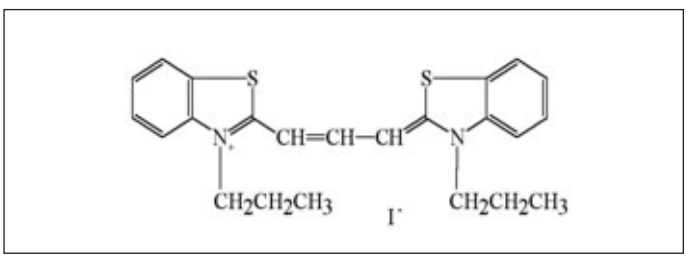
Měření chemických stresů vyvolaných cizími látkami

Cizí látky přítomné v prostředí často usmrtí kvasničné buňky depolarizací a permeabilizací jejich plazmatické membrány, první buněčné struktury, se kterou se setkají. Buňky se proti těmto zásahům brání pomocí tzv. PDR-pump (PDR, pleiotropic drug resistance) membránových proteinů, které cizí látky rozpoznají a vypudí je z buněk. Vyvinuli jsme metodu umožňující sledování účinků těchto pump a zároveň životně důležitého membránového potenciálu s využitím fluorescenčního potenciometrického barviva 3,3'-dipropylthiokarboxycyanin (diS-C_3(3) [9] (*obr. 1*).

Monitorováním časového průběhu vstupu barviva do buněk (tzv. barvící křivky) lze měřit změny membránového potenciálu (*obr. 2*) a také činnost PDR pump (*obr. 3*).

Změna membránového potenciálu způsobená např. působením protonoforu se okamžitě zobrazí na tvaru barvící křivky.

PDR-pumpy vypuzují barvičku z US buněk, proto se tyto buňky barví méně ve srovnání s AD buňkami bez pump. Velmi silné poškození jsme simulovali permeabilizací buněk působením horka. U US buněk způsobila teplotní permeabilizace vstup barvičky do buněk a zvýšení vlnové délky fluorescence. V kultuře AD buněk obsahujících vysokou koncentraci barvičky zapříčinila permeabilizace výstup barvičky z buněk.



Obr. 1 3,3'-dipropylthiokarboxycyanin (diS-C_3(3)) / *Fig. 1 3,3'-dipropylthiokarboxycyanin (diS-C_3(3))*

2 LABORATORY TESTS OF YEAST STRESS RESPONSES

Model experiments on laboratory strains concerned three main topics – the response of yeast to oxidative stress, effects of oxidative stress on the H^+-ATPase (EC 3.6.3.6), the main yeast enzyme responsible for cell energetics, and the function and activity of membrane proteins responsible for protecting the cells against foreign – potentially harmful – compounds that can form part of new substrates used in present-day technology.

Oxidative stress

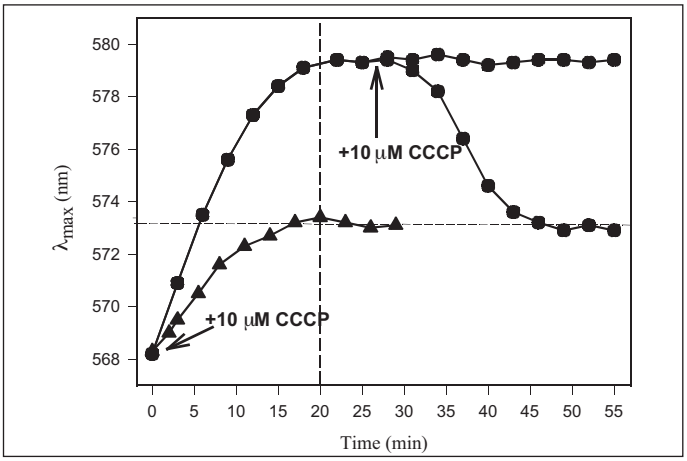
Our studies showed that membrane lipids of *Saccharomyces cerevisiae*, although they are generally poor in oxidation-prone polyunsaturated fatty acids, are subject to perceptible oxidant-induced and antioxidant-suppressed lipid peroxidation [1,2]. Lipid-soluble antioxidants such as vitamin A and E, which can act within the membrane structure, alleviate, for instance, oxygen-induced growth defects observed in yeast mutants lacking the important antioxidant enzymes Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) and Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD), EC 1.15.1.1. Superoxide dismutases, both cytosolic Cu,Zn-SOD and mitochondrial Mn-SOD, serve *S. cerevisiae* cells for defence against superoxide radical. Our study showed that unlike the Cu,Zn-SOD, whose major role is oxidative stress defense, Mn-SOD also plays a role in protecting the cells against other stresses – high osmolarity, heat and metalloid (arsenic) stress [3].

Effects of stress on yeast membrane energizing enzymes

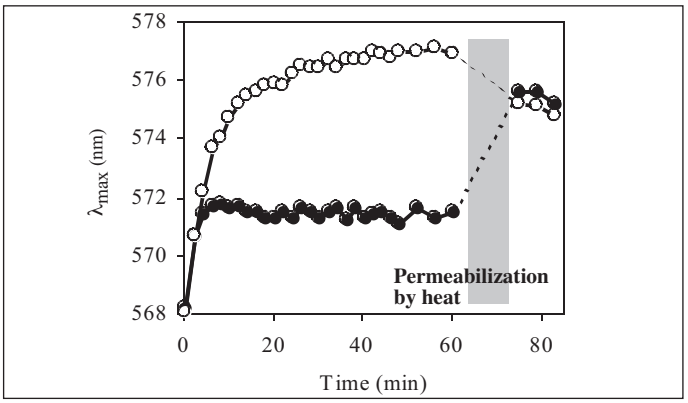
Membrane H^+-ATPase, which produces the transmembrane proton gradient that drives the transport of nutrients into the cells, is sensitive to oxidative damage induced by metals such as iron, that can be present in brewery water and other components of the environment [4,5]. Inactivated enzyme has a lower ability to generate the proton gradient [6,7]. The H^+-ATPase is also inactivated by agents that disrupt cell vacuoles [8]. On the other hand, it is activated by saccharides such as glucose.

Measuring the types of chemical stress imposed by foreign substances

Foreign substances present in the environment often kill yeast cells by depolarizing and permeabilizing the yeast plasma membrane, which is the first structure they encounter. To protect the cells against these attacks, cells have in their membrane proteins, so-called PDR pumps (PDR, pleiotropic drug resistance) that recognize these foreign substances and export them from the cells. For monitoring the action of these pumps as well as the vitally important membrane potential, we developed a method using the fluorescent potentiometric dye 3,3'-dipropylthiacarboxycyanine (diS-C_3(3) [9] (*Fig. 1*). By monitoring the time course of probe uptake by the cells – the so-called staining curves – we were able to measure changes in membrane potential (*Fig. 2*) and also the action of PDR pumps (*Fig. 3*).



Obr. 2 Odpověď diS-C3(3) na změnu membránového potenciálu po přídavku protonoforu karbonylkyanid 3-chlorfenylhydrazonu (CCCP) ke kultuře kvasinek postrádajících PDR-pumpy. Dolní křivka – přidání CCCP v čase 0, horní křivka, přidání CCCP po 20 min. / *Fig. 2 Response of diS-C3(3) fluorescence to a change in membrane potential of yeast cells having no PDR pumps to an addition of protonophore carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Lower curve – CCCP addition at time 0, upper curve – CCCP addition after 20 min.*



Obr. 3 Účinek působení PDR-pump na koncentraci diS-C3(3) v buňkách. Horní křivka, kmen bez PDR-pump; dolní křivka, kmen s PDR-pumpami / *Fig. 3 Effect of the action of PDR pumps on diS-C3(3) concentration in cells. Upper curve, strain without PDR pumps, lower curve – strain with PDR pumps.*

Naše předchozí práce ukázaly, že aktivita hlavních PDR-pump je závislá na růstové fázi [10]. Během exponenciální fáze růstu je vysoká, u diauxických a post-diauxických buněk prudce klesá. Závisí také na typu uhlíkového zdroje [11,12]. Naše výsledky dále ukazují, že PDR-pumpy mohou hrát významnou roli při interakci kvasničných buněk s antibiotiky a antiseptickými látkami [13] a také např. s hořkými složkami chmele či rostlinnými růstovými hormony ječmene.

Důležitost buněčné stěny a membránových komponent pro udržování kvasinek v optimálním stavu

Všechny zmíněné práce poukazují na důležitost plazmatické membrány při udržování kvasničných buněk v optimálním stavu. Zaměřili jsme se proto na membránové lipidy, obzvláště na minoritní, ale velmi důležité složky jako jsou mastné kyseliny s velmi dlouhými řetězci (very long chain fatty acids, VLCFA), tedy kyseliny s řetězcem složeným z více než 22 atomů uhlíku. Kvasinky mají velmi vysokou schopnost syntetizovat VLCFA, což nasvědčuje tomu, že tyto mastné kyseliny jsou pro buňku velmi důležité. *S. cerevisiae* obsahuje kromě běžných C10 – C18 mastných kyselin také VLCFA, které tvoří přibližně 1–2 % z celkových mastných kyselin. Hlavními kyselinami jsou 26:0 a 2-OH-26:0 kyseliny. Největší množství VLCFA je obsaženo ve fosfolipidech a glykolipidech a také ve formě esterů se steroly, které jsou důležitou složkou buněčné stěny kvasinek. VLCFA s řetězci o 26 uhlících mají velký význam při zachovávání struktury a funkce jaderné membrány. Mutace genů zodpovědných za syntézu mastných kyselin vedou ke vzniku morfologických defektů kvasničných buněk.

Podobně jako aktivita PDR-pump je i zastoupení VLCFA závislé na růstové fázi; a nejvyšší je ve střední exponenciální fázi a téměř nulové u buněk ve stacionární fázi růstu [14].

3 KVASINKY A PIVOVARSKÉ TECHNOLOGICKÉ STRESY

Všechny výše uvedené typy stresů a další, které jsou spojené s provozními podmínkami v pivovaru, mohou mít negativní vliv na vitalitu kvasinek. Snížená vitalita kvasinek se následně projeví na snížené kvalitě hotového výrobku.

Technologická část našeho výzkumu zahrnuje vyhodnocení účinků provozních stresů na vitalitu kvasinek a kvalitu hotového piva. Vitalita byla stanovena pomocí tzv. acidifikačního testu (AP test), který je založen na sledování dějů probíhajících na membráně.

Měření acidifikační síly kvasinek

Kvasinky, a např. také mléčné bakterie, okyselují vnější prostředí během fermentačních procesů (kynutí těsta, výroba sýru, vína, piva). Acidifikace prostředí, k níž dochází při resuspendování buněk v novém médiu či po přídavku metabolického substrátu, může sloužit jako užitečný indikátor normálního průběhu kvašení. Test acidifikační síly (AP test) je rychlá a jednoduchá metoda umožňující stanovit, jak různé typy stresů ovlivní vitalitu buněk [15,16,17].

AP test je relativně rychlá metoda, kterou lze aplikovat se zařízením běžně dostupným ve většině potravinářských laboratoří (centrifuga a pH metr s kompenzací teploty). Test je využíván pro hodnocení technologické kvality kultur pivovarských kvasinek [18], při výrobě moštu, v pekařském oboru a při výrobě sýra založené na pou-

A change in membrane potential caused, e.g., by a protonophore is immediately reflected in the shape of the staining curve.

As found in laboratory yeast strains, PDR pumps export the dye from US cells and cause their weaker staining when compared with AD cells lacking the pumps. The damage caused by a very strong stress was simulated by permeabilizing the cells by heat. In US cells permeabilization by heat causes dye inflow and an increase in fluorescence wavelength. In AD cells lacking the pumps, which contain a high concentration of the dye, it causes dye outflow.

Our previous studies showed that the activity of major PDR pumps depends strongly on the growth phase [10]. It is high during the exponential phase of growth and drops sharply in diauxic and post-diauxic cells. It depends also on the type of the carbon source [11,12]. Our current research shows that PDR pumps may play an important role in the interaction of yeast cells with antibiotics and antiseptics [13] as well as, e.g., with hop bitter compounds or plant growth hormones contained in barley.

Importance of cell wall and membrane components in maintaining yeast cells in an optimal state

All these studies pointed to the vast importance of the yeast plasma membrane in keeping the cells in an optimal condition. We therefore examined the plasma membrane lipids in detail, especially concerning minor but potentially very important constituents such as fatty acids with very long chain (VLCFA), i.e. acids with more than ~22 carbon atoms. Yeast was found to have an unprecedented ability to synthesize VLCFAs, which thus seem to be very important for the cell. *S. cerevisiae* contains, apart from the common C10-C18 FAs, also VLCFAs, which make up about 1-2% of all FAs. The major acids are 26:0 and 2-OH-26:0 acids. The highest amount of VLCFAs was found in phospholipids or glycolipids, and also as esters with sterols which are known to form an important part of the yeast cell wall. C26 VLCFAs is also important for maintaining the structure and function of the nuclear membrane. Mutations of the genes responsible for fatty acid synthesis in yeast bring about morphological defects in yeast cells.

Like the activity of the PDR pumps, the proportions of VLCFA strongly depend on the growth phase and are the highest in mid exponential phase and near zero in stationary cells [14].

3 YEAST AND BREWERY TECHNOLOGICAL STRESSES

All the above types of stresses, as well as other stresses encountered in the brewery, may have a negative effect on yeast vitality, which is then reflected in the lowered quality of the final product.

The technologically oriented part of our research concentrated on the evaluation of effect of these brewery-sited stresses on yeast vitality and on the quality of the final product. Vitality was determined by the so-called acidification power (AP test), which is again based on following membrane-sited phenomena in the cells.

Measuring yeast acidification power

Yeast and also, e.g., lactic acid bacteria acidify outer medium during fermentative processes, i.e. during dough leavening, cheese or wine making and during beer brewing. This external acidification taking place on resuspending cells in a new medium or adding a metabolic substrate may serve as a useful indicator of normal fermentation. The acidification power (AP) test based on measuring this acidification [15,16,17] provides a fast and simple means of assessing how various stresses affect the vitality of cells.

The test, which is relatively fast and requires only a centrifuge and a temperature-compensated pH meter available in most food industry laboratories, has been used as a rejection criterion for assessing the technological quality of starter cultures in breweries [18], cider production, bakery products manufacture and cheese making based on lactic acid bacteria. We optimized the test [19] and used it in a brewery setting for assessing the effects of different technological processes on yeast [20] and predicting its *performance* in wort fermentations *performed* in cylindro-conical tanks (CCT). Pitching rate, wort composition, ambient conditions in CCT, and other technological factors were found to vary much more than the vitality of the pitching yeast. A method was developed for a contact-free optical pH measurement of AP, which allows the simultaneous testing of several samples and minimizes the hands-on time in sample processing [21].

Effect of technological stresses on yeast and beer quality

In a continuation of our studies, yeast vitality expressed as acidifi-

Tab. 1 Vliv fermentace v podmínkách zvýšené osmolarity na maximální počet buněk ve vznosu, dobu fermentace, objem sedimentu na konci kvašení, acidifikační sílu kvasinek a celkový zákal mladého nefiltrovaného piva. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou hodnot. Kvašení probíhalo při teplotě 12 °C / *Table 1 Effect of fermentation at increased wort osmolarity on maximum suspended cell count, time of fermentation, sedimentation at the end of fermentation, yeast acidification power and total haze of green unfiltered beer. The values are means of two values. Fermentation trials were perfomed at 12 °C*

Kvašení ***Fermentation***	**Počet buněk** ***cell count*** **(106/ml)[a]**	**Konec kvašení / *End of fermentation* [b]**			
		Čas / *Time* **(h)**	**Sediment [c]**	**AP [d]**	**Celkový zákal** ***Total haze*[e,f]** **(EBC/106 cells/ml)**
12° 1. zakvašení / *1st pitching*	70.7	65	6.0	2.66	8.63
12° 2. zakvašení / *2nd pitching*	68.6	94	1.8	2.54	8.50
12° 3. zakvašení / *3rd pitching*	64.0	100	2.3	2.52	8.59
16° 1. zakvašení / *1st pitching*	68.9	70	9.0	2.62	8.60
16° 2. zakvašení / *2nd pitching*	60.5	112	4.5	2.49	8.51
16°/12° kontrolní / *control*	70.1	100	1.8	2.53	8.90
20° 1. zakvašení / *1st pitching*	56.3	84	9.3	2.57	8.46
20° 2. zakvašení / *2nd pitching*	46.4	156	6.3	2.41	8.54
20°/12° kontrolní / *control*	64.2	102	1.6	2.53	8.64

Pozn. / *Note*:[a] Maximální počet buněk ve vznosu / *maximum suspended cells count*; [b] kvašení bylo ukončeno po dosažení 4 % (v/v) koncentrace alkoholu / t*he fermentation was terminated when alcohol level reached 4 % (v/v)*; [c] uvádí se v ml sedimentu kvasnic v kalibrované zkumavce ve spodní části kvasného válce / *determined as the volume (ml) of yeast sediment in graduated test tube;* [d] AP = acidifikační síla/*acidification power*, jednotky pH / *pH units*; [e] hodnoty jsou normalizovány na 10^6 buněk / *values are normalized per 10^6 cells;* [f] byl měřen pouze zákal H90, neboť hodnoty zákalu H12 jsou špatně klasifikovatelné, což je dáno mnohonásobným rozptylem světla v přítomnosti kvasničných buněk / *only H90 was measured because H12 values are ambiguous due to the manifold light scattering in the presence of yeast cells*

Tab. 2 Koncentrace senzoricky aktivních látek na konci 2. a 3. (kontrolního) kvašení. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou hodnot / *Levels of flavor substances at the end of 2nd and 3rd (control) fermentation. The values are means of 2 values*

Kvašení / *Fermentation*		**diacetyl**	**pentanedione (μg/l)**	**DMS**	**acetaldehyde (mg/l)**
12°	2. zakvašení / *2nd pitching*	84	65	31.5	30.5
12°	3. zakvašení / *3rd pitching*	85	74	22.0	26.8
16°	2. zakvašení / *2nd pitching*	118	135.5	17.5	17.7
16/12°	3. zakvašení / *3rd pitching*	122	117	24.0	27.7
20°	2. zakvašení / *2nd pitching*	101.5	104	13.5	11.9
20/12°	3. zakvašení / *3rd pitching*	130	118.5	20.5	23.3

žití bakterií mléčného kvašení. AP test jsme optimalizovali [19] a použili v provozních podmínkách pro stanovení vlivů různých technologických procesů na kvasnice [20] a předpověď jejich chování při kvašení v CKT. Zákvasná dávka, složení mladiny, teplota v CKT a další technologické faktory jsou mnohem více proměnlivé nežli vitalita násadních kvasnic. Současné měření několika vzorků a tedy zkrácení doby přípravy vzorků umožňuje modifikace AP testu založená na optickém měření pH [21].

Vliv technologických stresů na kvasinky a kvalitu piva

Vitalita kvasnic (resp. jejich acidifikační síla) byla jedním z faktorů měřených v naší studii zabývající se účinky osmolarity mladiny na kvalitu kvasnic, průběh kvašení a vlastnosti mladého piva [22].

Čistý účinek zvýšené osmolarity mladiny na dobu fermentace, vitalitu a sedimentační schopnost kvasnic, chuťové látky a zákal piva byl stanoven pomocí kvasných testů v 12° mladině s přídavkem sorbitolu do osmolarity odpovídající mladině se stupňovitostí 16°a 20°. Sledováno bylo vždy první a druhé nasazení kvasnic v mladině s různou stupňovitostí (tj. 12°/12°, 16°/16° a 20°/20°) a všechny tři „varianty" kvasnic byly následně nasazeny do 12° mladiny (tzv. kontrolní kvašení).

Kvašení v 16° a 20° mladině zpomalilo buněčné dělení a prodloužilo dobu kvašení (*tab. 1*). Opakované nasazení tento efekt prohloubilo. Kvasnice v 16° a 20° mladině sedimentovaly se zpožděním, objem sedimentu na konci kvašení byl však až dvakrát vyšší ve srovnání s kvašením v kontrolní 12° mladině. Při třetím nasazení do kontrolní 12° mladiny již nebylo pozorováno zpoždění sedimentace, a objem sedimentu byl téměř shodný u všech tří variant kvasnic.

Pro pivo vyráběné při vyšší osmolaritě byla charakteristická zvýšená koncentrace diacetylu a pentandionu a nižší hladina dimethylsulfidu a acetaldehydu (*Tab. 2*). Estery a vyšší alkoholy vykazovaly malé rozdíly bez ohledu na osmolaritu mladiny a opakované nasazení.

cation power (AP) was one of the factors measured in our study of the effect of wort osmotic pressure on the quality of yeast, fermentation course and characteristics of the resulting green beer [22].

The net effect of increased wort osmolarity on fermentation time, yeast vitality and sedimentation, beer flavor compounds, and haze was determined in fermentations with 12° all-malt wort supplemented with sorbitol to reach osmolarity equal to 16° and 20°. Three pitchings were performed in 12°/12°/12°, 16°/16°/12°, and 20°/20°/12° worts. The 3rd "back to normal" pitching into 12° wort restored the yeast AP and reproductive abilities while the extended fermentation time remained.

Fermentations in 16° and 20° worts lowered yeast proliferation and increased fermentation time (*Tab.1)*. Repitching aggravated these effects. Yeast sedimentation in 16° and 20° worts was delayed but the sediment volume increased about two times at fermentation end relative to that in 12° wort. Third "back-to-normal" pitching abolished the delay in sedimentation and reduced its extent, which became nearly equal in all variants. Fermentation at increased wort osmolarity decreased yeast vitality by a maximum of 10%. Under our experimental conditions the haze in both green beer and in beer after a 20-day maturation, especially the chill haze pointing to the future colloid stability of the product, increased with increasing yeast generations, high osmolarity having no substantial effect. However, beer from high-osmolarity fermentations exhibited a faster clarification during maturation.

Beer brewed at increased osmolarity was characterized by increased levels of diacetyl and pentanedione and lower levels of dimethylsulfide and acetaldehyde (*Tab. 2*). Esters and higher alcohols displayed small variations irrespective of wort osmolarity or repitching.

sulfidu a acetaldehydu (*tab. 2*). Odchylky v koncentracích esterů a vyšších alkoholů závisely na osmolaritě mladiny či počtu zakvašení.

Dalším předmětem naší práce bylo měření vlivu teplotního stresu na kvasinky v klasickém pivovarském procesu a při kvašení v CKT. Množství invertázy uvolněné z periplazmatického prostoru kvasničných buněk sloužilo jako indikátor stavu kvasinek. Tento enzym se uvolňuje z lyzovaných buněk pouze při vyšších teplotách. Spolu s optimální teplotou kvašení je koncentrace invertázy v pivu pozitivně ovlivňována také promýváním kvasnic [23].

4 ZÁVĚR

Některé ze stresů, jimž jsou kvasinky vystaveny během výrobních procesů – oxidativní stres, chladový šok, osmotický, chemický, nutriční stres a jiné – byly studovány jak v modelových systémech (laboratorní kmeny v laboratorních podmínkách), tak s technologickými kmeny v pivovarském provozu. Naše další studie se budou zabývat, kromě jiného, sledováním vlivu kombinací různých stresů působících na kvasinky během pivovarského procesu.

Poděkování

Tato publikace byla zpracována z převážné části za podpory Výzkumného Centra 1M0570 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

We also studied the effect of temperature stress in both classical brewing process and in the CCT process on yeast cells by using as an indicator of yeast state the amount of invertase released from the periplasmic space of yeast cells. The release of the enzyme from lysed cells takes place only at higher temperatures. In addition to optimum temperature, the invertase level in beer is also positively affected by yeast washing [23].

4 CONCLUSION

Some of the stresses encountered by yeast cells during industrial processes such as beer brewing – oxidative stress, cold shock, osmotic and chemical stress, nutritional and other stresses have been explored in model systems (laboratory yeast strains in a lab setting), and, using strains of brewer s yeast, also in the brewery. Our future studies will aim, among other things, at exploring combinations of different stresses occurring during the brewing process.

Acknowledgements

The work was supported for the most part by the Research Center 1M0570 of the CR Ministry of Education, Youth and Sports.

Translated by Karel Sigler

LITERATURA / REFERENCES

1. Krasowska, A., Piasecki, A., Murzyn, A., Sigler, K.: Assaying the antioxidant and radical scavenging properties of aliphatic mono- and di-N-oxides in a test with SOD-deficient yeast and by a chemiluminescence test. Folia Microbiol. **52**, 2007, 45–51.
2. Krasowska, A., Sigler, K.: Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic antioxidants – phenolics and amine N-oxides: a review. Folia Microbiol. **52**, 2007, 585–592.
3. Dziadkowiec, D., Krasowska, A., Liebner, A., Sigler, K.: Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *S. cerevisiae*. Folia Microbiol. **52**, 2007, 120–126.
4. Stadler, N., Höfer, M., Sigler, K.: Mechanisms of Saccharomyces cerevisiae H^+-ATPase inactivation by Fe^{2+}, H_2O_2 and Fenton reagents. Free Radical Res. **35**, 2001, 643–653.
5. Stadler, N., Váchová, L., Höfer, M., Sigler, K.: Role of strategic cysteine residues in oxidative damage to the yeast plasma membrane H+-ATPase caused by Fe- and Cu-containing Fenton reagents. Folia Microbiol. **48**, 2003, 589–596.
6. Holoubek, A., Večeř, J., Opekarová, M., Sigler, K.: Ratiometric fluorescence measurements of membrane potential generated by yeast plasma membrane H^+-ATPase reconstituted into vesicles. Biochim. Biophys. Acta **1609**, 2003, 71–79.
7. Holoubek, A., Večeř, J., Sigler, K.: Monitoring of the proton electrochemical gradient in reconstituted vesicles: Quantitative measurements of both transmembrane potential and intravesicular pH by ratiometric fluorescent probes. J. Fluoresc. **17**, 2007, 201–213.
8. Krasowska, A., Chmielewska, L., Adamski, R., Luczynski, J., Witek, S., Sigler, K.: Antifungal effects of new lysosomotropic agents on yeast and yeast-like cells. Cell Mol. Biol. Lett. **9**, 2004, 675–683.
9. Gášková, D., Čadek, R., Chaloupka, R., Vacata, V., Gebel, J., Sigler, K.: Monitoring the kinetics and performance of yeast membrane ABC transporters by diS-C3(3) fluorescence. Int. J. Biochem. Cell Biol. **34**, 2002, 931–937.
10. Čadek, R., Chládková, K., Sigler, K., Gášková, D.: Impact of the growth phase on membrane potential and activity of MDR-pumps of S. cerevisiae: effect of pump overproduction and carbon source. Biochim. Biophys. Acta **1665**, 2004, 111–117.
11. Maláč, J., Sigler, K., Gášková, D.: Glucose-induced MDR pump resynthesis in respiring yeast cells depends on nutrient level. Biochem. Biophys. Res. Commun. **337**, 2005, 138–141.
12. Maláč, J., Urbánková, E., Sigler, K., Gášková, D.: Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by the carbon source and the composition of growth-depleted medium: diS-C3(3) fluorescence assay. Int. J. Biochem. Cell Biol. **37**, 2005, 2536–2543.
13. Hendrych, T., Kodedová, M., Sigler, K., Gášková, D.: Characterization of the kinetics and mechanisms of inhibition of drugs interacting with the S. cerevisiae multidrug resistance pumps Pdr5p and Snq2p. BBA Biomembranes **1788**, 2009, 717–723.
14. Řezanka, T., Sigler, K.: Odd-numbered very long chain fatty acids in the microbial, plant and animal kingdoms. Progr. Lipid Res. **48**, 2009, 206–238.
15. Opekarová, M., Sigler, K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in Saccharomyces cerevisiae. Folia Microbiol. **27**, 1982, 395–403.
16. Sigler, K., Höfer, M.: Mechanisms of acid extrusion in yeast. Biochim. Biophys. Acta **1071**, 1991, 375–391.
17. Sigler, K., Höfer, M.: Biotechnological aspects of membrane function. Critical Reviews in Biotechnology **17**, 1997, 69–86. CRC Press, Boca Raton.
18. Sigler, K., Hollerová, I., Šrogl, J., Kadlecová, J.: Vitalita a viabilita násadních kvasnic: metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou resistenci. Kvasny Prum. **51**, 2005, 3–7.
19. Sigler, K., Mikyška, A., Kosař, K., Gabriel, P., Dienstbier, M.: Factors affecting the outcome of the acidification power test as a measure of yeast quality: critical reassessment. Folia Microbiol. **51**, 2006, 525–534.
20. Gabriel, P., Dienstbier, M., Matoulková, D., Kosař, K., Sigler, K.: Optimized acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice. J. Inst. Brew. **114**, 2008, 270–276.
21. Gabriel, P., Dienstbier, M., Sladky, P., Sigler, K.: A new method of optical detection of yeast acidification power. Folia Microbiol. **53**, 2008, 527–533.
22. Sigler, K., Matoulková, D., Dienstbier, M., Gabriel, P.: Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor and haze. Appl. Microbiol. Biotechnol. **82**, 2009, 1027–1035.
23. Šrogl, J., Matasová, L., Vernerová, H., Sigler, K.: Faktory ovlivňující aktivitu invertasy během kvašení, dokvašování a v hotovém pivu / Factors affecting invertase activity during beer brewing, secondary fermentation and in the finished product. Kvasny Prum. **53**, 2007, 134–138.

Recenzovaný článek
Do redakce došlo: 2. 11. 2009
Přijato k publikování: 25. 11. 2009