

Pivovarské kvasinky a reakce na stres

Stress Responses in Brewing Yeast

KAREL SIGLER¹, DAGMAR MATOULKOVÁ²

¹ Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 / *Institute of Microbiology, Acad. Sci CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

e-mail sigler@biomed.cas.cz

² 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 Republic*

e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Sigler, K. – Matoulková, D.: Pivovarské kvasinky a reakce na stres. Kvasny Prum. 57, 2011, č. 7–8, s. 277–284.

Tento stručný přehled popisuje odpovědi kvasinek na různé typy stresů, kterým mohou být vystaveny. Stresy a reakce kvasinek jsou zde charakterizovány z pohledu genetických znaků, biochemických pochodů, vypínání a zapínání signálních drah během stresových odpovědí, a výsledných změn buněčné fyziologie a/nebo struktury. Článek obsahuje stručný výčet různých druhů stresů, jak environmentálních, tak stresů způsobených současnou pivovarskou technologií. Hlavní pozornost je věnována pivovarským kvasinkám, rozdílům mezi nimi a mnohem více studovanými laboratorními kmeny a vlivu těchto odlišností na způsoby, jakými pivovarské kvasinky zahajují a uskutečňují odpovědi na stresové podmínky.

Sigler, K. – Matoulková, D.: Stress responses in brewing yeast. Kvasny Prum. 57, 2011, No. 7–8, p. 277–284.

Even in nature, yeast cells are exposed to a combination of stressful conditions. When used for industrial production, as in brewery, they are subject to additional manmade stresses [1], and/or the natural environmental stresses are intensified. During the brewing process yeast cells are challenged, e.g., by variations in temperature, oxygen concentration and pH, hypo- and hyperosmotic stress, hydrostatic and chemical stress (ethanol, malt and hop phenolics, malt antimicrobial compounds, adjunct components, CO₂ overpressure, etc.), and changing levels of nutrients. Other stresses, include, e.g., acid washing to remove bacteria before repitching, or centrifugation causing hydrodynamic stress. To lower operating costs, reduce processing times and maximize revenue [2] breweries adopt and evolve continuously new systems that potentially amplify and/or extend the existing stresses. Here we tried to summarize briefly the main features of both environmental and brewing stresses, characterize the types of stress responses of yeast cells, and point out the specificities of brewing yeast strains and the conditions of their use for beer production, and the way in which they reflect in the stress responses of brewing yeast.

Sigler, K. – Matoulková, D.: Die Brauhefe und ihre Reaktion auf Stress. Kvasny Prum. 57, 2011, Nr. 7–8, S. 277–284.

Diese Kurzübersicht beschreibt Hefereaktionen auf die verschiedene Stresstypen, mit denen ausgesetzt werden können. Aus der Sicht der genetischen Charakter, biochemischen Prozesse, Aus- und Einschaltung der Signalbahnen während Stressreaktionen und aus den resultierenden Änderungen der Zellphysiologie und/oder Struktur werden die Hefestresse und Hefereaktionen charakterisiert. Dieser Artikel enthält eine kurze Liste von verschiedenen Stressen, die durch die Umwelt oder durch die zeitgenössische Brautechnologie verursacht sind. Die Hauptaufmerksamkeit wird den Brauhefen, den Unterschieden unter denen, den wesentlich mehr studierenden Laborstämmen und dem Einfluss der Unterschiede auf Verfahren, mit dem die Brauhefe die Antworten auf die Stressbedingungen beginnt und realisiert, gewidmet.

Klíčová slova: laboratorní kvasinky, pivovarské kvasinky, stresy, odpovědi na stres

Keywords: laboratory yeast, brewing yeast, stresses, stress responses

1 ÚVOD

V podmínkách přirozeného prostředí jsou buňky kvasinek vystaveny různým stresům a jejich různým kombinacím. Při použití v průmyslové výrobě, jako je např. pivovarství, je spektrum stresových faktorů rozšířeno o technologické stresy [1] nebo dochází k zesílení přirozených stresových faktorů. Během pivovarského procesu působí na kvasinky změny teploty, koncentrace kyslíku, změny pH, hypo- a hyperosmotický stres, hydrostatický a chemický stres (alkohol, sladové a chmelové fenolické látky, antimikrobiální látky sladu, surogáty, přetlak CO₂ atd.) a změny v obsahu živin. Mezi další stresy patří např. kyselé mytí (pro odstranění bakteriální kontaminace) nebo hydrodynamický stres (způsobený odstředováním kvasnic). Neustálý vývoj nových systémů, které snižují provozní náklady a výrobní dobu a maximalizují výnosy [2], může vést k rozšíření spektra existujících stresových faktorů a zvýšení jejich intenzity. Následující text obsahuje stručný souhrn hlavních rysů environmentálních a technologických stresů a odpovědí kvasinek na tyto stresy. Pozornost je věnována zejména specifickým vlastnostem pivovarských kvasinek, podmínkám jejich použití při výrobě piva a způsobům, jakým tyto specifické vlastnosti pivovarských kvasinek ovlivňují jejich reakci na stres.

1 INTRODUCTION

Even in nature, yeast cells are exposed to a combination of stressful conditions. When used for industrial production, as in brewery, they are subject to additional manmade stresses [1], and/or the natural environmental stresses are intensified. During the brewing process yeast cells are challenged, e.g., by variations in temperature, oxygen concentration and pH, hypo- and hyperosmotic stress, hydrostatic and chemical stress (ethanol, malt and hop phenolics, malt antimicrobial compounds, adjunct components, CO₂ overpressure, etc.), and changing levels of nutrients. Other stresses, include, e.g., acid washing to remove bacteria before repitching, or centrifugation causing hydrodynamic stress. To lower operating costs, reduce processing times and maximize revenue [2] breweries adopt and evolve continuously new systems that potentially amplify and/or extend the existing stresses. Here we tried to summarize briefly the main features of both environmental and brewing stresses, characterize the types of stress responses of yeast cells, and point out the specificities of brewing yeast strains and the conditions of their use for beer production, and the way in which they reflect in the stress responses of brewing yeast.

2 OBECNÉ ODPOVĚDI KVASINEK NA STRES

Při vystavení různým stresům spouští kvasinky obecnou stresovou odpověď nebo odpověď na environmentální stres [3] – genetické přeprogramování, které vede k dočasnému zastavení normálních buněčných procesů a k iniciaci exprese genů kódujících stresové proteiny (molekulární chaperony, transkripční faktory, membránové přenašeče a proteiny účastnící se opravy, degradace, detoxikace a metabolismu živin). Toto buněčné přeprogramování zahrnuje odstranění bílkovin nutných pro zajištění normálního růstu a bílkovin poškozených vlivem stresu, a syntézu proteinů indukovaných stresem. Intenzivní proteolýza je nutná pro zásobení buňky aminokyselinami pro syntézu nových proteinů na úkor již nepotřebných vegetativních proteinů [4]. Hlavním typem stresové odpovědi je nespecifická (celková) stresová odpověď na podmínky prostředí, aktivovaná oxidativním, pH, teplotním a osmotickým stresem a nedostatkem dusíku [5].

Stresové podmínky aktivují transkripční kontrolní elementy, mezi něž patří elementy teplotního šoku (Heat shock elements, HSEs), elementy stresových odpovědí (stress response elements, STRES) a AP-1 responzivní elementy (AP-1 responsive elements, AREs). Na elementy HSEs se váže transkripční faktor teplotního šoku, který vyvolá akumulaci abnormálních proteinů. Elementy STRES se podílejí na transkripční aktivaci vyvolané celou řadou stresových podmínek, zatímco elementy AREs se vážou na transkripční faktor Yap1p. Funkce těchto tří typů kontrolních elementů se překrývají – značná část každé z odpovědí není specifická pro určitý podnět, ale představuje obecnou odpověď na všechny stresové podmínky. Některé stresové proteiny kódované geny s HSE-regulací jsou nezbytné pro růst kvasinek v podmínkách mírného stresu. Produkty genů aktivovaných elementy STRES jsou zřejmě důležité pro přežití těžkých stresových podmínek a geny pod kontrolou ARE jsou funkční během oxidativního stresu a při reakci buněk na toxické prostředí, např. na přítomnost iontů těžkých kovů [6]. Zahájení odpovědi (za účasti přibližně 900 genů) je často krátkodobé a exprese genů, které se jí účastní, stejně jako množství transkriptů, se většinou vrátí na původní úroveň (tj. před působením stresu). V odpovědi na stres se buněčný aktinový cytoskeleton rychle depolarizuje a rovnoměrně rozprostře uvnitř buňky. Po adaptaci na nové podmínky prostředí proběhne repolarizace cytoskeletonu navozující lokální růst, a následně buněčné dělení [3].

3 ODPOVĚĎ NA TEPLOTNÍ ŠOK

Odpověď na teplotní šok zahrnuje syntézu proteinů teplotního šoku (Hsp) jako je Hsp104, Hsp70, Hsp60 a Hsp26. Hsp104 se účastní resolubilizace a reaktivace agregovaných proteinů. Hsp-proteiny indukované určitým stresem činí buňky tolerantními k ostatním stresům. Část Hsp-proteinů je indukována při přechodu buněk do stacionární fáze; některé Hsp-proteiny jsou exprimovány konstitutivně v kvasinkách, které využívají např. ethanol jako zdroj uhlíku při respirativním metabolismu. Stresové odpovědi se účastní trehalosa, která slouží jako rezervní materiál zejména vegetativně rostoucích kvasinek a zároveň jako stresový metabolit. Akumulace trehalosy v buňkách zabraňuje tepelné denaturaci buněčných bílkovin [7]. Nahromadění trehalosy způsobí zvýšení vnitrobuněčné osmolarity, a tím aktivaci protein-kinázové dráhy PKC1, která se podílí na zachování buněčné integrity (viz dále) [8]. Syntézu trehalosy vyvolávají různé stresy (teplo, aerace, koncentrace živin a metabolitů aj.). Rychlý metabolický obrát trehalosy tvoří část buněčné ochrany proti oxidativnímu stresu. Syntézu trehalosy indukuje také ethanol. Trehalosa se podílí na snižování propustnosti membrány a zvyšuje toleranci buněk k ethanolu. Odpověď buněk na teplotní šok může vést až k zastavení růstu buněk a v krajních případech k odumření buněk.

4 REAKCE NA OSMOTICKÝ STRES

Odpověď buněk na zvýšenou osmolaritu probíhá přes kinasovou kaskádu nazývanou HOG-MAP (high osmolarity glycerol / mitogen-activated protein; protein aktivovaný glycerolem / mitogenem při vysoké osmolaritě; pozn. mitogen je látka navozující buněčné dělení). Tato hlavní dráha regulující adaptace buněk zahrnuje produkci osmolytu glycerolu, a je uváděna v činnost spíše změnou turgoru nežli vodním stresem jako takovým [9]. Akutní odpověď zřejmě závisí také na normální funkci vakuol (smršťování a normalizace objemu), která také přispívá k rezistenci postdiauxických nebo stacionárně rostoucích buněk proti osmotickému stresu [10]. Během hypoosmotického přechodu buňky stimulují různé MAP-kinasové kaskády, buněčné

2 GENERAL STRESS RESPONSES IN YEAST

On exposure to various stresses yeast cells launch a general or environmental stress response [3], genetic reprogramming that leads to a transient arrest of normal cellular processes and initiation of expression of genes encoding stress proteins (molecular chaperones, transcription factors, membrane transporters and proteins involved in repair, degradation, detoxification and nutrient metabolism). This cellular reprogramming involves the elimination of proteins necessary for normal growth and stress-damaged proteins, and synthesis of stress-related proteins. Intensive proteolysis is needed to supply the cell with all amino acids for the synthesis of new proteins at the expense of no-longer-needed vegetative proteins [4]. The major type of stress response is the nonspecific general (global, environmental) stress response activated by oxidative, pH, heat and osmotic stresses and nitrogen starvation [5].

Stress conditions activate transcriptional control elements including heat shock elements (HSEs), stress response elements (STRES) and AP-1 responsive elements (AREs). HSEs bind heat shock transcription factor that causes the accumulation of abnormal proteins. STRES participate in transcriptional activation by a number of stress conditions while AREs bind the transcription factor Yap1p. The functions of the three types of control elements overlap – a substantial part of each of the responses is not specific to the stimulus but represents a common response to all the stress conditions. Some stress proteins encoded by HSE-regulated genes are necessary for growth of yeast under moderate stress, products of STRES-activated genes appear to be important for survival under severe stress and ARE-controlled genes may mainly function during oxidative stress and in response to toxic conditions, such as those caused by heavy metal ions [6]. The initiation of the response (which involves the participation of ~900 genes) is often transient and the expression of the genes forming parts of it, as well as transcript levels, usually return to near the pre-stress levels. In response to cellular stress, cellular actin cytoskeleton becomes rapidly depolarized and is distributed evenly within the cell. After adaptation to the new environment the cytoskeleton becomes again repolarized to promote localized growth and subsequent cell division [3].

3 HEAT SHOCK RESPONSE

The heat shock response includes the synthesis of heat shock proteins (Hsps) such as Hsp104, Hsp70, Hsp60, and Hsp26. Hsp104 functions in resolubilization and reactivation of aggregated proteins. Hsps induced by a particular stress agent render the cells cross-tolerant to other stresses. A subset of Hsps is induced as cells enter stationary phase; some Hsps are constitutively expressed in yeast grown on respiratory carbon sources such as ethanol. Another part of the response is trehalose, a reserve compound stored mainly in vegetative resting cells and a stress metabolite. Yeast proteins are protected from denaturation by high temperatures by trehalose accumulation [7] that, rather than the temperature increase as such, causes an increase in intracellular osmolarity that activates the cell integrity protein kinase C1 (PKC1) pathway (see below) [8]. Trehalose is synthesized in response to a number of stresses (temperature, aeration, nutrition, metabolite concentration and others). Rapid trehalose turnover also forms part of cellular protection against oxidative stress. Also ethanol stress induces the synthesis of trehalose, which plays a role in reducing membrane permeability and increasing ethanol tolerance. Heat stress response was observed to cause a shift from exponential growth to growth arrest and ultimately to cell death.

4 OSMOTIC STRESS RESPONSES

The response of yeast to high osmolarity proceeds via the HOG-MAP (high osmolarity glycerol mitogen-activated protein; mitogen is a substance that induces mitosis) kinase cascade pathway, the major route governing cellular adaptations, which involves the production of the osmolyte glycerol and seems to be actuated by a turgor change rather than by the water stress as such [9]; the acute response appears to depend on normal function (shrinkage and recovery) of the vacuole, which also contributes to the resistance to osmotic stress of postdiauxic/stationary phase cells [10]. Upon a hypoosmotic shift yeast cells stimulate a different MAP kinase cascade, the cell integrity pathway, which brings about a rapid export of glycerol and an adjustment of cell surface properties [11].

dráhy způsobující rychlý export glycerolu a úpravu vlastností buněčného povrchu [11].

Buňky ve stacionární fázi jsou mnohem více osmotolerantní nežli buňky v exponenciální fázi růstu. Jednou z příčin je syntéza osmoprotektivní trehalosy, jejíž produkce je zahájena v období pomalého růstu nebo hladovění buněk. Osmoticky kompatibilní látky, jako je glycerol, jsou při působení stresu syntetizovány a rychle asimilovány po jeho odstranění. Prostředí s vysokou osmolaritou může prodloužit délku života kvasinek, protože biosyntéza glycerolu zvyšuje hladinu NAD^+ a dochází tak k vyrovnávání redoxního stavu buněk a tím k prodloužení života [12].

5 ODPOVĚDI NA OSTATNÍ TYPY STRESŮ

Většina membránových pump, které zajišťují rezistenci buněk proti působení látek s toxickými účinky, tzv. PDR-pumpy (pleiotropic drug resistance; rezistence k pleiotropním látkám), se z buněk po ukončení exponenciální fáze růstu ztrácí [13]. Některé z takových pump (např. Pdr15p) jsou však silně exprimovány po ukončení exponenciální fáze a jejich exprese je indukována za stresových podmínek (teplotní šok, nízké pH, přítomnost slabých kyselin, zvýšená osmolarita) [14]. Tolerance k ethanolu je u kvasinek spojována s aktivitou superoxid-dismutasy aktivované manganem (Mn-SOD) [15].

Odpověď na chladový šok zahrnuje úpravu viskozity membrány, následovanou zvýšením aktivity antioxidantních enzymů superoxid-dismutasy aktivované mědí a zinkem (Cu,Zn-SOD) a katalasy, a zvýšenou syntézou proteinů teplotního šoku a enzymů metabolismu glykogenu a trehalosy. V buňkách se akumuluje trehalosa a poskytuje jim ochranu.

6 PIVOVARSKÉ KVASINKY A JEJICH ODPOVĚDI NA TECHNOLOGICKÉ STRESY

Při posuzování stresových odpovědí u pivovarských kvasinek je nutné brát v úvahu rozdíly mezi pivovarskými a laboratorními kmeny. Jedním z hlavních rozdílů je stupeň ploidie. Laboratorní kvasinky jsou haploidní nebo diploidní, zatímco produkční kmeny bývají polyploidní nebo aneuploidní. Vyšší stupeň ploidie je pro kvasinky výhodou, neboť další kopie důležitých genů mohou zajistit zlepšení průběhu kvašení. Polyploidní kvasinky jsou také mnohem více stabilní než haploidní, neboť k jejich změně je nutný vyšší počet mutací [16]. Průmyslové kvasinky se od laboratorních odlišují také růstovými podmínkami. Zdroje uhlíku obsažené v mladině jsou mnohem komplexnější a více variabilní nežli složky jednoduchých laboratorních médií. Hlavními cukry mladiny jsou maltosa (45–65%), maltotriosa (~15%), sacharosa (~5%), glukosa a fruktosa (~10%), a nezkrasitelné dextriny (~20–30%). Pivovarské kvašení navíc probíhá anaerobně za zvýšené osmolarity mladiny, tedy v podmínkách mnohem více stresujících nežli jsou podmínky laboratorní. Pivovarské kmeny jsou více citlivé na zvýšené teploty a jejich metabolické dráhy a membránové struktury jsou přizpůsobeny růstu při nižších teplotách.

Růst v laboratorním glukosovém médiu je aerobní, zatímco v mladině, s výjimkou krátké periody na začátku fermentace, jsou růstové podmínky anaerobní a respirativní růst běžný v laboratorních podmínkách, není v mladině únosný vzhledem k absenci kyslíku. Kvasinky jsou při kvašení mladiny navíc vystaveny vysokým koncentracím CO_2 a při použití cylindrických tanků také vysokému hydrostatickému tlaku. Buňky rostoucí aerobně v glukosovém médiu vstupují do stacionární fáze růstu po vyčerpání zkrasitelných cukrů, zatímco kvasinky při fermentaci mladiny zahajují tuto fázi růstu hlavně z důvodu absence kyslíku. Zkrasitelné cukry tedy nelimitují růst buněk v mladině během stacionární fáze, a fermentace (spíše než respirace) pokračuje i během této fáze.

Buněčný cyklus kvasinek se skládá ze čtyř fází, G0/G1 (klidová fáze a postmitotická fáze), S (syntéza DNA), G2 and M (mitosa) [17]. Sebrané pivovarské kvasinky jsou obvykle v G1 fázi, která je nejdelší a zahrnuje syntézu proteinů a RNA potřebných pro syntézu DNA v další fázi cyklu. Během typického kvašení mladiny se buňky dělí přibližně dvakrát nebo třikrát [18].

Důležitým rysem pivovarských kvasinek je schopnost flokulovat, což je využíváno při jejich separaci z mladého piva. Kvasinky neflokulují v přítomnosti zkrasitelných cukrů v mladině. Flokulace je zahájena ke konci exponenciálního růstu, kdy cukry mladiny nesuspeří s buněčnými cukernými zbytky o buněčné povrchové lektiny (flokuliny). Při použití technologie HGB (high gravity brewing; příprava vysokoobsažných várek) je flokulace často slabá. Je podporována ethanolom v koncentraci do 10 % a také přítomností kyslíku.

Stationary phase cells are much more osmotolerant than exponential phase cells, due partly to the synthesis of trehalose, which acts as osmoprotectant; its synthesis starts during periods of slow growth or starvation. Compatible solutes such as glycerol are synthesized and then rapidly assimilated when the osmotic stress is removed. Interestingly, high osmolarity has been observed to extend the yeast life span since the biosynthesis of glycerol apparently increases NAD^+ levels, thereby adjusting the redox state of the cells, and promotes longevity [12].

5 OTHER STRESS RESPONSES

Most of the very important membrane-sited pleiotropic drug resistance (PDR) pumps that protect cells against toxic actions of various chemicals by exporting them out of the cell disappear after exponential growth [13]. Yet, as reported by Wolfiger et al. [14], some of these pumps, namely Pdr15p, are strongly expressed when yeast cells exit the exponential growth phase and are strongly induced by stress conditions such as heat shock, low pH, weak acids or high osmolarity.

Ethanol tolerance of yeast cells has been associated with the activity of manganese-activated superoxide dismutase (Mn-SOD) [15].

Cold shock response involves adjustments in membrane viscosity, followed by increased activities of Cu / Zn-SOD and catalase and increased synthesis of heat shock proteins and enzymes of glycogen and trehalose metabolism. Trehalose accumulates in the cells and protects them.

6 BREWING YEAST AND ITS RESPONSES TO BREWING STRESSES

When assessing the stress responses of brewing yeast strains one should be aware that they differ in many respects from laboratory strains. One of the major differences is ploidy. Laboratory strains are either haploid or diploid, while brewery strains are polyploid or aneuploid. This is an advantage since extra copies of important genes can improve their fermentation performance. Polyploid yeasts are also more stable than haploid yeasts because more mutations are needed to change them [16]. Other features in which industrial yeast strains differ from laboratory ones concern their growth conditions. The carbon sources in wort are much more complex and varied than in the simple laboratory media. Major saccharides in wort include fermentable maltose (45–65%), maltotriose (~15%), sucrose (~5%), glucose and fructose (~10%), and nonfermentable dextrins (~20–30%). Moreover, brewery fermentations proceed under anaerobic conditions at high external osmolarity of the wort and these conditions are generally much more stressful than those encountered in the laboratory. Brewery strains are more thermosensitive than laboratory ones and their metabolic pathways and membrane structure have been altered to promote growth at lower temperatures.

Growth in glucose-containing laboratory media is aerobic while, with the exception of a short period early in the fermentation, growth conditions in wort are anaerobic and respiratory growth common under laboratory conditions is not sustainable due to the lack of oxygen. In addition, cells in wort experience high CO_2 concentrations and, in cylindro-conical vessels, also high hydrostatic pressure. For cells grown under aerobic conditions in glucose-rich medium, entry into stationary phase is the result of limitation of fermentable carbohydrates whereas cells grown in wort in brewery fermentation enter stationary phase chiefly as a result of lack of oxygen. Hence, fermentable carbohydrates are not limiting in stationary phase cells grown in wort and fermentation, rather than respiration, continues in wort in stationary phase cells.

The yeast cell cycle is divided into four phases, G0/G1 (gap), S (DNA synthesis), G2 and M (mitosis) [17]. Cropped brewery yeast cells are usually in the G1 phase, which is the longest, and the proteins necessary for DNA synthesis are being prepared and RNA is synthesized before the DNA synthesis. During typical brewery fermentation a yeast culture divides approximately two to three times [18].

An important feature of brewing yeast is its flocculation that makes it possible to separate yeast cells from green beer. Brewing yeast does not flocculate in the presence of fermentable sugars in wort and resumes flocculation towards the end of exponential growth, when the wort sugars no longer compete with cell's sugar residues for cell surface lectins (floculins). In HGB (high gravity brewing) worts flocculation is often poor. Flocculation is supported by ethanol in concentrations below 10% and also by oxygen.

Flokulace je určována složením a strukturou buněčné stěny. Mladé buňky mají hladký povrch, zatímco vrásčité a svrásťelý povrch starých buněk flokulaci podporuje. Proces flokulace také usnadňují větší rozměry starších buněk, které jsou nukleárními centry pro vznik floků [19].

7 STRESY A STRESOVÉ ODPOVĚDI PIVOVARSKÝCH KVASINEK

Reakce pivovarských kvasinek na stres jsou kmenově specifické - jejich forma a intenzita se liší v závislosti na kmeni kvasinek. Genom kvasinek vykazuje během kvašení značnou přizpůsobivost, obzvláště při fermentaci HGB mladiny, a při vyšších teplotách a v rámci odpovědi na stres genom prochází přeskupením a amplifikací genů [20].

7.1 Stresové odpovědi spojené s propagací

V průběhu propagace nastávají největší změny transkripce genů v prvních 8 hodinách od inokulace. Během této doby, pro kvasinky stresující, je aktivováno mnoho genů zodpovědných za stresové odpovědi [21]. Pivovarské kvasinky jsou schopné udržovat stresovou odpověď v prvních fázích kvašení. S pokračujícím kvašením je ale stresová odpověď potlačována [22]. Transkripční odpověď zahrnuje up-regulaci odpovědi na špatně složené proteiny (unfolded protein response, UPR) a down-regulaci glykozylace, která indikuje změny endoplazmatického retikula (ER), neboť 70 % proteinů zpracovávaných v ER a Golgiho komplexu kvasinek je glykozylováno. Pojem up-regulace je označována regulace vedoucí ke zvýšení odpovědi na určitý podnět, down-regulace naopak snížení odpovědi (např. úbytkem receptorů apod.). Represe glykozylace je sekundárním stresem, který ovlivňuje expresi glukosou reprimovatelných genů, účastníků se rezervního metabolismu a regulačního mechanismu UPR [23].

7.2 Přechod z aerobní na anaerobní fázi růstu

Přechod z aerobní fáze růstu (propagace) do anaerobní (fermentace) a opačný přechod se u spodních kvasinek projevuje výraznými změnami v růstové rychlosti nebo rychlosti produkce ethanolu [24,25]. Při přechodu z anaerobního růstu k aerobiose se rychle zvyšuje specifická aktivita CuZn-SOD, při opačné tranzici se její aktivita snižuje. Aktivita katalázy není ovlivněna. Změna anaerobní fáze růstu na aerobní dále způsobuje zvýšení aktivity citrát syntázy a Mn-SOD, opačný přechod snižuje Mn-SOD aktivitu, ale neovlivňuje činnost citrát syntázy. Anaerobně rostoucí buňky vykazují po vystavení kyslíku rychlou ztrátu viability.

7.3 Chemické stresy a jejich účinky

Mezi chemické stresy, které působí na kvasinky během fermentace mladiny, patří ethanol, chmelové fenolické látky, antimikrobiální peptidy a proteiny pocházející z ječmene a sladu [26,27,28], složky různých surogátů, CO₂ a složky mladinových kalů.

Konečná koncentrace ethanolu při běžné fermentaci dosahuje 3–6 %, při technologii HGB může přesáhnout 10 %. Pivovarské kvasinky tolerují 7–9 % ethanolu (v/v), ale za vhodných nutričních podmínek (tj. v přítomnosti vhodného zdroje dusíku, sterolu a nenasycených mastných kyselin) mohou produkovat až 16 % ethanolu [29]. Ethanol inhibuje růst kvasinek a způsobuje redukci velikosti buněk, snižuje rychlost respirace, příjem glukosy a fermentace, způsobuje pokles vnitrobuněčného pH, ztrátu protonmotorické síly na membráně a zvyšuje propustnost membrány. Ethanol také indukce vznik mutací mitochondriální DNA, které se projevují sníženou rychlostí kvašení a nežádoucími chuťovými změnami piva [30]. Obecně ethanol v koncentraci nad 10 % (v/v) inhibuje růst kvasinek a v množství 20 % inhibuje fermentační schopnost kvasinek [31]. Vystavení kvasinek vlivu 10 % ethanolu nebo 20 % sorbitolu po dobu 15 minut způsobuje smrtě kvasinek, zvrásnění jejich povrchu, abnormální morfologii buněčné stěny a snížení viability.

Mezi chmelové látky patří např. alfa- a beta-hořké kyseliny a další látky jako fytoestrogeny a prenylflavonoidy s různými biologickými účinky [32]. Alfa- a beta-hořké kyseliny jsou antioxidanty, které odbírají volné radikály a inhibují růst některých pivo-kazících bakterií, nikoliv však kvasinek. Alfa-hořké kyseliny fungují jako protonofory narušující transmembránovou protonmotorickou sílu. V koncentraci ~ 35 mg/l inhibují většinu mléčných bakterií kazících pivo, zatímco růst kvasinek je ovlivněn až při koncentraci ~ 0,5 g/l, tedy více než 10 x vyšší nežli je koncentrace inhibující bakteriální růst [33]. Takových koncentrací alfa-kyselin není dosaženo ani při vysokém chmelení. Protonofory aktivují membránovou H⁺-ATPázu kvasinek [34, Sigler et al., nepublikované výsledky], enzym nezbytný pro buněčnou ener-

The major determinant in flocculation is cell wall composition and structure. Young cells have smooth surface while the wrinkled and corrugated surface of old cells aids flocculation. The larger size of older cells may facilitate flocculation since these cells act as nucleation centers for floc formation [19].

7 STRESSES AND STRESS RESPONSES IN BREWING YEASTS

The stress responses of brewing yeast have been found to be strongly strain-specific and their form and intensity can vary widely from strain to strain. In addition, yeast genome shows marked plasticity during fermentation, especially in high specific gravity wort and at higher than normal temperatures and, **in response to stress** the genome **undergoes rearrangements and gene amplification** [20].

7.1 Propagation-associated stress responses

During brewery propagation, the greatest changes in gene transcription were found to occur in the first 8 hours after inoculation. A number of stress response genes are activated during this time. The period immediately after pitching seems to be particularly stressful for yeast but yeast cells are able to cope with it [21]. Brewery strains are capable of mounting a stress response at the early stages of fermentation but, as the fermentation proceeds, the response is repressed [22]. The transcriptional responses were found to include up-regulation of unfolded protein stress response and downregulation of glycosylation, which indicates marked changes in endoplasmic reticulum (ER) since 70% proteins processed in yeast ER and Golgi in are glycosylated. Upregulation leads to the enhanced response to a stimulus, while downregulation brings about reduction of the response (e.g. decrease in the number of cell receptors). Repression of glycosylation is a secondary stress that affects expression of glucose-repressible genes, genes involved in reserve metabolism and the unfolded protein response [23].

7.2 Aerobic/anaerobic transition

Data on the physiological effects of the transition from aerobic propagation to anaerobic fermentation and the reverse transition (from anaerobiosis to aerobiosis) on bottom-fermenting brewing yeast [24,25] showed that neither type of transition led to significant changes in growth rate or the rate of ethanol production. A rapid increase in the specific activity of CuZn-superoxide dismutase occurred on transition from anaerobiosis to aerobiosis, and a decrease in activity on the reverse transition, while catalase activity remained unchanged by the transitions. The transition from anaerobiosis to aerobiosis caused increases in citrate synthase and Mn-superoxide dismutase, the reverse transition caused a decrease in Mn-superoxide dismutase activity, while citrate synthase remained unchanged. Anaerobically grown cells showed a rapid loss of viability on exposure to oxygen while aerobically grown cells were unaffected.

7.3 Chemical stresses and their effects

Among chemicals acting on yeast cells during wort fermentation are, e.g., ethanol, hop phenolics, antimicrobial peptides and proteins from barley and malt [26,27,28], constituents of various adjuncts, CO₂ and trub (wort sludge) components.

The final ethanol concentration in usual fermentations is 3–6 %, under HGB conditions it may exceed 10 %. Brewer's yeast is reported to tolerate 7–9 % ethanol (v/v), while under suitable nutritional conditions, i.e. when suitable nitrogen source, sterol and unsaturated fatty acid source is provided, it can produce up to 16 % ethanol [29]. Ethanol inhibits growth and causes cell size reduction, lowered respiration rate, glucose uptake and fermentation, lowered intracellular pH, loss of protonmotive force across the plasma membrane and increased membrane permeability. It also induces petite yeast phenotype, which is associated with lowered fermentation rate and unfavorable flavor changes [30]. In general, ethanol inhibits yeast growth above 10 % v/v; the fermentation capacity is inhibited at 20 % ethanol [31]. A 15-min exposure of lager yeast to 10 % ethanol or to 20 % sorbitol was found to cause cell shrinkage, cell wall crenation and aberrant morphology and lowering of viability.

Hop compounds include, e.g., alpha- and beta-bitter acids and other compounds such as phytoestrogens and prenylflavonoids with a wide range of biological effects [32]. Alpha- and beta-bitter acids are antioxidants that can quench free radicals and inhibit the growth of some beer spoiling bacteria but not yeast growth. Alpha-bitter acids are protonophores that abolish the transmembrane protonmotive

getiku a výživu. Tolerance kvasinek k alfa-hořkým kyselinám zahrnuje, mimo jiné, aktivní vylučování těchto látek z buněk PDR pumpami [33]. Během stárnutí význam tohoto mechanismu klesá, protože po diauxické změně aktivita H^+ -ATPázy [35] i PDR pump ustává [13].

Mladinové kaly jsou složeny z tuků, proteinů a inaktivních buněk [18]. Stimulují fermentační aktivitu kvasinek, nicméně u kalových taninoidů adsorbovaných na buněčný povrch byl prokázán negativní vliv na vitalitu kvasinek [36].

Náhražky (surogáty), uhlíkaté zdroje nepocházející z ječného sladu, jsou používány pro úpravu barvy a chuti piva a pro zlepšení pěnivosti piva. Tekutými náhražkami je např. glukosový sirup, hydrolyzáty škrobu, směsi cukrů a dextrinů, výtažky z ječmene, pšenice, a karamely, mezi pevné náhražky patří pšenice, kukuřice, rýže, tritikále ve formě sušených vloček, mleté obilí, mouka nebo krupice. Náhražky ovlivňují výživu kvasinek a tedy i tvorbu ethanolu a senzoric-
kých látek.

Oxid uhlíčitý je popisován jako „parahormon“ ovlivňující mnoho buněčných procesů. Přetlak CO_2 inhibuje metabolismus kvasinek a jejich životaschopnost. S volnými aminoskupinami bílkovin vytváří karbamáty a ovlivňuje tím jejich strukturu a funkci [37]. CO_2 inhibuje některé enzymy a aktivuje jiné. Výtěžek buněk, růstová rychlost a konečná koncentrace mnoha senzoric-
kých aktivních látek se snižuje se stoupajícím množstvím CO_2 během kvašení. Přetlak CO_2 může být také příčinou zvětšení velikosti buněk [38]. Houbové adenylátcyklázy fungují jako senzory CO_2 . Různé koncentrace CO_2 mohou ovlivnit fermentaci, protože existuje přímé propojení adenylátcyklázové aktivity a glykolýzy [39]. Vysoké hladiny CO_2 indukují u nerostoucích pivovarských kvasinek stresové odpovědi. Snížení koncentrace rozpuštěného CO_2 při manipulaci s kvasinkami je tedy vhodné pro zachování jejich vitality [40].

V průběhu kvašení mladiny byla pozorována antimikrobiální aktivita látek pocházejících ze sladu. Zrna sladovnického ječmene obsahují proteiny podobné thaumatinu (thaumatin-like proteins; TLPs; vytvářejí se v některých rostlinách jako odpověď na infekci), které interagují s buněčnou membránou a stěnou kvasinek a inhibují metabolické děje uvolňováním buněčných složek; jejich účinek může být pro buňku letální [28,41]. Dalšími sladovnými peptidy s toxickým účinkem na kvasinky jsou např. thioniny [42], které také permeabilizují buňky. Pivovarské kvasinky jsou k inhibičním účinkům peptidů a/nebo proteinů více citlivé nežli kmeny laboratorní [26].

7.4 Nutriční stres

Nutriční stres vyvolává podstatné přebudování buněčných pochodů. Kvasinky, vystavené stresům spojeným s technologií HGB (nízká dostupnost dusíku způsobená přidávkou náhražek mladiny), mohou uvolňovat buněčné proteázy s cílem urychlit asimilaci mladinových peptidů.

7.5 Oxidativní stres

Oxidativní stres, vyvolaný např. provzdušněním kvasinek před fermentací, navozuje velmi rychle (během 45 minut) drastickou odpověď na oxidativní stres spolu s akumulací trehalosy. Hladina transkripčních faktorů, které se účastní detekce kyslíku, je zvýšená hlavně během prvních 3 hodin [43]. V počátečních fázích kvašení je také rychle akumulován ergosterol, který je důležitý při obnově fermentační kapacity buněk po jejich skladování [44]. Kvašení s prodlouženou aerací probíhá při nižším pH, výsledné pivo obsahuje více pyruvátu, méně SO_2 a acetaldehydu [45].

Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species; ROS) produkované za aerobních podmínek jsou primární příčinou buněčného stárnutí a mohou hrát roli při degeneraci buněk během jejich opakovaného nasazení v provozu [6]. Počet nasazení je dán tzv. replikační délkou života, která je určována zejména antioxidačním potenciálem a citlivostí buněk k oxidativnímu stresu.

Přibližně 85–95 % antiradikálové aktivity je tvořeno neenzymatickými termostabilními látkami tvořícími 1 % sušiny kvasinek [46]. Toxický účinek kyslíku je způsoben hlavně superoxidem a reaktivními formami kyslíku odvozenými ze superoxidu. Hlavní ochrannou funkci proti ROS zastává Cu,Zn-SOD [24,25], zatímco Mn-izoenzym této superoxidismutasy ochraňuje buňku i proti vysoké osmolaritě a tepelnému stresu a stresu vyvolanému metaloidy [47]. Syntéza Cu, Zn-enzymu *de novo* není vždy tak rychlá, aby zajistila plnou ochranu buňky.

Hladina buněčných antioxidantů a transkripce genů kódujících antioxidanty, která je regulována STRE-elementy, je nejvyšší po vstupu buněk do exponenciální fáze růstu. Snižená citlivost k oxidativnímu stresu je dána úbytkem zkvasitelných cukrů, spíše než iniciací respirace [15]. Odpověď na oxidativní stres je zahájena v rámci obecné

force. Concentration of ~35 mg/l inhibits most beer-spoiling lactic acid (G+) bacteria while inhibition of yeast growth occurs at ~ 0.5 g/l of the acids, i.e. > 10 times more than the concentrations inhibiting bacterial growth [33]. These concentrations of alpha-bitter acids are not attained even at high hopping. Moreover, it has been shown that protonophores activate the H^+ -ATPase of the yeast plasma membrane [34, Sigler et al., unpublished results], a yeast enzyme crucial for cell energetics and nutrition. Tolerance of yeast to iso-alpha-acids involves, apart from other mechanisms, active export from the cells by PDR pumps [33]. During aging the importance of this mechanism decreases as after diauxic shift the activity of both the H^+ -ATPase [35] and the PDR pumps drops [13].

Trub (wort sludge) consists of fats, proteins and inactive cells [18]. It stimulates yeast activity and fermentation, but trub tannoids adsorbed on cell surface were reported to lower yeast vitality [36].

Adjuncts, carbon sources not derived from malted barley, are used to adjust beer color, flavor, and to improve foam performance. Liquid adjuncts are, e.g., glucose syrup, starch hydrolysate, sugar/dextrin mixtures, extracts from barley, wheat, and caramels, solid adjuncts include wheat, maize, rice, and triticale in the form of dried flakes, milled grain, flour or grits. They affect yeast nutrition and thereby also ethanol formation and flavor substances.

CO_2 has been described as a „parahormone“ affecting many cell processes. CO_2 overpressure inhibits metabolism and reduces yeast viability. CO_2 forms carbamates with free amino groups of proteins and this affects protein structure and function [37]. Some enzymes are inhibited by CO_2 while others are activated. Cell yield and growth rate as well as the final concentration of many flavor compounds decrease on increasing CO_2 concentration during fermentation. Increased CO_2 pressure has also been shown to cause cell size increase [38]. Fungal adenylate cyclases function as CO_2 sensors. Different levels of CO_2 may thus influence yeast fermentation since there is a direct link between adenylate cyclase activity and glycolysis [39]. High ambient CO_2 levels induce stress response in non-growing brewery yeast and lowering of dissolved CO_2 level in yeast handling is thus beneficial to cell vitality [40].

Malt-associated anti-yeast activity was observed during brewery fermentations. Malting barley grain contains thaumatin-like proteins (TLPs; produced in some plants in response to an infection), which interact with the yeast cell membrane and cell wall and inhibit yeast metabolic activities by causing leakage of cell constituents; they can exert a lethal effect [28,41]. Other malt peptides with toxic action on yeast include, e.g., thionins [42], which also cause permeabilization of yeast cells. Brewery yeast was found to be more sensitive to the inhibitory impact of malt derived antimicrobial peptides and/or proteins than laboratory yeast [26].

7.4 Nutritional stress

Nutrient limitation evokes a significant remodelling of cell processes. Brewing yeast, when exposed to stresses associated with HGB brewing (low nitrogen availability caused by the addition of adjuncts), can release proteases into wort to facilitate the assimilation of wort peptides.

7.5 Oxidative stress

Oxidative stress brought about, e.g., by oxygenation of brewery yeast prior to fermentation, causes a very fast (within 45 min) and drastic response together with trehalose accumulation. Transcription factors involved in oxygen sensing were found to be mainly increased in the first 3 h [43]. The initial stages of lager fermentation were also found to involve a rapid accumulation of ergosterol, which is an important factor in restoring the fermentation capacity of the cells after storage [44]. Fermentation with extended aeration was found to proceed at lower pH, the finished beer containing more pyruvic acid, less SO_2 and acetaldehyde [45].

Reactive oxygen species (ROS) produced under aerobic conditions are the primary cause of cellular ageing and may play a role in yeast deterioration during repitching [6]. The number of pitchings is likely to be determined by the replicative life span, which is largely determined by the antioxidant potential and sensitivity to oxidative stress.

Some 85–95% of the free radical scavenging activity arrives from non-enzymatic thermostable compounds constituting 1% of brewing yeast dry weight [46]. The toxic effect of oxygen was found to be due to superoxide (or ROS species derived from it). The chief protective role against ROS is played by Cu,Zn-superoxide dismutase [24,25], while the Mn-izoenzyme also plays a role in protecting the cells against high osmolarity, heat and metalloid stress [47]. The *de novo* synthesis of the Cu,Zn-enzyme is not always rapid enough to confer full protection.

stresové odpovědi na podmínky limitující buněčný růst a nemusí být nutně výsledkem diauxického přechodu jako takového. Obecná odpověď na stres může být iniciována i v nepřítomnosti kyslíku nutného pro respiraci.

7.6 Osmotický stres

Vnitrobuněčná osmolarita kvasinek při plném turgoru (vnitřním tlaku) odpovídá 540–570 mOsm/l [48,49], zatímco osmotický tlak 12° mladiny je přibližně 800 mOsm/l. Plazmolýza snižující viabilitu kvasničných buněk začíná při zvýšení osmolarity na ~ 1200 mOsm/l [50, 51]. Při použití technologie HGB nebo VHГ jsou kvasinky vystaveny osmolaritě 1500–1800 mOsm/l, která může indukovat hyperosmotický stres ovlivňující buněčné struktury (vakuolu, plazmatickou membránu, buněčnou stěnu), zpozdžuje sedimentaci kvasinek a prodlužuje čas fermentace o 15–90 %, v závislosti na generaci kvasinek. V našich experimentech vykazovalo pivo připravené z mladiny s vyšší osmolaritou (odpovídající 16 % a 20 % mladinám) vyšší hladiny diacetylů a pentandionu a nižší koncentrace dimethylsulfidu a acetaldehydu nežli pivo připravené z 12 % mladiny [52]. Odchylky v koncentraci esterů a vyšších alkoholů nesouvisely s osmolaritou mladiny nebo s počtem nasazení kvasinek. Zákal mladého piva a vyčiření piva během zrání nebyly zvýšenou osmolaritou ovlivněny. Chladový zákal piva stoupal s počtem opakovaného nasazení kvasinek.

Propagace kvasinek ve vysokoobsažných mladinách má negativní vliv na kvasinky během následujících HGB kvašení (10% ztráta viability v 17,5 % mladině). Je zajímavé, že při použití vysokoobsažné mladiny pro propagaci kvasinek se objem buněk zvýší o 30 % v 17,5 % mladině v porovnání se 7,5° mladinou [53]. Při osmoadaptaci kvasinek se uplatňují membránové aquaporiny [54], které mohou ovlivnit flokulenci a hydrofobicitu kvasinek.

7.7 Mechanický stres

Při mechanickém míchání nebo recirkulaci CO₂ během pivovarské fermentace mohou být buňky kvasinek poškozeny vlivem zvýšeného hydrodynamického stresu [1]. Dalším zdrojem mechanického stresu je vertikální talířová odstředivka používaná v některých provozech pro sběr neflokulujících kvasinek z mladého piva a separaci horkých a studených kalů. Proces odstředování snižuje viabilitu kvasinek a způsobuje pokles vnitrobuněčného pH (ukazatele fyziologického stavu). Dochází k vyčerpání glykogenu a trehalosy a z buněčných stěn se uvolňuje mannan, který vytváří nefiltrovatelný zákal [2].

7.8 Hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak v cylindrokónických tancích má podobný vliv na kvasinky jako přetlak plynu [55] a poškozuje buňky stejně jako vysoká teplota nebo oxidativní stres [56]. Odolnost buněk k vysokému tlaku je nejnižší v exponenciální a nejvyšší ve stacionární fázi růstu. Iwahashi et al. [57] prokázali, že hladina Hsp104 je mnohem nižší u buněk vystavených vysokému hydrostatickému tlaku. Vysoký tlak tak může být zodpovědný za represí stresových odpovědí během kvašení mladiny (viz výše).

7.9 pH stres

Pokles pH mladiny z ~5,5 na ~4,0 během kvašení výrazně ovlivňuje produkci aromatických látek – produkce dimethylsulfidu se snižuje, zatímco množství diacetylů narůstá [58]. Acidifikace mladiny také může ovlivnit růstovou rychlost a replikativní délku života kvasinek. Kyselé mytí ovlivňuje proteiny plazmatické membrány, zejména v přítomnosti ethanolu – nově vznikající buňky vykazují nízkou míru přežití.

7.10 Opakované zakvašení

Stres popsané výše v textu jsou znásobeny opakovaným nasazením kvasinek – každé následné použití kvasinek přispívá ke snížení jejich viability, vitality a fermentační schopnosti [18]. S opakovaným zakvašením dochází k postupným změnám fyziologie, flokulace, povrchového náboje a viability kvasinek.

Poděkování

Tento přehledný článek byl připraven v rámci řešení projektu Výzkumné centrum 1M0570 financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

The greatest increase in cellular antioxidants and transcription of stress response element (STRE)-regulated antioxidant-encoding genes occurs following entry into the stationary phase. The reduced sensitivity to oxidative stress occurs in response to the loss of fermentable sugars rather than the initiation of respiration [15]. The oxidative stress response seems to be initiated as part of a general stress response to growth-limiting conditions and is not necessarily a result of the diauxic shift as such. Importantly, general stress response may be initiated even in the absence of the oxygen needed for respiration.

7.6 Osmotic stress

Yeast intracellular osmolarity at full turgor pressure is 540–570 mOsm/l [48,49] while the osmotic pressure of 12° wort is ~ 800 mOsm/l. Plasmolysis of yeast cells, which lowers viability [50], starts at ~ 1200 mOsm/l [51]. HGB or VHГ (very high gravity) wort osmolarity is 1500–1800 mOsm/l, which may induce hyperosmotic stress that affects cell structures (vacuole, plasma membrane, cell wall), lowers yeast proliferation rate (lower suspended yeast counts), delays yeast sedimentation, and extends fermentation time by 15–90 % depending on yeast generation. In our experiments [52], beer brewed at increased wort osmolarity (16° and 20°) had higher levels of diacetyl and pentandione and lower levels of dimethylsulfide and acetaldehyde than beer brewed from normal 12° wort. Esters and higher alcohols displayed small variations irrespective of wort osmolarity or repitching. Increased wort osmolarity had no appreciable effect on the haze of green beer and accelerated beer clarification during maturation. Chill haze increased with repitching.

Yeast propagation in HG worts has a deleterious effect on yeast during subsequent HGB fermentation (10% viability drop in 17.5° wort). Interestingly, when high gravity worts are used during propagation, the yeast cell volume increases (by 30% in 17.5° wort relative to 7.5° wort) [53]. Yeast osmoadaptation involves the action of aquaporins in the yeast membrane [54] that also affect cell flocculence and hydrophobicity.

7.7 Mechanical stress

Mechanical agitation or re-circulation of CO₂ in anaerobic brewing fermentations may cause damage to yeast cells through increased hydrodynamic stress [1]. Another source of mechanical stress is the disk stack centrifugation used in some breweries for cropping of non-flocculant yeast, removing yeast from green beer, and separation of the hot and cold breaks. It may lower both yeast viability and intracellular pH (a marker of physiological state). Yeast glycogen and trehalose are depleted, mannan is released from cell walls and forms unfilterable haze [2].

7.8 Hydrostatic pressure

High hydrostatic pressure in cylindro-conical tanks has similar effects as gas overpressure [55] and the damage it causes to yeast is the same as that due to high temperature and oxidative stress [56]. Barotolerance is the lowest in the exponential and highest in the stationary growth phase. Iwahashi et al. [57] showed that the levels of Hsp104 are greatly decreased in cells previously exposed to high hydrostatic pressure. High pressure thus may be a causative factor in the repression of the stress response in beer fermentation (see above).

7.9 pH stress

Wort pH, which drops from ~5.5 to ~4.0 during fermentation, affects strongly the production of flavor compounds – the production of dimethyl sulfide is reduced while production of diacetyl strongly increases [58]. Wort acidification can also affect yeast growth rate and replicative lifespan. Acid washing can affect plasma membrane proteins, especially in the presence of ethanol, newly formed cells exhibit poor survival rates.

7.10 Repitching

The stresses mentioned above are exacerbated by serial pitching – each subsequent pitching usually contributes to lowering of viability, vitality and fermentative ability [18]. Yeast physiology, flocculation, surface charge and viability gradually change with multiple serial repitching.

Acknowledgements

This review was written within the frames of the Research Center 1M0570 funded by the CR Ministry of Education, Sports and Youth.



Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 2. 5. 2011

Přijato k publikování / Accepted for publication: 1. 6. 2011

Translated by Karel Sigler

LITERATURA / REFERENCES

- Boswell, C. D., Nienow, A. W., Gill, N. K., Kocharunchitt, S., Hewitt C. J.: The impact of fluid mechanical stress on *Saccharomyces cerevisiae* cells during continuous cultivation in an agitated, aerated bioreactor; its implication for mixing in the brewing process and aerobic fermentations. *Food Bioprod. Process.* **81**, 2003, 23–32.
- Chlup, P. H., Bernard, D., Stewart, G. G.: Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology. *J. Inst. Brew.* **114**, 2008, 45–61.
- Gasch, A. P.: The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. *Curr. Top. Genet.* **1**, 2003, 11–70.
- Hilt, W., Wolf, D. H.: Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* **6**, 1992, 2437–2442.
- Ruis, H., Schuller, C.: Stress signaling in yeast. *BioEssays* **17**, 1995, 959–965.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., Smart, K. A.: Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 2007, 535–569.
- Yancey, P. H.: Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2005, 2819–2830.
- Mensonides, F. I. C., Brul, S., Klis, F. M., Hellingwerf, K. J., de Matos, M. J. T.: Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2005, 4531–4538.
- Tamas, M. J., Thevelein, J. M., Hohmann, S.: Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* **472**, 2000, 159–165.
- Nass, R., Rao, R.: The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology UK* **145**, 1999, 3221–3228.
- Hohmann, S.: Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* **66**, 2002, 300–372.
- Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Fink, G. R., Guarente, L.: High osmolarity extends life span of *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2002, 8056–8066.
- 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**: 111–117, 2004.
- Wolfger, H., Mamnun, Y. M., Kuchler, K.: The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J. Biol. Chem.* **279**, 2004, 11593–11599.
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Boulton, C. A., Box, W. G., Graham, N. S., Linforth, R. S. T., Smart, K. A.: The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS Yeast Res.* **8**, 2008, 574–585.
- Hammond, J. R. M.: Yeast genetics, in: *Brewing Microbiology*, eds. Priest, F. G., Campbell, I., 3rd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003.
- Muro, M., Izumi, K., Imai, T., Ogawa Y., Ohkochi M.: Yeast cell cycle during fermentation and beer quality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **64**, 2006, 1151–154.
- Powell, C. D., Quain, D. E., Smart, K. A.: The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.* **3**, 2003, 149–157.
- Barker, M. G., Smart, K. A.: Morphological changes associated with the cellular ageing of a brewing yeast strain. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 121–126.
- James, T. C., Usher, J., Campbell, S., Bond, U.: Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr. Genet.* **53**, 2008, 139–152.
- Gibson, B. R., Graham, N. S., Boulton, C. A., Box, W. G., Lawrence, S. J., Linforth, R. S. T., May, S. T., Smart, K. A.: Differential yeast gene transcription during brewery propagation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **68**, 2010, 21–29.
- Brosnan, M. P., Donnelly, D., James, T. C., Bond, U.: The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 2000, 746–755.
- Li, B.-Z., Cheng, J.-S., Quiao, B., Yuan, Y.-I.: Genome-wide transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial bioethanol fermentation. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 2010, 43–55.
- 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.* **113**, 2007, 168–184.
- 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* **7**, 1991, 91–103.
- van Nierop, S. N. E., Axcell, B. C., Cantrell, I. C., Rautenbach, M.: Quality assessment of lager brewery yeast samples and strains using barley malt extracts with anti-yeast activity. *Food Microbiol.* **26**, 2009, 192–196.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., Desamblanx, G. W., Osborn, R. W.: Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 1997, 297–323.
- Gorjanović, S., Beljanski, M. V., Gavrović-Jankulović, M., Gojgić-Cvijović, G., Pavlović, M. D., Bejoso, F.: Antimicrobial activity of malted barley grain thaumatin-like protein isoforms, S and R. *J. Inst. Brew.* **113**, 2007, 206–212.
- Casey, G. P., Magnus, C. A., Ingledew, W. M.: High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1984, 639–646.
- Castrejon, F., Codon, A. C., Cubero, B., Benitez, T.: Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 2002, 462–467.
- Pratt, P. L., Bryce, J. H., Stewart, G. G.: The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew.* **109**, 2003, 218–228.
- Krofta, K., Nesvadba, V., Poustka, J., Nováková, K., Hajšlová, J.: Contents of prenylflavonoids in Czech hops and beers. *Acta Horticult.* **668**, 2005, 201–206.
- Hazelwood, L. A., Walsh, M. C., Pronk, J. T., Daran, J.-M.: Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- -acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2010, 318–328.
- Pereira, M. B. P., Tisi, R., Fietto, L. G., Cardoso, A. S., Franca, M. M., Carvalho, F. M., Tropia M. J., Martegani, E., Castro, I. M., Brandao, R. L.: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induced calcium signaling and activation of plasma membrane H⁺-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 2008, 622–630.
- Nso, E., Goffeau, A., Dufour, J. P.: Fluctuations during growth of the plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiol.* **47**, 2002, 401–406.
- Mathieu C., van der Berg, R., Iserentant D.: Prediction of yeast fermentation performance using the acidification power test. *Proc. Eur. Brew. Conv.* **23**, 1991, 273–278.
- Lorimer, G. M.: Carbon dioxide and carbamate formation: the makings of a biochemical control system. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 1983, 65–68.
- Lumsden, W. B., Duffus, J. H., Slaughter, J. C.: Effects of CO₂ on budding and fission yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1987, 877–881.
- Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., Van Dijck, P. V.: Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2007, 815–824.
- Majara, M., O Connor-Cox, E. S. C., Axcell, B. C.: Trehalose: a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 221–227.
- van Nierop, S. N. E., Axcell, B. C., Cantrell, I. C., Rautenbach, M.: Optimised quantification of the antiyeast activity of different barley malts towards a lager brewing yeast strain. *Food Microbiol.* **25**, 2008, 895–901.
- Okada, T., Yoshizumi, H.: The mode of action of toxic protein in wheat and barley on brewing yeast. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 1973, 2289–2294.
- Verbelen, P. J., Depaetere, S. A., Winderinckx, J., Delvaux, F. R., Delvaux, F.: The influence of yeast oxygenation prior to brewery fermentation on yeast metabolism and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res.* **9**, 2009, 226–239.
- Higgins, V. J., Beckhouse, A. G., Oliver, A. D., Rogers, P. J., Dawes, I. A.: Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2003, 4777–4787.

45. Pearlstein, K. M.: Pilot-scale studies on extended aeration at fermentor fill. *ASBC Journal* **46**, 1988, 108–111.
46. Bourdauhui, G., Dillemans, M., Van Nederveelde, L., Debourg, A.: Improved yeast resistance to stress using antioxidants extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 29th EBC Congress*, pp. 586–597, Dublin 2003.
47. 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.
48. 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.* **81**, 1961, 631–639.
49. Levin, R. L.: Water permeability of yeast cells at sub-zero temperatures. *J. Membr. Biol.* **46**, 1979, 91–124.
50. White, P. A., Kennedy, A. I., Smart, K. A.: Osmotolerance and the adaptive osmotic stress response in ale and lager brewing yeast. *Proc. 29th EBC Congress*, pp. 563–574, Dublin 2003.
51. Arnold, W. N., Lacy, J. S.: Permeability of the cell envelope and osmotic behavior in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* **131**, 1977, 564–571.
52. 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.
53. Cahill G., Murray, D. M., Walsh, P. K., Donnelly, D.: Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **58**, 2000, 14–20.
54. Carbrey, J. M., Bonhivers, M., Boeke, J. D., Agre, P.: Aquaporins in *Saccharomyces*: characterization of a second functional water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2001, 1000–1005.
55. Reid, G. C.: A review of CO₂ toxicity in brewer's yeast. *Proc. 2nd Conv. Inst. Brew.*, 1989, 212–239.
56. 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.* **108**, 1993, 53–58.
57. Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S., Komatsu, Y.: Effect of temperature on the role of Hsp104 and trehalose in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **416**, 1997, 1–5.
58. Haukeli, A.D., Lie, S.: Conversion of α -acetolactate and removal of diacetyl: a kinetic study. *J. Inst. Brew.* **84**, 1978, 85–89.

77. zasedání MEBAK v Kulmbachu

Ve dnech 15. až 16. dubna 2011 proběhlo v Kulmbachu 77. zasedání komise MEBAK.

Jednání se zúčastnilo 19 delegátů, z toho 3 hosté. Hostiteli zasedání byl IREKS Kulmbach.

V zasedacím sále IREKS přivítal jménem firmy přítomné pan Soineé.

Bez připomínek byl schválen protokol ze 76. zasedání MEBAK konaného ve dnech 16. až 16. října 2010 v Rheinfeldenu.

Dr. Tenge, zástupce Spaten-Franziskaner Brau, požádal z pracovních důvodů o uvolnění z členství v MEBAK. Jménem přítomných mu za jeho dlouholetou úspěšnou práci v MEBAK poděkoval Dr. Jacob.

Roční zpráva o činnosti byla jednomyslně schválena a je vyvěšena na internetových stránkách MEBAK www.mebak.org.

Na příští zasedání MEBAK bude pozván zástupce vydavatelství Hans Carl Verlag a bude s ním projednána otázka možné prezentace analytických metod MEBAK na jejich internetové stránce.

Bez připomínek byla přijata účetní uzávěrka za rok 2010.

Ediční činnost MEBAK probíhá uspokojivě. Svazek II je již vyprodán a začíná prodej svazku Suroviny. Nicméně byl vyjádřen názor, že je nutné prodej zlepšit, neboť veškerá činnost MEBAK je financována právě z ediční činnosti. Dr. Jakob byl pověřen, aby diskutoval s vydavatelstvím Hans Carl Verlag možnost obnovit přiřazení čísla ISBN svazkům MEBAK, což by zlepšilo i jejich citovanost u odborné veřejnosti. Pro zlepšení informovanosti odborné veřejnosti jsou na internetových stránkách Hans Carl Verlag vyvěšeny odkazy na internetové stránky MEBAK, obdobně tomu bude v budoucnosti i na stránkách Německého pivovarského svazu. Byl vysloven i názor, že by mohly i jednotlivé výzkumné instituce na svých domovských stránkách umístit internetové odkazy na stránky MEBAK.

Byly dokončeny práce na svazku Mladina, pivo a míchané nápoje. S ohledem na enormní rozsah tohoto svazku, čítající 600 stran, bude ještě nutné provést snížení stávajícího rozsahu unifikací a zkrácením chromatografických metod a některými dalšími redakčními úpravami. V průběhu léta by měl být svazek připraven k závěrečné korektuře.

Práce na novém znění stanov MEBAK stále probíhají.

Dr. Coelhan seznámil přítomné s výsledky kruhového testu na stanovení prekurzorů dimethylsulfidu (DMS-P). I když se podařilo optimalizací laboratorních podmínek docílit zlepšení opakovatelnosti metody, stále přetrvávají problémy s hodnotou reprodukovatelnosti dosaženou mezi jednotlivými laboratorními v průběhu kruhového testu. Je otázkou, zda lze docílit lepší výsledky při použití metody založené na výluhu studenou vodou nebo metodou pracující s kongresní sladinou. Výzkumné práce proto na daném problému stále usilovně pokračují.

Obdobně pokračují práce na připravovaném svazku MEBAK věnovaném in-line technikám měření.

Z výsledků porovnání metod ISO 3310/1 : 2000 a starší metody MEBAK pro stanovení podílu na sítu vyplývá, že se obě metody liší zejména v podílu pluch a podílu hrubého šrotu. U ostatních podílů byla pozorována shoda. Proto nyní probíhají pokusy s různým obsahem vody.

Dr. Schmidt informoval přítomné o sloučení skupiny AHA (skupina pro analýzy chmele) se subkomisí pro chmel EBC. Kalibrační standard ICE3 vykazuje velmi dobrou stabilitu. Výsledky kruhového testu pro stanovení polyfenolů a flavonoidů naproti tomu nepřinesly očekávané výsledky. Variační koeficient přesáhl akceptovatelných 10 %, a proto nebylo doporučeno zařazení navrhované metody do analytiky EBC. V uplynulém období proběhly též tři kruhové testy zaměřené na stanovení obsahu konduktometrické hodnoty a obsahu α -hořkých kyselin ve chmelu. Všechny těchto porovnávacích zkoušek se zúčastnila úspěšně i naše laboratoř AZL (pozn. autora).

Dr. Coelhan referoval o závěrech mezilaboratorního porovnání výsledků stanovení obsahu železa v pivu metodami AAS, ICP-MS a ICP-OES. Výsledky se od sebe značně lišily a nezbyvá, než se dané problematice dále intenzivně věnovat. Z toho důvodu bylo navrženo rozšířit spolupráci s dalšími laboratorními.

Z výsledků získaných při optimalizaci metody stanovení kationtů v křemelinách vyplývá, že na rozdíl od délky třepání má vliv na konečné výsledky zejména použitá teplota. Při výluhu do piva byly získány uspokojivé výsledky při stanovení obsahu hliníku v křemelině, naopak v případě vápníku, že-

leza a arsenu byly výsledky neuspokojivé. Proto bylo zatím Dr. Kleinem doporučeno používat přednostně metodu ftalátového výluhu a při získávání výluhu pracovat při 20 °C. Pokusy v této oblasti dále pokračují.

Dr. Klein dále představil přístroj pro zkoušení správného nastavení korunkovačky. Tzv. Torque-Tester, přístroj vybavený senzorem pro měření kroutícího momentu, je schopen rychle poskytnout výsledky, na jejichž základě lze provést správné nastavení přitlačné síly korunkovačky.

Problémy s měřením změn přítomných přirozených a umělých barviv u míchaných nápojů během jejich stárnutí byly předmětem přednášky Dr. Harmse. Dle získaných poznatků poskytovalo měření prováděné pouze při vlnové délce 430 nm nevyhovující výsledky. Naopak metoda pracující s tzv. diferenčním spektrem, kdy jsou proměřovány vlnové délky v rozsahu 350 až 700 nm, byla schopna po čtyřech dnech u ferosírovaných piv vykazat vyhodnotitelný signál a sledovat tak barevné změny způsobené rozkladem barviva.

Prof. Methner přednesl sdělení o vlivu reduktonů na oxidačně-redukční vlastnosti piva. Čím větší podíl tmavého sladu je použit při výrobě piva, tím více reduktonů je tvořeno v mladině. Tomu odpovídá stoupající reakční potenciál měřený dle MEBAK nebo Chapona. Naproti tomu ale stoupá množství radikálů v pivu v přítomnosti kyslíku se stoupající teplotou pražení u použitých speciálních sladů. Výsledky pokusů ukázaly, že přídavek roztočiny obsahující reduktony vedl k urychlení Fenton- a Haber-Weissových reakcí. Zrychlená redukce Fe³⁺ na Fe²⁺ vede k aktivaci kyslíkového radikálu a následně ke zvýšení obsahu dalších vznikajících reakčních radikálů. Na rozdíl od současných představ se tedy zdá, že reduktony přispívají k urychlení oxidačních změn v pivu a současně způsobují snižování obsahu přirozených antioxidantů např. SO₂. To vede k tomu, že piva s vyšším obsahem speciálních (barvicích) sladů vykazují, v porovnání s pivy vyrobenými za stejných podmínek avšak ze sladů světlých, nižší antioxidační potenciál.

Příští zasedání komise MEBAK je plánováno 6. až 7. října v Mnichově.

Ing. Jiří Čulík, CSc.
člen MEBAK