

Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo

Mgr. Dagmar Matoulková, Mikrobiologie VÚPS
Ing. Karel Sigler, DrSc., Mikrobiologický ústav AVČR

23. pivovarsko-sladařské dny, České Budějovice,
14.-16.10.2009

Obsah prezentace

- 1) Antimikrobiální účinky hořkých chmelových kyselin
- 2) *Lactobacillus brevis* - mechanismus rezistence k hořkým chmelovým látkám
- 3) Růst *L.brevis* v přítomnosti chmelových kyselin
- 4) Genetický základ rezistence *L.brevis* k hořkým chmelovým kyselinám
- 5) Závěr



Vaughan et al., 2005

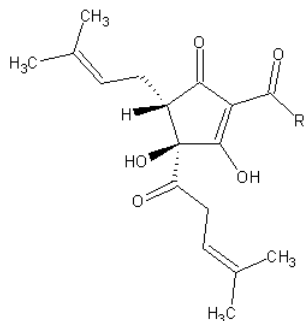
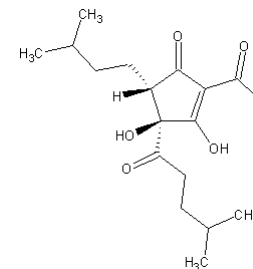
Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo



Antibakteriální účinky hořkých chmelových kyselin



- bakteriostatické nebo baktericidní účinky závislosti na koncentraci a době expozice
- citlivost grampozitivních bakterií (bakterie mléčného kvašení, *Bacillus*, *Staphylococcus*, aj.)
- mechanismus účinku není dosud spolehlivě objasněn
- snížení intracelulárního pH, pokles obsahu buněčných kationtů (Mn^{2+} , Mg^{2+}), narušení membránových transportních procesů - přerušení příjmu živin, hladovění buňky, odumření



Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo



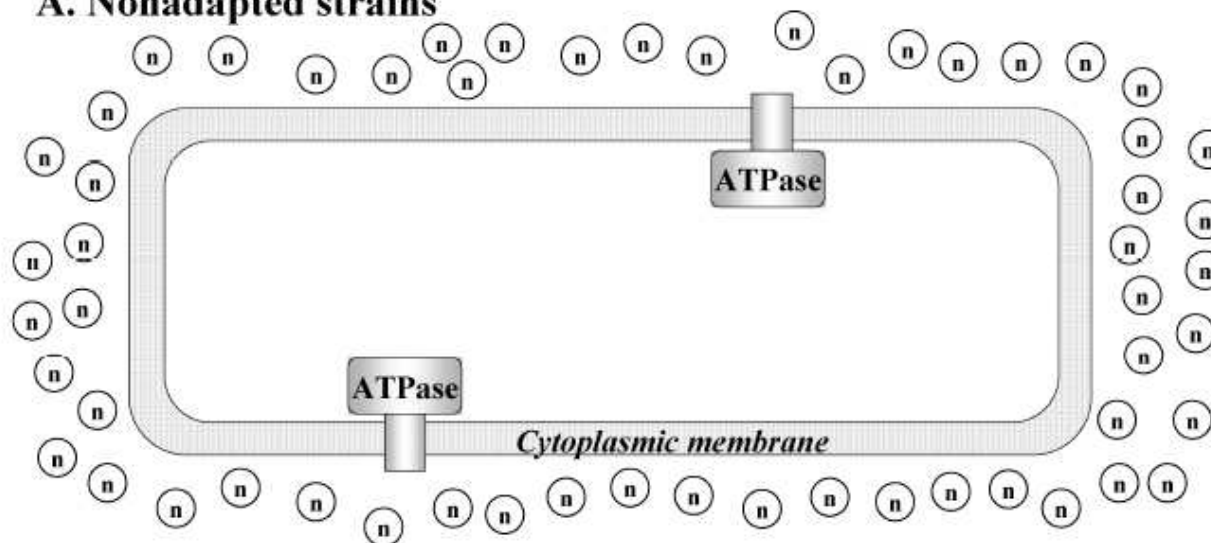
L. brevis – mechanismus rezistence k hořkým chmelovým látkám

- 1) Membránová H^+ ATPáza
- 2) Membránové MDR-pumpy horA a horC
- 3) Membránový protein hitA
- 4) Zvýšená pufrační kapacita cytoplazmy
- 5) Pozměněná struktura buněčné stěny a plazmatické membrány
- 6) Schopnost rezistentních kmenů využít „neobvyklé“ zdroje uhlíku a energie

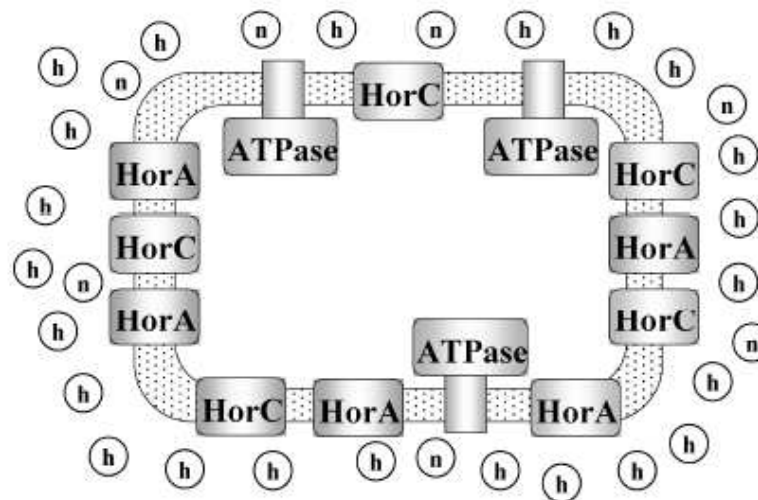
Horizontální
transfer genů



A. Nonadapted strains



B. Beer-adapted strains



Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo

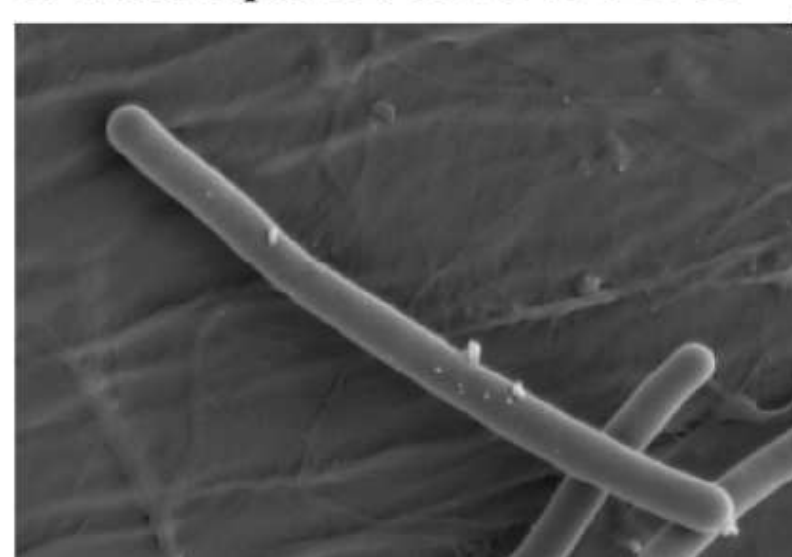


L. brevis – mechanismus rezistence k hořkým chmelovým látkám

A. Beer-adapted *L. brevis* ABBC45

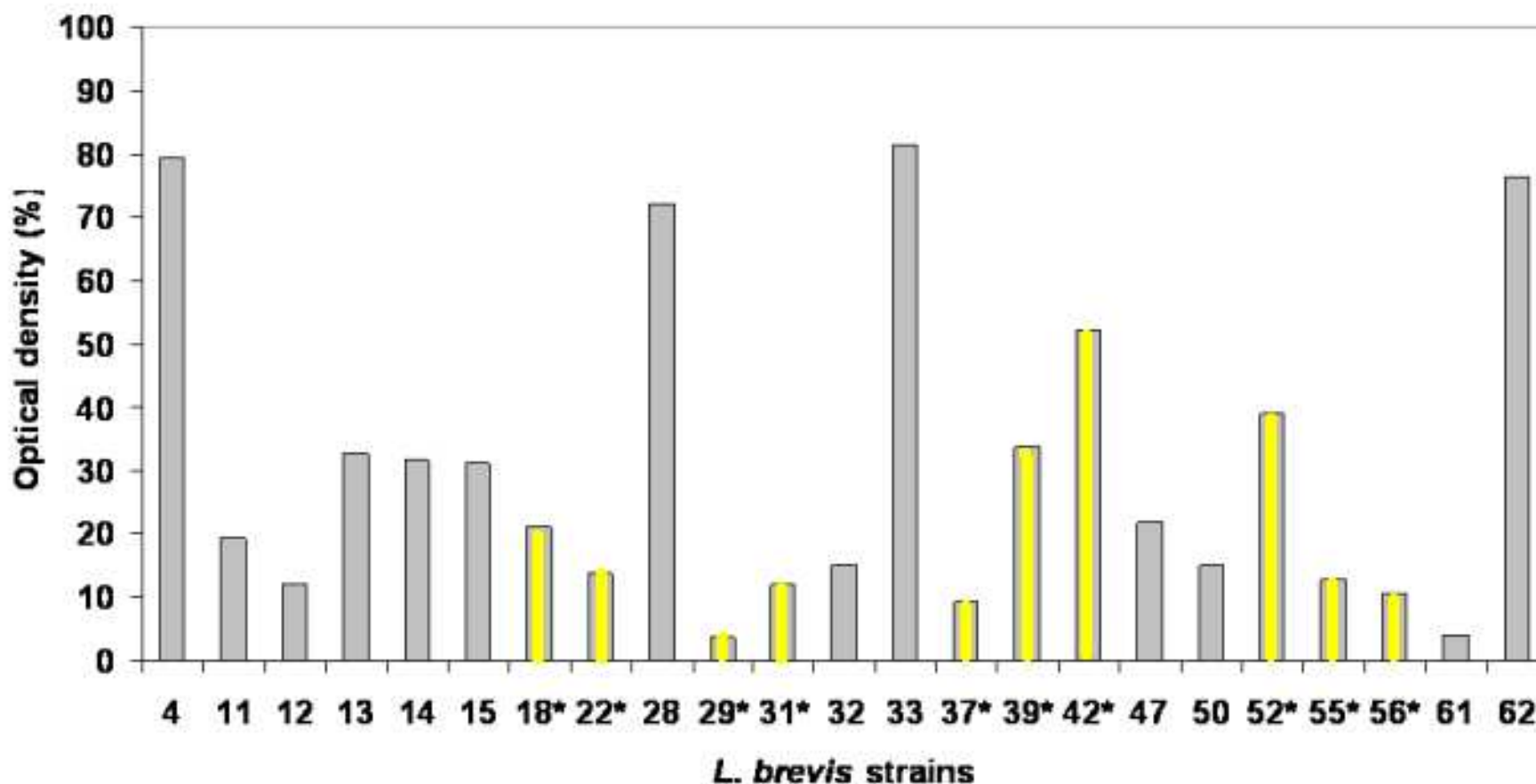


B. Nonadapted *L. brevis* ABBC45



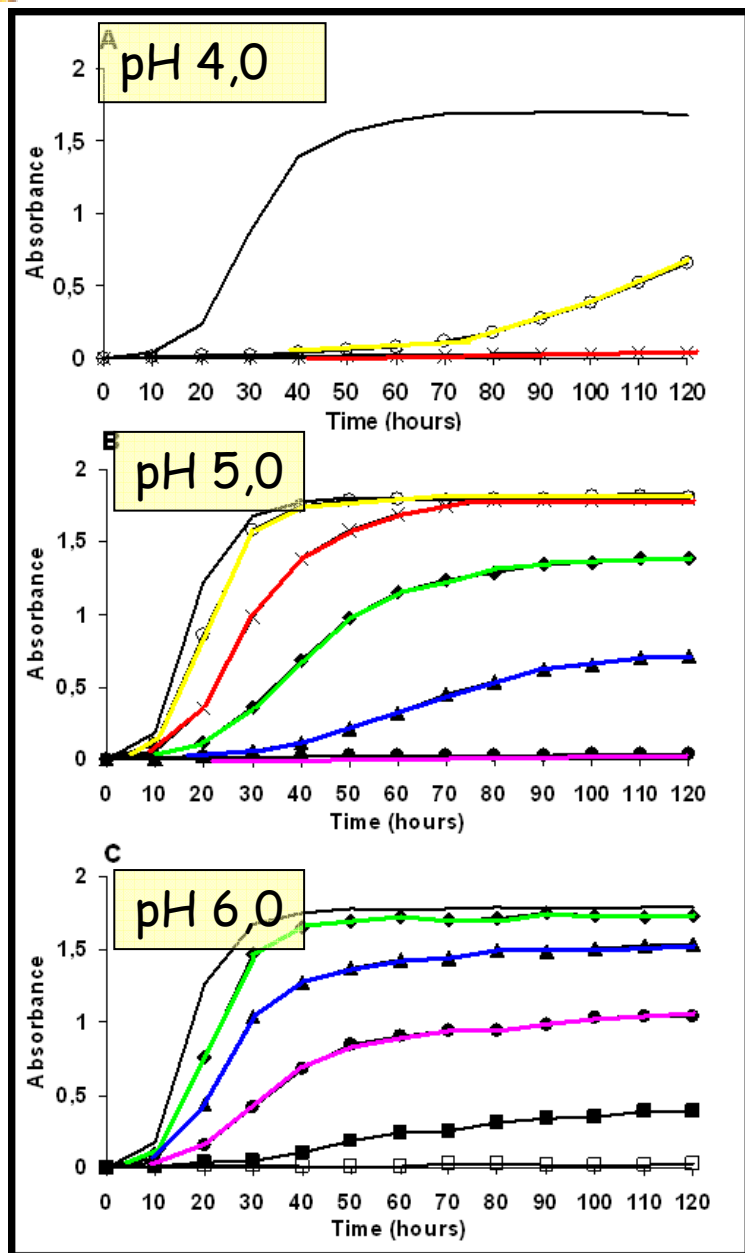
Suzuki et al., 2008

Růst *L. brevis* v přítomnosti hořkých kyselin



Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo





I. Schopnost *L. brevis* růst a množit se v přítomnosti různých koncentrací chmelových kyselin je ovlivněna počátečním pH kultivačního média.

II. Výrazné prodloužení lag-fáze vypovídá o možné selekci rezistentní populace buněk.

III. „Vyselektované“ rezistentní buňky nikdy nedosáhnou optické denzity kontroly.

IV. Tento trend je možné pozorovat u různých kmenů, bez korelace se schopností kazit pivo.

Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo



Genetický základ rezistence *L.brevis* k hořkým chmelovým kyselinám

- identifikace *L.brevis* (druhově specifické primery, API 50CH)
- PCR - detekce genů *horA*, *horC* a *hitA* v genomu kmenů *L.brevis*
- růst vybraných kmenů *L.brevis* v pivo - schopnost zkazit pivo (tvorba zákalu, přítomnost životaschopných bakterií)
- kmeny citlivé/rezistentní k hořkým chmelovým kyselinám



<i>L. brevis</i> RIBM	horA	horC	hitA	schopnost kazit pivo
2 - 4	-	+	+	-
2 - 16	+	+	+	-/+ *
2 - 20	+	+	+	+
2 - 33	-	-	-	-
2 - 62	-	-	-	+
2 - 67	+	+	+	+
2 - 68	+	+	+	+
2 - 69	+	+	+	+
2 - 78	+	-	+	-

V. Přítomnost genů
horA, *horC* a *hit A*
ne vždy koreluje se
schopností *L. brevis*
kazit pivo

Závěr

- Ve sbírce VÚPS je deponováno **84 kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných z pivovarských provozů** a ze zkaženého piva, dalších 18 je ve fázi identifikace a zařazení do sbírky
- Kmeny jsou primárně využívány pro řešení **Výzkumného záměru MSM6019369701** („Výzkum genetického základu škodlivosti grampozitivní bakteriální kontaminace v pivovarském průmyslu“) a **Výzkumného centra 1M0570** - (Stanovení vlivu chmelových látek na membránovou energetiku a celkový fyziologický stav mikroorganismů vyskytujících se v pivovarském provozu)



Použitá literatura

- 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 (2007a).
- 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, 63-70 (2008).
- 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 (2007).
- Suzuki K., Asano S., Iijima K., Kitamoto K.: Sake and beer spoilage lactic acid bacteria - a review. *J. Inst. Brew* 114, 209-223 (2008).
- Vaughan A., O'Sullivan T., van Sinderen D.: Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *J. Inst. Brew.* 111, 355-371 (2005).



Děkuji za pozornost

Zpracováno za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy
(Výzkumný záměr MSM6019369701, Výzkumné centrum 1M0570)

Genetický základ schopnosti *Lactobacillus brevis* kazit pivo

