

ZMĚNY VLASTNOSTÍ KVASINEK V PIVOVARSKÉM PROCESU A RYCHLÉ METODY JEJICH SLEDOVÁNÍ

CHANGES TO YEAST PROPERTIES IN BREWING PROCESS AND FAST METHODS OF THEIR MONITORING

JAN NOVÁK, GABRIELA BASAŘOVÁ, JAROMÍR FIALA, PAVEL DOSTÁLEK

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: Pavel.Dostalek@vscht.cz

Novák, J. – Basařová, G. – Fiala, J. – Dostálek, P.: Změny vlastností kvasinek v pивovarském procesu a rychlé metody jejich sledování. Kvasny Prum. 52, 2006, č. 1, s. 3–6.

V přehledném článku jsou shrnuty poznatky o působení stresových faktorů na pивovarské kvasinky během propagace, kvašení a skladování. Hlavní pozornost je věnována přehledu nejpoužívanějších fluorescenčně-optických metod pro sledování těchto změn.

Novák, J. – Basařová, G. – Fiala, J. – Dostálek, P.: Changes to yeast properties in brewing process and fast methods of their monitoring. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 1, p. 3–6.

The article summarises the information on the effect of stress factors on brewing yeast during propagation, fermentation and storage. Close attention is paid to the overview of the most frequently used fluorescent optical methods for monitoring of these changes.

Novák, J. – Basařová, G. – Fiala, J. – Dostálek, P.: Änderungen von Hefeeigenschaften im Brauprozess und schnelle Methoden. Kvasny Prum. 52, 2006, Nr. 1, S. 3–6.

In einem übersichtlichen Artikel werden alle Ergebnisse über Wirkung von Stressfaktoren auf Brauhefe im Laufe ihrer Vermehrung, der Hauptgärung und Lagerung zusammengefasst. Die Hauptaufmerksamkeit wird der Übersicht von häufigsten angewandten fluoreszenz-optischen Methoden zur Verfolgung von Hefeeigenschaftsänderungen gewidmet.

Новак, Й. – Басаржова, Г. – Фиала, Й. – Досталек, П.: Изменения свойств дрожжей в течение пивоваренного процесса и ускоренные методы их исследования. Kvasny Prum. 52, 2006, No. 1, стр. 3–6.

В статье наглядным образом подытожены знания о влиянии стрессовых факторов на пивные дрожжи в течение их размножения, брожения и хранения. Главное внимание уделяется часто употребляемым флуоресцентно-оптическим методам исследования этих изменений.

Klíčová slova: kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, průtoková cytometrie, stres, propagace, kvašení, skladování
Keywords: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, flow cytometry, stress, propagation, fermentation, storage

V průběhu výroby piva se uplatňují specifické technologické postupy, během kterých kvasinky procházejí buď vratnými, nebo nevratnými změnami. Mezi tyto postupy patří: propagace kvasnic, hlavní kvašení, ošetřování a skladování kvasnic. Takové procesy přinášejí více či méně stresující podněty, na něž kvasinky v různé míře reagují, a to jak v závislosti na genetické výbavě daného kmene, tak na povaze konkrétního stresového faktoru. Následující přehled literárních poznatků shrnuje hlavní stresové faktory v pивovarském procesu, hlavní změny, jimiž kvasinky procházejí během propagace, kvašení a skladování. Dále je uveden souhrn nejpoužívanějších fluorescenčně-optických metod pro sledování těchto změn.

Stresové faktory v pивovarském procesu

Pro vymezení pojmu stresový faktor bylo v minulosti použito více definic, například Hohman a Mager [1] definovali stresové faktory jako „některé chemické a fyzikální parametry procesu mající negativní vliv na buněčný růst“. Naproti tomu jiní, např. Ruis [2], si pod pojmem stresující představují ty procesy, jež odstraňují populaci buněk z „kvasničního ráje“. Tento ráj pak definují jako „prostředí nabízející optimální podmínky pro další život a růst populace kvasničních buněk za maximálního možného podílu viabilních buněk“. Většina technologických operací v periodickém procesu kvašení mladiny je pro kvasinky určitým způsobem stresující. Různé formy stresu, jako je například teplotní šok, vedou ke konformačním a strukturálním změnám v membránách, narůstající tvorbě specifických proteinů a k posunům v buněčném cyklu [3]. Základní částí mechanismu odpovědi na stres tvoří aktivace genů označovaných jako „heat shock genes“. Během zkou-

mání změn vyvolaných teplotním stresem bylo zjištěno, že buňky jako odpověď vytvářejí specifické bílkoviny, označované jako heat shock proteins (dále jen HSPs). Později bylo zjištěno, že HSPs jsou tvořeny i při jiných stresových podmínkách, než je teplotní stres, a že základní funkcí HSPs je rychlá a účinná odpověď na prožívaný stres [4].

Oxidační stres je spojován s působením aktivních forem kyslíku, jako jsou volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku, jakým je například peroxid vodíku. Tyto formy kyslíku vznikají při oxidačním metabolismu kvasinek, mohou se v buňce akumulovat a ovlivnit jejich činnost negativním způsobem. Při oxidačním stresu narůstá také obsah a aktivita následujících enzymů: CuZn superoxid dismutasy (EC 1.15.1.1), Mn superoxid dismutasy (EC 1.15.1.1) a katalasy (EC 1.11.1.6). Tyto enzymy jsou v literatuře [5] označovány jako SOD1, SOD2 a CTT1 a jejich zvýšená aktivita je brána jako marker oxidačního stresu. Některé experimenty [7] ukazují poškození kvasinek působením rychlé změny koncentrace rozpuštěného kyslíku. V reálném provozu však nejsou kvasnice vystaveny takovým koncentracím rozpuštěného kyslíku, které by negativně ovlivnily jejich aktivitu [5]. Oxidačnímu stresu jsou kvasinky vystaveny

pouze během aerobní propagace za použití čistého kyslíku nebo jeho směsi se vzduchem, kdy je koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu řádově desítky miligramů na litr [6].

Teplotní stres je vyvoláván změnou vnější teploty. Kritickým faktorem, který zde působí, je rychlost této změny. Teplotní šok působící na buňky vyvolává nejen zvýšenou toleranci k pozdějším teplotním výkyvům, ale i k ethanolovým a jiným stresům. Experimentálně ověřená data [10] ukazují, jak předchozí teplotní šok vede k nárůstu procenta přežívajících buněk po vystavení populace novým stresovým podmínkám (tab. 1). Tento jev je znám pod pojmem křížová ochrana. V podmínkách pivovaru teplotní stres narůstá po převedení kvasnic ze skladovacích prostor do kvasných nádob. Kvasnice jsou skladovány při teplotě 4 °C. V případě kvašení piva typu „ale“ mohou být kvasnice nasazeny do mladiny o teplotě až 25 °C. Pokud kvasí piva ležáckého typu, tato teplota se pohybuje na nižší hranici, a to od 8 do 13 °C [8]. Je také známo, že teplota kvasnic sedimentovaných v kónusu CKT není zcela uniformní a dosahuje poměrně vysokých hodnot ve větší vzdálenosti od chladicího povrchu kónusu, přičemž rozdíl mezi teplotou v těsné blízkosti

Tab. 1 Příklad zvýšené tolerance ke stresovým faktorům po předchozích stresových podmínkách [10]

Typ kvasnic	Použitý teplotní stres před inkubací (°C)	Přežívající buňky při 45 °C (%)	Přežívající buňky v 20% roztoku ethanolu (%)
Spodní	21	6,4	52,4
Spodní	37	85,5	98,5
Svrchní	21	14,7	49,2
Svrchní	37	89,4	78,5

duplikátoru a vprostřed kónusu může být až deset stupňů. Další rychlou změnu teploty představuje například styk povrchu chladicího hadu s okolní rozkvašenou mladinou. Praktické zkušenosti naznačují, že ačkoli jsou tyto náhlé změny v provozu běžné, nejsou určující pro stav kvasnic a průběh kvašení. Je také známo, že rostoucí teplota zesiluje nepříznivé účinky ethanolu na buňku [9].

Ethanol patří mezi hlavní stresové faktory působící při kvašení piva zejména při použití tzv. HGB technologií. Přítomnost ethanolu způsobuje pro kvasinky nepříznivou změnu fyzikálně-chemických vlastností kultivačního média. Hlavní toxické působení ethanolu spočívá v tom, že snižuje funkčnost hydrofobní vrstvy cytoplazmatické membrány. Tímto působením zvyšuje celkovou permeabilitu cytoplazmatické membrány a inhibuje specifický transport sacharidů a aminokyselin do buňky. Efekt zvýšené permeability buněčné membrány buňky částečně kompenzuje zvětšením průměrné délky acylových řetězců membránových fosfolipidů. Tím se obnoví esenciální bariérová funkce membrány. Ethanol ovlivňuje i aktivitu některých enzymů přítomných v buňce [11]. Zvýšená hladina ethanolu může způsobovat inhibici buněčného růstu, je-li ethanol přítomen v obsahu přesahujícím 2 % obj. V souvislosti s HSPs Piper a kol. [6] dokázali, že ethanol v koncentračním rozmezí 4 až 10 % obj. vede k podstatné tvorbě těchto proteinů. Lee a kol. [3] sledovali v souvislosti s ethanolovým a jinými stresy HSPs u více kmenů kvasinek. Po vyhodnocení výsledků autoři zjistili, že ze všech sledovaných stresů měl pouze ethanolový stres (7 % obj.) významný vliv na tvorbu HSPs. Tento trend byl zjištěn u všech sledovaných kmenů. Výsledky uvedené v jejich práci vyjasnily rozdíl mezi laboratorními a provozními kvasnicemi. Stresy aplikované na laboratorní kvasinky vedly k vytvoření mnoha HSPs, a to nejen v případě ethanolového stresu. To podle autorů ukazuje buď na to, že HSPs nejsou dobrými ukazateli stresu u průmyslových kmenů pivovarských

kvasinek, nebo že tyto kvasnice jsou přirozeně více odolné vůči stresům [4].

Osmotický stres je způsoben koncentračním rozdílem uvnitř a vně buňky, a v této souvislosti je zmiňován zejména se zaváděním technologií kvašení vysocekoncentrovaných mladín, kde k negativním efektům vysokého osmotického tlaku na aktivitu kvasinek dochází [10]. Reakce kvasnic na osmotický stres byly podrobně zkoumány a charakterizovány Ivorrou a kol. [12]. Při studiu HSPs během kvašení vína tyto autoři prokázali, že přítomnost bílkoviny GPD1 považované za měřítka osmotického stresu byla maximální v časných stádiích kvašení. Naproti tomu v konečných stádiích kvašení byla hladina této bílkoviny snížena na hranici možnosti detekce. Jako kompenzaci negativních vlivů vysokého osmotického tlaku při počátku kvašení doporučují někteří autoři [13] zvýšení obsahu stopových prvků (Ca, Mg, Mn a Zn) v zakvašené mladině a její obohacení o růstové faktory.

Doposud bylo publikováno velmi málo analýz [10, 14] vlivu hydrostatického tlaku na kvasnice. Výsledky ukazují, že použitím tlakového šoku narůstá odolnost kvasnic k pozdějším tepelným, tlakovým a ethanolovým šokům. Autoři [14] uvádějí tyto jevy do souvislosti s bílkovinou HSPs 104. Její podstatné zvýšení v kvasnicích pozorovali až při vystavení kvasnic tlakovému šoku s použitým tlakem 75 MPa. K tomu lze poznamenat, že tlaky použité v jejich studii podstatně převyšují hodnoty běžně se uplatňující v provozních podmínkách. Z běžných zkušeností nevyplývá, že by hydrostatický tlak byl determinujícím faktorem procesu kvašení.

Změny v průběhu propagace kvasnic

Kultivací neboli propagací kvasnic se rozumí aseptické namnožení čisté kultury v množství dostačujícím pro laboratorní nebo provozní účely. Doposud bylo popsáno několik způsobů propagace kvasnic a ty lze z bioinženýrského hlediska rozdělit na vsádkové (batch) a kontinuální procesy. Kontinuální pro-

cesy vzhledem k přetrvávajícím problémům s rizikem kontaminace nenalezly větší praktické uplatnění, navíc technologie výroby mladiny je vsádková a zakvašovat je třeba v určitých časových intervalech, a proto dodnes převažují procesy vsádkové. Tyto procesy lze rozdělit na aerované a neaerované. Živným médiem při rozmnožování pivovarských kvasinek je sterilní vychlazená mladina, která může být přizhívna rozpustnými solemi některých kovů. Během propagace dochází k jistým fluorescenčním metodami popsatelným změnám ve fyziologickém stavu a struktuře kvasničné populace [8, 15].

V posledním desetiletí se mnoho autorů zabývalo sledováním buněčného cyklu [16, 17], apoptosou [18], změnami ve viabilitě [19], změnami povrchových bílkovinných struktur [20] a sacharidů [21]. Další autoři pak sledovali esterasovou aktivitu [22], intracelulární pH [23] a proteasovou aktivitu [24]. Všechny tyto parametry byly sledovány pomocí průtokové cytometrie [25] nebo fluorescenční mikroskopie [26] a využity k optimalizaci propagace kvasnic z hlediska fyziologického stavu následní populace.

Buněčný cyklus kvasinek je často sledován fluorescenčním barvením DNA [21, 22, 25]. K tomuto účelu lze použít více barviv, jež se k DNA vážou různými mechanismy (tab. 2).

Apoptose, neboli „programované buněčné smrti“ různých kmenů pivovarských a laboratorních kvasinek se ve svých experimentech věnoval Neumajer [30] a Mamdoo [31]. Bylo zjištěno, že u pivovarských kvasinek nemá tento fenomén větší praktický význam a kvasinku lze v tomto ohledu využít spíše jako modelový organismus vyšších eukaryot při studiu rakoviny [31]. Z fluorescenčních sond lze jmenovat anexin V, kaspasové kity apod. Podrobnější výčet s desítkami odkazů na primární literaturu je obsažen na webových stránkách firmy Molecular Probes [32].

Fluorescenčním barvením a vyhodnocením fyziologicky významných kvasničných sacharidů a polysacharidů se zabývalo více studií [21, 22]. Bylo zjištěno, že pro barvení glykogenu lze po určitých úpravách využít fluorescenčního barviva acriflavinu, a pro stanovení trehalosy na fluorescein isothiokianát vázaného concavalinu A. Experimentální práce [33, 34] v Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství potvrdily pozitivní korelaci mezi různými metodami [35, 36] stanovení kvasničního glykogenu. Další fyziologicky významné látky, na jejichž obsah v buňkách lze usuzovat z fluorescenčního barvení, jsou neutrální lipidy barvitelné nilskou červení [37] a steroly reagující s FITC s vazbou na nystatin [38] (tab. 3).

Dále lze mluvit o sondách, s jejichž pomocí je možno usuzovat na vitalitu a aktivitu kvasinek, tyto sondy lze rozdělit na sondy pro stanovení intracelulárního pH, membránového potenciálu a enzymových aktivit (tab. 4).

Anaerobní propagace

Při modelování tohoto pochodu se obvykle používá počátečního jednorázového provzdušnění média na rovnovážnou koncentraci rozpuštěného kyslíku. Množení kvasnic poté probíhá za anaerobních podmínek, tedy stejných nebo velmi podobných podmínek jako při hlavním kvašení mladiny. Tento proces je charakteristický relativně pomalým množením kultury s nízkým výtěžkem biomasy a dlouhým rozmezím mezi jednotlivými kroky. Kvasnice ve fázi exponenciálního růstu

Tab. 2 Některé fluorescenční sondy používané při stanovení buněčného cyklu a nukleových kyselin

Sonda	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Použití
Propidium jodid [27]	535	617	barvení DNA, mrtvých buněk, průtoková cytometrie
Akridinová oranž [25]	500	526	RNA/DNA, průtoková cytometrie
Ethidium bromid [25]	518	605	barvení mrtvých buněk, průtoková cytometrie
DAPI [25]	358	461	buněčný cyklus
Hoechst 33342 [28]	350	461	buněčný cyklus; ...
TOTO-1 [29]	514	533	buněčný cyklus, viabilita
YO Pro1 [29]	567	583	buněčný cyklus, viabilita

Tab. 3 Příklady sond pro barvení fyziologicky významných látek

Sonda	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	Použití
Acriflavine [22,35]	470	512	glykogen
FITC-concavaline A[21]	500	526	trehalosa
FITC[25]	518	605	bílkoviny
FITC-nystatine[38]	358	461	steroly
Nilská červen[37]	350	461	neutrální lipidy
Monobromimane[25]	514	533	glutathion
Propidium jodid[27]	567	583	celkové nukleové kyseliny

Tab. 4 Příklady sond pro stanovení aktivity kvasinek

Sonda	Použití
5-(and-6)-carboxy SNARF®-1, acetoxymethyl ester, acetate [25]	intracelulární pH
2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF, AM) [25]	intracelulární pH
3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) [32]	membránový potenciál
Rhodamine 123 [37]	membránový potenciál, mitochondriální aktivita
Dihydrorhodamine 123 [40]	reaktivní kyslík
Fluorescein diacetát [22]	esterasová aktivita
Anti-H ⁺ -ATPase 69 kDa subunit (yeast vacuolar), mouse IgG2a, monoclonal 8B1 [32]	ATPasová aktivita

Tab. 5 Vliv teploty a koncentrace mladiny na koncentraci rozpuštěného kyslíku při konstantním přetlaku 0,1 MPa [19]

	Voda	10% mladina	12% mladina
Teplota (°C)	Rozpuštěný kyslík (mg/l)		
9	11,58	9,14	8,92
10	11,33	8,95	8,72
11	11,08	8,75	8,53
12	10,83	8,56	8,34

jsou v poměru 1:4 až 1:6 doplňovány zchlazenou sterilní mladinou o původní koncentraci mladiny 11 až 12 %. Samotná propagace probíhá 48 až 72 hodin v duplikátorových nádobách zvaných propagátory. Za tuto dobu dojde k namnožení buněk z výchozí 8 až 15 milionů/ml na 50 až 80 milionů/ml na konci cyklu. Extrakt poklesne asi na třetinu původní hodnoty, někteří autoři [17] dokonce uvádějí, že by jeho hodnota neměla poklesnout pod 8 %. Vsádkový proces je charakteristický tím, že propagační cykly se opakují řadu měsíců a kultura v důsledku hromadění změn stárne [10, 15].

Aerobní propagace

Zatímco při klasické propagaci je kvasnicím dostupný kyslík z provzdušněné mladiny pouze na počátku kvašení, při aerobní propagaci je kvasící mladina provzdušňována v celém průběhu propagace. Vzdušnění může být periodické nebo kontinuální. Hlavní přínos tohoto postupu [10, 15, 41] spočívá v intenzivnějším nárůstu biomasy, ve zvýšení výtěžnostního koeficientu Y_{x/s} (biomasy ze substrátu) a v celkovém zvýšení aktivity kvasinek.

Jako provzdušňovací médium se používá sterilní vzduch nebo čistý kyslík, případně jejich směs. Mladina patří mezi silně pěnící kapaliny, a proto je použití sterilního vzduchu méně efektivní, jelikož k dosažení potřebného obsahu rozpuštěného kyslíku je zapotřebí relativně velkého množství dodávaného vzduchu, což způsobuje zásadní problémy s pěněním. Zatímco při použití vzduchu se rovnovážná koncentrace rozpuštěného kyslíku v mladině (podle teploty) pohybuje od 8 do 9 mg/l, při použití čistého kyslíku je její hodnota okolo 30 mg/l [4]. Fyzikálně-chemické údaje o rozpustnosti kyslíku v mladině ukazují nepřímo úměru mezi rozpustností kyslíku v mladině a její koncentrací (tab. 5) [41].

Provoz aerobní propagační stanice je nutno optimalizovat. Při použití sterilního vzduchu se provádí optimalizace z hlediska tvorby pěny a reálně dosažené koncentrace rozpuštěného kyslíku. Při probublávání mladiny

čistým kyslíkem se při vyšších koncentracích rozpuštěného kyslíku mohou projevit inhibiční účinky kyslíku a následně zpomalit nárůst biomasy. Vzhledem k intenzivnějšímu nárůstu biomasy je třeba častěji převádět kulturu do provozu. Samotný cyklus aerobní propagace trvá 30 až 48 hodin. Získané kroužky se použijí k zakvašení provozní mladiny v poměru 1:15 až 1:20 [10, 15]. Kvasnice pocházející z aerobní propagace vytvářejí více zásobních látek, např. glykogenu, což se projeví rychlejším přechodem do exponenciální fáze růstu a rychlejším průběhem kvašení [16].

Wackerbauer a kol. [41] se ve své rozsáhlé studii zabývali porovnáním různých systémů propagace. Jejich práce porovnává jednorázové vzdušnění, kontinuální vzdušnění, diskutují vliv teploty, rychlosti chodu míchadla, koncentrace mladiny a kmene kvasnic. Sledovanými parametry byly počet buněk, tvorba vedlejších produktů kvašení a specifická růstová rychlost. Z výsledků jejich pokusu vyplývá, že s rostoucím stupněm nasycení média kyslíkem roste tvorba vyšších alkoholů, klesá tvorba esterů a vicinálních diketonů. S rostoucím stupněm jednorázového nasycení kyslíkem roste specifická růstová rychlost, např. při 0 % nasycení autoři udávají hodnotu 0,032 h⁻¹ a při 59 % nasycení 0,045 h⁻¹. Frekvence otáček míchadla zkoumaná v rozmezí 50 až 350 min⁻¹ neměla podle uvede-

ných výsledků výraznější vliv na množení buněk. Z hlediska maximálního dosaženého počtu buněk se oproti jednorázovému vzdušnění jako účinnější ukázalo kontinuální vzdušnění s aerační rychlostí 2 l/min. Při tomto pokusu byl také zaznamenán výraznější pokles obsahu vyšších alkoholů a ethylacetátu, zato obsah acetaldehydu byl zřetelně vyšší [41].

Změny při hlavním kvašení

V průběhu hlavního kvašení je pro jeho modelování a monitorování možno sledovat v podstatě stejné parametry jako v případě propagace kvasnic. Kromě výše uvedených parametrů je během hlavního kvašení důležité koncentrační rozložení buněk v objemu kvasičích média a dále pak flokulace, sedimentace a pohyb biomasy v kvasicím médiu. Některé zdroje zmiňují možnost fluorescenčně barvit povrchové lektinové domény kvasinek, které hrají zásadní roli během flokulace [20]. Na konci hlavního kvašení jsou pak důležité hodnoty jako případná kontaminace a znečištění sbíraných kvasnic, které lze stanovit průtokovou cytometrií [22].

Ovlivnění kvality kvasnic jejich ošetřováním a skladováním

K ošetřování a praní kvasnic se přistupuje z několika důvodů, hlavními jsou především redukce bakteriální kontaminace, odstranění nečistot a odstranění oslabených nebo nekrotických buněk, a tím zvýšení podílu životaschopných kvasnic s vysokou vitalitou [10, 15].

Při zvýšeném mikrobiologickém znečištění kvasnic se provádí kyselé praní pomocí roztoků anorganických nebo organických kyselin. Využívá se při něm fakt, že kvasinky jsou na rozdíl od většiny kontaminujících mikroorganismů vysoce odolné vůči nízkému pH. Při kyselém praní se k biomase kvasnic nejčastěji přidává kyselina fosforečná, vinná, sírová nebo mléčná, přičemž za nejvhodnější je považována kyselina fosforečná. Po působení pH 2,2 po dobu dvou hodin nebo pH 2,8 po dobu 12 až 24 hodin se snížil podíl kontaminace na minimum, avšak zároveň narůstá podíl mrtvých kvasinek. Odumřelá kvasničná biomasa podléhá autolýze a fyziologický stav viabilních buněk se zhoršuje. Pro sledování těchto změn existuje několik rychlých přesných metod za využití fluorescenčních technik. Vhodná jsou zejména barviva sledující vitalitu a viabilitu kvasnic (tab. 6) [43].

Další možností, jak snížit kontaminaci kvasnic, představuje oxid chloričitý (chlórdioxid), který se již dlouhá léta používá pro dezinfekci pitné vody. Jeho dezinfekční vlastnosti jsou založeny na schopnosti penetrace do bakteriální buňky přes hydrofobní oblast membrány

Tab. 6 Příklady sond pro stanovení viability kvasinek

Sonda	Vyhodnocení
Fluorescein diacetate/Propidium iodide [48]	Průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie
Oxonol/Propidium iodide [48]	Průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie
5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA)/Propidium iodide [46]	Průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie
Oxonol [DiBAC4(3)], MgANS, berberine, sytox orange, FUN1 [46]	Průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie
2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) [47]	Fluorescenční spektrometrie

a její následné oxidaci. Oxid chloričitý reaguje s aminokyselinami obsahujícími síru, které jsou součástí bakteriální membrány [44].

V mezičase mezi jednotlivými nasazeními v provozu vzniká potřeba pivovarské kvasnice po určitou dobu skladovat. Mezi nejčastěji používané způsoby skladování patří např. uchovávání kvasnic v chladu pod pivem, skladování ve vodě či v roztocích různých solí (NaCl, KH_2PO_4 apod.) [44]. Během skladování mají na kvalitu kvasnic největší vliv chemické, fyzikální a biologické faktory. Mezi chemické faktory patří zejména obsah rozpuštěných solí ve skladovacím roztoku, přičemž jako výrazně příznivý je v literatuře popisován 2% roztok dihydrogenfosforečnanu sodného. Fyzikálními faktory jsou mechanické vlivy jako je pravidelné míchání a dále vliv doby skladování. Na rychlost poklesu počtu přežívajících buněk mají největší vliv genetické vlastnosti daného kmene. V průběhu skladování je opět vhodné monitorovat pokles vitality a viability (tab. 6). Z fluorescenčních technik je nutno zmínit především monitoring intracelulárního pH v populaci pomocí průtokové cytometrie [23, 45].

Tato práce je součástí řešení Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a sladu 1M6215648902.

Literatura

- Hohmann, S., Mager, W. H. (Ed.): Yeast Stress Responses. Springer Verlag, Heidelberg, 1997, 153–154.
- Ruis, H.: Yeast stress responses: achievements, goals and a look beyond yeast. In Yeast Stress Responses (Ed. – Hohmann, S., Mager, W. H.), Springer Verlag, Heidelberg, 1997, 231–247.
- Lee, M.: Eur. Brew. Conv. Monograph 28, Nutfield, 1999, 154–156.
- Piper, P. W.: Differential role of Hsps and trehalose in stress tolerance. Trends Microbiol. **43**, 1998 (2), 43–44.
- Piper, P. W.: Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free Radical Biol. Med. **27**, 1999 (3), 11–18.
- Piper, P. W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas, P., Byrne, K., Praekelt, U. M., Meacock, P., Recnacq, M., Boucherie, H.: Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. Microbiology **11**, 1994, 140–147.
- Martin, V., Quain D. E., Smart K. A.: The oxidative stress response of ale and lager yeast strains. Proc. Eur. Brew. Conv. **27**, 1999, 679–686.
- Kunze, W.: Technology Brewing & Malting, 2nd revised edition, VLB, Berlin, 1999.
- Forster, C., Back, W.: Pitching and filling procedures of cylindro-conical fermentation tanks and its influence on the anti-oxidant activity of beer. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **37**, 2000 (1), 59–64.
- EBC Monograph 28, Yeast Physiology. A new Era of Opportunities, Nutfield, U.K., 1999.
- Ciesarová, Z., Šmogračová, D.: The influence of ethanol and temperature on yeast growth. Vliv ethanolu a teploty na růst kvasinek. Kvasny Prum. **42**, 1996, 129–132.
- Ivorra, C., Perez-Ortin, J. E., Olmo, M.: An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study, Biotech. Bioeng. **64**, 1999 (6), 698–708.
- Šavel, J.: Stresové faktory kvasinek. Kvasny Prum. **44**, 1998, 5.
- Tamura, K., Kamiki, Y., Miyashita, M.: Measurement of microbial activities under high pressure by calorimetry. Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Proceedings of the International Conference, Heidelberg, 1999.
- Basařová, G., Čepička, J.: Sladařství a pivovarství, SNTL, Praha, 1986.
- Novák, J., Basařová, G., Fiala, J.: Rychlost zkvašování sacharidů mladiny a buněčný cyklus pivovarských kvasinek za podmínek modelového kvašení. Kvasny Prum. **50**, 2004, 214–217.
- Hutter, K. J.: Flow cytometric determinations of glycogen content of yeast during fermentation. J. Inst. Brew. **108**, 2002 (1), 52–53.
- Smart, K.: Brewing Yeast Fermentation Performance, Blackwell Science, Oxford, 2003.
- Simal, O., Gualdoni, S., Smart, K.: Determination of yeast viability using fluorophores. J. Am. Soc. Brew. Chem. **61**, 2003(2), 15–22.
- Walker, M. G.: Yeast Physiology and Biotechnology, Wiley, Dundee, 2000.
- Hutter, K. J., Lange, C.: Yeast management and process control by flow cytometric analysis, Proc. Eur. Brew. Conv. **28**, Budapest, 2001.
- Novák, J., Basařová, G., Fiala, J.: Vliv praní a skladování pivovarských kvasnic na jejich kvalitu, Kvasny Prum. **49**, 2003, 260–263.
- Imai, T., Back, W., Yasuda, Y., Arimura, H., Hori, T., Abe, M., Takeuchi, T.: Novel method for evaluation yeast vitality and its application to yeast handling technology, Proc. Eur. Brew. Conv. **28**, Budapest, 2001.
- Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R. J., Pilkington, H., Sobczak, J., Russell, I.: Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. **37**, 2000, 409–430.
- Shapiro, H.: Practical flow cytometry, 4th Edition, Wiley, New York, 2003.
- Hammond, J. R. M., et al.: EBC Analytica Microbiologica II, Section 3, Yeast Examinations, Hans Carl, Nürnberg, 1992.
- Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol. **66**, 1975 (1), 188–193.
- Puite, K. J., Broeke, W. R. R.: DNA staining of fixed and nonfixed plant protoplasts for flow cytometry with Hoechst 33342. Plant Sci. Lett. **32**, 1983 (3), 79–83.
- Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., Takata, K.: DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. J. Histochem. Cytochem. **45**, 1997 (1), 49–53.
- Neumajer, T.: Užití průtokové cytometrie pro studium projevů stárnutí kvasinek, Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2002.
- Mamdooh, G.: Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. Anticancer Res. **24**, 2004 (6), 1455–1463.
- <http://probes.invitrogen.com/> staženo 20. 7. 2005.
- Maternová, J.: Identifikace mikrobiálních kmenů ve směsných populacích optickými metodami, Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2003.
- Kovářová, J.: Využití třídiče buněk ke studiu procesu stárnutí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2003.
- Hutter, K. J., Remor, M., Muller, S.: Bio-monitoring in practice by optical fluorescence methods – VII. Studies on the flow cytometric determination of the glycogen content of brewery yeast. Monatsschr. Brauwiss. **53**, 2000 (5/6), 68–76.
- Quain, D. E., Tubb R. S.: A rapid and simple method for the determination of glycogen in yeast. J. Inst. Brew. **89**, 1983 (1), 38–40.
- Verstrepen, K. J., et. al.: The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. Yeast **21**, 2004 (4), 367–377.
- Fiala, J.: Knowledge Based Analysis and Control of Sterol Biosynthesis in Yeast Cells in a Fed-Batch Culture, Disertační práce, VŠCHT Praha, 2003.
- Skowronek, P., Krummeck, G., Haferkam, O., Roedel, G.: Flow cytometry as a tool to discriminate respiratory-competent and respiratory-deficient yeast cells. Curr. Genet. **18**, 1990, 265–275.
- Pelt, L. J., Zwieten, R., Weening, R. S., Roos, D., Verhoeven, A. J., Bolscher, B. G. J. M.: Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. J. Immunol. Methods, **191**, 1996 (2), 187–196.
- Wackerbauer, K., Cheong, Ch., Beckmann, M.: The propagation of yeast. Brauwelt **142**, 2002 (23/24), 785–797.
- Hutter, K. J., Kliem, C., Nitzsche, F., Wiessler, M.: Biomonitoring of process yeasts by fluorescence optical methods in practice. Part IX: Trehalose stress protectant of *Saccharomyces* strains. Monatsschr. Brauwiss. **56**, 2003 (7/8), 121–125.
- Johnson, D., Kunz, K.: A new Method of washing yeast using chlorine dioxide, The New Brewer, 1998, 9–16.
- EBC Analytica Microbiologica II, EBC Microbiology Group, 2001, 92–115.
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., Mattanovich, D.: Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **71**, 2005, 1515–1532.
- Van Zandycke, S. M., Olivier, S., Gualdoni, S., Smart, K. A.: Determination of yeast viability using fluorophores. J. Am. Soc. Brew. Chem. **6**, 2003 (1), 15–22.
- Ki-Bong, O., Matsuoka H.: Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. Int. J. Food Microbiol. **76**, 2002 (1/2), 47–53.
- Hutter, K. J.: Rapid methods of yeast viability analysis. Brauwelt **132**, 1992 (7/8), 252–262.

Zpracováno na základě přednášky na 21. Pivovarsko-sladařských dnech, 6.–7. 10. 2005, Ústí nad Labem