Some stresses acting on yeast cells in present-day beer brewing

Některé stresy působící na kvasnice během moderního pivovarského procesu

K. Sigler[a], D. Matoulková[b]

[a] Mikrobiologický ústav AVČR, Praha 4,

[b] Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha 2

Motto:

„To optimize operating costs, while reducing processing times, in order to gain a competitive advantage and maximize revenue, is imperative to brewery survival.“

„Zásadní pro přežití pivovaru je optimalizace výrobních nákladů a zkrácení času výroby, které zaručuje získání konkurenční výhody a dosažení maximálního zisku.“

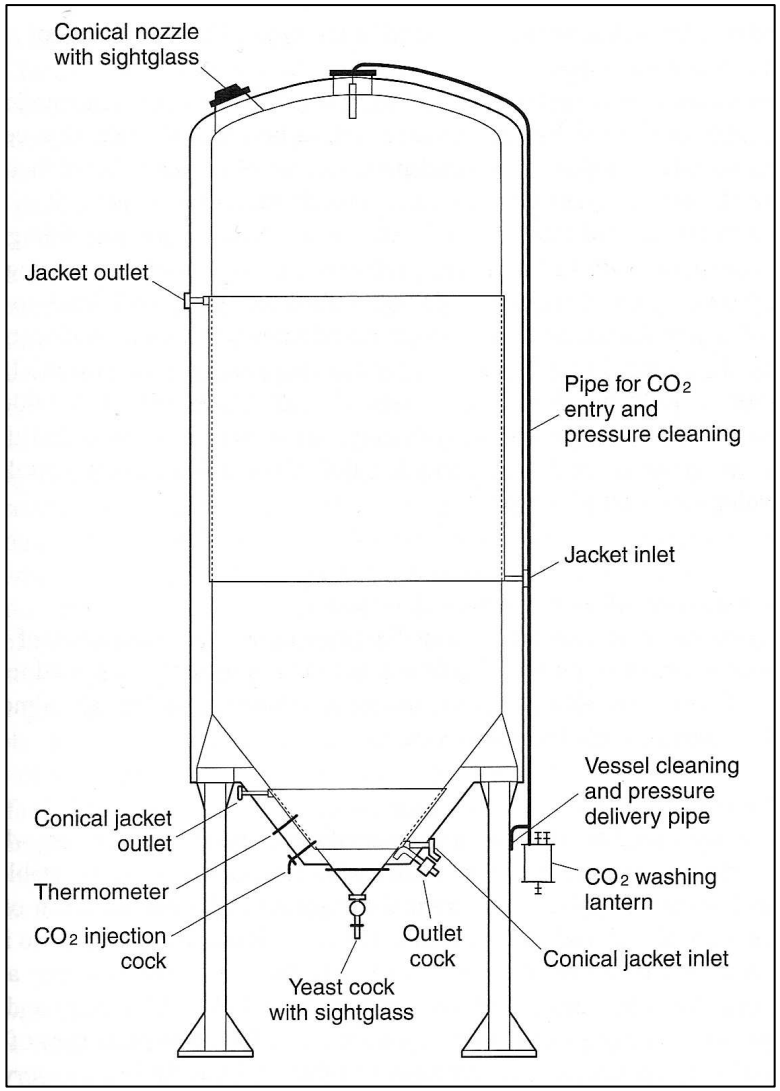
(Chlup et al., J. Inst. Brew. 114, 45-61, 2008)

Tradiční pivovarský proces

- **Tradičně probíhá kvašení mladiny v otevřených kvasných kádích (kapacita 20 – 500 hl, výška do 200 cm)**
- **„Kvasné deky“ jsou odstraňovány – spolu s nežádoucími látkami**
- **CO_2 může volně unikat během kvašení**
- **Kvašení spodními kvasnicemi (9 – 12 ^{o}C) trvá 6 – 10 dní**
- **Následné zrání piva trvá týdny (21 – 70 dní)**

- **Nejlepší část kvasnic sedimentujících na dně je použita pro další nasazení (až 10-krát)**

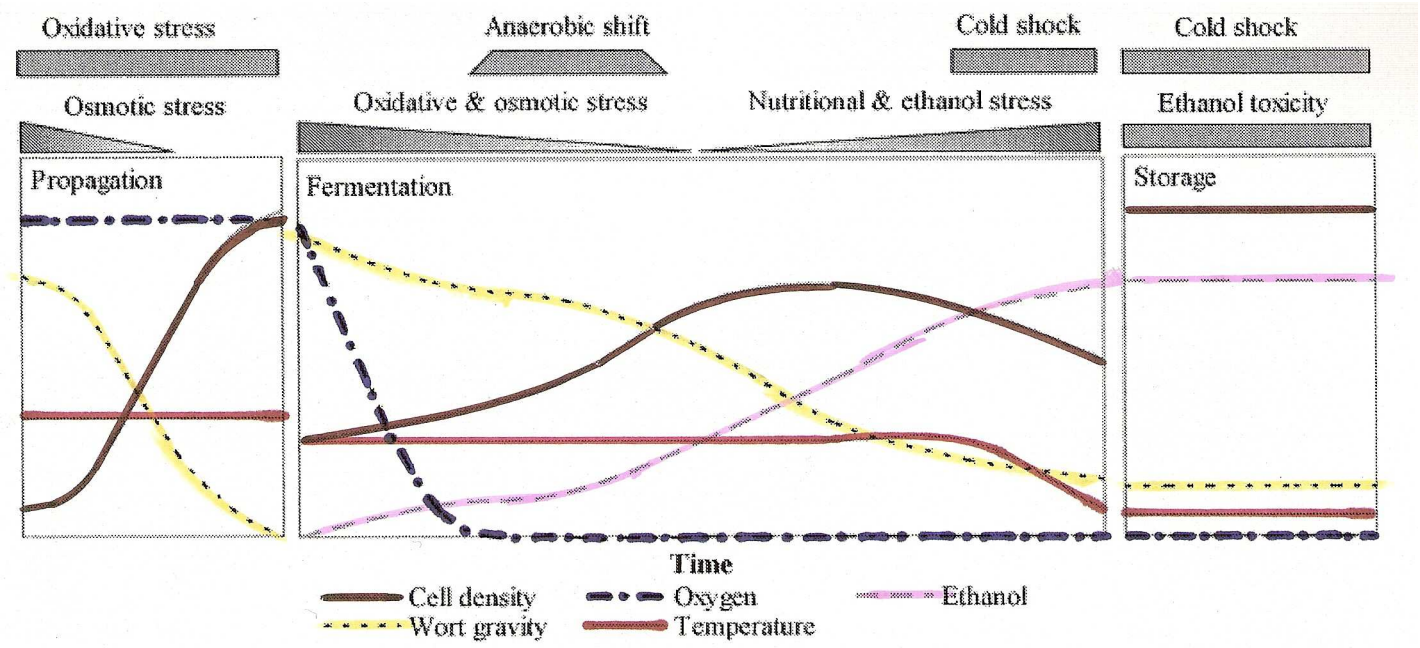
Kvašení v cylindro-konických tancích (CKT)



- **Dnes - velké (až 5000 hl, výška až 18 m) uzavřené tanky plněné několika várkami mladiny**
- **Teplotní profil se mění s výškou tanku**
- **Přetlak CO_2**
- **Kvasné deky nejsou odstraňovány**
- **Celková doba kvašení včetně zrání piva – 15 – 30 dní**
- **Kvasnice jsou vystaveny silnému hydrostatickému tlaku**
- **Odstřel – dobré a méně dobré frakce kvasnic jsou promíchány**
- **Opakované nasazování – pouze 2-3-krát**

Některé stresy působící na kvasnice během pivovarského procesu

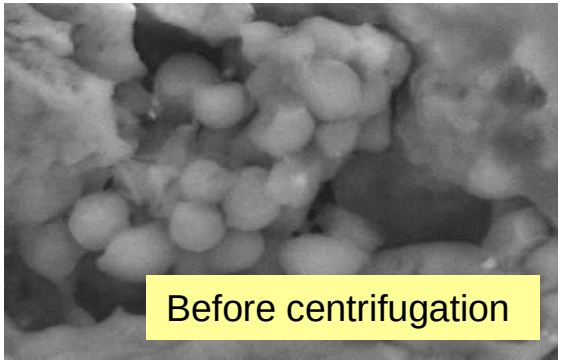
- **Propagace, kvašení mladiny a následující procesy <u>zahrnují mnoho druhů stresu</u>**
- **- oxidativní**
  - osmotický
  - aerobní/anaerobní přechod
  - tlakový stres
  - chladový šok
  - chemický stres (ethanol)
  - nutriční stres
  - pH stres

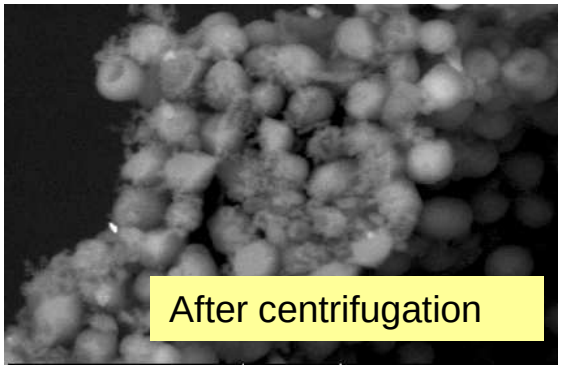


Stres způsobený hydrostatickým tlakem (CKT)

- **Silný hydrostatický tlak má podobné účinky jako přetlak plynu** (*1*).
- **Poškození kvasnic hydrostatickým tlakem ≈ poškození vysokou teplotou a oxidativním stresem** (*2*)
- **Barotolerance je nízká v exponenciální a vysoká ve stacionární fázi růstu kvasinek**

Hydrodynamický stres – centrifugace





Používá se pro *(3):*

- **Sklizeň neflokulujících kvasnic**
- **Odstranění kvasnic z mladého piva před dokvašováním**
- **Získání piva ze sklizených kvasnic**

Centrifugované kvasnice mohou vykazovat:

- **Pokles viability a vnitrobuněčného pH**
- **Uvolňování mananu z buněčné stěny → zákal piva**
- **Ztráty buněčného glykogenu a trehalosy**

Přetlak CO_2

- CO_2 volně prochází membránami a ovlivňuje membránový potenciál tím, že mění elektrický odpor membrány.
- Přetlak CO_2 inhibuje metabolismus a snižuje viabilitu buněk
- S volnými aminoskupinami proteinů tvoří CO_2 karbamáty :

$$\begin{array}{ccc} R\text{-}C\text{-}COOH & + CO_2 \Leftrightarrow & R\text{-}C\text{-}COOH \\ | & & | \\ NH_2 & & H\ N\text{-}COOH \end{array}$$

- Při neutrálním pH jsou karbamáty anionty: $RNHCOO^-$. Kladný náboj na bílkovině se mění na záporný → to ovlivňuje strukturu bílkoviny a její funkci.
- Některé enzymy jsou inhibovány HCO_3^-/CO_2:

  malát dehydrogenasy; isocitrát dehydrogenasa; G-6-P dehydrogenasa; aminopeptidasa; G-6-P fosfohydrolasa; glutamát dehydrogenasa; laktát dehydrogenasa; nitrogenasa; polyfenol oxidasa; pyruvát kinasa
- Některé enzymy jsou aktivovány HCO_3^-/CO_2:

  membránové ATPasy; ATP:citrát lyasa; cytochrom c oxidasa; G-6-P dehydrogenasa (NADP); glutaminasa; sukcinát dehydrogenasa

Nutriční/chemický stres – surogáty, kaly, mykotoxiny, EtOH

Surogáty – zdroje C, které nepocházejí ze sladu. Použití – adjustace barvy a chuti piva, zlepšení pěnivosti.

- **Kapalné surogáty – glukosový sirup, škrobový hydrolyzát, směsi cukr/dextrin, extrakty z ječmene, pšenice, karamely.**
- **Pevné surogáty - ječmen, pšenice, kukuřice, rýže, triticale. Sušené vločky, drcené zrno, mouka, krupice.**
- **Ovlivňují výživu kvasnic a tím tvorbu EtOH, chuťové látky**

- **Kaly stimulují aktivitu kvasnic a fermentaci**
- **ALE tannoidy z kalů adsorbované na povrch buněk snižují vitalitu (*5*).**
- **Ethanol – vyšší koncentrace jsou toxické**
- **Mykotoxiny (deoxynivalenol, zearalenon, fumonisinsy – dostávají se do piva z ječmene a mohou ovlivňovat kvasnice.**

pH stresy – kyselé praní, pokles pH během fermentace

Odstranění bakteriální kontaminace mezi nasazeními:

- **Kyselé praní - zředěná kyselina (fosforečná, citronová, vinná, sírová, na pH 2.0) s kontinuálním mícháním, pak stání až 2 h.**
- **Praní v kyselině/ persulfátu amonném: persulfát amonný (0.75% v/v) se přidá ke kvasničné pastě, okyselení kys. fosforečnou na pH 2.8, 1 h kontakt.**
- **Kombinace vysoké koncentrace EtOH obvyklé u HGB a kyselého praní - pokles viability a vitality. ATP uniká z buněk (zvláště při použití kys. fosforečné).**

Velikost poklesu pH během kvašení – silný vliv na hladiny chuťových látek v pivu (dimethylsulfid, diacetyl).

Oxidativní stres – vzdušnění během kvašení

VZDUŠNĚNÍ:

- **Zajišťuje syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin.**
- **O_2 je přítomen pouze na začátku kvašení – má negativní vliv na kvalitu piva.**
- **Obsah O_2 v mladině závisí na její hustotě (10° – 8.5 ppm, 17° – 7.9 ppm).**
- **Požadavek na kyslík (4 – 40 ppm) je silně závislý na použitém kmeni kvasnic**
- **Příliš mnoho kyslíku – nadměrný růst buněk, nízká produkce EtOH.**
- **Příliš málo kyslíku – nízké výtěžky EtOH, pomalý růst a fermentace (*7*).**

OXIDATIVNÍ STRES a ODPOVĚĎ NA NĚJ:

- **Pivovarské kvasnice → rychlá odpověď na oxidativní stres (*8*) – geny kódující antioxidanty jsou většinou exprimovány během první hodiny fermentace**
- **Oxidativní stres může způsobit rychlé stárnutí u opakovaně nasazovaných kvasnic**
- **Citlivost na oxidativní stres určuje replikativní dobu života kvasnic a vitalitu při opakovaném nasazování (*9*).**

Osmotický stres při HGB

Fermentace vysoce koncentrovaných mladin - high-gravity brewing (HGB) nebo **very high gravity (VHG) fermentation.**

Kvasnice jsou vystaveny kombinaci (*10*):

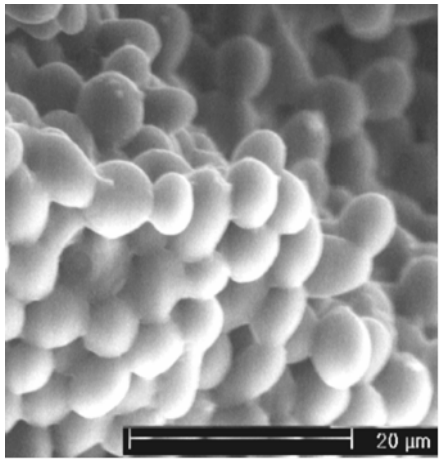
- **Vysokého osmotického tlaku.**
- **Zvýšené koncentraci sacharidů → změny rheologických vlastností mladiny → nižší rozpustnost a koncentrace kyslíku.**
- **Vysoké koncentrace toxických produktů fermentace (ethanol)**
- **Nutriční limitace (dusíkaté zdroje).**

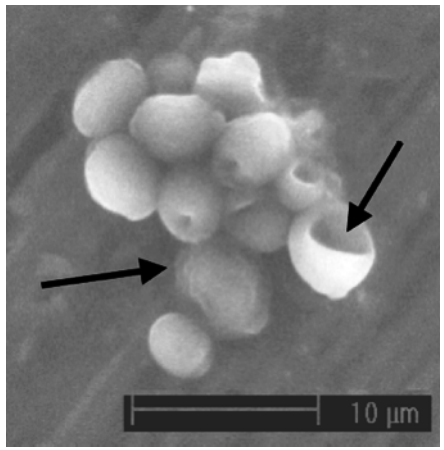
To může způsobit:

- **Změněné organoleptické vlastnosti piva**
- **Pokles viability kvasnic**
- **Tvorbu „neviditelného zákalu“ způsobeného glykogenem**
- **Všechny tyto problémy se zhoršují při opakovaném nasazení.**

Osmotický stres a kvasinky (laboratorní studie)

- **Vnitrobuněčná osmolarita kvasinek za plného turgoru je 540-570 mOsm/l *(u lidí je to 308 mOsm/l)* (*11, 12*).**
- **Osmotický tlak konvenční 12º mladiny ~ 800 mOsm/l. Počínající plasmolýza kvasinek nastává při ~ 1200 mOsm/l (*13*).**
- **HGB neboVHGB – osmolarita mladiny je 1500-1800 mOsm/l - hyperosmotický stres.**
- **Ovlivňuje buněčné struktury (vakuolu, plasmatickou membránu, buněčnou stěnu) – studie většinou prováděny s nefermentujícími buňkami.**





- **Oproti rostlinným buňkám je buněčná stěna kvasinek částečně pružná, vlivem osmotického tlaku se vchlipuje (*14*).**

Vliv samotné vysoké osmolarity mladiny na kvasnice a fermentaci

METODIKA:

Fermentace se spodním kmenem 95 (12 °C, 1-l otevřené kvasné válce)

- **12° standardní mladina VÚPS – osmolarita nastavena na 16° a 20° sorbitolem.**
- **Fermentace ukončena, když koncentrace EtOH dosáhla 4 % .**
- **Konstantní podmínky (hladina živin, stejná hladina EtOH)**
- **3 nasazení - varianty: 12/12/12 (kontrola), 16/16/12, 20/20/12 (3. fermentace při 12° - reversibilita vlivů vysoké osmolarity §).**

Parametry:

- **Doba fermentace**
- **Proliferace kvasnic (počet buněk ve vznosu)**
- **Vitalita a sedimentace kvasnic**
- **Chuťové látky v pivu**
- **Zákal piva**

Čisté vlivy kvašení v 16° a 20° mladině na kvasnice

- **Doba fermentace se prodlužuje o 15-90 % v závislosti na generaci kvasnic**
- **Proliferace buněk klesá (nižší počet buněk ve vznosu) §**
- **Sedimentace je zpomalena, ale v konci fermentace je vyšší §**
- **Vitalita je snížena až o 10 % §**
- **Hladiny diacetylu a pentandionu v pivu stoupají, dimethylsulfid a acetaldehyd klesají**
- **Estery a vyšší alkoholy - malé fluktuace nezávislé na osmolaritě a generaci**
- **Zákal mladého piva není významně ovlivněn**
- **Vyčeření piva během zrání je zrychleno.**
- **Chladový zákal u všech variant vzrůstá s opakovaným nasazením**

Thank you – and bottoms up!
Děkuji za pozornost – a na zdraví!

The work was supported by Research Center 1M0570 and Institutional Research Concepts AV0Z50200510 and MŠMT 6019369701

References

1 Reid G.C., A review of CO_2 toxicity in brewer's yeast. *Proc. 2nd Conv. Inst. Brew*., 1989, 212-239.

2 Iwahashi H., Fujii S., Obuchi K., Kaul S.C., Sato A., Komatsu A., Hydrostatic pressure is like temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. *FEMS Microbiol. Lett*., 1993, **108**, 53-58.

3 Chlup P.H., Bernard D., Stewart G.G., Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology. *J. Inst. Brew*. 2008, **114(1)**, 45-61.

4 Schisler D.O., Ruocco J.J., Mabee M.S., Wort trub content and its effect on fermentation and beeer flavor. *J. Am. Soc. Brew. Chem.,* 1982, **40(2**), 57-61.

5 Mathieu Ch., van der Berg, Iserentant D., Prediction of yeast fermentation performance using the acidification power test. *Proc. Eur. Brew. Conv*. 1991, **23**, 273-278.

6 Maemura H., Morimura S., Kida K., Effects of aeration during the cultivation of pitching yeast on its characteristics during the subsequent fermentation of wort. *J. Inst. Brew*. 1998, **104**, 207-211.

7 Jones R.P., Pamment I., Greenfield P.F., Alcohol fermentation by yeast – the effect of environmental and other variables. *Process Biochem*. **1981**, 16(3), 42-49.

8 Clarkson S.P., Large P.J., Boulton C.A., Bamforth C.W., Synthesis of superoxide dismutase, catalase and other enzymes and oxygen and superoxide toxicity during changes in oxygen concentration in cultures of brewing yeast., *Yeast* 1991, **7**, 91-103.

9 Gibson B.R., Lawrence S.J., Leclaire J.P.R., Powell C.D., Smart K.A., Yeast responses to stresses associated with industrial brewery. *FEMS Microbiol. Rev*. 2007, **31**, 535-569.

10 Jones H.L., Margaritis A., Stewart R.J., The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew*., 2007, **113(2)**, 168-184.

11 Conway E.J., Armstrong W. McD., The total intracellular concentration of solutes in yeast and other plant cells and the distensibility of the plant-cell wall. *Biochem. J.,* 1961, **81**, 631-639.

12 Levin R.L., Water permeability of yeast cells at sub-zero temperatures, *J. Membr. Biol*., 1979, **46**, 91-124.

13 Arnold W.N. and Lacy J.S., Permeability of the cell envelope and osmotic behavior in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact*., 1977, **131(2)**, 564-571.

14 Pratt P.L., Bryce J.H., Stewart G.G., The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew*. 2003, **109(3)**, 218-228.