

Vliv tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin na růst bakterií kazících a nekazících pivo*Effect of Tetrahydroiso- α -acids on the Growth of Beer-spoiling and –nonspoiling Bacteria*DAGMAR MATOULKOVÁ¹, KAREL SIGLER², MIROSLAV NĚMEC³¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, Plc., Lípová 15, 120 44 Prague 2, Czech Republic² Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 / Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic³ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno, Tvrdého 14, 602 00 Brno / Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Tvrdého 14, 60200, Brno, Czech Republic
e-mail: matoulkova@beerresearch.cz**Matoulková, D. – Sigler, K. – Němec, M.: Vliv tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin na růst bakterií kazících a nekazících pivo. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 10, s. 396–403.**

Sledovali jsme vliv tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin (Tetra) na růst a růstové parametry 23 kmenů *Lactobacillus brevis* izolovaných z několika českých pivovarů. Kmeny byly pomocí testu mikrobiologické stability piva rozděleny na kmeny kazící pivo (10 kmenů) a kmeny nekazící pivo (13 kmenů). Pro sledování růstu *L. brevis* v MRS-bujónu s přidavkem různých koncentrací Tetra byl použit přístroj Bioscreen C. Z růstových křivek byly vypočteny základní růstové parametry. Všechny kmeny byly schopny růstu v přítomnosti Tetra, přičemž mezi jednotlivými kmeny byly zjištěny rozdíly. Přídavek Tetra ovlivňuje růst a množení bakterií *L. brevis* nezávisle na jejich schopnosti kazit pivo. Se stoupající koncentrací Tetra dochází ke snížení koncentrace buněk v suspenzi, snížení specifické růstové rychlosti, a k prodloužení lag-fáze. Výsledky ani jejich statistické zpracování neprokázaly žádný vztah mezi schopností kazit pivo a rezistencí k hořkým chmelovým látkám. Stupeň rezistence k antibakteriálním účinkům Tetra je závislý na počátečním pH kultivační půdy, u žádného kmene *L. brevis* však nebyla prokázána korelace mezi pH-indukovanou změnou stupně rezistence a schopností kazit pivo.

Matoulková, D. – Sigler, K. – Němec, M.: Effect of tetrahydroiso- α -acids on the growth of beer-spoiling and –nonspoiling bacteria. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 10, pp. 396–403.

We studied the effects of hop analogue compounds tetrahydroiso- α -acids (Tetra) on the growth and growth parameters of 23 *Lactobacillus brevis* strains isolated from several Czech lager breweries. Forcing test was used to divide the isolates into two groups, beer-spoilage strains (10 isolates) and non-spoilers (13 isolates). The growth of *L. brevis* in MRS-broth containing varying concentrations of Tetra was investigated using Bioscreen C. The measured growth curves were used to calculate the basic growth parameters. All 23 isolates were able to grow in the presence of tetrahydroiso- α -acids, albeit to a varying extent. Tetra affected the growth and multiplication of all *L. brevis* strains regardless of their beer-spoilage ability. Increasing concentrations of Tetra led to a decrease in cell suspension optical density (O.D.) and in the specific growth rate (β), and extension of lag phase. The results and their statistic analysis revealed no relationship between the beer-spoilage ability and hop-resistance. The degree of resistance to the antibacterial activity of Tetra was strongly affected by the initial pH of culture medium, but there was no correlation between the pH-induced change in the level of resistance and the beer spoilage ability of any *L. brevis* strain.

Matoulková, D. – Sigler, K. – Němec, M.: Einfluss der Tetrahydro-iso- α -Bittersäuren auf das Wachstum der bierschädlichen und bierunschädlichen Bakterien. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 10, S. 396–403.

Es wurde der Einfluss der Tetrahydro-iso- α -Bittersäuren (Tetra) auf das Wachstum und die Wachstumsparameter der aus einigen tschechischen Brauereien isolierten 23 *Lactobacillus brevis* Stämme verfolgt. Durch den Test der mikrobiologischen Stabilität des Bieres wurden die Stämme auf die Bierversäuerungs- (10 Stämme) und Bierunversäuerungs- (13 Stämme) geteilt. Für die *L. brevis* Wachstumsverfolgung in MRS – Bouillon unter Zugabe von verschiedenen Tetra Konzentrationen wurde das Gerät Bioscreen angewandt. Aus den Wachstumskurven sind Grundwachstumsparameter berechnet worden. Alle Stämme waren fähig unter Tetra Anwesenheit zu wachsen, wobei Unterschiede unter einzelnen Stämmen festgestellt worden sind. Unabhängig von der Eigenschaft dem Bier schaden zu können, beeinflusst die Tetra Zugabe das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien *L. brevis*. Die Steigerung der Tetra Konzentration führt zur Herabsetzung der Zellkonzentration in der Suspension, zur Reduktion der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit und zur Verlängerung der Lag – Phase. Weder die Ergebnisse noch ihre statistische Verarbeitung haben einen Zusammenhang zwischen der Eigenschaft dem Bier schaden zu können und der Resistenz gegen die Bitterstoffe nachgewiesen. Die Tetra Resistenzstufe gegen die antibakterielle Wirkungen hängt von dem ursprünglichen pH – Wert des Nährbodens ab, eine Korrelation zwischen der durch den pH Wert induzierte Änderung der Resistenzstufe und der Eigenschaft, dem Bier schaden zu können, wurde bei den Stämmen *L. brevis* jedoch nicht festgestellt.

Klíčová slova: kažení piva, rezistence k hořkým chmelovým látkám, *Lactobacillus brevis*, tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny, růstové parametry, stres**Keywords:** beer spoilage, resistance to hop bitter compounds, *Lactobacillus brevis*, tetrahydroiso- α -acids, growth parameters, stress**1 ÚVOD**

Pivo je nápoj s vysokou mikrobiologickou stabilitou. Mezi hlavní faktory ovlivňující mikrobiologickou stabilitu piva patří hořké chmelové látky, alkohol, CO₂, nízké pH a nízké koncentrace kyslíku a užitelných živin [1, 2]. Mikroorganismy schopné růstu a množení v mla-

1 INTRODUCTION

Beer is taken as a beverage with high microbiological stability. The main factors affecting the microbiological stability of beer include hop bitter substances, alcohol, carbon dioxide, low pH and a low level of oxygen and utilizable nutrients [1,2]. Microorganisms capable of growing and multiplying in wort and beer belong to several genera. Lactic

dině a pivu patří do několika rodů. Bakterie mléčného kvašení, zvláště rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*, jsou považovány za nejvíce škodlivé [1]. Při mikrobiologické kontrole piva a pivovarských provozů je nejčastěji nacházen druh *Lactobacillus brevis*, který je zodpovědný za přibližně více než 50 % případů mikrobiálního kažení piva [3, 4]. Růst těchto mikrobů je doprovázen produkcí kyselých metabolitů a vznikem masivního zákalu. *L. brevis* je typický svou schopností zkvašovat dextriny a škrob, způsobuje tzv. super-atenuaci neboli hlubší prokvašení piva [1, 2].

Hořké chmelové látky jsou ve své izomerované formě zodpovědné za hořkou chuť a aroma piva a zároveň vykazují antimikrobiální účinky proti grampozitivním bakteriím a některým houbám [3, 5]. Účinek chmelových látek může být bakteriostatický nebo baktericidní, v závislosti na koncentraci a době expozice. Mechanismus antimikrobiálního účinku hořkých chmelových kyselin nebyl ještě zcela objasněn. Iso- α -hořké kyseliny a jejich redukované deriváty jsou slabé kyseliny, které fungují jako protonofory zvyšující propustnost lipidové dvojvrstvy biologických membrán pro protony. Do buněk se iso- α -hořké kyseliny dostávají ve své nedisociované formě pasivní difúzí přes plazmatickou membránu. Intracelulární pH (pH_i) vyšší nežli hodnota pK_a iso- α -hořkých kyselin ($pK_a = 3,1$) způsobí jejich disociaci na aniony a protony. V citlivých buňkách způsobí takto uvolněné protony snížení vnitrobuněčného pH vedoucí k narušení transmembránové protonmotivní síly (protonmotive force; pmf), která je využívána jako zdroj energie při transportních dějích na membráně [6]. Může dojít k zastavení příjmu živin řízeného protonmotivní silou a k hladovění buněk. Vnitrobuněčná acidifikace způsobí snížení aktivity některých enzymů a může nepříznivě ovlivnit buněčné proteiny a DNA. Uvolněné aniony vytváří s dvojmocnými kationty elektroneutrální komplex, které mohou pasivně opustit buňku. Dochází tak k elektroneutrální výměně protonů za buněčné dvojmocné kationty jako je např. Mn^{2+} nebo Mg^{2+} [6, 7, 8].

I přes grampozitivní typ buněčné stěny vykazují některé kmeny *L. brevis* silnou rezistenci k hořkým látkám chmele a mohou se v pivu množit. Rezistence k hořkým chmelovým látkám je pravděpodobně dána kombinací několika různých mechanismů a je známa pouze u mléčných bakterií schopných růst v pivu [3, 9]. Rezistence k chmelovým kyselinám se účastní membránová H^+ -ATPasa. Buňky schopné růst v přítomnosti hořkých látek chmele se vyznačují zvýšenou syntézou tohoto enzymu. Vypuzováním nadbytečných protonů si rezistentní buňky udržují optimální gradient pH, zatímco u citlivých buněk dojde ke snížení vnitrobuněčného pH pod fyziologickou mez a k odumření buněk [6, 10]. Na rezistenci k hořkým chmelovým látkám se podílí také ATP-dependentní a pmf-dependentní MDR-přenašeče (multidrug resistance; rezistence k různým látkám) kódované geny *horA* a *horC*, resp. [11]. Přítomnost nebo absence těchto genů koreluje se schopností *L. brevis* kazit pivo [12]. Homology genů *horA* a *horC* jsou rozšířeny výhradně u mléčných bakterií kazících pivo, nezávisle na druhu, a mohou se zřejmě rozšiřovat horizontálně. U některých bakterií dochází v nepřítomnosti chmelových látek ke ztrátě těchto genů a tím i rezistence [11]. Ztráta buněčných dvojmocných kationtů může být kompenzována činností přenašeče dvojmocných kationtů *HitA* [13]. Gen *hitA* nebo *horC* nebo oba současně spolu s *horA* byly detekovány u kmenů *Lactobacillus* a *Pediococcus* se schopností rychlého růstu v pivu a jeho kažení [14, 15]. Vysoce rezistentní kmeny *L. brevis* mohou používat dynamickou regulaci zásob manganu a bránit se tak účinkům hořkých chmelových látek [16]. Na výsledné rezistenci se může podílet i zvýšená pufrací kapacita cytoplazmy, pozměněné složení buněčné stěny nebo modifikovaná cytoplazmatická membrána [17, 18, 19, 20].

Předpokládá se, že schopnost některých kmenů *L. brevis* kazit pivo je založena na jejich rezistenci k antimikrobiálnímu působení hořkých chmelových látek [11, 21]. Pro ověření této teorie jsme u 23 kmenů *L. brevis* s různou schopností kazit pivo testovali jejich růst v přítomnosti různých koncentrací tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin.

2 MATERIÁL A METODY

Bakteriální kmeny a růstové podmínky

Pro experimenty bylo používáno 23 kmenů *Lactobacillus brevis* ze Sbírký pivovarských mikroorganismů (RIBM 655) Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze. Kmeny byly původně získány ze zkaženého piva a z pivovarských provozů. Pomocí testu mikrobiologické stability piva byly rozděleny na kmeny kazící a nekazící pivo [22]. Pro přehlednost jsou kmeny kazící pivo dále v textu označeny hvězdičkou. Kmeny jsou uchovávány v MRS bujónu při teplotě 4° C a převáděny každé 3 týdny do čerstvé pudy.

acid bacteria (LAB), particularly the genera *Lactobacillus* a *Pediococcus*, are considered the most deleterious [1]. Microbiological check-ups of beer and brewery establishments most often reveal the presence of *Lactobacillus brevis*, which is responsible for more than 50 % cases of microbial beer spoilage [3, 4]. The growth of this bacterium is accompanied by the production of acid metabolites and a massive haze. *L. brevis* is characterized by its ability to ferment dextrans and starch and is known to cause so-called superatenuation, i.e. deeper wort fermentation [1, 2].

Hop bitter substances in their isomerized form are responsible for the bitter taste and aroma of beer and exhibit also antimicrobial action against Gram-positive bacteria and some fungi [3, 5]. The effect of bitter substances can be bacteriostatic or bactericidal depending on concentration and length of exposure. The mechanism of the antimicrobial effect has not yet been fully elucidated. According to Simpson [6] iso- α -acids and their reduced derivatives are weak acids that act as protonophores, increasing the permeability of the lipid bilayer of biological membranes for protons. Their undissociated forms are reported to pass the plasma membrane of cells by passive diffusion. Intracellular pH (pH_i) higher than the pK_a value of iso- α -acids ($pK_a=3.1$) causes dissociation of iso- α -acids inside the cells to anions and protons. In sensitive cells the protons so liberated lower intracellular pH, disturbing thereby the transmembrane protonmotive force (pmf), which is used as an energy source in transmembrane transport processes [6]. This may result in the cessation of pmf-driven uptake of nutrients and cell starvation. Intracellular acidification also brings about a lowering of activity of some acid-sensitive enzymes and can adversely affect cell proteins and DNA. With divalent cations, the liberated anions form neutral complexes that can passively leave the cell. This results in an electroneutral exchange of protons for cellular divalent cations such as Mn^{2+} or Mg^{2+} [6, 7, 8].

Despite their Gram-positive character some strains of *Lactobacillus brevis* exhibit a strong resistance to the action of bitter substances and can multiply in beer. Resistance to hop acids probably results from a combination of a number of several different mechanisms and is known only in lactic acid bacteria capable of growing in beer [3, 9]. The resistance to hop bitter acids was shown to involve the action of membrane H^+ -ATPase. Cells capable of growing in the presence of hop bitter acids exhibit an increased synthesis of H^+ -ATPase; by excreting the excess protons they maintain the pH gradient near optimum, whereas sensitive cells experience a lowering of intracellular pH below the physiologically acceptable limit and die [6, 10]. The hop-resistance of the bacteria is also augmented by the action of ATP-dependent and pmf-dependent multidrug resistance transporters encoded by genes *horA* a *horC*, respectively [11]. The presence or absence of these genes correlates with the beer-spoiling ability of *L. brevis* [12]. Homologs of genes *horA* and *horC* are spread nearly exclusively in beer-spoiling LAB, independently of the species, and can apparently be disseminated by horizontal transfer. In some species, however, the genes are lost in the absence of hop bitter acids and so is their ability to spoil beer [11]. Loss of cellular divalent cations may be compensated by the action of *HitA*, putative divalent cation transporter [13]. Either *hitA*, *horC* or both genes were detected, in addition to *horA*, in *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains capable of rapid growth in beer and its spoilage [14, 15]. According to Behr and Vogel [16] highly hop-resistant *L. brevis* strains may possess dynamic regulation of manganese storage and its maintenance and thus cope with the action of hop bitter compounds. The overall resistance can also involve a higher buffering capacity of cytoplasm in the cells of resistant strains, altered composition of the cell wall or a modified plasma membrane [17, 18, 19, 20].

The beer-spoiling ability of some strains of *L. brevis* is assumed to be given by their resistance to the antimicrobial action of hop bitter substances [11, 21]. To test this hypothesis we examined growth characteristics of a set of 23 strains of *L. brevis* with different beer-spoiling abilities in the presence of different concentrations of tetrahydroiso- α -acids.

2 MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

Strains of *Lactobacillus brevis*, 23 in total, were obtained from the Culture Collection of Microorganisms (RIBM 655) of the Research Institute of Brewing and Malting in Prague, Czech Republic. The strains were previously isolated from several Czech lager breweries and forcing tests were done to divide them into two groups: beer-spoilage strains (10 isolates) and non-spoilers (13 isolates) as described by

Chmelové látky

Při experimentech byl používán 10% (w/v \pm 0,3 %) vodný roztok draselných solí tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin (YC-TETRA, Yakima Chief, Inc., USA). Koncentrace tetrahydroiso- α -hořkých kyselin (dále jen Tetra) v médiu je vyjádřena jako jejich celkový obsah.

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

Kultury *L. brevis*, staré 24 hodin, byly zaočkovány do zkumavek s 2 ml MRS bujónu obsahujícího Tetra v koncentraci od 0,19 do 44,84 μ g/ml. Zkumavky byly inkubovány při teplotě 30 °C a po dobu 5 dní byla sledována tvorba zákalu a sedimentu. Hodnota MIC byla stanovena jako koncentrace, při níž dochází k viditelné inhibici růstu, v porovnání s kontrolou bez přídavku Tetra.

Stanovení růstu *L. brevis* v přítomnosti Tetra

Suspenze buněk byly připraveny naočkováním 24-hodinové kultury do 100 ml MRS bujónu s počátečním pH 6,4. Kultivace probíhala na třepačce (120 min⁻¹) při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Poté byly suspenze zcentrifugovány (5000 x g/20 min/4 °C), dvakrát promyty ve sterilním MRS-bujónu a rozmíchány ve sterilním MRS-bujónu do koncentrace přibližně 10⁶ buněk/ml. Počet buněk byl stanoven tradiční plotnou metodou na MRS agaru, pH 6,4. Růst buněk byl monitorován s použitím přístroje Bioscreen C a software BioLink (LabSystems, Finsko). MRS bujón (300 μ l) obsahující různé koncentrace Tetra byl zaočkován 30 μ l bakteriální suspenze, čímž došlo ke snížení počtu buněk na cca 10⁵ buněk/ml. Koncentrace Tetra byly zvoleny na základě výsledků stanovení MIC. Jako pozitivní kontrola byl zaočkován MRS bujón bez přídavku Tetra. Kultivace buněk probíhala po dobu 120 hodin při +30 °C, s třepáním každých 10 minut po dobu 10 s. Přístroj zaznamenával hodnoty optické hustoty (OD) při vlnové délce 600 nm ve 20minutových intervalech.

Vliv pH na antibakteriální aktivitu Tetra

Vybrané kmeny *L. brevis* byly nakultivovány a promyty dle postupu uvedeného výše. Po poslední centrifugaci byly suspendovány ve sterilním MRS bujónu s počátečním pH 4,0, 5,0 a 6,0. Monitorování růstu buněk v přítomnosti různých koncentrací Tetra v MRS bujónu s různým počátečním pH probíhalo s použitím přístroje Bioscreen C.

Stanovení růstových parametrů

Hodnoty optické hustoty tří nezávislých měření během exponenciální fáze růstu buněk byly použity pro výpočet růstových konstant pro každý kmen *L. brevis* a koncentraci Tetra.

$$\text{Průměrná rychlost množení} \quad R = 1/\log_2 (\log X_2 - \log X_1) / t_2 - t_1 \quad (1)$$

$$\text{Průměrná generační doba} \quad G = 1/R \quad (2)$$

$$\text{Specifická růstová rychlost} \quad \mu = 0,693/G \quad (3)$$

X_1 – počáteční hodnota OD₆₀₀ v čase t_1

X_2 – konečná hodnota OD₆₀₀ v čase t_2

Tab. 1 Minimální inhibiční koncentrace (MIC) Tetra / *Minimal inhibitory concentration (MIC) of Tetra*

Kmen/Strain ^a	Tetra (μ g/ml)
4	0.76
11	0.38
12	0.76
13	0.38
14	0.38
15	0.38
18*	0.38
22*	0.38
28	0.76
29*	0.38
31*	0.38
32	0.38
33	0.76
37*	0.38
39*	0.76
42*	1.53
47	0.38
50	0.38
52*	0.38
55*	0.38
56*	0.38
61	0.38
62	1.53

^a kmeny označené symbolem hvězdičky vykazují schopnost kazit pivo / strains marked with asterisk exhibit the ability to spoil a beer

nové délce 600 nm ve 20minutových intervalech.

Hollerová and Kubizniaková [22]. For the sake of clarity, the beer spoilage strains of *L. brevis* are marked with asterisk. Strains were sub-cultured at three-week intervals in MRS broth and maintained at 4 °C.

Hop compounds

Tetrahydroiso- α -acids (Tetra) were obtained from Yakima Chief, Inc., (USA) as a 10% (w/v \pm 0.3%) aqueous solution. The concentrations of Tetra in the medium were expressed as the total tetrahydroiso- α -acids content.

Assay for determining the minimal inhibitory concentration (MIC)

24-hour cultures of *L. brevis* were inoculated into test-tubes with 2 mL of MRS-broth containing tetrahydroiso- α -acids in a final concentration from 0.19 to 44.84 μ g/ml. The growth (haze and sediment formation) was monitored for five days at 30 °C. The MIC value was determined as the concentration that caused visible inhibition of cell growth, compared to Tetra-free control.

Determination of growth of *L. brevis* cells in the presence of Tetra

The cell suspensions were prepared by inoculating a 24-hour culture into 250 mL Erlenmeyer flasks with 100 mL MRS broth, pH 6.4. The flasks were shaken at 120 rpm and 30 °C for 24 hours. The cells were then harvested by centrifugation at 5000 x g for 20 min at 4 °C, washed twice in sterile fresh MRS broth and finally suspended in sterile MRS broth (pH 6.4) to a cell count of approximately 10⁶ cells/mL. Cell counts were evaluated by a traditional plate counting technique using MRS agar medium, pH 6.4. The growth of cells was measured using Bioscreen C and BioLink (LabSystems, Finland). Thirty microlitres of suspended cells was added to 300 μ l MRS broth containing various amounts of Tetra. Thus the cell count was approximately 10⁵ cells/mL. The concentrations of Tetra used in the analysis reflect the results of MIC determination. As a positive control, 30 μ l cell suspension was added to 300 μ l MRS broth. MRS broth medium with no cells added served as a negative control. All experiments were carried out at least in triplicate. Cells were grown at 30 °C for 120 hours with shaking every 10 min for a period of 10 s. Absorbance at 600 nm was measured at 20-min intervals.

Effect of pH on the antibacterial activity of Tetra

Cells of selected *L. brevis* strains were grown and washed as described above. After final centrifugation the cells were suspended in sterile MRS broth with initial pH 4.0, 5.0 and 6.0. The cell growth in the presence of a series of dilutions of Tetra in MRS broth with varying pH was monitored using Bioscreen as noted above.

Determination of growth parameters

The optical density values measured in three independent experiments during the exponential phase of growth curves served for calculating the following growth constants for individual *L. brevis* strains for given concentrations of Tetra.

$$\text{Mean rate of multiplication} \quad R = 1/\log_2 (\log X_2 - \log X_1) / t_2 - t_1 \quad (1)$$

$$\text{Mean generation time} \quad G = 1/R \quad (2)$$

$$\text{Specific growth rate} \quad \mu = 0,693/G \quad (3)$$

X_1 – initial value of OD₆₀₀ at time t_1

X_2 – final value of OD₆₀₀ at time t_2

3 RESULTS**Growth of *L. brevis* strains in the presence of Tetra**

The tolerance to tetrahydroiso- α -acids of each of the 23 *L. brevis* strains isolated from several Czech lager breweries was examined in a range of concentrations of Tetra that encompassed the minimal inhibitory concentration determined for the given strain. Cells were grown in shaken cultures in MRS broth containing different concentrations of Tetra (0; 0.38; 0.76; 1.53; 3.05; 6.10; 12.21 and 22.42 μ g/ml) and the O.D. of cell culture was measured. The strains differed widely in their ability to grow in the presence of Tetra. As seen in Tab. 2, the highest MIC value (1.53 μ g/ml) was found in strains 42* and 62, followed by strains 4, 12, 28, 33 and 39*. The effect of 3.05 μ g/ml Tetra on the cell suspension O.D. of all 23 strains of *L. brevis* after 100 hours of cultivation is shown in Fig. 1. Under these conditions, the strains having the highest O.D. were 4, 28, 33 and 62, while the lowest O.D. was observed with strains 12, 29*, 31*, 37*, 55*, 56* and 61. Hence, many strains having the highest suspension O.D., i.e. strains

3 VÝSLEDKY**Růst kmenů *L. brevis* v přítomnosti Tetra**

Tolerance k Tetra byla testována u 23 kmenů *L. brevis* izolovaných z českých pivovarských provozů. Rozmezí koncentrací pro jednotlivé kmeny *L. brevis* bylo zvoleno na základě výsledků stanovení mini-

Tab. 2 Vliv různých koncentrací Tetra na délku lag-fáze *L. brevis* (pH média 6,4). Délka lag-fáze je vyjádřena v hodinách. Výsledky jsou průměrem ze tří měření / *Effect of different concentrations of Tetra on the duration of lag phase of L. brevis (medium pH 6.4). Lag phase durations are expressed in hours. The results are average of three trials*

Kmen/ Strain ^a	Tetra ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	0.38–3.05	6.10	12.21
4	7	7–12	16	46
11	10	15–28	– ^c	–
12	5	5–11	N	–
13	8	10–22	70	N
14	8	10–22	75	N
15	10	11–25	–	–
18*	8	10–20	–	–
22*	7	12–50	–	–
28	7	7–10	13	N
29*	8	10–28	–	–
31*	5	7–14	–	–
32	6	7–18	–	–
33	5	5–8	11	53
37*	7	12–36	–	–
39*	7	7–9	14	–
42*	10	10–24	50	–
47	7	9–22	N	–
50	5	6–14	N	–
52*	5	5–7	10	–
55*	5	6–23	N	–
56*	5	6–10	N	–
61	5	7–8	–	–
62	7	7–10	12	–

^a kmeny kazící pivo jsou označeny symbolem hvězdičky / *beer spoilers are marked with asterisk*

^b N, lag-fáze nestanovena / *lag phase not determined*

^c –, růst nedetekován / *no growth detected*

least sensitive to Tetra, are nonspoilers. The values of O.D. are expressed as a percentage of Tetra-free control. Three-way analysis of scatter with interactions was used to evaluate the differences in the cell suspension O.D. between spoilers and nonspoilers during 20-h and 100-h cultivation in the presence of Tetra. The cell suspension O.D. was seen to be highly significantly ($p < 0.00005$) affected by both Tetra concentration and the length of cultivation, whereas the effect of other factors was insignificant (results not shown).

Effect of Tetra on the growth characteristics of beer-spoiling and –nonspoilng *L. brevis* strains

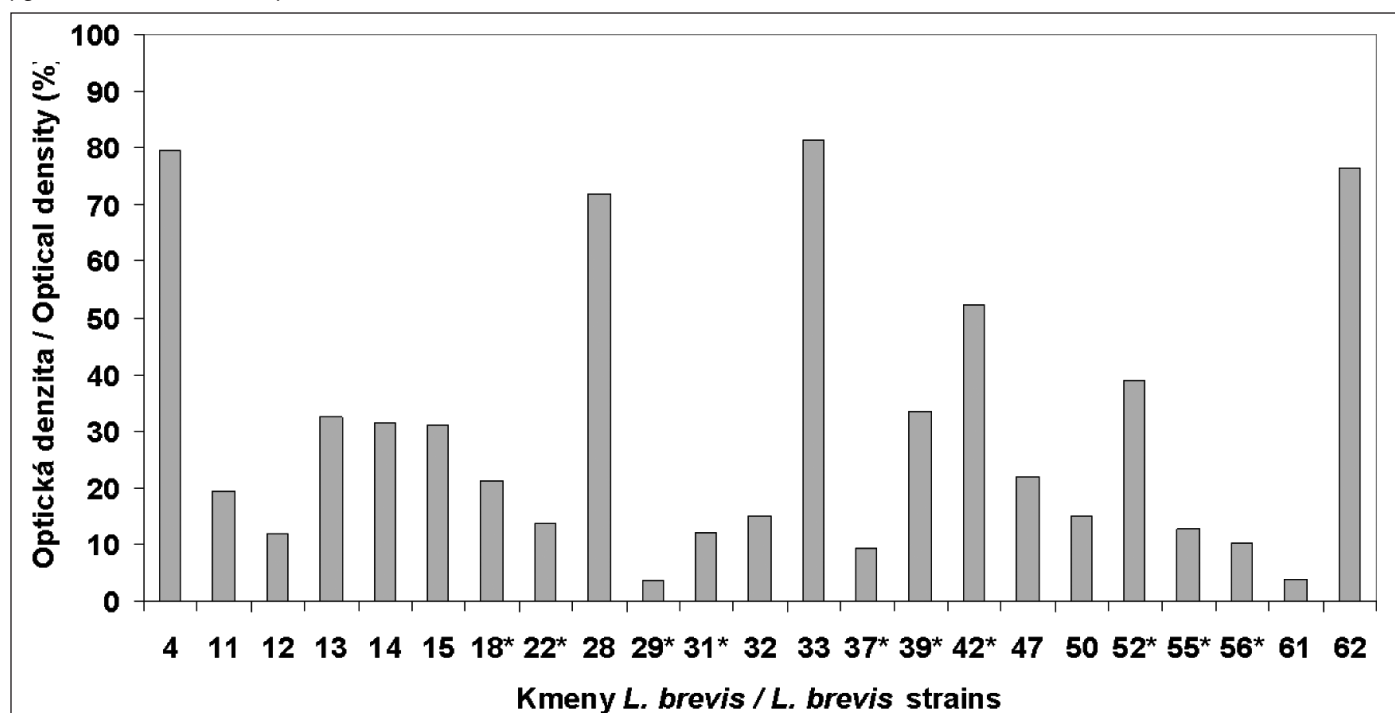
Duration of the lag phase

Lag phase may be defined as an interval necessary for the transferred cells to adapt to the new situation and start to grow and multiply. Its length generally depends on the volume of cell inoculum, composition of new culture medium, presence of potential inhibitors, CO₂ tension, etc. A lag phase of about 5 to 10 hours was observed with most of the studied strains in a MRS medium (pH 6.4) with no Tetra added. Increasing Tetra concentration in culture medium brought about an extension of the lag phase of the majority of strains (Table 2). Some strains, notably the non-spoilers 33 and 4, exhibited growth even at 12.21 $\mu\text{g/ml}$ Tetra in the medium, though the lag phase was considerably extended (to 53 and 46 h, respectively). They were followed by strains 13, 14, 28 and 62, whose growth curves at this Tetra concentration showed no discernible transition from lag phase to exponential phase of growth. The beer-spoilage strains were able to withstand no more than 6.10 $\mu\text{g/ml}$ Tetra in the medium. Some of them (strains 39*, 42*, 52*) exhibited at this Tetra concentration a defined, though extended, lag phase, while strains 55* and 56* grew without clear lag phase-exponential phase transition. Here again non-spoilers showed the ability to withstand higher Tetra concentrations.

Specific growth rate

The effect of Tetra on the specific growth rate for all *L. brevis* strains in MRS-broth is shown in Tab. 3. The values of specific growth rate are expressed as a percentage of Tetra-free control. Though the specific growth rate of all studied strains decreased with increasing concentration of Tetra in the medium, their sensitivity to Tetra strongly differed. The strains exhibiting the highest tolerance to Tetra were again the non-spoilage strains 13 and 14, which grew even in the presence of the highest amount of Tetra (24.42 $\mu\text{g/ml}$), followed by strains 4 and 33. Strains most sensitive to the activity of Tetra were the beer spoilers 22*, 29*, 37*, 55* together with the non-spoiler strain 61. Sta-

Obr. 1 Vliv koncentrace 3,05 $\mu\text{g/ml}$ Tetra na koncentraci buněk v suspenzi kmenů *L. brevis* po 100 hodinách kultivace / *Fig. 1 Effect of 3.05 $\mu\text{g/ml}$ Tetra on the cell suspension O.D. of L. brevis strains after 100-h cultivation*



Kmeny označené hvězdičkou mají schopnost kazit pivo. Koncentrace buněk je vyjádřena jako optická denzita buněčné suspenze v procentech pozitivní kontroly (měřeno při 600 nm). Výsledky jsou průměrem ze tří měření. / *Strains marked with asterisk cause beer-spoilage. Optical density was measured at 600 nm. Cell suspension O.D. is expressed in % of positive control. The results are the average of three trials.*

Tab. 3 Vliv různých koncentrací Tetra na specifickou růstovou rychlost kmenů *L. brevis* (pH média 6,4). Hodnoty specifické růstové rychlosti jsou vyjádřeny v procentech kontroly. Výsledky jsou průměrem ze tří měření / *Effect of Tetra concentration on the specific growth rate of L. brevis strains (medium pH 6.4) Values of specific growth rate are expressed in % of Tetra-free control. The results are average of three trials*

Kmen/ Strain ^a	Tetra (µg/ml)						
	0.38	0.76	1.53	3.05	6.10	12.21	24.42
4	C ^b	97.1	92.5	79.2	75.7	39.9	— ^d
11		71.5	67.7	44.6	27.4	—	—
12	C	74.2	55.5	33.0	N ^c	—	—
13		57.8	49.6	37.1	25.8	14.1	N
14		78.9	72.3	46.5	32.9	23.0	N
15		88.6	78.4	44.9	35.2	—	—
18*		77.5	70.6	45.0	29.8	—	—
22*		56.0	35.8	26.5	18.3	—	—
28	C	74.8	69.4	77.6	60.5	N	—
29*		86.9	34.4	13.5	N	—	—
31*		95.4	83.2	46.2	29.4	—	—
32		91.9	81.5	53.6	25.2	—	—
33	C	98.8	92.2	81.6	53.7	25.4	—
37*		53.2	43.9	22.3	8.9	—	—
39*	C	91.4	85.2	48.2	22.8	—	—
42*	C	89.6	75.2	54.3	31.7	—	—
47		89.3	44.1	30.6	21.4	N	—
50		96.7	91.8	65.4	23.4	N	—
52*		93.0	86.8	71.3	55.1	37.1	—
55*		98.3	94.1	55.1	13.9	N	—
56*		86.0	85.6	67.7	32.6	N	—
61		79.1	61.8	30.7	N	—	—
62	C	87.1	60.5	55.0	33.6	—	—

^a kmeny kazící pivo jsou označeny symbolem hvězdičky / *beer spoilers are marked with asterisk*

^b C, růst srovnatelný s kontrolou / *growth comparable to Tetra-free control (100 %)*

^c N, růstové parametry nestanoveny / *growth parameters not determined*

^d —, růst nedetekován / *no growth detected*

máliní inhibiční koncentrace tak, aby dvě z nich odhadnutou MIC přesahovaly a dvě ležely pod touto hodnotou. Kultivace buněk za současného měření optické hustoty probíhala po dobu 120 hodin při +30 °C v MRS-médii s obsahem různých koncentrací Tetra (0; 0,38; 0,76; 1,53; 3,05; 6,10; 12,21 a 22,42 µg/ml). Kmeny se velmi lišily svou schopností růst v přítomnosti Tetra. Nejvyšší hodnota MIC (1,53 µg/ml) byla zjištěna u kmenů 42* a 62, následovaných kmeny 4, 12, 28, 33 a 39* (tab. 1). Vliv 3,05 µg/ml Tetra na koncentraci buněk v suspenzi všech 23 kmenů *L. brevis* po 100 hodinách kultivace je graficky znázorněn na obr. 1. Nejvyššího počtu buněk dosahovaly kmeny 4, 28, 33 a 62, nejnižšího pak kmeny 12, 29*, 31*, 37*, 55*, 56* a 61.

Kmeny, které dosáhly nejvyšší koncentrace buněk v suspenzi, tedy kmeny nejméně citlivé k působení Tetra, patří mezi kmeny kazící pivo. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech optické hustoty kontroly bez přídatku Tetra. Pro statistické vyhodnocení rozdílů koncentrace buněk v suspenzi u kmenů kazících a nekazících pivo v přítomnosti zmíněných koncentrací Tetra v čase kultivace 20 a 100 hodin byla použita trojcestná analýza rozptylu s interakcemi. Koncentraci buněk v suspenzi významně (na hladině menší než 0,00005) ovlivňuje koncentrace Tetra i doba kultivace. Ostatní interakce nejsou statisticky průkazné (výsledky nejsou uvedeny).

Vliv Tetra na růstové parametry kmenů *L. brevis* kazících a nekazících pivo

Délka lag-fáze

Lag-fáze může být definována jako interval nutný pro adaptaci buněk na nové podmínky. Její délka závisí na velikosti buněčného inokula, složení nového média, přítomnosti potenciálních inhibitorů, tlaku CO₂ apod. Lag-fáze 5 až 10 hodin byla pozorována u většiny kmenů *L. brevis* kultivovaných v MRS bujónu bez přídatku Tetra. Se stoupající koncentrací Tetra lze pozorovat prodloužení lag-fáze (tab. 2). Kmeny 33 a 4 byly schopny růstu v přítomnosti 12,21 µg/ml Tetra s lag-fází trvající 53 a 46 hodin, resp. u kmenů 13, 14, 28 a 62 nedošlo při této

tistická evaluace rozdílů v specifické růstové rychlosti *L. brevis* v přítomnosti různých koncentrací Tetra odhalila, že specifická růstová rychlost je významně ovlivněna pouze koncentrací Tetra, nikoli typem kmenů (beer-spoiling versus non-spoiling) a nikoli interakcí typu kmenů s koncentrací Tetra. Statistická analýza dat byla provedena pomocí R-jazyka. Rozdíly v specifické růstové rychlosti beer-spoiling a non-spoiling *L. brevis* kmenů v přítomnosti různých koncentrací Tetra byly vyhodnoceny dvoutřídní analýzou rozptylu s interakcemi. Rozdíl v mediánu byl vyhodnocen pomocí Wilcoxonova testu, rozdíl v průměru pomocí t-testu s Welchovou modifikací (nebyla předpokládána shoda rozptylů) a rozdíl v rozptylu pomocí F-testu. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi kmeny. Při nižších koncentracích Tetra beer-spoiling kmeny vykazovaly větší rozptyl specifické růstové rychlosti než non-spoiling kmeny, zatímco opačná situace byla nalezena při vyšších koncentracích Tetra (data nejsou uvedena).

Effect of pH on the antibacterial activity of Tetra

Vliv pH kultivačního média na antibakteriální aktivitu Tetra byl studován s cílem určit vliv pH média a změny v stupni disociace Tetra (pK_a=3.1) na jeho účinnost. Růst reprezentativního non-spoiler kmeny 11 a reprezentativního spoiler kmeny 18* s podobnou rezistencí v přítomnosti různých koncentrací Tetra v MRS-broth s různými pH hodnotami byl měřen při 30 °C po 120 hodinách pomocí Bioscreen C. Fig. 2 ukazuje růstové křivky kmeny 11 za těchto podmínek.

Výsledky ukazují, že nízké pH média (4.0) zpomaluje růst buněk i v případě, že není přítomna Tetra. Podrobnější srovnání růstových křivek ukázalo, že lag-fáze kmenů 11 a 18* při pH 5.0 a 6.0 trvala 10 hodin, zatímco při pH 4.0 trvala 20 a 14 hodin. Specifická růstová rychlost, která byla při pH 5.0 a 6.0 stejná, byla při pH 4.0 snížena o 40 % vzhledem ke kontrole.

koncentraci Tetra k rozeznatelnému přechodu z lag-fáze do fáze exponenciální. Kmeny 39*, 42*, 52* v přítomnosti 6,10 $\mu\text{g/ml}$ Tetra vykazovaly prodlouženou lag-fázi, zatímco u jiných pivo-kazičních kmenů (55* a 56*) nebyl přechod z fáze růstového lagu do exponenciální fáze rozeznatelný. Kmeny pivo nekaziční tedy vykazují schopnost odolávat působení vyšších koncentrací Tetra v médiu.

Specifická růstová rychlost

Účinek látky Tetra na specifickou růstovou rychlost kmenů *L. brevis* v MRS-bujónu je shrnut v tab. 3. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta kontroly bez přídavku Tetra. Specifická růstová rychlost se snižuje s rostoucí koncentrací Tetra v médiu, citlivost k Tetra se však u jednotlivých kmenů velmi liší. Kmeny s nejvyšší tolerancí k Tetra, schopné růstu i při koncentraci 24,42 $\mu\text{g/ml}$, jsou opět kmeny pivo nekaziční, 13 a 14, následované kmeny 4 a 33. Kmeny nejvíce citlivé k Tetra patří většinou mezi pivo kaziční (*L. brevis* 22*, 29*, 37*, 55*, 61). Z provedené statistické analýzy vyplývá, že specifickou růstovou rychlost významně ovlivňuje pouze koncentrace Tetra. Vliv typu kmene (tj. kmen kaziční a nekaziční pivo) a vliv interakce typu kmene s koncentrací Tetra nejsou průkazné. Statistické hodnocení naměřených dat bylo prováděno pomocí programového systému R-language. Použitou statistickou metodou pro vyhodnocení rozdílů v hodnotách specifické růstové rychlosti obou typů kmenů byla dvoucestná analýza rozptylu s interakcemi. Pro rozdíl mediánů byl použit Wilcoxonův pořadový test, pro rozdíl průměrů t-test ve Welchově modifikaci (nepředpokládá se shoda rozptylů) a pro rozdíl rozptylů F-test. Rozdíly mezi kmeny nejsou statisticky významné. Při nižších koncentracích Tetra mají kmeny kaziční pivo větší rozptyly specifické růstové rychlosti než kmeny nekaziční, při vyšších koncentracích Tetra je tomu naopak.

Vliv pH na antibakteriální aktivitu Tetra

V další fázi naší studie jsme sledovali účinek pH kultivačního média na antibakteriální aktivitu Tetra s cílem stanovit čistý vliv pH a stupně disociace Tetra ($\text{pK}_a=3,1$) v extracelulárním prostředí na její působení na buňky. Pro experimenty byl vybrán reprezentativní středně rezistentní kmen bez schopnosti kazit pivo (*L. brevis* 11) a kmen kaziční pivo s podobnou rezistencí k Tetra (*L. brevis* 18*). Růst v přítomnosti různých koncentrací Tetra v MRS-bujónu s různým počátečním pH byl sledován po dobu 120 hodin při teplotě 30 °C pomocí přístroje Bioscreen C. Růstová křivka kmene 11 je znázorněna na obr. 2.

Nízké pH (4,0) zpomaluje buněčný růst i v nepřítomnosti Tetra. Lag fáze u obou kmenů při pH 5,0 a 6,0 trvala 10 hodin, zatímco při pH 4,0 došlo k jejímu prodloužení na 20 hodin u kmene 11 a 14 hodin u kmene 18*. Specifická růstová rychlost, při pH 5,0 a 6,0 srovnatelná, poklesla při pH 4,0 přibližně o 40 %.

Pokles pH z 6,0 na 4,0 vede k zesílení inhibičního účinku Tetra na bakteriální růst a množení. Tetra v koncentraci 6,10 $\mu\text{g/ml}$ v médiu s počátečním pH 6,0 způsobila zastavení růstu bakterií. Této inhibičního účinku bylo při pH 5,0 dosaženo již při koncentraci 1,53 $\mu\text{g/ml}$. V MRS-bujónu s počátečním pH 4,0 nedocházelo k růstu buněk již při koncentraci Tetra 0,19 $\mu\text{g/ml}$. Nebyly pozorovány rozdíly mezi kmeny 11 a 18*.

Zajímavé zjištění je dokumentováno na obr. 2. Koncentrace Tetra do 0,38 $\mu\text{g/ml}$ zpomalovaly růst bakterií, ale kultura po nějaké době dosáhla koncentrace buněk srovnatelné s kontrolou. Koncentrace Tetra vyšší než 0,38 $\mu\text{g/ml}$ nezpůsobily jen prodloužení lag-fáze a zpomalení růstové rychlosti, ale růst buněk byl inhibován do takové míry, že i během velmi dlouhé kultivace nedosáhla koncentrace buněk v suspenzi hodnoty srovnatelné s pozitivní kontrolou. K přechodu do stacionární fáze došlo při mnohem nižších hodnotách OD. Nejnižší použitá koncentrace Tetra, 0,095 $\mu\text{g/ml}$, výrazně inhibovala růst obou kmenů pouze při pH 4,0 a 5,0. V porovnání s kontrolou (MRS-bujón bez přídavku Tetra) dosáhly hodnoty OD při této koncentraci a pH 4,0 po 100 hodinách kultivace pouze 23 % u kmene 11 a 33 % kontroly u kmene 18*, přičemž došlo k prodloužení lag-fáze o 58 resp. 54 hodin.

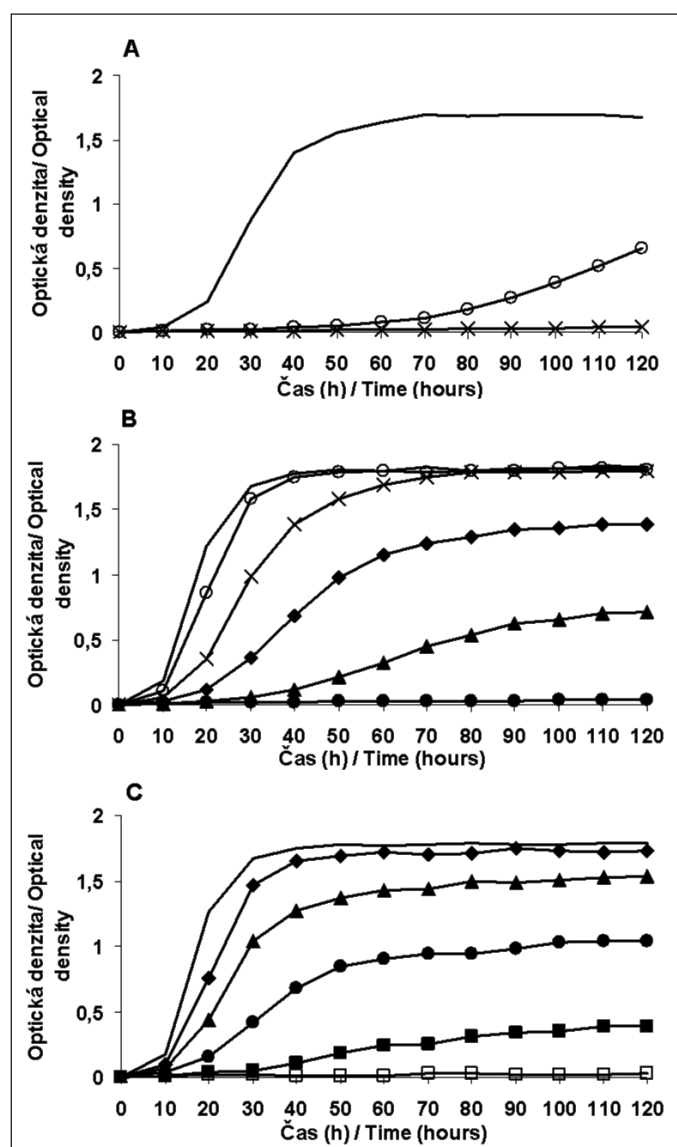
Podobná data byla získána při sledování vlivu pH média na specifickou růstovou rychlost *L. brevis* 11 a 18* (obr. 3). Při pH média 6,0 dosáhly oba kmeny 18–20 % růstové rychlosti kontroly i v přítomnosti 3,05 $\mu\text{g/ml}$ Tetra. Působení nižších koncentrací Tetra při pH 5,0 vedlo ke snížení specifické růstové rychlosti obou kmenů na přibližně 40% hodnoty dosažené při téže koncentraci a pH 6,0. Při pH 4,0 už nejnižší koncentrace Tetra 0,095 $\mu\text{g/ml}$ způsobila snížení specifické růstové rychlosti na 30 % kontroly a vyšší koncentrace zcela zastavily růst buněk.

Z výsledků vyplývá, že kmeny *L. brevis* kaziční a nekaziční pivo nelze odlišit na základě růstových charakteristik v přítomnosti Tetra. Jediným výrazným rozdílem mezi kmeny 11 a 18* bylo zpoždění nástupu exponenciální fáze při počátečním pH 4,0. Toto zpoždění bylo 10 hodin u kmene 11 a pouze 4 hodiny u kmene 18*.

In addition, lowering medium pH from pH 6.0 to 4.0 strongly enhanced the inhibitory effect of Tetra on bacterial growth and multiplication. While at pH 6.0 a concentration of 6.10 $\mu\text{g/ml}$ Tetra was needed to block the growth, at pH 5.0 the same growth inhibition occurred at 1.53 $\mu\text{g/ml}$ and at pH 4.0 the growth was practically abolished by 0.19 $\mu\text{g/ml}$ Tetra. Strain 18* provided practically identical results (data not shown).

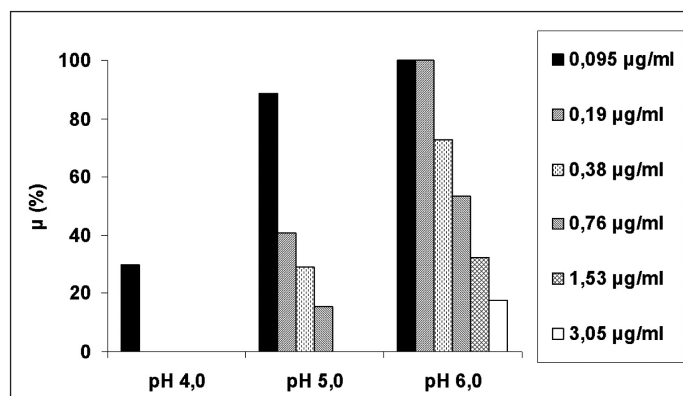
An interesting finding documented in Fig. 2 was that while Tetra concentrations up to 0.38 g/ml slowed down the growth but the culture finally reached the O.D. of the control culture, higher Tetra concentrations caused not only extension of the lag phase and lowering of the growth rate but also stymied the growth so that the final O.D. after a prolonged cultivation failed to reach the level of the control culture and leveled off at a much lower level. The lowest concentration of Tetra, 0.095 g/ml, considerably inhibited cell growth of both strains only at pH 4.0 and 5.0. Compared to the Tetra-free control, the cell

Obr. 2 Vliv Tetra na růst kmene *L. brevis* 11 v MRS-bujónu s různým počátečním pH / Fig. 2 Effect of Tetra on the growth of *L. brevis* 11 cultivated in the MRS-broth with different initial pH



A, pH 4,0; B, pH 5,0; C, pH 6,0; ○ = 0,095 $\mu\text{g/ml}$, × = 0,19 $\mu\text{g/ml}$, ◆ = 0,38 $\mu\text{g/ml}$, ▲ = 0,76 $\mu\text{g/ml}$, ● = 1,53 $\mu\text{g/ml}$, ■ = 3,05 $\mu\text{g/ml}$ and □ = 6,10 $\mu\text{g/ml}$. Plná čára bez symbolů označuje kultivaci bez Tetra (pozitivní kontrola). Optická densita byla měřena při 600 nm. Základní tvar růstových křivek byl získán spojením hodnot získaných po 10-hodinových intervalech. Výsledky jsou průměrem ze tří měření. A, pH 4.0; B, pH 5.0; C, pH 6.0; ○ = 0.095 $\mu\text{g/ml}$, × = 0.19 $\mu\text{g/ml}$, ◆ = 0.38 $\mu\text{g/ml}$, ▲ = 0.76 $\mu\text{g/ml}$, ● = 1.53 $\mu\text{g/ml}$, ■ = 3.05 $\mu\text{g/ml}$ and □ = 6.10 $\mu\text{g/ml}$. Solid line with no symbols indicates cultivation without Tetra (positive control). Optical density was measured at 600 nm. Only points obtained at 10-h intervals are given to show the general shape of the curves. The results are the average of three trials.

Obr. 3 / Vliv pH a Tetra na specifickou růstovou rychlost kmene *L. brevis* 11 / Fig. 3 Effect of pH and Tetra on the specific growth rate of *L. brevis* strain 11.



Specifická růstová rychlost je vyjádřena v % kontroly (médium bez Tetra). Výsledky jsou průměrem ze tří měření. / Specific growth rate is expressed in % of Tetra-free control. The results are the average of three trials.

4 DISKUSE

Iso- α -hořké kyseliny a jejich redukované deriváty jsou slabé kyseliny, které fungují jako protonofory zvyšující propustnost lipidové dvojvrstvy biologických membrán pro protony [6]. Bakterie mléčného kvašení využívají několik způsobů kompenzace nízkého vnitrobuněčného pH způsobeného disociací hořkých chmelových látek. Jsou schopny udržovat Δ pH v širokém rozmezí vnějších hodnot pH [23, 24]. Mezi mechanismy regulace cytoplazmatického pH patří a) existující pufrací kapacita buněk daná obsahem proteinů a zásobou glutamátu a polyaminů, b) pravděpodobně nejdůležitější pH-homeostatický systém u mléčných bakterií – membránová protony-translokující ATPasa (H^+ -ATPasa), c) produkce kyselých a alkalických metabolických produktů v závislosti na pH média, d) sekundární transportní systémy na bázi symportu s protony, e) aktivita K^+ -ATPasy [25, 26, 27, 28].

Vedle schopnosti kompenzovat změny intracelulárního pH jsou u některých bakterií známy další způsoby obrany proti aktivitě hořkých chmelových látek, např. export chmelových kyselin z membrány a/nebo z cytosolu ATP- nebo pmf-řízenými přenašeči [3]. Takové mechanismy rezistence k hořkým látkám chmele vyžadují nepochybně velké množství energie. Hotové pivo je prostředím chudé na živiny, neboť většinu jich při hlavním kvašení spotřebují kulturní kvasinky [3, 15]. U některých mléčných bakterií byla zjištěna schopnost získávat energii i v prostředí s velmi nízkým obsahem živin – tyto bakterie metabolizují zbytkové substráty jako je citrát, malát, pyruvát a arginin [12]. Suzuki a kol. [12] prokázali, že buňky *L. brevis* ABBC45 při růstu v pivu využívají citrát, pyruvát, malát, arginin a v menší míře i tyrosin. Transport některých živin do buněk může být nezávislý na protonové hnací síle, nebo se za určitých podmínek může dokonce na tvorbě jedné nebo obou složek protonové hnací síly podílet. Vzhledem ke skutečnosti, že hořké chmelové látky inhibují příjem živin řízený pmf (leucin, maltotrióza), by mohla schopnost bakterií získávat energii ze zmíněných substrátů transportovaných do buněk systémy nezávislými na pmf (malát, arginin, atd.), významně přispívat k rezistenci k hořkým chmelovým látkám, nebo tedy obecně ke schopnosti bakterií růst v pivu [12].

Stupeň disociace slabých kyselin klesá s klesajícím pH okolí. Malá změna v pH piva nebo kultivačního média tedy může vést k velkým změnám antibakteriální aktivity těchto látek. Naše data potvrzují pH-indukované zvýšení antibakteriálních účinků Tetra. Snížení specifické růstové rychlosti *L. brevis*, prodloužení lag-fáze a zpomalení buněčného dělení jsou tím intenzivnější, čím vyšší je koncentrace Tetra a nižší pH média. Prodloužení lag-fáze může mít několik příčin. Jednou z nich může být dobře známá heterogenita bakteriální populace, která se uplatňuje významně např. při kolonizaci nových prostředí [29]. Stres vyvolaný přítomností Tetra může vést k selekčnímu tlaku ve prospěch takových buněk v populaci, které se vyznačují zvýšenou tolerancí nebo rezistencí k inhibičnímu účinku chmelových látek. Několik individuálních buněk může vykazovat extrémní toleranci k působení těchto látek a velmi dlouhá lag-fáze tak může být způsobena delším časem potřebným pro jejich pomnožení. Růst stejných bakteriálních kmenů v různých pivech je různým způsobem limitován, v zá-

culture O.D. at this Tetra concentration in a medium of pH 4.0 after a 100-h cultivation was 23 % in strain 11 and 33 % in strain 18* and the lag phase was extended by 58 and 54 h, respectively.

Nearly identical data for both *L. brevis* strains 11 and 18* were also obtained when examining the effect of medium pH on specific growth rate (see Fig. 3). In a pH 6.0 medium both strains reached 18–20 % growth rate relative to Tetra-free control even at 3.05 g/ml Tetra. Lower Tetra concentrations in pH 5.0 medium reduced the specific growth rate of both strains to about 40% of the value achieved at pH 6.0. At 4.0 even the lowest Tetra concentration of 0.095 μ g/ml reduced the specific growth rate to some 30 % of control and higher concentrations completely prevented cell growth.

These results show that beer-spoiling strains cannot be distinguished from nonspoilors on the basis of growth characteristics in the presence of Tetra. The only observable difference between strain 11 and strain 18* was the delay in the onset of the exponential phase relative to control in cultivation in a pH 4.0 medium. This delay was 10 h in the former and only 4 h in the latter strain.

4 DISCUSSION

Iso- α -acids and their reduced derivatives are weak acids that act as protonophores, increasing the permeability of the lipid bilayer of biological membranes for protons [6]. Lactic acid bacteria possess several mechanisms to compensate the lowering of intracellular pH caused by intracellular dissociation of hop bitter compounds and it is well known that they can maintain a Δ pH over a wide range of external pH values [23, 24]. Possible mechanisms for cytoplasmic pH regulation include a) preexisting buffering capacity of the cell mediated by the protein content and the cytoplasmic pools of glutamate and polyamines, b) perhaps the most important pH-homeostatic system in lactic acid bacteria – the membrane-bound proton-translocating ATPase (H^+ -ATPase), c) production of acidic or alkaline metabolic products depending on the varying pH in media, d) proton-symport secondary transport systems, e) activity of K^+ -ATPase [25, 26, 27, 28].

Besides being able to compensate changes in intracellular pH some bacteria are reported to develop various ways to counteract the activity of hop bitter compounds including export of hop acids from the membrane and/or from the cytosol by the ATP- or pmf-driven hop transporters [3]. Such mechanisms of hop-resistance require considerable amount of energy. Beer is a medium poor in nutrients since most of them are used up by brewer's yeast during main fermentation [3, 15]. Beer-spoiling lactic acid bacteria have been reported to be able to obtain their energy from environments with very low nutrient content by metabolizing residual substrates such as citrate, malate, pyruvate and arginine [12]. It was shown that the cells of *L. brevis* ABBC45 growing in beer utilized all these substrates and, to a lesser extent, also tyrosine. The transport of some nutrients into the cells can proceed independently of the protonmotive force, or may even under certain conditions participate in the production of one or both of its components. Since hop bitter substances inhibit the pmf-dependent uptake of nutrients such as leucine or maltotriose, this ability of the bacteria to acquire energy from substrates such as malate or arginine by using pmf-independent uptake systems could significantly contribute to the resistance to hop substances and thus to the ability to grow in beer [12].

Since the degree of dissociation of weak acids decreases with lowering the ambient pH, a small change in pH in beer or culture medium may cause large changes in antibacterial activity of these compounds. Our data confirm this pH-induced increase in the antibacterial effect of Tetra by showing that the lowering of specific growth rate of *L. brevis* strains, extension of the lag phase and a drop in cell multiplication are the stronger the higher is the concentration of Tetra and the lower is medium pH. The extension of the lag phase can be caused by several reasons. One possible reason may be the well-known heterogeneity of bacterial populations, which is a property that is of concern especially during colonization of a new environment [29]. Then, the stress caused by the presence of Tetra may exert a selection pressure that favors the growth of cells with elevated tolerance or resistance to the inhibitory effects of the hop bitter compounds within the population. A few individual cells may show an extreme tolerance to Tetra and the longer lag phase may be due to a longer time needed for their sufficient multiplication in the culture.

Growth of the same bacterial strains in different beers is restricted to different degrees, because of differences in pH, alcohol content, content of hop compounds, utilizable substrate concentration, CO_2

vislosti na pH, obsahu alkoholu, chmelových látek, koncentraci užitelných živin, tlaku CO_2 a SO_2 . Fernandez and Simpson [30] uvádí, že k bakteriálnímu kažení jsou více náchylná piva s vyšším obsahem aminokyselin, fermentovatelných cukrů, s vyšším pH a nižším obsahem nedisociovaných chmelových kyselin a nedisociovaného SO_2 . Podle Suzuki a kol. [11] je rezistence k chmelovým látkám stabilní vlastnost bakteriálních kmenů se schopností kazit pivo, na základě které je lze odlišit od kmenů pivo-nekazících.

Naše data jsou v rozporu s těmito předpoklady. Stupeň citlivosti nebo rezistence k Tetra je ovlivňován pH média, ale nebyla zjištěna korelace mezi pH-indukovanou hladinou rezistence a schopností kazit pivo. Kmeny použité v naší studii byly udržovány v bohatém médiu, s dostatkem zdrojů energie, minerálních látek, růstových faktorů a s optimálním pH. Po jejich převedení do pudy s obsahem chmelových látek nebyly zjištěny rozdíly mezi pivo-kazícími a nekazícími. Rezistence laktobacilů k hořkým chmelovým látkám nebyla v našich experimentálních podmínkách přímo spojena se schopností kazit pivo. Bakteriální systémy, pomocí nichž se buňky vyrovnávají se stresy vyvolanými změnami prostředí, závisí na koordinované regulované expresi genů. Z našich výsledků vyplývá, že jedním z klíčových faktorů, které vyvolávají expresi genů kódujících proteiny v rezistenci k hořkým chmelovým látkám, může být nedostatek živin, který poskytuje pivo-kazícím bakteriím výhodu pro přežití.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z prostředků Výzkumných záměrů MSM6019369701, AV0Z50200510 a MSM0021622413.

LITERATURA / REFERENCES

- Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D.: Enhancing the microbiological stability of malt and beer – a review. *J. Inst. Brew.* **111**, 2005, 355–371.
- Jespersen, L., Jakobsen, M.: Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 1996, 139–155.
- Sakamoto, K., Konings, W. N.: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* **89**, 2003, 105–124.
- Thelen, K., Beimfohr, C., Snaird, J.: VIT-Bier: The rapid and easy detection method for beer-spoiling bacteria. *MBA Tech. Q.* **41**, 2004, 115–119.
- Larson, A. E., Yu, R. R. Y., Lee, O. A., Price, S., Haas, G. J., Johnson, E. A.: Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 1996, 195–207.
- Simpson, W. J.: Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1993, 1041–1045.
- Fernandez, J. L., Simpson, W. J.: Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 1993, 315–319.
- Simpson, W. J., Smith, A. R. W.: Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 1992, 327–334.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H.: A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* **112**, 2006, 173–191.
- Sakamoto, K., van Veen, H. W., Saito, H., Kobayashi, H., Konings, W. N.: Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2002, 5374–5378.
- Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y.: Hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria (LAB) and other related quality assurance issues – review. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., Venice, CD ROM 2007. Presentation 128.*
- Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., Yamashita, H.: Study on ATP production of lactic acid bacteria in beer and development of a rapid pre-screening method for beer-spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.* **111**, 2005, 328–335.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., Taguchi, H.: Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 2001, 596–603.
- Haakensen, M., Schubert, A., Ziola, B.: Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **66**, 2008, 63–70.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kitamoto, K.: Sake and beer spoilage lactic acid bacteria – a review. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 209–223.
- Behr, J., Vogel, R. F.: Role of manganese in beer spoilage – a revised view of hop resistance. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., Venice, CD ROM 2007. Presentation 126.*
- Behr, J., Gänzle, M. G., Vogel, R. F.: Characterization of a highly Hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2006, 6483–6492.
- Behr, J., Vogel, R. F.: Mechanisms of hop-adaptation in emergence of beer spoiling *Lactobacillus brevis*. *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv., Venice, CD ROM 2007. Presentation 125.*
- Simpson, W. J., Fernandez, J. L.: Mechanism of resistance of lactic acid bacteria to trans-isohumulone. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**, 1994, 9–11.
- Cloete, T. E.: Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **51**, 2003, 277–282.
- Behr, J., Israel, L., Gänzle, M. G., Vogel, R. F.: Proteomic approach for characterization of Hop-inducible proteins in *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2007, 3300–3306.
- Hollerová, I., Kubizniaková, P.: Monitoring Gram-positive bacterial contamination in Czech breweries. *Kvasny Prum.* **48**, 2002, 309–313.
- Konings, W. N.: The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **82**, 2002, 3–27.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., Maguin, E.: Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **82**, 2002, 187–216.
- Booth, I. R.: Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 1985, 359–378.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P.: Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2005, 3060–3067.
- Hill, C., O'Driscoll, B., Booth, I.: Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1995, 245–254.
- Hutkins, R. W., Nannen, N. L.: pH homeostases in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**, 1993, 2354–2365.
- Booth, I. R.: Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int. J. Food Microbiol.* **78**, 2002, 19–30.
- Fernandez, J. L., Simpson, W. J.: Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 1995, 419–425.

Recenzovaný článek / Reviewed paper
Do redakce došlo / Manuscript received: 15. 6. 2010
Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 8. 2010