

# Pivovarské kvasinky a reakce na stres



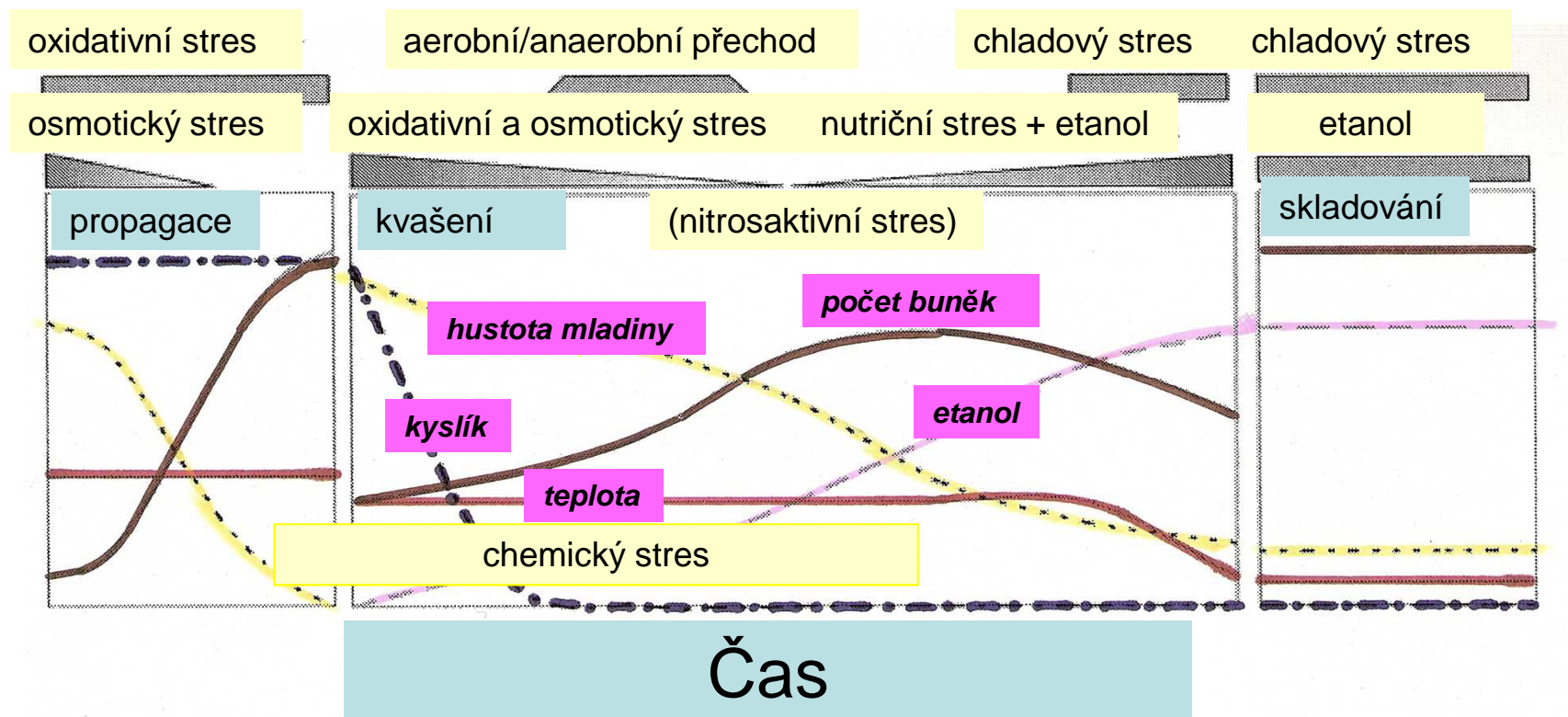
**K. Sigler<sup>1</sup>, D. Matoulková<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

<sup>2</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. Praha

# Stresy působící na kvasinky během pivovarského procesu

Propagace, kvašení a následující pochody při výrobě piva zahrnují řadu stresů, kterým jsou pivovarské kvasinky vystaveny.



# Obecné reakce na stres

- Při vystavení stresu zapínají kvasinky **stresovou reakci**
  - **zástava normálních pochodů** v buňce
  - **zapnutí pochodů indukujících produkci stresových bílkovin.**
- Bílkoviny nutné pro normální růst jsou štěpeny,
- Jejich složky jsou použity pro syntézu stresových bílkovin.
- Hlavní reakce - tzv. **obecná (nespecifická) reakce** na oxidativní, pH, teplotní a osmotický stres a hladovění na dusík.
- **Reakce** (zahrnující změněnou funkci ~900 genů) **je často přechodná** a buňka se pak vrací do normálního stavu.

# Reakce na **teplotní stres**

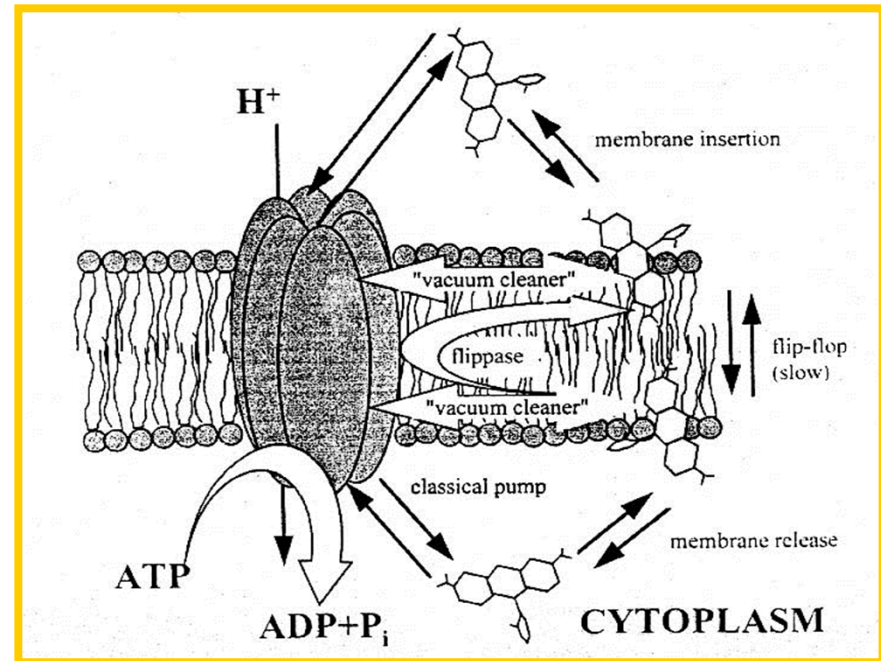
- **Produkce tzv. bílkovin teplotního šoku** (**heat shock proteins, Hsp**), např. Hsp104, Hsp70, Hsp60, and Hsp26.
- **Hsp indukované jedním typem stresu chrání i proti dalším typům.** Některé Hsp jsou produkovány po vstupu buněk do stacionární fáze růstu, jiné u buněk metabolizujících etanol.
- **Produkce trehalosy - stresový metabolit** syntetizovaný při teplotním, a také při oxidativním, nutričním a dalších stresech. **Trehalosa chrání buněčné bílkoviny před denaturací.** Její syntéza je také indukována etanolem.
- **Reakce na teplotní stres** také **způsobí přechod z exponenciálního růstu do stavu, kdy je růst buněk zastaven.**

# Odpověď na **osmotický stres**

- Hlavní částí **buněčné odpovědi na vysokou vnější osmolaritu** je **produkce glycerolu**.
- Akutní odpověď závisí také na **normální funkci buněčných organel**, hlavně **vakuoly**.
- **Hypo-osmotický stres** působí **výstup glycerolu** a nastávají změny v povrchových strukturách buňky.
- **Buňky ve stacionární fázi růstu jsou mnohem více osmotolerantní, než exponenciální buňky**, částečně díky **produkci trehalosy**. Glycerol je rychle metabolizován, když stres pomine.
- **Vysoká vnější osmolarita prodlužuje život kvasinkových buněk**, patrně tím, že se mění redoxní stav buněk.

# Další mechanismy stresové reakce

- **Reakce na chladový šok** zahrnuje **změnu viskozity** buněčné **membrány**, zvýšenou aktivitu některých enzymů (**Cu,Zn-SOD**) a **katalasy**, **zvýšenou syntézou Hsp, glykogenu a trehalosy**.
- Na **toleranci buněk vůči ethanolu** se podílí důležitý antioxidační enzym, **manganem aktivovaná superoxiddismutasa (Mn-SOD)**.
- Některé **membránové bílkoviny**, tzv. **MDR pumpy**, které aktivně zbavují buňky toxických látek, hlavně **Pdr15p**, jsou **silně produkovány za stresu** (teplotní, nízké pH, slabé kyseliny, vysoká osmolarita).



# Specifické rysy pivovarských kvasinek

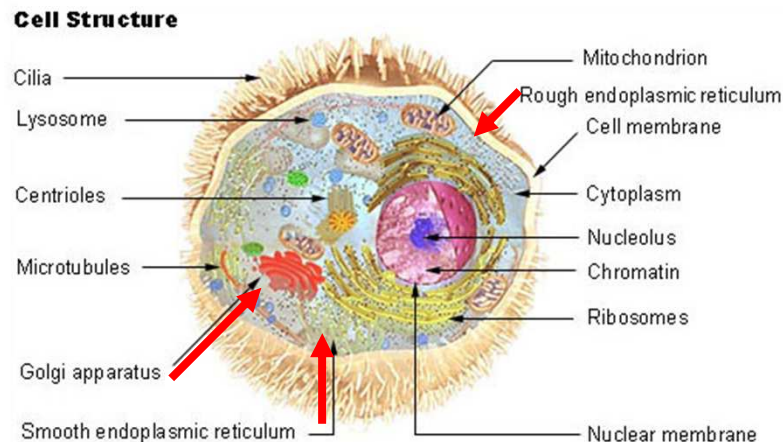
Pivovarské kvasinky se v řadě ohledů liší od laboratorních kmenů.

- **Ploidie – laboratorní kmeny** → 1 či 2 sady chromosomů, **pivovarské kvasinky** → více a/nebo neúplných sad (vyšší fermentační schopnost a stabilita).
- **Rozmanité zdroje uhlíku v mladině** (maltosa, maltotriosa, sacharosa, glukosa a fruktosa, nefermentovatelné dextriny).
- **Stresy. Kvašení mladiny probíhá za anaerobních podmínek**, za přetlaku CO<sub>2</sub>, vysokého hydrostatického tlaku a při vysoké vnější osmolaritě.
- **Nízká teplota**. Pivovarské kmeny jsou citlivější na změny teploty a jejich metabolismus dovoluje **růst při nízkých teplotách**.
- **Stacionární fáze růstu v laboratoři** → vyčerpání zkvasitelných sacharidů a přechod na respiraci (ethanol, glycerol); **buňky v mladině** → stacionární fáze → **nedostatek kyslíku i v přítomnosti zkvasitelných cukrů**.



# Časový průběh odpovědi na stresy

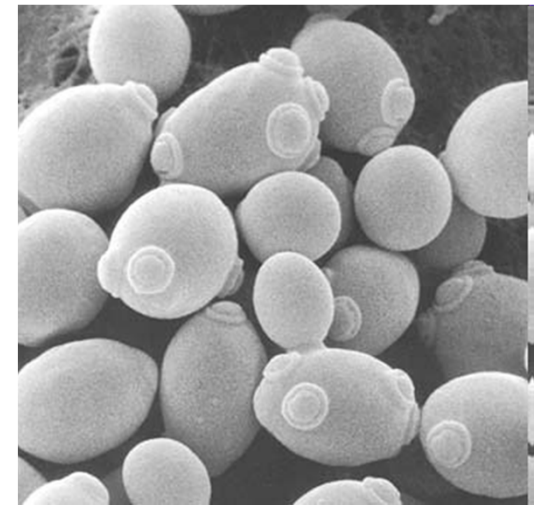
- **Reakce pivovarských kvasinek** na stres **se silně liší podle kmene**. Reakce je velmi pružná.
- **Největší změny** v tvorbě stresových bílkovin **nastávají během prvních 8 hodin po inokulaci**. Největší stres působí na buňky těsně po zakvašení.
- S pokračujícím kvašením se **stresová odpověď pivovarských kvasinek snižuje**. Součástí stresové reakce jsou změny buněčných struktur, hlavně **endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu**.





# Přechod z aerobiosy do anaerobiosy

- **Přechod z aerobiosy (propagace) do anaerobiosy (během kvašení)** ani opačný přechod **nemají podstatný vliv na rychlost růstu ani produkci etanolu u kvasínek spodního kvašení.**
- Při přechodu z aerobiosy do anaerobiosy se **rychle snižuje aktivita antioxidačních enzymů (CuZn-superoxiddismutasa)**, při opačném přechodu tato aktivita vzrůstá. Aktivita katalázy se přitom nemění.
- **Anaerobně rostlé buňky vystavené kyslíku rychle ztrácejí viabilitu, aerobně rostlé buňky nejsou ovlivněny.**



# Chemický stres – etanol a hořké kyseliny

**Chemický stres buněk během kvašení mladiny** - **ethanol, fenolické látky chmele a sladu, antimikrobiální peptidy a proteiny sladu, složky surogátů, CO<sub>2</sub> a složky kalů.**

- **≥10% ethanol** inhibuje růst, rychlost dýchání, vstupu glukosy, snížené buněčné pH, protonmotorickou sílu, zvyšuje propustnost membrány, snižuje viabilitu a fermentační schopnost.
- **Chmelové alfa- a beta-hořké kyseliny** - antioxidanty. Alfa-hořké kyseliny potlačují transmembránovou protonmotorickou sílu.
- **Kvasinky** jsou **odolné** proti mnohem vyšším koncentracím těchto kyselin než bakterie.
- **Odolnost kvasinek proti chmelovým alfa- a beta-hořkým kyselinám klesá během stárnutí buněk.**

# Další látky působící **chemický stres**

- **Kaly** zvyšují aktivitu kvasinek, ale **tannoidy z kalů adsorbované na povrch buněk mohou snižovat vitalitu.**
- **Surogáty** - glukosový sirup, škrobový hydrolyzát, směsi cukrů a dextrinů, extrakty z ječmene, pšenice, karamely, atd.) **ovlivňují výživu kvasinek a tím tvorbu etanolu a chuťové látky piva.**
- **CO<sub>2</sub>** - „**parahormon**“ **ovlivňující buněčné pochody.** Inhibuje řadu enzymů a aktivuje jiné. **Přetlak CO<sub>2</sub>** inhibuje růst, pučení, metabolismus a snižuje viabilitu, zvyšuje velikost buněk a potlačuje tvorbu chuťových látek.
- **Antimikrobiální látky ječmene a sladu** (bílkoviny podobné thaumatinu, thioniny) **porušují buněčnou membránu a stěnu** a mohou způsobit smrt buněk.
- **Pivovarské kvasinky jsou citlivější na jejich působení než laboratorní kmeny.**
- **Dusitan, reaktivní formy dusíku - snižují prokvašení mladiny, sedimentaci a růst kvasinek.** **Zdroje** – voda, kvasnice kontaminované nitrát redukujícími bakteriemi Dusitany reagují se složkami mladiny za vzniku N-nitrososloučenin.

# Reakce na **nutriční stres**

- **Nutriční stres vyvolává podstatné přebudování buněčných pochodů.**
- **Pivovarské kvasinky** vystavené stresům spojeným s kvašením HGB (nízká dostupnost zdrojů dusíku daná přidavkem surogátů) **mohou uvolňovat do mladiny proteasy**, aby zvýšily asimilaci peptidů mladiny.



# Reakce na **oxidativní stres**

**Oxidativní stres** → velmi rychlá (~ 45 min) stresová odpověď, **akumulace trehalosy a ergosterolu** (důležitý pro obnovu buněčných funkcí po skladování). Kvašení s vyšší aerací → nižší pH, hotové pivo obsahuje více pyruvátu, méně SO<sub>2</sub> a acetaldehydu.

- **Volné radikály (ROS)** způsobují stárnutí buněk a snižují kvalitu buněk při opakovaném zakvašování.
- **Neenzymové antioxidanty (glutathion, thioredoxin) ~ 85-95% antiradikálových aktivit pivovarských kvasinek.**
- Hlavní enzym **enzymatické ochrany proti ROS - Cu,Zn-SOD. Mn-SOD**, chrání buňky také proti vysoké osmolaritě vysoké teplotě a metaloidům.
- Největší vzestup antioxidantních pochodů nastává během vstupu do **stacionární fáze**

# Reakce na **osmotický stres**

- Vnitřní **osmolarita kvasinek** je 540-570 mOsm/l. **Osmolarita 12° mladiny** je ~ 800 mOsm/l, **plasmolýza** buněk nastává při ~ 1200 mOsm/l. **Osmolarita HGB nebo VHG mladin** je 1500-1800 mOsm/l, což působí **hyperosmotický stres**.
- Ten **ovlivňuje buněčné struktury** (vakuolu, buněčnou membránu a stěnu), snižuje rychlost množení a prodlužuje kvašení a počátek sedimentace.
- **Propagace kvasinek v HG mladině** má negativní vliv na kvasinky během následné HGB fermentace (10% pokles viability) a **působí zvětšení velikosti** buněk.
- **Osmoadaptace kvasinek** zahrnuje působení membránových aquaporinů a **ovlivňuje flokulaci a hydrofobicitu buněk**

# Mechanický stres

- **Mechanický stres nebo recirkulace CO<sub>2</sub>** při anaerobním kvašení mladiny může poškodit buňky zvýšeným **hydrodynamickým stresem**.
- Dalším zdrojem mechanického stresu je „**disk stack**“ **centrifugace** někdy používaná pro separaci buněk od piva.



- Ta **snižuje viabilitu a vnitrobuněčné pH**, působí vyčerpání glykogenu a trehalosy a uvolňování mananu z buněčných stěn. Ten může tvořit **nefiltrovatelné zákaly**.



# Hydrostatický a pH stres

- **Vysoký hydrostatický tlak v CKT** má podobné účinky jako přetlak plynu a **poškozuje buňky stejně jako vysoká teplota a oxidativní stres**. Barotolerance je nejnižší v exponenciální a nejvyšší ve stacionární fázi růstu.
- **V buňkách vystavených hydrostatickému tlaku silně klesá koncentrace Hsp104** (a tedy ochrana buněk proti následkům stresu).
- **Pokles pH mladiny během fermentace** (z ~5.5 na ~4.0) silně ovlivňuje **produkci chuťových látek**. Acidifikace mladiny také ovlivňuje rychlost růstu a stárnutí.
- **Kyselé praní** silně ovlivňuje bílkoviny buněčné membrány, zvláště v přítomnosti etanolu. Nově vyrostlé buňky vykazují snížené přežívání.

# Opakované zakvašování

- Všechny výše zmíněné **stresy se prohlubují při opakovaném zakvašování.**
- Každé následné zakvašení obvykle přispěje ke snižování viability, vitality a fermentační schopnosti.
- **Buněčná fyziologie, flokulace, povrchový náboj a účinnost reakcí na stres se s opakovaným zakvašováním rovněž postupně mění.**

Děkuji za pozornost

