

DOI: 10.18832/kp201720

Faktory ovlivňující produkci sensoricky aktivních látek u pivovarských a vlnářských kvasinek

Factors Influencing the Production of Sensory Active Substances in Brewer's and Wine Yeast

Eva VONTROBOVÁ¹, Jana KOPECKÁ¹, Gabriela ROTKOVÁ¹, Dagmar MATOULKOVÁ²¹Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita
Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: 402078@mail.muni.cz, 223187@mail.muni.cz, gabcamik@mail.muni.cz²Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.,
Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lipová 15, 120 44 Prague
e-mail: matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Vontrovová, E., Kopecká, J., Rotková, G., Matoulková, D., 2017: Faktory ovlivňující produkci sensoricky aktivních látek u pivovarských a vlnářských kvasinek. Kvasny Prum. 63(4): 173–189

Publikace je zaměřena na pivovarské a vlnářské kvasinky a jejich roli při výrobě alkoholických nápojů. Jednotlivé rody a druhy kvasinek se odlišují stavbou genomu. Četné hybridizace vedly ke vzniku nových linií kvasinek, jako jsou například skupiny spodních pivovarských kvasinek Saaz a Froberg. Se strukturou genomu je spjata syntéza proteinů. Proteiny ovlivňují metabolické pochody buňky a tedy i vznik metabolitů. Díky svým specifickým metabolickým pochodům mají kvasinky významný vliv na aroma a chuť kvašených nápojů. Alkoholy, estery, acetaldehydy, monoterpenoidy, organické kyseliny, glycerol, vicinální diketony nebo sírné sloučeniny produkované kvasinkami dávají vznik charakteristickým chutovým a aromatickým profilům, čehož je využíváno při výrobě různých druhů piv a vín. Aroma a chuť jsou ovlivněny i působením stresových faktorů na kvasničné buňky v průběhu kvasných procesů. V publikaci je také zahrnut stručný přehled metabolismu kvasinek, s důrazem na katabolismus glukosy a ethanolové kvašení.

Vontrovová, E., Kopecká, J., Rotková, G., Matoulková, D., 2017: Factors influencing the production of sensory active substances in brewer's and wine yeast. Kvasny Prum. 63(4): 173–189

The publication focuses on brewer's and wine yeast and their role in the production of alcoholic beverages. Individual strains and yeast species differ in the structure of the genome. Numerous hybridizations led to the formation of new yeast lines, for example groups of bottom-fermenting yeasts Saaz and Froberg. The structure of the genome is linked with the synthesis of proteins. Proteins affect the cell's metabolic processes and their products. Therefore, yeast have a significant effect on the flavor and taste of fermented beverages. Alcohols, esters, acetaldehydes, monoterpenoids, organic acids, glycerol, vicinal diketones, or sulfur compounds produced by yeast give rise to the characteristic flavor and aroma profiles used in the production of various types of beers and wines. The aroma and the taste are also affected by stress factors that act on yeast cells during fermentation processes. The publication also includes a brief overview of yeast metabolism, with emphasis on glucose catabolism and ethanol fermentation.

Vontrovová, E., Kopecká, J., Rotková, G., Matoulková, D., 2017: Die Faktoren, die die Produktion der sensorischen Aktivstoffen von Brau- und Weinhefen beeinflussen. Kvasny Prum. 63(4): 173–189

Der Artikel ist der Problematik der Brau- und Weinhefe und ihrer Aufgabe bei der Herstellung von alkoholischen Getränken gewidmet. Durch den Genombau werden die verschiedene Gattungen und Arten der Hefe unterschieden. Durch die zahlreiche Hybridisationen sind neue Linien der Hefe entstanden worden, z.B. die Gruppen der untergärigen Hefe Saaz und Froberg. Mit der Genom Struktur wird die Protein Synthese verbunden. Die Proteine beeinflussen die metabolischen Zellgänge und auch die Bildung von Metaboliten. Dank ihren spezifischen metabolischen Gängen weist die Hefe einen bedeutenden Einfluss auf das Aroma und den Geschmack von den vergorenen Getränken auf. Die Alkohole, Ester, Acetaldehyd, Monoterpenoide, organische Säuren, Glycerin, die vizinale Diketone oder mittels Hefe produzierte Schwefelverbindungen geben einen Anlass zu den charakteristischen Geschmacks- und Aromatischen Profilen, was bei der Produktion von verschiedenen Bier- und Weinsorten angewandt wird. Auch durch die Wirkung von Stressfaktoren auf die Hefezellen während des Gärungsprozesses werden auch das Aroma und der Geschmack beeinflusst. Im Artikel wird auch einen kurzen Überblick über einen Hefestoffwechsel mit dem Schwerpunkt auf den Abbau der Glucose und die alkoholische Gärung angeführt.

Klíčová slova: genom, kvasinky, pivo, regulace metabolismu, *Saccharomyces*, víno**Keywords:** genome, yeast, beer, regulation of metabolism, *Saccharomyces*, wine

1 ÚVOD

Saccharomyces cerevisiae, kvasinka patřící do pododdělení *Ascomycotina* (houby vřecovkytrusné), má jeden z nejjednodušších a nejlépe popsaných eukaryotických genomů, i přesto dochází k neustálému testování a obnovování anotací v genomové databázi *Saccharomyces* (Fisk et al., 2006). Kvasinky využívané při technologických procesech prošly dlouhodobou domestikací. Rozdíly v genomu *S. cerevisiae* se vyskytují jak mezi průmyslovými a „nepřmyslovými“ kmeny, tak mezi průmyslovými kmeny navzájem. Kmeny využívané v pivovarství vykazují velkou genetickou vzdálenost nejen od „nepřmyslových“ kmenů, ale i od kmenů používaných při výrobě vína a bioethanolu (Borneman et al., 2011).

1 INTRODUCTION

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* belongs to the subdivision *Ascomycotina* (spruce mushrooms). It has one of the simplest and best described eukaryotic genomes even though annotations in the gene database *Saccharomyces* are constantly being tested and refreshed (Fisk et al., 2006). Yeast used in the technological processes has gone through a long-term domestication. Differences in the genome of *S. cerevisiae*, occur between industrial and “non-industrial” strains and also mutually between industrial strains. Strains used in brewing have a large genetic distance from “non-industrial” strains and from strains used in the wine and bioethanol production (Borneman et al., 2011).

2 GENOM PIVOVARSKÝCH A VINAŘSKÝCH KVASINEK

Pivovarské kvasinky jsou řazeny do dvou druhů – *Saccharomyces pastorianus* na výrobu piva spodním kvašením a *Saccharomyces cerevisiae* pro svrchně kvašená piva. Kulturní vinařské kvasinky patří do druhů *S. cerevisiae* a *Saccharomyces bayanus*. Druhy *S. pastorianus* a *S. bayanus* jsou v porovnání s ostatními druhy rodu schopny růst při nižších teplotách, což se odráží i v jejich technologickém využití (Rainieri et al., 2003). U kvasinek rodu *Saccharomyces* může docházet k mezidruhové hybridizaci, při níž se přenáší genetická informace v podobě chromosomální a/nebo mitochondriální DNA (Marinoni et al., 1999).

Genom laboratorního kmene *S. cerevisiae* S288c, který je kompletně osekvenován a ve výzkumu je využíván např. pro biochemické studie, je velký 12 068 Kb a zahrnuje 16 chromosomů. Velikost jednotlivých chromosomů se pohybuje od 200 bp do 2500 bp. Počet genů kódujících proteiny je odhadován na 5885. Přibližně 140 genů kóduje ribosomální RNA (rRNA), 40 genů malou jadernou RNA (snRNA) a 275 genů transferovou RNA (tRNA) (Goffeau et al., 1996).

Předpokládá se, že vzniku spodních kvasinek *Saccharomyces pastorianus* předcházely dvě nebo více nezávislých hybridizací a na vzniku jejich genomu mají podíl druhy *S. cerevisiae*, *S. eubayanus* a pravděpodobně i další tzv. non-*S. cerevisiae* druhy (Dunn a Sherlock, 2008; Rainieri et al., 2006). Po prvotní hybridizaci a vzniku allotetraploidních kvasinek došlo ke značné reorganizaci genomu – mitotické rekombinaci, ztrátě heterozygotního stavu, rekombinaci chimerických chromosomů (Gibson a Liti, 2015). Hybridní kmeny jsou zvýhodněny díky lepší adaptaci na měnící se podmínky (např. nízká teplota) než rodičovské kmeny (González et al., 2008) a větší schopnosti využít cukrů (Hebly et al., 2015). Na rozdíl od *S. cerevisiae* jsou kvasinky *S. pastorianus* schopny kvasit při nízkých teplotách (8–15 °C), za tvorby vyšší koncentrace siřičitanů. Tyto vlastnosti byly získány pravděpodobně od kvasinky *Saccharomyces bayanus*.

Genom *S. pastorianus* je velký přibližně 25 000 Kb a je tvořen 36 chromosomy (Nakao et al., 2009). *S. pastorianus* W34 (Weihenstephan 34/70) je allopolyploidní mezidruhový hybrid kvasinek *S. cerevisiae* (S288c) a *S. bayanus* (NBRC 1948). V genomu se vyskytuje subgenom typu Sb (*S. bayanus*, 12 chromosomů), subgenom Sc (*S. cerevisiae*, 16 chromosomů) a 8 chromosomů vzniklých vzájemnými translokacemi obou genomů. Mitochondriální DNA pochází ze *S. bayanus*. V genomu *S. pastorianus* se nachází 8 genů, které nebyly identifikovány v *S. cerevisiae* (S288c) ani v *S. bayanus* (NBRC 1948). Tyto geny, kromě LBYG 13665 (homolog genu YJM789 *S. cerevisiae*), jsou lokalizovány v subtelomerických oblastech. Geny LBYG 05796 (transkripční regulační protein), LBYG 11275 (melibiáza), LBYG 05774 (tyrosin permeasa), LBYG 08543 (symport fruktózy), LBYG 05783 (amidasa), LBYG 09147 (amidasa) dávají ležáckému pivu specifické vlastnosti. Pouze gen LBYG 09608 nemá žádný známý homolog v genomu *S. cerevisiae*. Pravděpodobně kóduje monokarboxylátový transportér, lokalizovaný v plasmatické membráně nebo v endoplasmatickém retikulu. Gen je exprimován u kvasinek ve středním a pozdním stádiu fermentace (Nakao et al., 2009).

Dvě nezávislé hybridizace daly vznik dvěma typům spodních pivovarských kvasinek, skupiny Saaz a Frohberg (Dunn a Sherlock, 2008). Výsledky nedávných studií se liší – některé naznačují, že obě linie mají původ v jedné hybridizaci a společného předchůdce (Hewitt et al., 2014), jiné potvrzují nezávislé hybridizace, kterých se účastnily různé linie *S. cerevisiae* (Monerawela et al., 2015). Rozdělení spodních pivovarských kvasinek do skupin Saaz a Frohberg částečně odráží i geografické rozložení. Do skupiny typu Saaz patří kmeny používané v České republice a v Dánsku (Carlsberg), které ztratily významné množství genomu *S. cerevisiae* díky chromosomové aneuploidii, ale ponechaly si většinu genomu *S. eubayanus*. Skupinu typu Frohberg tvoří kmeny z Holandska (Heineken, Oranjeboom a jiné pivovary), z Dánska (kromě pivovaru Carlsberg) a Severní Ameriky. Tyto kmeny si ponechaly většinu genetického materiálu obou kmenů (Wendland, 2014). Allotriploidní kmeny Saaz nejsou schopny, na rozdíl od allotetraploidních kmenů Frohberg, fermentovat maltotriosu, což způsobuje nižší míru fermentace (Mertens et al., 2015). Kvasinky Saaz vykazují větší toleranci k nízkým teplotám. Jedním z genů, které umožňují růst kvasinkám Saaz za nízkých teplot, je KEX2, pocházející z genomu *S. eubayanus*. Gen KEX2 kóduje protein kexin a podporuje růst buněk. Odlišnosti mezi skupinami Saaz a Frohberg se vyskytují i v produkci aromatických látek. Frohberg kmeny produkují vyšší koncentraci ethylacetátu (banán, roz-

2 GENOME OF BREWER'S AND WINE YEASTS

Brewer's yeast is classified into two species – *Saccharomyces pastorianus* for bottom beer fermentation and *Saccharomyces cerevisiae* for the top-fermented beer. Cultural wine yeast belong to the species *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. Species *S. pastorianus* and *S. bayanus* are adapted to grow at lower temperatures, which is also reflected in their use in technologies (Rainieri et al., 2003). The genus *Saccharomyces* is capable of interspecific hybridization - genetic information is shared in the form of chromosomal and mitochondrial DNA (Marinoni et al., 1999).

The genome of the laboratory strain *S. cerevisiae* S288c has been completely sequenced and is used in research, for example in biochemical studies; the genome has 12 068 Kb with 16 chromosomes. The size of individual chromosomes ranges from 200 bp to 2500 bp. The number of genes encoding proteins is estimated at 5885. Approximately 10 genes encode ribosomal RNA (rRNA), 40 genes encode small nucleus RNA (snRNA) and 275 genes encode transfer RNA (tRNA) (Goffeau et al., 1996).

The formation of bottom-fermented yeasts was probably preceded by two or more independent hybridizations and *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* and probably also other non-*S. cerevisiae* species have had a share in the formation of their genome (Dunn and Sherlock, 2008; Rainieri et al., 2006). After the initial hybridization and the formation of all tetraploid yeasts a significant reorganization of the genome occurred – mitotic recombination, loss of heterozygous state, and recombination of chimeric chromosomes (Gibson and Liti, 2015). Hybrid strains are better adapted to changing conditions (e.g. low temperature) than parental strains (González et al., 2008) and have a better ability to use sugars (Hebly et al., 2015).

The genome size of *S. pastorianus* is about 25 000 Kb and it consists of 36 chromosomes (Nakao et al., 2009). *Saccharomyces pastorianus* W34 (Weihenstephan 34/70) is an allopolyploid inter-hybrid of *S. cerevisiae* (S288c) and *S. bayanus* (NBRC 1948). The genome consists of a Sb subgenus (*S. bayanus*, 12 chromosome), a Sc subgenus (*S. cerevisiae*, 16 chromosomes) and 8 chromosomes created by translocations of both genomes. The mitochondrial DNA originates from *S. bayanus*. In contrast with *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* can ferment at low temperatures (8–15 °C) and produce higher concentrations of sulfites. These abilities are probably inherited from *S. bayanus*. In the *S. pastorianus* genome are 8 genes that have not been identified either in *S. cerevisiae* (S288c) or in *S. bayanus* (NBRC 1948). All of these genes except the gene LBYG13665 (homologue of *S. cerevisiae* gene YJM789), are located in subtelomeric regions. Genes LBYG05796 (transcriptional regulatory proteins), LBYG11275 (melibiase), LBYG05774 (tyrosine permease), LBYG08543 (symport of fructose), LBYG05783 (amidase) and LBYG09147 (amidase) give specific properties to the lager beer. Only one gene, LBYG09608, has no known homologue in the *S. cerevisiae* genome. This gene probably encodes a monocarboxylate transporter that is located in the plasma membrane or in the endoplasmic reticulum. The gene is expressed in yeast in the middle and late phase of fermentation (Nakao et al., 2009).

Two independent hybridizations gave rise to two types of bottom brewer's yeast types Saaz and Frohberg (Dunn and Sherlock, 2008). The results of recent studies differ – some suggest, that both lines have their origin in one hybridization and a common ancestor (Hewitt et al., 2014), others confirm independent hybridization in which were included different *S. cerevisiae* lines (Monerawela et al., 2015). The division of the bottom brewer's yeasts into the Saaz and Frohberg types is partially dependent on geographic distribution. The type Saaz includes strains used in the Czech Republic and Denmark (Carlsberg), which lost a significant amount of *S. cerevisiae* genome due to chromosome aneuploidy, but retained most of the *S. eubayanus* genome. The type Frohberg includes strains from Netherlands (Heineken, Oranjeboom and other breweries), from Denmark (except Carlsberg brewery) and from North America. These strains retained most of the genetic material of both strains (Wendland, 2014). Allotriploid strains of Saaz aren't capable of fermenting maltotriose and have a lower fermentation rate, in contrast to allotetraploid strains of Frohberg (Mertens et al., 2015). Saaz yeasts have greater tolerance to low temperatures, this property being affected by the gene KEX2 from *S. eubayanus*. The gene KEX2 encodes the protein kexin and promotes cell growth. Differences between Saaz and Frohberg are also in the production of aromatic compounds. Frohberg yeast produces higher concentrations of ethyl acetate (banana, solvent), 3-methylbutylacetate (banana, pear) and methylcarboxylate (ap-

pouštědlo), 3-methylbutylacetátu (banán, hruška) a methylkaprylátu (jablko, anýz), než kmeny skupiny Saaz (Gibson et al., 2013).

U kvasinek se mimo jadernou DNA vyskytuje i DNA mitochondriální (mtDNA). Replikace mtDNA není vázaná na buněčný cyklus a dochází při ní k častému vzniku mutací. Velikost a genová rozmanitost mtDNA se mezi druhy liší, a to i v případě pivovarských kvasinek. Velikost mtDNA *S. cerevisiae* (S288c) je 85 779 bp. Spodně kvasící kvasinka *S. pastorianus* má velikost mtDNA 70 578 bp (Nakao et al., 2009). MtDNA je více citlivá na poškození nežli jaderná DNA, neboť je v přímém kontaktu s reaktivními molekulami kyslíku vznikajícími v mitochondriích (Kang a Hamasaki, 2002). Mutace mtDNA vedou ke vzniku dvou typů tzv. respiračně-deficientních (RD) mutantů: rho⁻ mutanty, jimž chybí část mtDNA, ale zbývající sekvence se amplifikují, a rho⁰ mutanty, jimž mtDNA zcela chybí (Jenkins et al., 2009).

Respiračně-deficientní mutace vznikají v menší míře samovolně; zvýšené procento mutací se tvoří např. vlivem působení ethanolu a hydrostatického tlaku (Jenkins et al., 2009). U pivovarských kvasinek je zvýšený výskyt RD-mutant (typ rho⁻) spojován zejména s jejich skladováním „pod pivem“ za současného působení vyšší teploty. Mutanty typu rho⁰ nebyly u pivovarských kvasinek zaznamenány, typ rho⁻ se vyskytuje běžně ve frekvenci 0,1–4% a může dosáhnout až 10% při dlouhodobém skladování kvasnic (Morrison a Suggett, 1983).

Součástí genomu jsou i mobilní genetické elementy (transposony), které se v rámci genomu dokáží přesouvat z místa na místo bez nutnosti replikace. Transposony kvasinek, nazývané Ty-elementy, mají délku kolem 6 Kb a jsou ohraničeny dlouhými terminálními repetičemi (LTR) o velikosti 35 bp (Xu a Boeke, 1987). Retrotransposony se vyskytují u většiny eukaryotických organismů a jejich způsob přenosu se podobá životnímu cyklu retrovirů. DNA sekvence retrotransposonů je nejdříve přepsána do RNA a poté reverzní transkripcí zpět do DNA (Curcio et al., 2015). U kvasinky *S. cerevisiae* se vyskytuje pět retrotransponálních rodin Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 a Ty5, lišících se procentuálním zastoupením a umístěním v genomu (Devine a Boeke, 1996; Chalker a Sandmeyer, 1992; Zou et al., 1996).

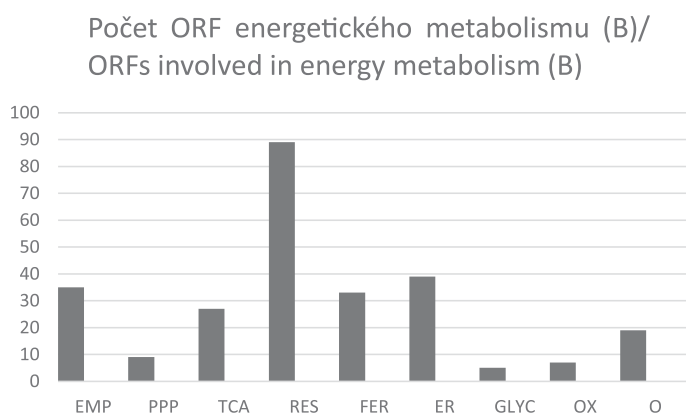
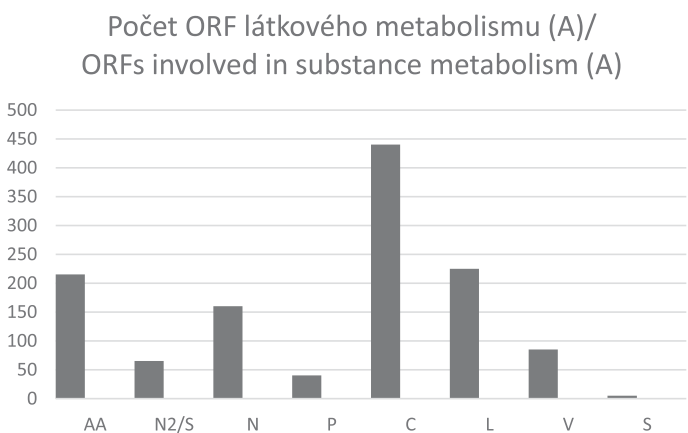
Retrotransponální sekvence jsou využívány k lokalizaci genů. Při transponální mutagenézi dochází k vyšší frekvenci vzniku mutací, než je tomu u jiných metod (např. mutagenéze navozena chemickými sloučeninami či UV zářením). Výhodou je i snadná identifikace mutantů s odlišným fenotypem. Konstrukce transponálních mutací je méně náročná než cílená genová mutagenéze. Není ale možné cílit na jeden určitý gen. Některé transposony upřednostňují specifické sekvence a transponální mutagenéze tak není striktně náhodná. Pro výzkumné účely jsou transposony často modifikovány. Centrální gen v transposonu může být označen nebo nahrazen požadovaným markerem (Xu et al., 2011). Geny regulované zinkem, vyskytující se v genomu kvasinek, byly identifikovány za pomoci označených transponů. Zinek je důležitým kofaktorem v metabolismu kvasinek. Nedostatek se může projevovat narušením procesů

ple, anise) than type Saaz (Gibson et al., 2013). In addition to DNA, yeasts have also mitochondrial DNA (mtDNA). Replication of mtDNA is not dependent on the cell cycle, and many mutations occur during this process. The size and gene diversity of mtDNA differs between species, and also between brewer's yeasts. The size of *S. cerevisiae* (S288c) mtDNA is 85 779 bp while the bottom-fermenting *S. pastorianus* has mtDNA with 70 578 bp (Nakao et al., 2009). MtDNA is more susceptible to damage than nuclear DNA, because mtDNA is in direct contact with reactive oxygen molecules generated in the mitochondria (Kang and Hamasaki, 2002). Mutations of mtDNA lead to the two types of respiratory-deficient (RD) mutants: rho⁻ mutants which do not have a part of mtDNA but remaining sequences are amplified, and rho⁰ mutants which have no mtDNA (Jenkins et al., 2009).

Respiratory-deficient mutations are formed to a lesser extent spontaneously; an increased percentage of mutations is formed for example by the influence of ethanol and hydrostatic pressure (Jenkins et al., 2009). An increased occurrence of RD-mutants (rho⁻ type) of brewer's yeasts is mainly associated with their storage "under beer" at a higher temperature. Rho⁰ mutants weren't found in brewer's yeasts, rho⁻ mutation occurs with a frequency of 0.1–4% up to 10% in long-term stored yeast (Morrison and Suggett, 1983).

The genome also includes mobile genetic elements (transposons) that can move from one place to another place without a replication. Transposons of yeasts are called Ty-elements. Ty-elements have about 6 Kb and are bounded by long terminal repeats (LTR) containing 35 bp (Xu and Boeke, 1987). Retrotransposons occur in most eukaryotic organisms and their mode of transmission is like the life cycle of retroviruses. The DNA sequence of retrotransposons is first transcribed into RNA and then reverse transcribed back into DNA (Curcio et al., 2015). *S. cerevisiae* has five retrotransposon families: Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 and Ty5, which differ in per cent representation and genome locations (Devine and Boeke, 1996; Chalker and Sandmeyer, 1992; Zou et al., 1996).

Retrotransposon sequences are used to localize genes. Transposon mutagenesis generates more mutations than other methods (e.g. mutagenesis induced by chemical compounds or UV radiation). An advantage is an easy identification of mutants with a different phenotype. The construction of transposon mutations is less demanding than targeted gene mutagenesis. However, it isn't possible to target only one gene. Some transposons prefer specific sequences, and transposon mutagenesis isn't strictly random. Transposons are often modified for research purposes. The central gene in the transposon may be marked or replaced by the required marker (Xu et al., 2011). Genes in yeast genome which are regulated by zinc have been identified by using marked transposons. Zinc is an important cofactor in yeast metabolism. The deficiency of zinc can be manifested by disruption of some processes such as flocculation and vacuolization of cells. These phenotypic manifestations were observed in *ZAP1*



Obr. 1 Počet otevřených čtecích rámců zapojených do látkového (A) a energetického (B) metabolismu. A: AA – aminokyselina, N₂/S – dusík a síra, N – nukleotidy, P – fosfát, C – uhlíkaté sloučeniny a karbohydráty, L – lipidy, mastné kyseliny, isoprenoidy, V – vitamíny, kofaktory, S – sekundární metabolity; B: EMP – glykolyza a glukogenese, PPP – pentosafosfátová dráha, TCA – dráha trikarboxylových kyselin, RES – respirace, FER – fermentace, ER – energetické rezervy (glykogen, trehalosa), GLYC – glyoxalátový cyklus, OX – oxidace mastných kyselin, O – další aktivity energetického metabolismu (Förster et al., 2003; upraveno). / Fig. 1 Number of open reading frames involved in substance (A) and energetic (B) metabolism. A: AA – amino acid, N₂ / S – nitrogen and sulfur, N – nucleotides, P – phosphate, C – carbon compounds and carbohydrates, L – lipids, fatty acids, isoprenoids, V – vitamins, co-factors; B: EMP – glycolysis and gluconeogenesis, PPP – pentose phosphate pathway, TCA – tricarboxylic acid pathway, RES – respiration, FER – fermentation, ER – energy reserves (glycogen, trehalose), GLYC – glyoxalate cycle, OX – other activities of energy metabolism (Förster et al., 2003; modified).

flokulace a vakuolisace buněk. Tyto fenotypové projevy byly pozorovány u *ZAP1* mutantů, kteří mají narušen příjem zinku. Zinkem regulované elementy jsou přítomny v promotoru genu *FLO1*, který se podílí na řízení procesu flokulace. Vakuolisace buněk je podmíněna genem *FAB1* kódujícím fosfatidylinositol-3-fosfát-5-kinasu (Gary et al., 1998). Na udržování správné koncentrace fosfatidylinositol-3-fosfát-5-kinasy se podílí nejméně jeden *ZAP1* dependentní gen (Yuan, 2000).

Se strukturou genomu je spjata syntéza proteinů. Proteiny ovlivňují metabolické pochody a vznik metabolitů. U kvasinky *S. cerevisiae* je do metabolických pochodů zahrnuto 16% genů. Bylo identifikováno přibližně 1000–1500 metabolických procesů spojených s téměř 800 otevřenými čtecími rámci („open reading frame“, ORF) (Nookaew et al., 2008). Největší procento genů energetického metabolismu je zapojeno v procesu dýchání. V látkovém metabolismu připadá největší podíl otevřených čtecích rámců na produkci uhlíkatých látek (obr. 1). Kvasinky vytváří nespočet metabolitů, díky kterým nacházejí uplatnění v průmyslu. Při výrobě piva a vína hrají významnou roli sensoricky aktivní látky, a to zejména: alkoholy, estery, acetaldehydy, těkavé kyseliny, monoterpenoidy, glycerol, sírné sloučeniny a vicinální diketony.

3 STRESOVÉ FAKTORY PŮSOBÍCÍ NA KVASINKY PŘI VÝROBĚ PIVA A VÍNA

Buňky *S. cerevisiae* jsou při výrobě piva a vína vystaveny mnoha stresovým faktorům: změnám koncentrace kyslíku, osmotického potenciálu, pH, koncentrace ethanolu, dostupnosti živin, teplotnímu stresu atd. Stresové faktory mají vliv na konečnou chuť a kvalitu kvasných produktů (Gibson et al., 2007).

Kvasinky reagují na stresové podmínky utlumením nebo zvýšením exprese některých genů, přičemž se jedná o cca 900 genů (Gasch, 2003). Reakce na stres je krátkodobá. Významnou roli hraje proteolýza odstraňující nežádoucí bílkoviny. *S. cerevisiae* disponuje dvěma různými proteolytickými systémy: lysosomální systém obsahující řadu nespecifických peptidas a systém s vysoce specifickými peptidasami v jiné části buňky (Hilt a Wolf, 1992).

U *S. cerevisiae* existují dvě hlavní cesty stresové odpovědi. Reakce tepelného šoku je zprostředkovávána tzv. transkripčními faktory tepelného šoku a globální stresová reakce, která je aktivována řadou stresových faktorů a která je řízena pravděpodobně 200 geny. Expres těchto genů je závislá na přítomnosti elementu STRE (Gibson et al., 2007). V buňce *S. cerevisiae* byl element STRE poprvé identifikován v *CTT1* genu exprimovaného v závislosti na působení stresových faktorů (Marchler et al., 1993). Element STRE byl nalezen i v genu *DDR2*, u kterého dochází až k dvacetinásobnému zvýšení transkripce při stresu (Kobayashi a McEntee, 1993). Proteiny Msn2 a Msn4 regulující transkripci genů s promotorem STRE jsou přítomné v celé řadě reakcí zapříčiněných stresem. Při působení jednoho stresového faktoru tak dochází k navození odolnosti i vůči jiným stresovým faktorům (Boy-Marcotte et al., 1998).

Problematika stresových faktorů je již zpracována v celé řadě publikací (např. Albertyn et al., 1994; Belloch et al., 2008; François a Parrou, 2001; Gasch, 2003; Gijs et al., 2002; Gibson et al., 2007; Gray et al., 2004; Gualtieri et al., 2004; Klis et al., 2002; Nass a Rao, 1999; Novák et al., 2006; Sigler a Matoulková, 2011; Smart, 2017; Tamás et al., 2000). V této práci jsou některé ze stresových faktorů blíže zmíněny v jednotlivých kapitolách zabývajících se produkcí sensoricky významných látek.

4 METABOLISMUS KVASINEK

U kvasinek *Saccharomyces*, které jsou označovány jako fakultativně-anaerobní, se vyskytují dva různé způsoby využívání cukrů: energeticky výhodnější aerobní dýchání (respirace) a anaerobní alkoholové kvašení (fermentace). Volba mezi těmito dvěma typy respirace je závislá zejména na dostupnosti kyslíku. Dalšími regulačními mechanismy, při nichž se uplatňuje zejména koncentrace glukosy, je tzv. Crabtree efekt (Díaz-Ruiz et al., 2008; Fukuhara, 2003; Lagunas et al., 1982). Při Crabtree efektu dochází k inhibici respirace v důsledku vysoké koncentrace glukosy, a to i přes vysoký obsah kyslíku v kultivačním prostředí. Crabtree efekt se neprojevuje u všech kvasinek. *Saccharomyces cerevisiae* se projevuje jako Crabtree pozitivní. Přesný mechanismus Crabtree efektu není dodnes vysvětlen. Velký význam v tomto procesu má zřejmě fruktosa-1,6-difosfát, který reguluje oxidativní fosforylaci a tím inhibuje mitochondriální respira-

mutants which have impaired zinc intake. Zinc-regulated elements are in the promoter of the *FLO1* gene, which is involved in flocculation control. Vacuolization of cells is conditioned by the *FAB1* gene encoding phosphatidylinositol-3-phosphate-5-kinase (Gary et al., 1998). The correct phosphatidylinositol-3-phosphate-5-kinase concentration is affected by at least one *ZAP1* dependent gene (Yuan, 2000).

The structure of the genome is linked to the synthesis of proteins. Proteins affect metabolic processes and synthesis of metabolites. *S. cerevisiae* has 16% of genes that are included in metabolic processes. Approximately 1000–1500 metabolic processes associated with nearly 800 open reading frames (ORFs) have been identified (Nookaew et al., 2008). The largest percentage of energy metabolism genes is involved in the respiration process. The largest share of open reading frames in the substance metabolism is in the production of carbonaceous substances (Fig. 1). Yeasts generate many metabolites that are used in the industry. Sensory-active substances, especially: alcohols, esters, acetaldehydes, volatile acids, monoterpenoids, glycerol, sulfur compounds and vicinal diketones, play a significant role in the production of beer and wine.

3 STRESS FACTORS AFFECTING YEASTS DURING BEER AND WINE PRODUCTION

S. cerevisiae cells are exposed to many stress factors during beer and wine production: changes in the concentration of oxygen, osmotic pressure, pH, ethanol concentration, availability of nutrients, temperature stress, etc. Stress factors influence the final taste and a quality of fermentation products (Gibson et al., 2007).

Yeasts respond to stress factor by attenuating or increasing the expression of some genes (about 900 genes) (Gasch, 2003). The response to stress is short-term. The proteolysis that removes unwanted proteins plays an important role. *S. cerevisiae* makes use of two different proteolytic systems: a lysosomal system with many nonspecific peptidases and a system of highly specific peptidases in another part of the cell (Hilt and Wolf, 1992).

S. cerevisiae has two main ways of stress response. The heat shock reaction is mediated by the so-called transcription factors of heat shock and global stress reaction, which is activated by a number of stress factors and is probably controlled by 200 genes. The expression of these genes is dependent on the STRE element (Gibson et al., 2007). The STRE element of *S. cerevisiae* was first identified in the *CTT1* gene that was expressed in response to stress factors (Marchler et al., 1993). The STRE element has also been found in the *DDR2* gene, which is up to twenty times more transcribed under stress (Kobayashi and McEntee, 1993). The proteins Msn2 and Msn4 regulate transcription of genes with the STRE promoter and are present in many stress-induced reactions. If one stress factor acts on a cell, resistance to other stress factors is induced (Boy-Marcotte et al., 1998).

The problem of stress factors has already been dealt with in a number of publications (např. Albertyn et al., 1994; Belloch et al., 2008; François and Parrou, 2001; Gasch, 2003; Gijs et al., 2002; Gibson et al., 2007; Gray et al., 2004; Gualtieri et al., 2004; Klis et al., 2002; Nass and Rao, 1999; Novák et al., 2006; Sigler and Matoulková, 2011; Smart, 2017; Tamás et al., 2000). In this publication, some of the stress factors are mentioned in the individual chapters dealing with the production of sensory substances.

4 METABOLISM OF YEASTS

Saccharomyces, usually described as facultative anaerobic, possesses two different ways of sugar utilization: energetically more efficient aerobic respiration and anaerobic alcoholic fermentation. Metabolic trigger that switches between these two modes depends on the availability of oxygen. Further regulation mechanism including mainly effect of glucose concentration is so-called Crabtree effect (Díaz-Ruiz et al., 2008; Fukuhara, 2003; Lagunas et al., 1982). During the Crabtree effect, high concentration of glucose inhibits the respiration even if there is a sufficient concentration of oxygen. The Crabtree effect doesn't occur in all yeasts. *Saccharomyces cerevisiae* appears to be Crabtree positive. The exact mechanism of the Crabtree effect hasn't been explained. Fructose-1,6-diphosphate, which regulates oxidative phosphorylation and thus inhibits mitochondrial respiration, is of a great importance in this process (Díaz-Ruiz et al., 2008). Crabtree positive yeasts have lower biomass, because part of the

ci (Díaz-Ruiz et al., 2008). U Crabtree pozitivních kvasinek vzniká ve výsledku nižší množství biomasy, protože část glukosy je přeměněna na ethanol. Kvasinky musí konzumovat více glukosy, aby poskytly stejné množství biomasy jako Crabtree negativní kvasinky (obr. 2). U kvasinek Crabtree pozitivních by tento proces vedl ke zpomalení růstu, kvasinky pravděpodobně využívají ethanol ke snížení mikrobiální konkurence.

U některých kvasinek se vyskytuje Pasteurův efekt, při kterém dochází ke zpomalení glykolysy v aerobním prostředí. Veškerý pyruvát vzniklý glykolysou je využit v Krebsově cyklu, fermentace je potlačena. Tento efekt má odlišný vliv na fermentující kvasinky, mezi které patří i *S. cerevisiae*. Pokud *S. cerevisiae* roste v médiu s dostatkem glukosy a dusíku, pak se inhibice fermentace v exponenciální fázi růstu neprojevuje. *Saccharomyces cerevisiae* využívá v exponenciální fázi aerobní respiraci přibližně z 3–20%. Při vyčerpání zdroje dusíku a přechodu buněk do stacionární fáze dochází k potlačení fermentace a využití aerobního dýchání je zvýšeno o 25–100%. Nedostatek dusíku a tím způsobený nedostatek amoniakových iontů pravděpodobně vede k potlačení aktivity fosfofruktokinasy, která je významným regulátorem procesu glykolysy (Lagunas et al., 1982).

Růst kvasinek je ovlivněn i typem cukerného substrátu. Některé typy cukrů neumožňují růst kvasinek za anaerobních podmínek. Mechanismus Kluverova efektu je pravděpodobně založen na rozdílné rychlosti transportu odlišných typů cukrů do buňky. Cukry s pomalou rychlostí transportu neposkytují dostatečný tok substrátu pro fermentaci, zatímco při aerobním dýchání je dostačující i nízká koncentrace substrátu v buňce (Fukuhara, 2003).

Výkonnost metabolismu může být ovlivněna i velikostí kvasničných buněk. Menší buňky produkují více organických kyselin a spotřebovávají více základních látek (např. lysin), což ovlivňuje pH. Při výrobě piva se pH prostředí pohybuje na začátku kvašení na hodnotě 5,0–5,2 a končí na 3,8–4,0. Ve víně se pH média/prostředí pohybuje v rozmezí 2,75 až 4,2 (Belloch et al., 2008). Hodnota pH je klíčovým faktorem, který ovlivňuje chuť a aroma produktů. Nižší pH zvyšuje aktivitu enzymů, zvyšuje přeměnu acetolaktátu na diacetyl a omezuje produkci dimethylsulfidu v průběhu fermentace. Naproti tomu zvýšení hodnoty pH podporuje tvorbu esterů, flokulaci kvasinek a využití chmele, zvyšuje isomeraci alfa-kyselin a vyčiření piva (Gijs et al., 2002). S velikostí buňky roste i produkce esterů kyseliny octové, podmíněná zvýšenou aktivitou alkoholacetyltransferasy. Naopak aktivita esterasy s růstem buněk klesá. Pivo vyrobené za použití větších kvasinek mělo ve většině případů lepší chuť a stabilitu. Nicméně velikost buněk není jedinou určující determinantou stability, důležitou roli hrají kultivační podmínky (Shimizu et al., 2001).

4.1 Katabolismus glukosy

Transmembránový přenos glukosy je u *S. cerevisiae* kódován nejméně 20 geny (*HXT* geny). Proteiny Snf3 a Rtg2 jsou glukosové receptory indukující signál pro genovou expresi genů *HXT*. Snf3 s vysokou afinitou reaguje na nízkou hladinu glukosy, naopak Rtg2 je receptorem pro vyšší hladinu glukosy. Různá hladina glukosy vyvolává expresi odlišných genů. Gen *HXT1* je exprimován v závislosti na vysoké hladině glukosy, kdežto geny *HXT2* a *HXT4* jsou transkribovány v reakci na nízkou. Expresí genů *HXT* je ovlivněna proteinem Rgt1, který se v nepřítomnosti glukosy váže na promotory genů *HXT* a potlačuje jejich expresi. Pokud je glukosa přítomna, dochází k inaktivaci represoru Rtg1 (Özcan et al., 1998). Z 1 molu glukosy se v průběhu glykolysy (Embden-Meyerhof-Parnasova dráha) vytváří

glukose is converted to ethanol. Yeast must consume more glucose to produce the same amount of biomass as Crabtree negative yeasts (Fig. 2). This process would lead to slowing down the growth of Crabtree positive yeasts. Yeasts probably use ethanol to reduce microbial competition.

Some yeasts exhibit Pasteur effect in which glycolysis slows down in the aerobic environment. All pyruvate produced by glycolysis is utilized in the Krebs cycle and fermentation is suppressed. This effect has a different effect on fermenting yeast, including *S. cerevisiae*. If *S. cerevisiae* grows in a medium with sufficient concentration of glucose and nitrogen, then inhibition of fermentation in the exponential growth phase doesn't occur. In the exponential phase, *Saccharomyces cerevisiae* uses aerobic respiration approximately from 3–20%. Fermentation is suppressed and aerobic respiration is increased by 20–100%, when nitrogen is exhausted and the cells are transferred to the stationary phase. Phosphofructokinase is a significant regulator of the glycolytic process. The activity of phosphofructokinase is suppressed in the absence of ammonium ions due to nitrogen deficiency (Lagunas et al., 1982).

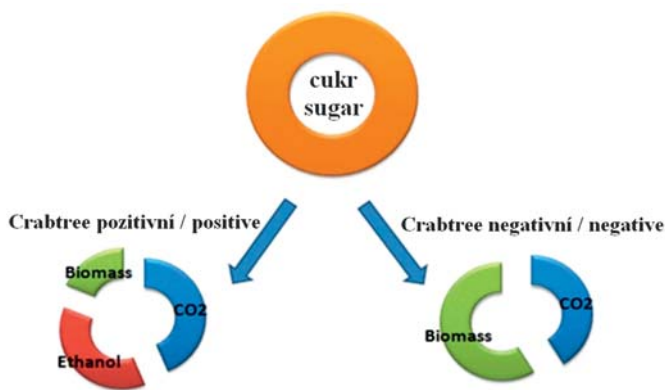
The type of sugar substrate also affects yeast growth. Some types of sugars don't allow growth of yeast under anaerobic conditions. The mechanism of Kluver effect is probably based on different rates of sugar transport into the cell. Different sugars have different speed of transport. Sugars with a slow rate of transport don't provide enough substrate for fermentation, whereas the low concentration of substrate is sufficient for aerobic respiration (Fukuhara, 2003).

The metabolic rate can also be affected by the size of yeast cells. Smaller cells produce more organic acids and consume more basic substances (e.g. lysine). This affects the pH. In beer production, the pH of medium is 5.0–5.2 at the beginning of fermentation and 3.8–4.0 at the end. In wine, the pH of the medium/environment is from 2.75 to 4,2 (Belloch et al., 2008). The pH value is a key factor influencing the taste and aroma of final products. Lower pH increases the activity of enzymes and the conversion of acetolactate to diacetyl. It also limits the production of dimethyl sulfide during fermentation. In contrast, a higher pH promotes the formation of esters, flocculation of yeast and utilization of hops, increases alpha-acid isomerization and beer clarification (Gijs et al., 2002). With increasing cell size the production of acetic acid esters increases due to increased alcohol acetyltransferase activity. Conversely, the activity of esterase decreases with cell growth. Beer made using larger yeast has in most cases better taste and stability. However, cell size isn't only one determinant of stability; culture conditions also play an important role (Shimizu et al., 2001).

4.1 Glucose catabolism

In *S. cerevisiae*, the transmembrane transfer of glucose is encoded by at least 20 genes (*HXT* genes). The Snf3 and Rtg2 proteins are glucose receptors that induce a signal for the expression of *HXT* genes. Snf3 protein with high affinity reacts to low glucose level, Rtg2 protein is a receptor for higher glucose level. Different levels of glucose cause expression of different genes. *HXT1* gene is expressed depending on a high glucose level, *HXT2* and *HXT4* are transcribed in response to a low concentration of glucose. The expression of *HXT* genes is influenced by Rgt1 protein. If glucose is deficient, the Rgt1 protein binds to the promoter of *HXT* genes. Rgt1 linked to the promoter suppresses expression of *HXT* genes. When glucose is present, Rgt1 repressor is inactivated (Özcan et al., 1998). During the glycolysis, two molecules of pyruvate and 2 ATP are generated from 1 molecule of glucose. Glucose is converted to fructose-1,6-diphosphate, which is then split into two tricarbon compounds. Two molecules of ATP are consumed in this process. In the second phase, glyceraldehyde-3-phosphate is gradually converted to pyruvate and 4 ATP molecules are formed (Teusink et al., 2000). Pyruvate is converted under aerobic conditions by oxidative decarboxylation to acetyl CoA, which enters to Krebs cycle (van Rossum et al., 2016).

The Krebs cycle (citrate cycle) is central to the catabolism of proteins, carbohydrates and lipids. The Krebs cycle metabolic pathway is an aerobic sequence of chemical reactions that oxidize cyclic acetyl residues in the form of acetyl-CoA. Acetyl-CoA is oxidized to CO₂ to produce energy and reduced cofactors. Electrons from reduced cofactors are passed into the respiratory process. Reductive equivalents are oxidized in the respiratory process and ADP is phosphorylated to ATP. The citrate cycle is a catabolic process sited in mitochondria. It is an amphibolic process, some intermediates enter other anabolic processes. In the citrate cycle, 3 NADH and 1 FADH₂ are formed from 1 molecule of glucose. The yield is 36 ATP molecules (Lodish et al., 2000).



Obr. 2 Crabtree efekt (Dashko et al., 2014; upraveno) / Fig. 2 Crabtree effect (Dashko et al., 2014; modified).

dvě molekuly pyruvátu a 2 ATP. Při glykolýse dochází k přeměně glukosy na fruktosa-1,6-difosfát, který je následně rozštěpen na dvě tříuhlíkaté sloučeniny. Při tomto procesu jsou spotřebovány 2 molekuly ATP. V druhé fázi dochází postupně k přeměně glycerinaldehyd-3-fosfátu na pyruvát za vzniku 4 molekul ATP (Teusink et al., 2000). Pyruvát je za aerobních podmínek přeměněn oxidativní dekarboxylací na acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu (van Rossum et al., 2016).

Krebsův cyklus (citrátový cyklus) je metabolická dráha, do níž vstoupí katabolismus proteinů, sacharidů i lipidů. Jedná se o aerobní cyklickou sekvenci chemických reakcí, při kterých dochází k oxidaci acetylových zbytků vstupujících do cyklu ve formě acetyl-CoA. Ten je oxidován na CO_2 za vzniku energie a redukováných kofaktorů, které předávají své elektrony dále do dýchacího řetězce. Redukční ekvivalenty jsou oxidovány v dýchacím řetězci a následuje fosforylace ADP na ATP. Citrátový cyklus je katabolický děj probíhající v mitochondriích, některé meziproducty směřují do dalších anabolických dějů, tudíž se jedná o amfibolický děj. V citrátovém cyklu připadají na každou molekulu acetyl-CoA 3 molekuly NADH a 1 molekula FADH_2 s výtěžností 12 molekul ATP. Celkově se při aerobním dýchání vytvoří 36 molekul ATP (Lodish et al., 2000).

4.2 Ethanolové kvašení

Všechny kvasné procesy mají společnou počáteční dráhu (Embden-Meyerhof-Parnasova dráha), která vede ke vzniku pyruvátu. Za anaerobních podmínek dochází při alkoholovém kvašení k dekarboxylaci pyruvátu enzymem pyruvátdekarboxylasou. Uvolněné elektrony jsou přijímány jinými organickými sloučeninami. Vzniklý acetaldehyd je redukován enzymem alkoholdehydrogenasou na ethanol. Ačkoliv tvorba alkoholu nemění pH buňky, je množství vytvořeného alkoholu omezené (Klouda, 2013).

Před rokem 1996 bylo u *S. cerevisiae* známo jen pět alkoholdehydrogenas. Sekvencování genomu umožnilo odhalit existenci dalších dvou. AdhI, AdhII a AdhV jsou lokalizovány v cytosolu, AdhIII a AdhIV v mitochondriální matrix. Lokalizace AdhVI a AdhVII není známa (De Smidt et al., 2008). Alkoholdehydrogenasy AdhI a AdhII v cytosolu a AdhIII v mitochondriální matrix se od sebe liší sekvencí aminokyselin, podobnost mezi Adh je přibližně 80-90 %, rozdíl je pouze v N-konci AdhIII, který obsahuje 27 aminokyselin zodpovědných za lokalizaci AdhIII v matrix (van Loon a Young, 1986).

AdhI se specializuje na tvorbu ethanolu v anaerobních podmínkách nebo v nadbytku glukosy, AdhII tvoří ethanol převážně z glukosy nahromaděné za aerobních podmínek. Mimo konverze acetaldehydu na ethanol je důležitá funkce udržování stabilní hladiny NAD^+ (oxidovaná forma NAD) a NADH (redukováná forma NAD). AdhIII hraje roli v reoxidaci a exportu NADH z mitochondrií do cytosolu (De Smidt et al., 2008). Mutace v genu pro expresi proteinu AdhIV neovlivňuje tvorbu ethanolu, nicméně AdhIV může při nedostatečném množství zinku zastoupit roli inhibovaného AdhI a AdhIII (Bird et al., 2006).

Na základě schopnosti redukovat acetaldehyd na ethanol i v nepřítomnosti enzymů AdhI až AdhIV se předpokládá, že AdhV má schopnost vytvářet ethanol (Drewke et al., 1990). AdhVI je NADPH specifická alkoholdehydrogenasa a akceptuje široké množství substrátů od alkoholů po aldehydy. AdhVII má 64% podobnost s proteinem AdhVI a vykazuje širokou substrátovou specifitu. AdhVI a AdhVII nejsou bezpodmínečně nutné pro přežití kvasinek. Oba enzymy se mohou účastnit NADP (H) homeostasy nebo degradace ligninu (Larroy et al., 2002).

Při výrobě piva jsou kvasinky běžně vystaveny koncentraci ethanolu v rozmezí cca 3–6 obj. %, při vaření piva o vysoké stupňovitosti může koncentrace dosahovat až 10 obj. % (Gibson et al., 2007). Nadměrné množství ethanolu způsobuje nežádoucí změny v metabolismu, stavbě buněk a v extrémních případech i buněčnou smrt. Buněčná membrána ztrácí působením ethanolu svou propustnost, fluiditu a integritu. Permeabilita membrán je ovlivněna Mg^{2+} ionty, které ovlivňují toleranci buněk k ethanolu (Hu et al., 2003). Expozice buněk *S. cerevisiae* NCYC 1681 po dobu 10 minut 30% ethanolom způsobuje pokles viability na 9%, po hodinové expozici je viabilita buněk nulová (Canetta et al., 2006).

Buňka kvasinek obsahuje nenasycené mastné kyseliny (např. palmitolejová, olejová), jejichž vznik je podmíněn genem *OLE1*. Toleranci k ethanolu zajišťuje především kyselina olejová (You et al., 2003). Zvýšená koncentrace ethanolu má na buňky podobný účinek jako zvýšená teplota a tyto dva děje se navzájem ovlivňují, jsou synergické (zvýšení propustnosti membrány, snížení fluidity membrán, snížení intracelulárního pH, inhibice glykolýsy). Pokud teplota stoupá, tolerance k ethanolu je značně snížena. Další látka, která zacho-

4.2. Ethanol fermentation

All fermentation processes have a common initial pathway (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) in which a pyruvate is formed. In alcohol fermentation (anaerobic conditions), pyruvate is decarboxylated by pyruvate decarboxylase. Released electrons are accepted by other organic compounds. The resulting acetaldehyde is reduced by alcohol dehydrogenase to ethanol. Although alcohol production doesn't change the pH of a cell, the alcohol production is limited (Klouda, 2013).

Before 1996, only five alcohol dehydrogenases were known for *S. cerevisiae*. Sequencing revealed two other alcohol dehydrogenases. AdhI, AdhII and AdhV are located in the cytosol, AdhIII and AdhIV in the mitochondrial matrix. The location of AdhVI and AdhVII isn't known (De Smidt et al., 2008). The cytosolic alcohol dehydrogenases AdhI and AdhII and the mitochondrial AdhIII differ from each other in the amino acid sequence. The similarity between individual Adh enzymes is approximately 80-90%. The difference is only at the N-terminus of AdhIII, which contains 27 amino acids. These amino acids are responsible for the localization of AdhIII in the matrix (van Loon and Young, 1986).

AdhI specializes in the formation of ethanol under anaerobic conditions or in excess of glucose. AdhII forms ethanol mainly from glucose accumulated under aerobic conditions. Another important function of Adh is to maintain a stable level of NAD^+ (oxidized form of NAD) and NADH (reduced form of NAD). AdhIII plays a role in the reoxidation and export of NADH from mitochondria to cytosol (De Smidt et al., 2008). Mutation in the gene for expression of AdhIV doesn't affect the formation of ethanol. However, in the absence of zinc AdhIV may represent the role of the inhibited AdhI and AdhIII (Bird et al., 2006).

The reduction of acetaldehyde to ethanol also occurs in the absence of AdhI and AdhIV. Therefore, it is assumed that AdhV can also produce ethanol (Drewke et al., 1990). AdhVI is NADPH-specific and accepts a wide variety of substrates from alcohols to aldehydes. AdhVII has a 64% similarity to AdhVI and has broad substrate specificity. Yeast survival isn't unconditionally dependent on the AdhVI and AdhVII. Both enzymes may participate in NADP (H) homeostasis or lignin degradation (Larroy et al., 2002).

In the production of beer, yeast is normally exposed to an ethanol concentration in the range of about 3-6 vol. %. The ethanol concentration for high-grade beers is 10 vol. % (Gibson et al., 2007). Excessive amounts of ethanol cause undesirable changes in metabolism and structure of yeast cells. Ethanol causes loss of permeability, fluidity and integrity of cell membrane and can also induce cell death. Membrane permeability is influenced by Mg^{2+} ions, which affect cell tolerance to ethanol (Hu et al., 2003). If *S. cerevisiae* NCYC 1681 is exposed to 30% ethanol for 10 minutes, the viability decreases to 9%. After an hour exposure, cells viability drops to zero (Canetta et al., 2006).

The yeast cells contain unsaturated fatty acids (e.g. palmitoleic, oleic), which are affected by the *OLE1* gene. Tolerance to ethanol is mainly provided by oleic acid (You et al., 2003). Increased ethanol concentration has a similar effect as elevated temperature; their effects are synergistic (increased penetration of membrane, decreased membrane fluidity, reduction of intracellular pH and inhibition of glycolysis). If the temperature rises, tolerance to ethanol is greatly reduced. Trehalose also preserves the structural and functional integrity of yeast membranes. Trehalose concentration increases with the presence of stress factors. A positive relationship was observed between cell viability and trehalose concentration. Trehalose alleviates the ethanol-induced leakage of electrolytes from the cell. Trehalose deficient *S. cerevisiae* YN158 was less resistant to ethanol than the YN162 strain able to form trehalose (Fig. 3).

The effect of stress factors causes the expression of antioxidant proteins. The Ctt1 protein (Catalase T) protects the cell against the oxidative effect of ethanol and the Sod1 protein (superoxide dismutase) is expressed at the same time. These proteins were also observed in *S. cerevisiae* K310, which was isolated from wine fermentation (Trabalzini et al., 2003).

4.3 Chemical compounds affect the quality of fermented beverages

4.3.1 Higher alcohols

Higher alcohols are produced by yeast metabolism as a by-product of amino acid synthesis from pyruvate (anabolic pathway) or catabolism of amino acids (Moir, 1992). Amino acids contained in a substrate (a brewer's wort, a grape must, etc.) are absorbed by

vává strukturální a funkční integritu membrán kvasinek, je trehalosa. Koncentrace trehalosy se při působení stresových faktorů zvyšuje. Pozitivní vztah byl pozorován mezi životaschopností buněk a obsahem trehalosy. Trehalosa zmírnila únik elektrolytů z buňky vyvolaný ethanolem. Kmen *S. cerevisiae* YN158, trehalosa deficitní, byl méně odolný vůči působení ethanolu než kmen YN162, který byl schopen trehalosu tvořit (obr. 3).

Při působení stresových faktorů dochází k expresi antioxidantních proteinů. Protein Ctt1 (katalasa T) chrání buňku před oxidačním účinkem ethanolu, současně dochází k expresi proteinu Sod1 (superoxid-dismutasa). Tyto proteiny byly pozorovány i u kmene *S. cerevisiae* K310 izolovaného z fermentace vína (Trabalzini et al., 2003).

4.3 Chemické sloučeniny ovlivňující kvalitu kvašených nápojů

4.3.1 Vyšší alkoholy

Vyšší alkoholy jsou v metabolismu kvasinek vytvářeny jako vedlejší produkty syntesy aminokyselin z pyruvátu (anabolická dráha) nebo při katabolismu aminokyselin (Moir, 1992). Aminokyseliny obsažené v substrátu (pivovarské mladíně, hroznovém moštu atd.) jsou vstřebávány kvasinkami a dále metabolisovány v procesu označovaném jako Ehrlichova dráha. Ehrlichova dráha se skládá ze tří kroků: transaminace aminokyseliny na kyselinu α -keto, dekarboxylace kyseliny α -keto na aldehyd a redukce aldehydu na alkohol (Pires et al., 2014).

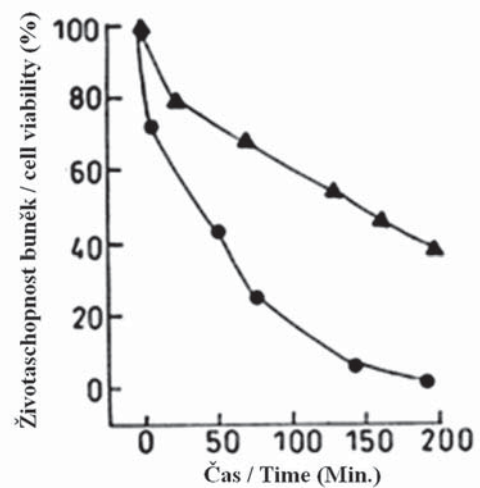
Aminokyseliny jsou kvasinkami v průběhu kvašení přijímány v určitém pořadí, resp. ve skupinách, dle priority pro buňku – asimilace některých aminokyselin podléhá regulaci, tzv. katabolické represí dusíkem (Procopio et al., 2011).

Aminokyseliny jsou přenášeny do buňky pomocí několika transportérů obsažených v buněčné membráně kvasinek. U *S. cerevisiae* CB11 bylo popsáno 7 permeas kódovaných geny *AGP3*, *ALP1*, *MMP1*, *MUP1*, *SAM3*, *TAT1* a *TAT2* s úzkou substrátovou specifičitou. A další 4 permeasy kódované geny *AGP1*, *GNP1*, *DIP5* a *BAP2* se širokou substrátovou specifičitou. Každá permeasa přenáší specifické aminokyseliny, například permeasa kódovaná genem *BAP2* translokují valin, leucin a isoleucin (Procopio et al., 2011).

Po přenesení aminokyselin do buňky následuje první krok Ehrlichovy dráhy, kterým je transaminace. Transaminace je u *S. cerevisiae* řízena geny *BCCA* (mitochondriální a cytosolové aminokyseliny s rozvětvenými řetězci), *BAT1* a *BAT2* (aminotransferasy) a *ARO8*, *ARO9* (aminotransferasy aromatických aminokyselin). Při transaminaci dochází k přenosu aminoskupiny z aminokyseliny za vzniku α -ketokyseliny, která podléhá dekarboxylaci (Pires et al., 2014). Do α -keto dekarboxylace je zapojeno pravděpodobně pět proteinů: pyruvátdekarboxylasy *Pdc1*, *Pdc5* a *Pdc6*, fenylpyruvátdekarboxylasa *Aro10* a karboxylasa *Thi3*. Karboxylasa *Thi3* je mimo jiné zapojena v biosyntese thiaminu. Při dekarboxylaci dochází k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny. Poslední krok přeměny, redukce aldehydů na alkoholy, je katalyzován alkoholdehydrogenasami (*Adh1p*, *Adh7p*), formaldehyddehydrogenasou (*Sfa1p*), 3-methylbutanalreduktasou (*Gre2p*), aldo-keto reduktasou (*Ypr1p*) a alespoň jednou arylalkoholdehydrogenasou (*Aad6p*). Dále jsou s Ehrlichovou cestou spojeny geny *PAD1* a *SPE1* kódující karboxylasy a dva geny *OYE2* a *HOM2* kódující dehydrogenasy (Cordente et al., 2012). Při oxidaci aldehydů za pomoci aldehyddehydrogenas dochází ke vzniku těkavých kyselin. Rovnováha mezi oxidací a redukcí aldehydů závisí na kultivačních podmínkách. V aerobních podmínkách v limitní koncentraci glukosy a dostatku aminokyselin (leucin, methionin, fenylalanin) dochází téměř výlučně k převodu aldehydů na kyseliny (Hazelwood et al., 2008).

Transkripce genů *S. cerevisiae* podílejících se na katabolismu aromatických aminokyselin (*ARO9* a pravděpodobně i *ARO10*) je regulována za pomoci proteinu *Aro80* (součást rodiny proteinů *Zn2Cys6*) a transkripčních faktorů rodiny GATA. *Aro80* se váže na promotory genů *ARO9* a *ARO10* a za přítomnosti aminokyselin aktivuje transkripci. Faktory GATA, které se skládají ze dvou aktivátorů (*Gat1*, *Gln3*) a dvou represorů (*Gzf3*, *Dal80*), hrají roli i v metabolismu dusíku (Lee a Hahn, 2013). Mimo Ehrlichovu dráhu mohou vyšší alkoholy vznikat z glukosy přes pyruvát (Moir, 1998).

V pivu bylo identifikováno více než 40 různých vyšších alkoholů, nejvýznamnější jsou n-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, 2-phenylethanol a isoamylalkohol. Jejich produkce je ovlivňována zastoupením a koncentrací jednotlivých aminokyselin v mladíně, kmenem kvasinek a podmínkami kvašení (He et al., 2014; Procopio et al., 2014). Vyšší alkoholy se v pivu běžně vyskytují v koncentraci 100-200 mg/l; největší podíl tvoří většinou 2-methylbutanol a 3-methylbutanol (Boulton a Quain, 2001). Význam vyšších



Obr. 3. Vliv ethanolu na životaschopnost buněk *S. cerevisiae*. (▲) kmen *S. cerevisiae* YN162, (●) kmen *S. cerevisiae* YN158 (Sharma, 1997; upraveno) / Fig. 3 Effect of ethanol on the viability of *S. cerevisiae* cells. (▲) *S. cerevisiae* strain YN162, (●) *S. cerevisiae* strain YN158 (Sharma, 1997; modified)

yeast and metabolized in a process known as the Ehrlich pathway. The Ehrlich's pathway consists of three steps: the transamination of the amino acid to α -keto acid, decarboxylation of α -keto acid to aldehyde and reduction of aldehyde to alcohol (Pires et al., 2014).

Amino acids are taken up by yeast cells during fermentation in a specific order or in groups, according to cell priority – assimilation of some amino acids is subject to regulation, so-called catabolic repression with nitrogen (Procopio et al., 2011).

Amino acids are transported to the cell by several transporters, which are contained in the yeast cell membrane. *Saccharomyces cerevisiae* CB11 has 7 permeases encoded by *AGP3*, *ALP1*, *MMP1*, *MUP1*, *SAM3*, *TAT1* and *TAT2* genes with low substrate specificity, and another 4 permeases encoded by the *AGP1*, *GNP1*, *DIP5* and *BAP2* genes with broad substrate specificity. Each permease transports specific amino acids; for example the permease encoded by the *BAP2* gene translocates valine, leucine and isoleucine (Procopio et al., 2011).

The transfer of amino acids into the cell is followed by the first step of the Ehrlich pathway - transamination. In *S. cerevisiae*, transamination is controlled by *BCCA* genes (branched-chain mitochondrial and cytosolic amino acids), *BAT1* and *BAT2* (aminotransferases) and *ARO8*, *ARO9* (aminotransferases of aromatic amino acids). During the transamination, the amino groups are transferred from the amino acid to produce α -keto acids, which are subject to decarboxylation (Pires et al., 2014). Five proteins are probably involved in α -keto-decarboxylation: pyruvate decarboxylases *Pdc1*, *Pdc5* and *Pdc6*, phenylpyruvate decarboxylase *Aro10* and carboxylase *Thi3*. The carboxylase *Thi3* is also involved in the biosynthesis of thiamine. During decarboxylation, carbon dioxide is cleaved from the carboxyl group. The final step of conversion is reduction of aldehydes to alcohols. This step is catalyzed by alcohol dehydrogenases (*Adh1p*, *Adh7p*), formaldehyde dehydrogenase (*Stp1p*), 3-methylbutanal reductase (*Gre2p*), aldo-keto reductase (*Ypr1p*) and at least one arylalcohol dehydrogenase (*Aad6*). In addition, genes *PAD1*, *SPE1* (encoding carboxylases) and *OYE2*, *HOM2* genes (encoding dehydrogenases) are also associated with the Ehrlich pathway (Cordente et al., 2012). Aldehydes are reduced by aldehyde dehydrogenases and volatile acids are produced. The balance between oxidation and reduction of aldehydes depends on the culture conditions. In aerobic conditions, when the concentration of glucose is limiting and enough amino acids (leucine, methionine, phenylalanine) are present, conversion of aldehydes to acids occurs. Under these conditions, the yield of biomass is 40% lower (Hazelwood et al., 2008).

The transcription of *S. cerevisiae* genes involved in aromatic amino acid catabolism (*ARO9* and possibly *ARO10*) is regulated by the *Aro80* protein (part of the *Zn2Cys6* protein family) and the transcription factors of the GATA family. The protein *Aro80* binds to promoters of *ARO9* and *ARO10* genes. The *Aro80* together with amino acids activates the transcription of GATA factors, which consist of two activators (*Gat1*, *Gln3*) and two repressors (*Gzf3*, *Dal80*), and also play a role in nitrogen metabolism (Lee and Hahn, 2013). Besides

alkoholů pro celkový charakter piva spočívá zejména v intensifikaci alkoholové chuti a vůně piva. Pokud však množství vyšších alkoholů přesáhne koncentraci 300 mg/l, dostává pivo silnou štiplavou chuť a vůni (Olaniran et al., 2017).

Jelikož jednotlivé sensoricky aktivní látky se vzájemně ovlivňují, hraje významnou roli poměr jednotlivých složek. V ležáku se jako ideální poměr jeví 3:1 (resp. 4:1) vyšších alkoholů a esterů (Procopio et al., 2011).

U vína koncentrace vyšších alkoholů do 300 mg/l dodává nápoji komplexní a plnou chuť, koncentrace vyšší než 400 mg/l dává vznik silnému vínu se svíravým pocitem. Bílá vína mají zpravidla menší koncentraci alkoholu (162–266 mg/l) než vína červená (140–417 mg/l). Ve víně jsou nejvíce zastoupeny alkoholy: propanol, butanol, isobutanol, isoamylalkohol, hexanol a 2-fenylethanol. Z těchto alkoholů je nejvíce zastoupen isoamylalkohol (ovocno-banánové aroma) s koncentrací v rozmezí 6–490 mg/l (Furdiková et al., 2007).

Vyšší alkoholy slouží kvasničným buňkám pravděpodobně jako signální molekuly při mechanismu quorum sensing, kdy dochází k diferenciaci a adaptaci kvasinových buněk na změnu prostředí. Isoamylalkohol nebo 2-fenylethanol mají vliv na pseudohyphální růst kvasinek, doprovázený zvýšenou aktivitou sukcinátdehydrogenas a vyšším množstvím chitiny (Hazelwood et al., 2008).

4.3.2 Estery

Přestože jsou estery ve finálním produktu přítomny pouze v minimálních koncentracích, patří k nejdůležitějším prvkům ovlivňujícím výsledné aroma piva i vína. Vznik esterů je spjat s metabolismem lipidů. Kvasinky vytváří dva typy esterů: estery octové kyseliny a estery mastných kyselin s ethanolem (ethylestery). Estery octové kyseliny vznikají pomocí alkoholacetyltransferas z acetyl-CoA a alkoholu (He et al., 2014). Většina acetyl-CoA vzniká oxidativní dekarboxylací pyruvátu. Acetyl-CoA za aerobních podmínek vstupuje do Krebsova cyklu. V nepřítomnosti kyslíku je acetyl-CoA esterifikován alkoholem za vzniku esterů octové kyseliny. Ethylestery vznikají kondenzační reakcí mezi ethanolem a acetyl-CoA, tato reakce je katalyzována O-acyltransferasami, kódovanými genem *EEB1* a pravděpodobně i genem *EHT1*. Estery jsou syntetisovány uvnitř buněk, ale protože jsou lipofilní, tak difundují přes membránu do vnějšího prostředí – snadněji difundují estery obsahující kratší řetězce mastných kyselin. Ethylestery jsou proto v pivu a vínu zastoupeny méně než estery octové kyseliny (Pires et al., 2014).

Nejvyšší produkce esterů je v první fázi kvašení, kdy vznikají kondenzací organických kyselin a alkoholů. Rychlost tvorby esterů ovlivňuje jak koncentrace substrátu, acetyl-CoA a alkoholu, tak aktivita enzymů (acyltransferas a esterasy). Mezi enzymy ovlivňující syntesu a hydrolysu esterů patří: Atf1p, Atf2p, Eht1p, Eeb1p a lah1p (Cordente et al., 2012). V pivu i vínu je možné nalézt desítky různých esterů se specifickým aroma: hexylacetát (sladký, parfém), ethylacetát (kyselé ovoce, lak na nehty), isoamylacetát (banán, hruška), 2-fenylethylacetát (ovoce, růže, med), isobutylacetát (banán, ovoce), ethylbutanoát (květina, ovoce), ethylhexanoát (anýz, sladké jablko), ethyloktanoát (aroma kyselého jablka, mýdlo), ethyldekanoát (květina, mýdlo). Ze všech esterů zastoupených v pivu tvoří zhruba třetinu ethylacetát. Jeho prahová koncentrace je 30 mg/l, v pivu typu ležák se běžně vyskytuje v množství okolo 8–12 mg/l (Boulton a Quain, 2001). Prahová koncentrace ostatních esterů je ještě nižší – např. 0,5 mg/l pro ethyloktanoát, 2 mg/l pro isoamylacetát atd. Pokud jsou tyto koncentrace překročeny, pivo získává nežádoucí aroma (Olaniran et al., 2017).

V průběhu skladování piva dochází k esterifikaci 3-methylmáslé a 2-methylmáslé kyseliny na jejich ethylestery (3-methylbutyrát, 2-methylbutyrát), tyto složky dodávají pivu vínové aroma. Naproti tomu některé estery, např. isoamylacetát se v průběhu skladování piva hydrolyzují. Při stárnutí piva dochází i k tvorbě ethylnikotínátu, ethylpyruvátu a ethylakrylátu. Postupem času dochází ke ztrátě svěžího ovocného aroma a vznikají nepříjemné nasládlé chutě (Pires et al., 2014).

Ve víně se s nejvyšší koncentrací (22–63 mg/l) vyskytuje ethylacetát (Furdiková et al., 2007). Geny vinařského kmene *S. cerevisiae* (VIN13) *ATF1* a *ATF2*, které kódují alkoholacetyltransferasu, jsou zodpovědné za syntesu ethylacetátu, isoamylacetátu, 2-fenylethylacetátu, hexylacetátu a ethylkaproátu. Protein Atf2 má mnohem menší vliv na koncentraci těchto sloučenin a na rozdíl od Atf1p neovlivňuje produkci ethylkaprylátu. Gen *EHT1* kódující hexanoyltransferasu je zodpovědný za syntesu ethylkaproátu. Kromě toho protein Eht1 mírně zvyšuje koncentrace všech esterů, nejvíce však ethylkaproátu, ethylkaproátu a ethylkaprylátu. Tyto estery mohou být degradovány esterasou kódovanou genem *IAH1* (Lilly et al., 2006). Díky genetické

the Ehrlich pathway, higher alcohols can be formed from glucose through pyruvate (Moir, 1998).

More than 40 different higher alcohols have been identified in beer. The most important are n-propanol, isobutanol, 2-methylbutanol, 3-methylbutanol, 2-phenylethanol and isoamyl alcohol. Their production is influenced by the representation and concentration of individual amino acids in the wort, the yeast strain, and the conditions of fermentation (He et al., 2014; Procopio et al., 2014). Higher alcohols are commonly found at a concentration of 100–200 mg/l in beer; the most common are 2-methylbutanol and 3-methylbutanol (Boulton and Quain, 2001). Higher alcohols intensify the alcoholic flavors and aromas of beer. However, when the concentration of 300 mg/l is exceeded, higher alcohols produce in beer a strong pungent taste and aroma (Olaniran et al., 2017).

The relative ratio of aromatic active substances is important, because they interact with each other. In lager beer, the ideal ratio of higher alcohols to esters is 3:1 (or 4:1) (Procopio et al., 2011).

A concentration of up to 300 mg/l of higher alcohols in wine gives it a complex and full flavor. A strong wine with an astringent flavor is produced at a concentration higher than 400 mg/l. White wines have a lower alcohol concentration (162–266 mg/l) than red wines (140–417 mg/l). The most common alcohols in wine are: propanol, butanol, isobutanol, isoamyl alcohol, hexanol and 2-phenylethanol. Isoamyl alcohol (fruit-banana flavor) at a concentration of about 6–490 mg/l, is the most common alcohol in wine (Furdiková et al., 2007).

Yeasts probably use higher alcohols as signal molecules as part of the quorum sensing mechanism, in which yeasts differentiate and adapt to environmental change. Isoamyl alcohol or 2-phenylethanol influence pseudohyphal growth of yeast, which is accompanied by increased activity of succinate dehydrogenase and production of higher amounts of chitin (Hazelwood et al., 2008).

4.3.2 Esters

Esters occur in minimal concentration in the final product, but they are still the most important compounds affecting the resulting aroma of beer and wine. The formation of esters is linked to the metabolism of lipids. Yeast forms two types of esters: acetic acid esters and fatty acid esters with ethanol (ethyl esters). Acetic acid esters are formed from acetyl-CoA and alcohol under catalysis by alcohol acetyltransferase (He et al., 2014). Oxidative decarboxylation of pyruvate forms most of acetyl-CoA. Acetyl-CoA under aerobic conditions enters the Krebs cycle. In the absence of oxygen, acetyl-CoA is esterified with alcohol to form acetic acid esters. Ethyl esters are formed by a condensation reaction between ethanol and acetyl-CoA catalyzed by O-acyltransferases, which is encoded by the *EEB1* gene and possibly the *EHT1* gene. The esters are synthesized inside the cells. They are lipophilic and diffuse across the membrane out of the cells – esters which contain shorter fatty acid chains diffuse more easily. Therefore, ethyl esters are represented in beer and wine less than esters of acetic acid (Pires et al., 2014).

The highest production of esters is in the first stage of fermentation, when condensation of organic acids and alcohols forms esters. The concentration of substrates, acetyl-CoA, alcohol and enzyme activity (acyltransferases and esterases), affects the rate of ester formation. The enzymes that affect the synthesis and hydrolysis of esters, include: Atf1p, Atf2p, Eht1p, Eeb1p and lah1p (Cordente et al., 2012). In beer and wine are dozens of different esters that have a specific flavor, e.g. hexylacetate (sweet, perfume), ethyl acetate (sour fruits, nail polish), isoamylacetate (banana, pear), 2-phenylethyl acetate (fruit, rose, honey), isobutyl acetate (banana, fruit), ethylbutanoate (flowers, fruits), ethylhexanoate (anise, sweet apple), ethyl octanoate (acidic apple, soap) and ethyl decanoate (flowers, soap). Ethyl acetate forms a third of esters in beer. Its threshold concentration is 30 mg/l. Lager beer contains about 8–12 mg/l ethyl acetate (Boulton and Quain, 2001). The threshold concentration of other esters is lower – e.g. ethyl octanoate 0,5 mg/l, isoamylacetate 2 mg/l, etc. If these concentrations are exceeded, beer assumes an undesirable aroma (Olaniran et al., 2017).

During the storage of beer, 3-methylbutyric and 2-methylbutyric acid are esterified to their ethyl esters (3-methylbutyrate, 2-methylbutyrate), which give wine aroma to beer. In contrast, some esters (eg. isoamylacetate) hydrolyze during storage of beer. Ethyl nicotinate, ethyl pyruvate and ethyl lactate are formed during beer aging. Over time, a fruity aroma is lost and sweetish smells are created (Pires et al., 2014).

The ester most abundant in wine is ethyl acetate (22–63 mg/l) (Furdiková et al., 2007). *S. cerevisiae* VIN13 genes *ATF1* and *ATF2*

rekombinací je možné získat kvasinky, které jsou schopny produkovat enzymy ovlivňující syntesu či degradaci esterů a tím dospět k požadované chuti, nicméně momentálně není možné geneticky modifikované kvasinky použít pro komerční výrobu. Spodně kvasící kvasinky obsahují mimo gen *ATF1* i homologní gen *Lg-ATF1*, který také kóduje alkoholacetyltransferasu. Expresí tohoto genu tak zvyšuje produkci esterů kyseliny octové (Pires et al., 2014).

Provozdušňování fermentačního média vede ke zvýšení syntesy mastných kyselin. Vyšší úroveň nenasycených mastných kyselin ve fermentačním médiu potlačuje expresi genu *ATF1* a vede u *S. cerevisiae* (CMBS SS01) ke snížení koncentrace esterů. Vyšší hodnoty teplot mají za následek zvýšení produkce ethyloktanoátu a ethyldekanoátu. Naproti tomu vyšší obsah uhlíku nebo dusíku ovlivňuje koncentraci ethylesterů pouze mírně, avšak zapříčiňuje vyšší koncentraci acetátů (esterů kyseliny octové). Regulací teploty, obsahu cukru nebo koncentrace dusíku je možné regulovat aromatický profil. Ovlivňování aromatického profilu je možné i změnou genové exprese. Zdá se být užitečnější regulovat expresi jiných genů (např. mastných kyselin) než expresi *EHT1* a *EEB1* genů přímo řídících hladinu esterů (Saerens et al., 2008).

4.3.3 Vicinální diketony

Vicinální diketony (VDK), zejména pak diacetyl, jsou zodpovědní za „máslové“ aroma, které není vždy v nápoji žádoucí. V průběhu kvašení buňky *S. cerevisiae* uvolňují meziproducty biosyntesy isoleucinu a valinu: α -aceto- α -hydroxybutyrát a α -acetylaktát. Z těchto látek se vytváří neenzymatickou oxidativní dekarboxylací 2,3-pentandion a diacetyl (Horák et al., 2009). Syntesa prekurzorů VDK α -acetylaktátu a α -aceto- α -hydroxybutyrátu je zprostředkována α -aceto- α -hydroxyacid syntetásou, kódovanou geny *ILV2* a *ILV6*. Prekurzory vicinálních diketonů jsou dále metabolisovány působením α -aceto- α -hydroxyacidreduktoisomerasy, kódované genem *ILV5*

encodes for alcohol acetyltransferase and are responsible for the synthesis of ethyl acetate, isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, hexyl acetate and ethyl caproate. The protein Atf2 has much less effect on the concentration of these compounds and doesn't affect the production of ethyl caprylate, in contrast of Atf1p. The EHT1 gene, which encodes hexanoyl transferase, is responsible for the synthesis of ethyl caproate. Eht1p slightly increases concentrations of all esters, mostly ethyl caprate, ethyl caproate and ethyl caprylate. These esters can be degraded by esterase, which is encoded by the *IAH1* gene (Lilly et al., 2006). Genetic recombination can produce yeasts that can produce enzymes affecting the synthesis or degradation of esters and thus achieve the desired taste. However, it isn't currently possible to use genetically modified yeasts for commercial production. Bottom fermenting yeasts contain the *ATF1* gene and also the homologous gene *Lg-ATF1* that also encodes alcohol acetyltransferase. The expression of Lg-ATF1 increases the production of acetic acid esters (Pires et al., 2014).

Aeration of the fermentation medium leads to increased synthesis of fatty acids. Higher levels of unsaturated fatty acids in the fermentation medium suppress the expression of *ATF1* gene and, in *S. cerevisiae* (CMBS SS01), lead to decreased concentration of esters. Higher temperatures increase the production of ethyl octanoate and ethyl decanoate. On the other hand, higher concentration of carbon or nitrogen affects the concentration of ethyl esters only slightly, but causes a higher concentration of acetates (acetic acid esters). By regulating temperature, concentration of sugar or nitrogen, it is possible to regulate the aromatic beer profile. The aromatic profile can also be influenced by changing gene expression. It seems more useful to regulate the expression of other genes (e.g. fatty acids) than the expression of *EHT1* and *EEB1* genes that directly control the level of esters (Saerens et al., 2008).

4.3.3 Vicinální diketony

Vicinální diketony (VDKs), especially diacetyl, are responsible for the “butter” flavor, which isn't always desirable in beverages. During fermentation, Cells release α -aceto- α -hydroxybutyrate and α -acetylactate, which are intermediates of isoleucine and valine biosynthesis. A non-enzymatic oxidative decarboxylation of α -aceto- α -hydroxybutyrate and α -acetylactate produces 2,3-pentanedione and diacetyl (Horák et al., 2009). The synthesis of α -acetylactate and α -aceto- α -hydroxybutyrate precursors is mediated by aceto- α -hydroxyacid synthase, which is encoded by *ILV2* and *ILV6* genes. Precursors of VDKs are metabolized by α -aceto- α -hydroxyacid reductoisomerase, which is encoded by *ILV5* (Fig. 4). The production of VDKs is influenced by temperature, oxygen concentration, yeast strain and the presence of assimilable nitrogen that contributes to the synthesis of amino acids. A sufficiently high concentration of valine inhibits α -aceto- α -hydroxyacid synthase. The aceto- α -hydroxyacid synthase catalyzes

Obr. 4 Tvorba vicinálních diketonů v průběhu syntesy aminokyselin isoleucinu a valinu; AHAS – α -aceto- α -hydroxyacid syntetasa, RI – α -aceto- α -hydroxyacidreduktoisomerasa (Omura, 2008; upraveno).

(obr. 4). Produkce vicinálních diketonů je ovlivněna teplotou, koncentrací kyslíku, kmenem kvasinek a přítomností asimilovatelného dusíku, který se podílí na syntese aminokyselin. Dostatečně vysoká koncentrace aminokyseliny valinu inhibuje α -aceto- α -hydroxyacid syntetasu. Enzym α -aceto- α -hydroxyacid syntetasa katalyzuje konverzi pyruvátu na α -acetylaktát (prekurzor diacetyl) a přeměnu α -ketobutyryátu na α -aceto- α -hydroxybutyrát (Krogerus a Gibson, 2013).

Aktivitu enzymu α -aceto- α -hydroxyacid syntetasy (AHAS) je možné regulovat na úrovni transkripce, translace a alosterickou regulací jeho katalytické aktivity. Valin vytváří strukturální změny enzymu a způsobuje zpětnovazebnou inhibici. U kvasinek se AHAS skládá z katalytické a regulační podjednotky, které mohou disociovat. Pokud se vyskytuje katalytická podjednotka samostatně, není citlivá k inhibici valinem. V kombinaci s regulační podjednotkou se katalytická aktivita zvyšuje 7 až 10krát a vzniká citlivost na valin (Pang a Duggleby, 2001).

Kvasinky jsou schopny, mimo produkci, vicinální diketony i redukovat. Vicinální diketony difundují zpět do buňky a jsou přeměněny na acetoin a 2,3-butanediol. Tyto sloučeniny mají vysoké prahové hodnoty (150 mg/l) a ovlivňují aroma alkoholických nápojů jen minimálně (Romano a Suzzi, 1996).

the conversion of pyruvate to α -acetylactate (diacetyl precursor) and the conversion of α -ketobutyrate to α -aceto- α -hydroxybutyrate (Krogerus and Gibson, 2013).

The catalytic activity of α -aceto- α -hydroxyacid synthase (AHAS) can be regulated by transcription, translation, and allosteric regulation. Valine structurally alters the AHAS enzyme and causes

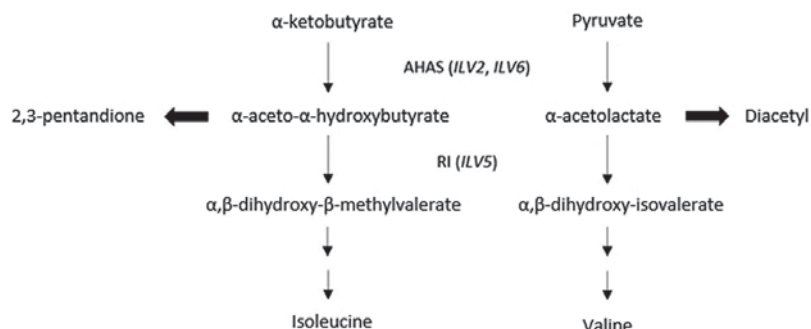


Fig. 4 Formation of vicinálních diketonů during the synthesis of isoleucine and valine; AHAS – α -aceto- α -hydroxyacid syntetasa, RI – α -aceto- α -hydroxyacidreduktoisomerasa (Omura, 2008; modified).

Koncentrace vicinálních diketonů se snižuje v průběhu zrání, kdy se kvasinky dostávají do stacionární fáze. Pokud chceme zkrátit dobu zrání, je nutné použít kvasinky, které produkují méně vicinálních diketonů (Omura, 2008). Koncentrace diacetylu v pivu by neměla přesáhnout 0,05–0,10 mg/l. Prahová koncentrace 2,3-pentandionu je o něco vyšší: 1 mg/l (Horák et al., 2009). Diacetyl může být také produkovan bakteriální kontaminací, a to rodu *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Sakamoto a Konings, 2003).

Mimo vhodně zvolené kultivační podmínky lze snížit produkci vicinálních diketonů genetickou rekombinací. Prvním postupem je inaktivace acetohydroxyacid syntetasy kódované genem *ILV2* a *ILV6*. Druhý přístup je založen na regulaci exprese genu *ILV5*, který zvyšuje koncentraci acetohydroxyacid reductoisomerasy (*Ilv5p*). Transformované kvasinky s genem *ILV5* vykazují 50–60% snížení produkce VDK. Enzymy podílející se na syntese isoleucinu a valinu jsou umístěny v mitochondriích. Některé enzymy jsou kódované jadernou DNA a po syntese v oblasti ribosomů v cytosolu jsou transportovány do mitochondrií. Transport do mitochondrií je zprostředkován transmembránovými proteiny TIM (translokasa vnější mitochondriální membrány) a TOM (translokasa vnitřní mitochondriální membrány). Jejich translokace je umožněna na základě specifické sekvence na N-konci. Protein *Ilv5* je bifunkční a ovlivňuje jak syntesu aminokyselin, tak stabilitu mitochondriální DNA. Zvýšení exprese cytosolového *Ilv5p* vede ke snížení produkce VDK bez vlivu na kvalitu piva (Omura, 2008).

4.3.4 Acetaldehyd

Aldehydy jsou organické sloučeniny vznikající oxidací nebo dehydrogenací primárních alkoholů. Acetaldehyd vzniká během alkoholové fermentace působením enzymu pyruvátdekarboxylasy, který odštěpuje oxid uhličitý z pyruvátu. Acetaldehyd je poté redukován alkoholdehydrogenasou na ethanol. Obecně platí, že acetaldehyd dosahuje nejvyšší koncentrace v počátečních fázích fermentace a poté je postupně využíván kvasinkami (Jackowetz et al., 2011). Acetaldehyd je terminálním akceptorem elektronů alkoholového kvašení. Energie ve formě ATP, může vznikat při glykolýse pouze tehdy, pokud je NADH reoxidován pomocí acetaldehydu (Pronk et al., 1996).

Pyruvátdekarboxylasa se nachází v cytosolu kvasinek. Jedná se o tetramer složený ze čtyř stejných nebo velmi podobných podjednotek. Kompetitivním inhibitorem pyruvátdekarboxylasy je fosfát. Enzym pyruvátdekarboxylasa je pravděpodobně ovlivněn geny *PDC1*, *PDC2*, *PDC3*, *PDC4*, *PDC5* a *PDC6*. Geny *PDC1* a *PDC5* jsou regulovány genem *PDC2*. Úloha dalších genů nezbytných pro expresi enzymu pyruvátdekarboxylasy, *PDC3* a *PDC4*, zůstává zatím nejasná. Ačkoliv má gen *PDC6* podobnou sekvenci jako geny *PDC1* a *PDC5*, nezpůsobila jeho deaktivace významné změny koncentrace pyruvátdekarboxylasy (Pronk et al., 1996).

Nízká koncentrace acetaldehydu uděluje pivu i vínu ovocné aroma. Pokud acetaldehyd dosáhne vyšších koncentrací, chuť se mění na nežádoucí aroma shnilých jablek. Prahová koncentrace acetaldehydu v pivu se pohybuje v rozmezí 10–20 mg/l. Nad tuto hodnotu udává pivu nepřijemné trávové aroma (Boulton a Quain, 2001).

Koncentrace acetaldehydu ve víně se může pohybovat v rozmezí 30–300 mg/l. V červeném víně (30 mg/l) je koncentrace obvykle nižší než v bílém (80 mg/l). Koncentrace acetaldehydu stoupá se zvyšující se teplotou během fermentace a jeho přítomnost lze maskovat přidáním SO_2 (Furdiková et al., 2007).

4.3.5 Organické kyseliny

Těkavé kyseliny jsou organické kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem. Nadměrné množství těkavých kyselin je známkou nestability nápoje. Nízké koncentrace dodávají výrobku specifické aroma a chuť. Těkavé kyseliny jsou až z 99% zastoupeny octovou kyselinou, dále pak kyselinami propionovou, máselnou a hexanovou. Optimální koncentrace ve víně se pohybuje v rozmezí 0,2–0,7 g/l. Množství těkavých kyselin závisí zejména na koncentraci cukru, dusíku a použitím kmeni. Kmeny *S. cerevisiae* jsou schopny produkovat octovou kyselinu v rozmezí 0,1–2 g/l (Swiegers et al., 2005). Kryotolerantní kmeny *Saccharomyces uvarum* (Giudici et al., 1995) a *S. bayanus* (Eglinton et al., 2000) produkují octové kyseliny méně. Vytvořením směsných kultur je možné ovlivnit výslednou koncentraci. Směsná fermentace kvasinek *Candida zemplinina* a *S. cerevisiae* vykazovala snížení množství těkavých kyselin o 0,3 g/l (Rantsiou et al., 2012).

Produkce kyseliny je u sladkých vín vyšší než u vín suchých. Přidáním dusíku k fermentaci, s vysokým obsahem cukru, je možné produkci snížit. Nejnižší koncentrace těkavých kyselin byla naměřena

feedback inhibition. In yeast, the AHAS consists of a catalytic and a regulatory subunit, which can dissociate. If the catalytic subunit is alone, it isn't susceptible to valine inhibition. If the catalytic and the regulatory subunits are linked together, the catalytic activity increases 7 to 10 times and this complex has valine sensitivity (Pang and Duggleby, 2001).

Yeasts can produce and reduce vicinal diketones. Vicinal diketones diffuse back into the cell and are converted to acetoin and 2,3-butanediol. These compounds have high thresholds (150 mg/l) and only minimally affect the aroma of alcoholic beverages (Romano and Suzzi, 1996).

The concentration of vicinal diketones decreases during maturation, when yeast gets into the stationary phase. To reduce maturation time, it's possible to use yeast that produces less vicinal diketones (Omura, 2008). The concentration of diacetyl shouldn't exceed 0,05–0,10 mg/l beer. The threshold concentration of 2,3-pentandione is slightly higher: 1 mg/l (Horák et al., 2009). Diacetyl can also be produced due to bacterial contamination: by *Lactobacillus* and *Pediococcus* (Sakamoto and Konings, 2003).

The production of vicinal diketones can be reduced by appropriate conditions of cultivation, but also by genetic recombination. The first step is the inactivation of acetohydroxyacid synthase, which is encoded by *ILV2* and *ILV6* genes. The second approach is based on the regulation of expression of *ILV5* gene, which increases the concentration of acetohydroxyacid reductoisomerase (*Ilv5p*). Yeast transformed with *ILV5* gene shows a 50–60% reduction of VDKs production. Enzymes involved in the synthesis of isoleucine and valine reside in mitochondria. Some enzymes are encoded by nuclear DNA; these enzymes are transported to the mitochondria after the synthesis in the ribosomal region of the cytosol. The transport to mitochondria is mediated by transmembrane proteins TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane) and TIM (translocase of the internal mitochondrial membrane). A specific N-terminal sequence enables their translocation. The protein *Ilv5p* is bifunctional and affects amino acid synthesis and mitochondrial DNA stability. Increased expression of cytosolic *Ilv5p* results in reduced VDKs production, without affecting quality of beer (Omura, 2008).

4.3.4 Acetaldehyde

Aldehydes are organic compounds formed by the oxidation or dehydrogenation of primary alcohols. Acetaldehyde is formed by the oxidation of ethanol and is therefore a by-product of alcoholic fermentation in *S. cerevisiae*. During alcohol fermentation, acetaldehyde is formed by pyruvate decarboxylase, which cleaves carbon dioxide from pyruvate. Acetaldehyde is reduced by alcohol dehydrogenase to ethanol. In general, acetaldehyde achieves the highest concentration in the initial stages of fermentation and is then used by the yeast (Jackowetz et al., 2011). Acetaldehyde is a terminal acceptor of electrons from alcohol fermentation. ATP as a form of energy arises in glycolysis, but only when NADH is reoxidized by acetaldehyde (Pronk et al., 1996).

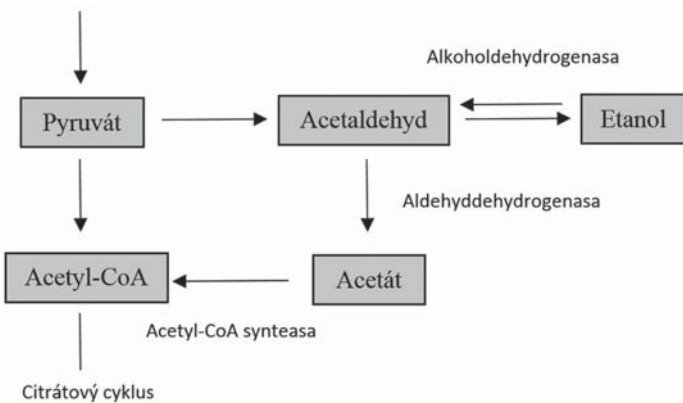
Pyruvate decarboxylase is found in the cytosol. It is a tetramer composed of four identical or very similar subunits. A competitive inhibitor of pyruvate decarboxylase is phosphate. Pyruvate decarboxylase is probably influenced by *PDC1*, *PDC2*, *PDC3*, *PDC4*, *PDC5* and *PDC6* genes. *PDC1* and *PDC5* genes are regulated by the *PDC2* gene. The role of *PDC3* and *PDC4* is still unknown. Although *PDC6* has a similar sequence as *PDC1* and *PDC5*, its deactivation didn't cause significant changes in the concentration of pyruvate decarboxylase (Pronk et al., 1996).

Low concentration of acetaldehyde lends fruity aroma to beer and wine. At higher concentration of acetaldehyde, the taste changes to the undesirable aroma of rotten apples. The threshold concentration of acetaldehyde in beer is about 10–20 mg/l. The concentration above this value gives to beer an unpleasant grass aroma (Boulton and Quain, 2001).

The concentration of acetaldehyde in wine may range from 30 to 300 mg/l. The concentration in red wine (30 mg/l) is usually lower than that in white wine (80 mg/l). The concentration of acetaldehyde increases with increasing temperature during fermentation, its presence can be masked by the addition of SO_2 (Furdiková et al., 2007).

4.3.5 Organic acids

Volatile acids are organic acids with a short carbon chain. Excessive amount of volatile acids indicates instability in the beverage. Low concentrations give to the product a specific aroma and flavor. As much as 99% of volatile acids is represented by acetic acid, followed by propionic acid, butyric acid and hexanoic (caproic) acid. The optimal



Obr. 5 Schéma acetátového metabolismu (Mizuno et al., 2006; upraveno)

na po přidání 190 mg/l dusíku (Bely et al., 2003). Legislativa České republiky (zákon č. 606/2009) stanovuje maximální obsah těkavých kyselin na 1,1 g/l u bílých a růžových vín a 1,2 g/l u vín červených. Octová kyselina vzniká oxidací acetaldehydu. Reakce je katalyzována aldehyddehydrogenasou (obr. 5), kódovanou geny *ALD*. Kmeny *S. cerevisiae* s mutacemi v genu *ALD6* produkují menší množství octové kyseliny (Eglinton et al., 2002). Kromě proteinu Ald6 ovlivňuje produkci také protein Ald5 a v některých případech i Ald4p (Saint-Prix et al., 2004).

4.3.6 Monoterpenoidy

Terpenoidy jsou organické lipofilní látky složené z isoprenových (2-methylbuta-1,3-dien) podjednotek. Vyskytují se přirozeně v přírodě v souvislosti s květy a plody rostlin (hrozný *Vitis vinifera*), také mohou hrát roli v metabolismu kvasinek. Dodávají květinové aroma a vyskytují se volné nebo vázané na glukosu. Během fermentace působením glykosidas dochází k uvolnění vazby na glukosu, vzniklé monoterpenoidy ovlivňují aroma a chuť. *S. cerevisiae* produkuje β-glykosidasu, nicméně její aktivita ke glykosidické vazbě je velmi nízká. Hydrolysu glykosylovaných terpenoidů je možné vyvolat přidáním enzymů vytvořených jinými organismy (nejčastěji *Aspergillus* spp.). Komerčně jsou nejčastěji používané pektinázy, glukánázy a xylanázy. Přidání enzymů však může mít negativní dopad na chuť nebo aroma produktů (Cordente et al., 2012).

Další možností úspěšné regulace hydrolysy terpenoidů je genetická modifikace kvasinek. Úprava genomu *S. cerevisiae* vede k expresi požadovaných enzymů, například enzym p-1,4-endoglukanasa je kódovaná genem *egl1* původem z *Trichoderma longibrachiatum*. Enzym *egl1* zlepšuje ovocné aroma. Další geneticky upravený kmen *S. cerevisiae* syntetisuje p-1,4-endoxylasu expresí genů *xlnA* z *Aspergillus nidulans*. Enzym p-1,4-endoxylasa zvyšuje koncentraci několika esterů, alkoholů a terpenů. Ko-exprese genu *xyn2* (*Trichonema resei*), který kóduje xylanasu, a genu *end1* (*Butyrivibrio fibriosolvens*) kódujícího endo-p-1,4-glukanasu ukázala významné zlepšení v aromatickém profilu vína. Ať už se jedná o strategii přidání enzymů štěpících glykosidickou vazbu v terpenoidech přímo do média nebo přímou expresí enzymů kvasinkami, pokud substrát využívaný při kvašení nemá dostatek volných či vázaných monoterpenoidů, není možné těmito způsoby ovlivnit aroma. Alternativou se jeví sestavení kmenů *S. cerevisiae*, které syntetisují terpenoidy de novo (Cordente et al., 2012).

Některé kmeny *S. cerevisiae* vyskytující se v přírodě mohou syntetisovat terpenoidy, ale bohužel jen ve velmi omezeném množství. Nejvíce je zastoupen linalol a α-terpineol. Ve víně jsou většinou přítomné terpenoidy původem z hroznů. U kvasinky *S. cerevisiae* (M522) byla syntéza monoterpenoidů pozitivně ovlivněna vysokou koncentrací dusíku (Carrau et al., 2005).

4.3.7 Glycerol

Glycerol je organická viskózní sloučenina sladké chuti vznikající jako vedlejší produkt při ethanolovém kvašení *S. cerevisiae*, která posiluje chuť a aroma kvašených nápojů. Během kvašení zastává glycerol dvě důležité funkce – ovlivňuje osmotický gradient buněčných membrán a udržuje cytosolový redoxní gradient (reoxidace přebytkového NADH) (Zhao et al., 2015).

Obsah glycerolu pozitivně koreluje s viskozitou, hustotou a vláčností piva. V pivech se pohybuje v koncentracích 1-3 g/l. Přispívá

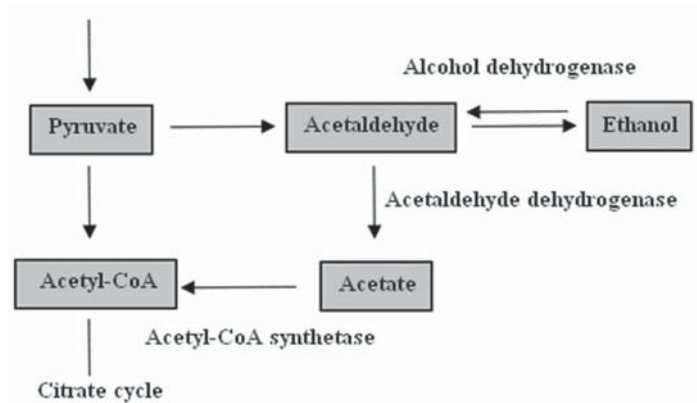


Fig. 5 Diagram of acetate metabolism (Mizuno et al., 2006; modified)

concentration in wine is about 0.2-0.7 g/l. The amount of volatile acids depends primarily on the concentration of sugar, nitrogen, and the strain of yeast. Strains of *S. cerevisiae* are able to produce acetic acid in the range of 0.1-2 g/l (Swiegers et al., 2005). Cryotolerant strains of *S. uvarum* (Giudici et al., 1995) and *S. bayanus* (Eglinton et al., 2000), produce less acetic acid. The resulting concentration of volatile acids can be influenced by the formation of a mixed culture. Mixed fermentation of the yeasts *C. zemplinina* and *S. cerevisiae* showed a decrease in the amount of volatile acids by 0,3 g/l (Rantsiou et al., 2012).

The production of acetic acid is higher for sweet wines than for dry wines. Production of acetic acid can be reduced by adding nitrogen to the fermentation with high concentration of sugar. The lowest concentration of volatile acids was measured after the addition of 190 mg/l of nitrogen (Bely et al., 2003). The legislation of the Czech Republic (Act No. 606/2009) sets maximum levels of volatile acids to 1.1 g/l for white wine and 1.2 g/l for red wines. Acetic acid is formed by the oxidation of acetaldehyde. The reaction is catalyzed by acetaldehyde dehydrogenase (Fig. 5), which is encoded by the *ALD* genes. Strains of *S. cerevisiae* with mutations in the *ALD6* gene produce less acetic acid (Eglinton et al., 2002). The production of acetic acid is also affected by *ald5p* and sometimes *ald4p* (Saint-Prix et al., 2004).

4.3.6 Monoterpenoids

Terpenoids are organic lipophilic substances, which are composed of isoprene subunits (2-methylbuta-1,3-diene). Terpenoids occur naturally in nature, namely in flowers and plant fruits (*Vitis vinifera* grapes), may also play a role in yeast metabolism. Terpenoids cause floral aroma and are free or bound to glucose.

During fermentation in the presence of glycosidase, the binding of terpenoids to glucose is released. The monoterpenoids so produced affect the flavor and taste. *S. cerevisiae* produces β-glycosidase whose ability to split the glycosidic bond is very low. Hydrolysis of glycosylated terpenoids can be induced by the addition of enzymes formed by other organisms (most commonly *Aspergillus* spp.). The most commonly used are pectinases, glucanases and xylanases. However, the addition of enzymes may have a negative impact on the taste or aroma of the products (Cordente et al., 2012).

Genetic modification of yeast can also regulate the hydrolysis of terpenoids. The desired enzymes are expressed by modifying *S. cerevisiae* genome. For example, the enzyme p-1,4-endoglucanase, which is encoded by *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*, improves fruity flavor. Another genetically modified strain of *S. cerevisiae* synthesizes p-1,4-endoxylase by expression of *xlnA* genes from *Aspergillus nidulans*. The enzyme increases the concentration of several esters, alcohols, and terpenes. The co-expression of *xyn2* gene (*Trichonema resei*), which encodes xylanase, and *end1* gene (*Butyrivibrio fibriosolvens*), which encodes endo-p-1,4-glucanase, show a significant improvement in the aromatic profile of wine. The flavor can thus be affected by adding enzymes, that cleave the glycosidic bound in terpenoids or by expression of foreign enzymes by yeast. However, aroma can only be affected if free or bound monoterpenoids are present in the medium. An alternative is the construction of *S. cerevisiae* strains that synthesize terpenoids de novo (Cordente et al., 2012).

Some *S. cerevisiae* strains occurring in nature can synthesize terpenoids, but only in very limited amounts. The most common are linalool and α-terpineol. Wine mostly contains terpenoids from grapes.

k „lepšimu pocitu v ústech“ a potlačuje hořkost (Boulton a Quain, 2001).

Ve víně je obsah glycerolu vyšší (4-15 g/l). S jeho zvyšující se koncentrací dochází ve většině případů ke zvyšování plnosti vína. Glycerol v koncentraci 10 g/l již výrazně ovlivňuje chuť a viskozitu vína. Efekt glycerolu závisí ale i na konkrétním víně (Gawel et al., 2007). Ve studii Zhao et al. (2015) nebyl v Ryzlinku s koncentrací glycerolu 10 g/l a v ledovém víně s koncentrací 13,8 g/l pozorován žádný zřejmý vliv koncentrace glycerolu na aroma vína. Plnost vína je ovlivněna zejména viskozitou a intenzitou chuti.

Nadprodukce glycerolu je možná změnou genů zapojených v glykolyse a fermentaci nebo změnou fermentačních podmínek. U geneticky upravených kvasinek došlo ke zvýšení produkce glycerolu a současně ke snížení hladiny alkoholu. Takto geneticky modifikované *S. cerevisiae* bohužel mohou vykazovat i produkci látek, které jsou nežádoucí: acetaldehyd, acetát a acetoin. Mimo to může docházet i k poruše růstu kvasinek (Zhao et al., 2015).

Kvasinky jsou při promývání potravinářskými kyselinami nebo při očkování do mladiny vystaveny osmotickému šoku. Nejchoulostivější jsou buňky *S. cerevisiae* v exponenciální fázi růstu. K osmoleranci přispívá vakuola kvasinek, membránové struktury, disacharid trehalosa a Nhx1 Na⁺/H⁺ pumpa, která hraje významnou roli při obnově růstu buněk po expozici osmotickým šokem (Nass a Rao, 1999). Při osmoadaptaci akumulují kvasinky rozpuštěné látky uvnitř buňky a zvyšují tak intracelulární osmotický potenciál. U *S. cerevisiae* se v buňce hromadí glycerol. Tvorba glycerolu je ovlivněna enzymem glycerol-3-fosfátdehydrogenasou kódovanou genem *GPD1*. Mutanti *S. cerevisiae*, kterým gen *GPD* chyběl, vytvářeli málo glycerolu a vykazovali citlivost na osmotický stres (Albertyn et al., 1994). Koncentrace glycerolu je řízena i HOG (high osmolarity glycerol: vysoká osmolarita glycerolu) dráhou, která stimuluje expresi více než 100 genů spojených s produkcí glycerolu (Tamás et al., 2000). HOG dráha pravděpodobně reguluje i membránový protein Fsp1 ovlivňující tok glycerolu. Mutanti *S. cerevisiae*, kterým protein Fsp1 chyběl, byli citliví na osmotický šok (Karlgrén et al., 2005).

4.3.8 Sírné sloučeniny

Aroma kvašených nápojů ovlivňuje celá řada sirných látek. Sírné látky obsažené v pivu pocházejí buď z mladiny a do hotového piva se dostanou v nezměněném stavu, nebo je jejich množství ovlivňováno činností kvasinek. Ve druhém případě se jedná zejména o oxid siřičitý a sirovodík, které ovlivňují chuť a aroma v závislosti na své koncentraci a např. typu piva (Boulton a Quain, 2001).

Oxid siřičitý je mírně toxický alergen s antioxidantní a antimikrobiální aktivitou. Reaguje s chinony, aldehydy, karbonylem a především s peroxidem vodíku (Comuzzo et al., 2017). Většina oxidu siřičitého v pivu vzniká činností pivovarských kvasinek v průběhu kvašení. Kvasinky produkují oxid siřičitý během syntesy aminokyselin obsahujících síru. Zdrojem síry pro kvasničnou buňku jsou anorganické sírany, které jsou z média přenášeny specifickou permeasou do buňky a přeměňovány ATP-sulfurylasou na adenosinofosfosulfát (APS) a ten dále APS-kinasou na fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), který je redukován na siřičitan. Redukovaný sulfid je esenciální pro tvorbu proteinů (tj. síru obsahujících aminokyselin), koenzymů a dalších buněčných sloučenin (Van Haecht a Dufour, 1995; Lodolo et al., 2008). Regulace metabolismu síry zahrnuje zpětnou inhibici a genovou represi. Klíčovým metabolitem je A-adenosylmethionin, který je kofaktorem mnoha biochemických reakcí a zároveň reprimuje transkripční enzymů, které se účastní metabolismu síry (Thomas a Surdin-Kerjan, 1997).

Oxidace vína probíhá enzymatickou nebo neenzymatickou cestou. Enzymatická oxidace se vyskytuje v hroznovém moštu a zahrnuje hydroxycinnamáty. Neenzymatická oxidace probíhá ve fermentovaném víně a je založená na oxidaci fenolických sloučenin. Tento proces vede ke vzniku peroxidu vodíku (silný oxidant) a dalších látek, které narušují kvalitu vína (Oliveira et al., 2011). Peroxid vodíku je přeměněn, za působení kovových katalyzátorů, na hydroxylový radikál. Hydroxylový radikál je schopen reagovat téměř se všemi složkami vína, což může vést ke vzniku aldehydů a ketonů. Oxid siřičitý reverzibilně váže aldehydy a ketony, které vytváří vazby mezi taniny a dalšími látkami (bílkoviny, polysacharidy), a tím narušují vodíkové vazby a van der Waalsovy interakce taninů, což může mít negativní dopad na chuťový profil vína. Oxid siřičitý také redukuje chinonový produkt zpět na fenol. Srážení a polymerace fenolických látek snižuje celkovou koncentraci fenolů, dochází ke vzniku větších fenolických komplexů, které jsou schopny vázat anthokyany a stabilizovat chuť a barvu vína (Waterhouse a Laurie 2006).

The synthesis of monoterpenoids in *S. cerevisiae* (M522), was positively influenced by high nitrogen concentration (Carrau et al., 2005).

4.3.7 Glycerol

Glycerol is an organic sweet viscous compound which is produced as a by-product of ethanol fermentation of *S. cerevisiae*. It strengthens the flavor and the aroma of fermented beverages. During fermentation, glycerol has two important functions: it affects the osmotic gradient across cell membranes and maintains the cytosolic redox state (re-oxidation of surplus NADH) (Zhao et al., 2015).

The concentration of glycerol positively correlates with the viscosity, density and softness of beer. The concentration in beer is about 1–3 g/l. Glycerol contributes to “better feeling in the mouth” and suppresses bitterness (Boulton and Quain, 2001).

In wine, the concentration of glycerol is higher than in beer (4–15 g/l). When glycerol concentration increases, the fullness of wine often increases. Glycerol at 10 g/l significantly influences the taste and viscosity of wine. The effect of glycerol also depends on the type of wine (Gawel et al., 2007). Zhao et al. (2015) did not observe any effect of glycerol on the aroma of wine, in riesling (glycerol concentration 10 g/l) and ice wine (13.8 g/l). The fullness of wine is influenced by viscosity and intensity of taste.

The overproduction of glycerol is possible by altering the genes involved in glycolysis and fermentation, or by changing the conditions of fermentation. In genetically modified yeast, the production of glycerol increased and the concentration of alcohol reduced but the modified yeast may also produce undesirable substances: acetaldehyde, acetate and acetoin. In addition, yeast growth may be impaired (Zhao et al., 2015).

When yeast is washed with food acids or re-injected into the wort, it is exposed to osmotic shock. In the exponential phase of growth, *S. cerevisiae* cells are the most vulnerable. The mechanism of osmoregulation includes: yeast vacuole, membrane structures, the disaccharide trehalose and Nhx1 Na⁺/H⁺ pump. Nhx1 pump plays a significant role in restoring growth of cells after exposure to osmotic shock (Nass and Rao, 1999). In osmoadaptation, yeast accumulates dissolved substances inside the cell. The accumulation of the substances increases intracellular osmotic pressure. *S. cerevisiae* accumulates glycerol. The formation of glycerol is influenced by the glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which is encoded by the *GPD1* gene. Mutants of *S. cerevisiae* deficient in the *GPD* gene produced little glycerol and exhibited sensitivity to osmotic stress (Albertyn et al., 1994). The concentration of glycerol is controlled by HOG (high osmolarity glycerol) pathway, which stimulates the expression of more than 100 genes associated with production of glycerol (Tamás et al., 2000). HOG pathway probably regulates the membrane protein Fsp1 that affects the flow of glycerol. Mutants of *S. cerevisiae* lacking Fsp1 protein were sensitive to osmotic shock (Karlgrén et al., 2005).

4.3.8 Sulphur compounds

Aroma of fermented beverages is affected by number of sulphur compounds. They can come directly from wort and persist in beer unchanged or some of them can be affected by yeast metabolism. Sulphur compounds that are influenced by yeast metabolism during fermentation include mainly sulphur dioxide and hydrogen sulphide – compounds that can affect taste and aroma of beer depending on their concentration and type of beer (Boulton and Quain, 2001).

Sulphur dioxide is a slightly toxic allergen with antioxidant and antimicrobial activity. Sulphur dioxide reacts with quinones, acetaldehydes, carbonyl compounds and especially with hydrogen peroxide (Comuzzo et al., 2017). The most of sulphur dioxide in beer originates from the activity of brewer's yeast. Yeast produces sulfur dioxide during the synthesis of sulphur-containing aminoacids. Anorganic sulphates enter the cell via a specific permease and are converted by ATP-sulphurylase to adenosine 5'-phosphosulphate (APS), which is then converted to phosphoadenosine-5'-phosphosulphate (PAPS) by APS-kinase. PAPS is reduced to sulphite. After further reduction sulphide is essential for protein formation, coenzymes and other cell compounds (Van Haecht and Dufour, 1995; Lodolo et al., 2008). Regulation of sulphur metabolism involves feedback inhibition and repression of gene expression. The key metabolite is A-adenosylmethionine, that acts as cofactor in many biochemical reactions and at the same time it is repressor of transcription of enzymes that are involved in sulphur metabolism (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997).

The oxidation of wine can be enzymatic or non-enzymatic. Enzymatic oxidation occurs in grape must and includes hydroxycinnamates. Non-enzymatic oxidation takes place in fermented wine and is based on the oxidation of phenolic compounds. This process leads

Kvasinky *S. cerevisiae* produkují i další sloučeniny síry. Furfurylthiol dodává kvašeným nápojům aroma pražené kávy a další ovocné thioly (3-merkaptohexyl acetát, 4-merkapt-4-methyl-pentan-2-on, 3-merkaptohexan-1-ol a 4-merkapt-4-methyl-pentan-2-on) dodávající aroma po mučence, angreštu či grapefruitu. Často se objevuje methanthiol (aroma vařené kapusty), dimethylsulfid, dimethylsulfid, dimethyltrisulfid (aroma zelí, květáku, česneku) a methylthioester (vařený květák, sýr, pažitka) (Cordente et al., 2012).

Polyfunkční thioly 3MH, 3MHA a 4MMP mají velký vliv na chuť a aroma vína. Zvláště důležitý vliv mají ve víně Sauvignon Blanc. Thioly 4MMP a 3MH se vyskytují ve formě prekurzorů glutathionu nebo cysteinu. Kvasinky glutathion a cystein štěpí za vzniku thiolů. Ovšem jen malá část prekurzorů je převedena na thioly. Polyfunkční thiol 3MHA nemá žádný prekurzor, ale vzniká během esterifikace thiolu 3MHA za pomoci acetyltransferasy ATF1. Transport thiolových prekurzorů cysteinu a glutathionu je z části ovlivněn plasmatickým transportérem GAP1 (Cordente et al., 2012).

Po transportu prekurzorů do buňky *S. cerevisiae* dochází k jejich rozštěpení a uvolnění thiolů. Nadměrná exprese genu *STR3* kvasinky *S. cerevisiae* vede ke zvýšení produkce 3MH. Enzym Str3p je cystothionin- β -lyasa a má schopnost štěpit prekurzory za vzniku 3MH (Holt et al., 2011). Je pravděpodobné, že uvolnění 3MH je zprostředkováno více než jedním genem. Gen *IRC7* hraje klíčovou roli v uvolňování 4MMP a částečně přispívá k uvolnění 3MH. U kmenů *S. cerevisiae* je často gen *IRC7* inaktivován, to je pravděpodobně zodpovědné za různé koncentrace uvolněných thiolů u různých kmenů kvasinek (Swiegers et al., 2009). Cystein má větší podíl na vzniku thiolů než glutathion. V některých případech může být nízký podíl glutathionu na vzniku thiolů kompenzován jeho vysokým obsahem v médiu (Winter et al., 2011).

Sirovodík produkovaný kvasinkami je odpovědný za aroma zkaženého vejce a tato pachut se projevuje již při jeho nízkých koncentracích. Klíčovým enzymem zodpovědným za jeho produkci je oxidoreduktasa H_2S . Oxidoreduktasa katalyzuje redukci siřičitanu za vzniku sulfidu, který se následně uvolňuje ve formě H_2S . Produkce H_2S je závislá na kmenu kvasinek i na fermentačních podmínkách (dostupnost sloučenin síry, dusíku, vitamínů, atp.). Sirovodík vzniká v metabolismu *S. cerevisiae* nejčastěji při biosyntese methioninu a cysteinu, pokud jsou aminokyseliny vyčerpány, vzniká H_2S . Nejběžnějším zdrojem síry je sulfát, který se vyskytuje v hroznové šťávě. Sulfát je transportován do buňky a redukován na siřičitan a následně na sulfid. Sulfid je produkován v kombinaci s O-acetylserinem a O-acetylhomoserinem, což jsou prekurzory methioninu a cysteinu. Pokud je ve fermentačním médiu nedostatek dusíku, nedochází k syntese prekurzorů, sulfid se hromadí a vzniká H_2S , ten nakonec difunduje z kvasinky do prostředí (Spiropoulos a Bisson, 2000).

Rízení exprese genu *MET17* (synonyma *MET15* nebo *MET25*), který kóduje bifunkční O-acetylserin/O-acetylhomoserinsulfhydrolasu, by mělo ovlivnit produkci H_2S . Nicméně při testování dvou odlišných kmenů *S. cerevisiae* (UCD522 a UCD713) nebyly výsledky jednoznačné. Kmen UCD713 sice vykazoval snížení syntesy H_2S , ale u kmene UCD522 došlo při zvýšení exprese genu *MET17* dokonce ke zvýšení hladiny H_2S (Spiropoulos a Bisson, 2000). Gen *CYS4* ovlivňuje expresi cystathionin- β -syntasy, snižuje produkci H_2S a zvyšuje rychlost fermentace (Linderholm et al., 2006).

Další z možných kroků pro snížení produkce sirovodíku je ovlivnění produkce siřičitanreduktasy. Siřičitanreduktasa je heterotetramerní protein složený ze dvou α podjednotek a dvou β podjednotek. Podjednotka α je kódována genem *MET10* a β podjednotka je kódována genem *MET5*. Při inaktivaci genu *MET10* nebo *MET5* dochází k akumulaci siřičitanů, siřičitany nejsou redukovány na sulfidy a dochází k 50-99% snížení koncentrace sirovodíku v závislosti na kmenech *S. cerevisiae*. Ovlivnění exprese genu *MET10* a *MET5* je možné i jinak než genetickou modifikací. Ethylmethansulfonát vyvolává genetické substituce při minimální letalitě *S. cerevisiae*. Vede ethylmethansulfonátu je možné vyvolat mutagenesi působením UV záření. Takto modifikované kvasinky je možné využít v průmyslu, protože se nejedná o přímou genetickou modifikaci (Cordente et al., 2009).

Snížená produkce H_2S má za následek zvýšenou produkci SO_2 během fermentace. Nadměrná koncentrace SO_2 může u vína vést k inhibici jablečno-mléčného kvašení. Optimalizace hladiny SO_2 je možná za pomoci hybridizace kvasinek. Hybridní kmen kvasinek *S. cerevisiae* a *S. kudriavzevii* (AWRI 1810) produkoval velice nízkou koncentraci SO_2 (17 mg/l) vzhledem ke snížené koncentraci H_2S (Bizaj et al., 2012).

to the formation of hydrogen peroxide (strong oxidant) and other substances that disturb the quality of wine (Oliveira et al., 2011). In the presence of metal catalysts hydrogen peroxide is converted to hydroxyl radical. Hydroxyl radical is able to react with almost all wine components and it can lead to the formation of aldehydes and ketones. Sulphur dioxide reversibly binds to aldehydes and ketones, creating thus bonds between tannins and other substances (proteins, polysaccharides), and thus distorting hydrogen bonds and van der Waals interactions of tannins. This can have a negative impact on the taste profile of wine. Sulphur dioxide also reduces the quinone product back to phenol. The precipitation and polymerization of phenolic compounds reduces the overall concentration of phenols. Larger phenolic complexes are formed and are able to bind anthocyanins and stabilize wine taste and color (Waterhouse and Laurie, 2006).

Saccharomyces cerevisiae produces other sulfur compounds. Furfurylthiol causes the aroma of roasted coffee in fermented beverages while other fruit thiols (3-mercaptohexyl acetate, 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one, 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-2-one), cause the aroma after passionflower, gooseberry or grapefruit. Methanthiol (aroma-cooked cabbage), dimethylsulfide, dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide (cauliflower, cauliflower, garlic) and methylthioester (boiled cauliflower, cheese, chives) also often appear (Cordente et al., 2012).

Polyfunctional thiols 3MH, 3MHA and 4MMP have a great effect on the taste and aroma of wine. Polyfunctional thiols have an important influence in Sauvignon Blanc wine. The thiols 4MMP and 3MH are present in the form of glutathione or cysteine precursors which are cleaved to form thiols. However, only a small portion of the precursors is converted to thiols. The polyfunctional thiol 3MHA has no precursor, but is formed during the esterification of thiol 3MHA in the presence of ATF1 acetyltransferase. The transport of thiol precursors, cysteine and glutathione, is partially influenced by GAP1 membrane transporter (Cordente et al., 2012).

After the transfer of precursors to *S. cerevisiae* cell, they are cleaved and thiols are released. Overexpression of STR3 gene from *S. cerevisiae* causes an increased production of 3MH. The enzyme Str3p is cystothionine- β -lyase and can cleave precursors to form 3MH (Holt et al., 2011). Release of 3MH is probably mediated by more than one gene. The gene *IRC7* plays a key role in 4MMP release and partly contributes to 3MH release. In *S. cerevisiae* strains, the *IRC7* gene is often inactivated. It is probably responsible for different concentration of released thiols in different yeast strains (Swiegers et al., 2009). Cysteine has a higher share in the formation of thiols than glutathione. In some cases, a low proportion of glutathione involved in the formation of thiols may be compensated by a high concentration of glutathione in the medium (Winter et al., 2011).

S. cerevisiae produces hydrogen sulfide, which is responsible for the rotten egg off-flavor, and this odor appears already at a low concentration of H_2S . The major enzyme responsible for production of H_2S is H_2S oxidoreductase. The oxidoreductase catalyzes the reduction of sulfite to a sulfide which is released as H_2S . The production of H_2S is dependent on the yeast strain and fermentation conditions (availability of sulfur, nitrogen, vitamins, etc.). Hydrogen sulfide is produced in *S. cerevisiae* metabolism and occurs most often during methionine and cysteine biosynthesis, H_2S forms when amino acids are depleted. The most common source of sulfur is sulfate, which is found in grape juice. Sulfate is transported into the cell and reduced to sulfite and then to sulfide. Sulfide is produced in combination with O-acetylserine and O-acetylhomoserine, which are precursors of methionine and cysteine. If nitrogen in the fermentation medium is deficient, synthesis of the precursors doesn't occur. The sulfide accumulates, H_2S is formed and diffuses from the yeast to the environment (Spiropoulos and Bisson, 2000).

Control of *MET17* gene expression (synonyms *MET15* or *MET25*), which encodes bifunctional O-acetylserine/O-acetylhomoserine sulfhydrolase, should affect the production of H_2S . However, the results of tests on two different strains of *S. cerevisiae* (UCD522 and UCD713) weren't unambiguous. The strain UCD713 showed a reduction in H_2S synthesis whereas in the UCD522 strain, when the expression of *MET17* gene was increased, the level of H_2S also increased (Spiropoulos and Bisson, 2000). The *CYS4* gene affects the expression of cystathionine- β -synthase that reduces H_2S production and increases the rate of fermentation (Linderholm et al., 2006).

Another possible step to reduce the production of hydrogen sulfide is to influence the production of sulfite reductase. Sulfite reductase is a heterotetrameric protein composed of two α subunits and two β subunits. The subunit α is encoded by *MET10* gene and the β subunit by the *MET5* gene. The inactivation of *MET10* or *MET5* gene leads to accumulation of sulfites. Sulfites are not reduced to sulfides

5 ZÁVĚR

Volba vhodného kmene kvasinek má značný dopad na kvalitu piva i vína. Jednotlivé kmeny pivovarských a vinařských kvasinek se vzájemně liší stavbou genomu (jaderná DNA, mitochondriální DNA, přítomnost transposonů, mutace). V závislosti na stavbě genomu dochází k syntéze mnoha proteinů, které významně ovlivňují metabolické pochody (kvašení, katabolismus glukosy apod.) a vznik metabolitů. Právě metabolity kvasinek mají uplatnění ve vinařském a pivovarském průmyslu.

Významnou roli hrají sensoricky aktivní látky. Jde zejména o alkoholy, estery, acetaldehydy, těkavé kyseliny, monoterpenoidy, glycerol, sirmé sloučeniny a vicinální diketony. Tvorba vyšších alkoholů závisí na anabolismu a katabolismu aminokyselin (Ehrlichova dráha). Estery dokáží ovlivnit aroma (banán, květiny, mýdlo, apod.) piva i vína již ve stopových množstvích, jejich vznik je spjat s metabolismem lipidů. Acetaldehydy v nízkých koncentracích ovlivňují aroma kvašených nápojů také pozitivně (ovocné aroma), ale ve vyšších koncentracích dochází ke vzniku pachuti připomínající shnilá jablka. Vznikají oxidací nebo dehydrogenací primárních alkoholů a jsou vedlejším produktem alkoholového kvašení. Vicinální diketony jsou zodpovědné za mnohdy nežádoucí „máslové“ aroma. Další důležitou složkou jsou těkavé kyseliny, které v nízké koncentraci ovlivňují aroma a chuť pozitivně, ovšem v nadměrném množství způsobují nestabilitu nápoje. Nejčastěji je zastoupena octová kyselina. Terpenoidy se vyskytují přirozeně v přírodě v souvislosti s květy a plody rostlin, hrají roli v metabolismu kvasinek a dodávají květivané aroma. Kvasinky ovšem ve většině případů nejsou schopny syntetizovat monoterpenoidy *de novo*. Další významnou látkou je glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt ethanolového kvašení a posiluje chuť a aroma kvašených nápojů. Ovlivňuje osmotický gradient buněčných membrán a udržuje cytosolový redoxní gradient. V kvašených alkoholických nápojích jsou přítomny sirmé sloučeniny. Oxid siřičitý má antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Další sirmou látkou produkovanou kvasinkami je například furfurylthiol (aroma pražené kávy) a různé ovocné thiole. Sirmé sloučeniny nemají jen pozitivní dopad, ale ovlivňují kvašené nápoje i negativně. Např. sirovodík dodává pivu aroma zkaženého vejce.

Koncentrace a vzájemný poměr sensoricky aktivních látek ovlivňují výslednou kvalitu piva i vína. Jejich přítomnost v kvašených nápojích je významně ovlivněna řadou stresových faktorů, které působí na kvasinky v průběhu fermentace (koncentrace kyslíku, osmotický potenciál, pH, koncentrace ethanolu, živiny, teplota, apod.). Kvasinky jsou ovšem do jisté míry schopny se stresovým faktorům bránit, dochází k utlumení nebo zvýšení exprese různých genů. Významnou roli při odpovědi na stres hrají zejména reakce tepelného šoku a globální stresová reakce. Během výroby kvašených alkoholických nápojů je nutné dbát na správné fermentační podmínky a zamezit vzniku negativních stresových faktorů. Neméně důležitá je volba vhodného kmene kvasinek s požadovanými vlastnostmi.

PODĚKOVÁNÍ

Článek byl zpracován s podporou Specifického výzkumu Masarykovy univerzity (MUNI/A/1013/2015), s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství ČR na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1916) a projektu Výzkumné sensorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová vlna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Prior, B.A., 1994: GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 14(6): 4135-4144. DOI: 10.1128/MCB.14.6.4135
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., 2008: Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.*, 122(1-2): 188-195. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.083
- Belly, M., Rinaldi, A., Dubourdieu, D., 2003: Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 96(6): 507-512. DOI: 10.1016/S1389-1723(04)70141-3
- Bird, A.J., Gordon, M., Eide, D.J., Winge, D.R., 2006: Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. *EMBO J.*, 25(24): 5726-5734. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601453

and the concentration of hydrogen sulfide is reduced by 50-99% depending on *S. cerevisiae* strain. In addition to genetic modification, the expression of MET10 and MET5 genes can be influenced in other ways. Ethylmethanesulfonate induces genetic substitution with minimal lethality of *S. cerevisiae*. It is also possible to cause mutagenesis by UV radiation. Such modified yeast can be used in industry, because the procedure is not a direct genetic modification (Cordente et al., 2009).

The reduced production of H₂S causes increased production of SO₂ during fermentation. Excessive concentration of SO₂ may lead to inhibition of malolactic fermentation in wine. The optimization of SO₂ can be done by yeast hybridization. The hybrid of *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* (AWRI 1810) produced a very low concentration of SO₂ (17 mg/l) due to reduced concentration of H₂S (Bizaj et al., 2012).

5 CONCLUSIONS

The choice of a suitable yeast strain has a significant impact on the quality of beer and wine. Individual brewer's and wine yeast strains differ from each other by genome construction (nuclear DNA, mitochondrial DNA, presence of transposons, mutations). Depending on the construction of the genome, many proteins are synthesized that significantly affect metabolic processes (fermentation, glucose catabolism, etc.) and the formation of metabolites. Yeast metabolites are used in the viticulture and brewing industry.

Sensory active substances play a significant role in quality of fermented beverages. These include alcohols, esters, acetaldehydes, volatile acids, monoterpenoids, glycerol, sulfur compounds and vicinal diketones. The formation of higher alcohols depends on the anabolism and catabolism of amino acids (Ehrlich pathway). Esters can affect the beer and wine aroma (banana, flower, soap, etc.) already in trace amounts. The origin of esters is related to the metabolism of lipids. Low concentration of acetaldehydes also positively affects the aroma of fermented beverages (fruity aroma) but higher concentration causes a scent resembling a rotten apple. Acetaldehydes are formed by the oxidation or dehydrogenation of primary alcohols and are by-products of alcoholic fermentation. Vicinal diketones are responsible for the often undesirable "butter" flavor. Other important substances are volatile acids, which in low concentration positively affect the aroma and the taste, but in excess amounts cause instability of the beverage. The most common is acetic acid. Terpenoids occur naturally in nature in flowers and plant fruits, play a role in yeast metabolism and give a flowery aroma. However, in most cases, yeast is unable to synthesize monoterpenoids *de novo*. Another important ingredient is glycerol, which is a by-product of ethanol fermentation and strengthens the taste and the aroma of fermented beverages. Glycerol can influence the osmotic gradient across cell membranes and maintains cytosolic redox state. Fermented alcoholic beverages also contain sulfur compounds. Sulfur dioxide has antimicrobial and antioxidant properties. Yeast also produces other sulfur compounds, for example furfuryl thiol, which causes the aroma of roasted coffee, and various fruity thiols. Sulfur compounds don't have only a positive impact, they may also negatively affect fermented beverages. An important negative factor is hydrogen sulfide, causing the rotten egg flavor.

The concentration and ratio of sensory active substances influences the resulting quality of beer and wine. Their presence in fermented beverage is significantly influenced by many stress factors that affect yeast during fermentation (oxygen concentration, osmotic pressure, pH, ethanol concentration, nutrients, temperature, etc.). Yeast can resist a certain degree of stress factors. Expression of some genes is suppressed while the expression of others is increased. An important role in responding to stress is played by the heat shock response and the global stress response. During the production of fermented alcoholic beverages, proper fermentation conditions must be observed and negative stress factors must be avoided. However, it is very important to choose a suitable strain of yeast with the desired properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The article was elaborated with the support of the Specific research of Masaryk University (MUNI/A/1013/2015), using the institutional support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for the long-term conceptual development of RIBM - Research of Quality and Processing of Malting and Brewing raw materials (RO1916) and with support of CR Ministry of Education, Sports and Youth - Research Sensory Center in Prague and Research and Development - Sustainability and Development (LO1312).

- Bizaj, E., Cordente, A.G., Bellon, J.R., Raspor, P., Curtin, C.D., Pretorius, I.S., 2012: A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.*, 12(4): 456–465. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00797
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., Chambers, P.J., 2011: Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.*, 7: e1001287. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001287
- Boulton, C., Quain, D., 2001: *Brewing yeast and fermentation*. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England.
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., Jacquet, M., 1998: Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 180(5): 1044–1052.
- Canetta, E., Adya, A. K., Walker, G.M., 2006: Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. *FEMS Microbiol. Lett.*, 255: 308–315. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2005.00089
- Carrau, F.M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., Henschke, P.A., 2005: De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243(1): 107–115. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.11.050
- Comuzzo, P., Toniolo, R., Battistutta, F., Lizee, M., Svegli, R., Zironi, R., 2017: Oxidative behavior of (+)-catechin in the presence of inactive dry yeasts: A comparison with sulfur dioxide, ascorbic acid and glutathione. *J. Sci. Food Agric.* DOI: 10.1002/jsfa.8397
- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., Pretorius, I.S., 2012: Flavour-active wine yeasts. *Appl Microbiol Biot.*, 96: 601–618. DOI: 10.1007/s00253-012-4370-z
- Cordente, A.G., Heinrich, A., Pretorius, I.S., Swiegers, J.H., 2009: Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.*, 9(3): 446–459. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00489
- Curcio, M.J., Lutz, S., Lesage, P., 2015: The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Spectr.*, 3(2): 1–35. DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0053-2014
- De Smidt, O., Preez, D., C.J., Albertyn, J., 2008: The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Res.*, 8(7): 967–978. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00387
- Devine, S.E., Boeke, J.D., 1996: Integration of the yeast retrotransposon Ty1 is targeted to regions upstream of genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes Dev.* 10(5): 620–633. DOI: 10.1101/gad.10.5.620
- Díaz-Ruiz, R., Avéret N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M., 2008: Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate a possible role in crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.*, 283(40): 26948–26955. DOI: 10.1074/jbc.M800408200
- Drewke, C., Thielen, J., Ciriacy, M., 1990: Ethanol formation in adh⁰ mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 172: 3909–3917.
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.*, 18: 1610–1623. DOI: 10.1101/gr.076075.108
- Eglinton, J.M., Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A., De Barros Lopes, M., 2002: Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast*, 19(4): 295–301. DOI: 10.1002/yea.834
- Eglinton, J.M., McWilliam, S.J., Fogarty, M.W., Francis, I.L., Kwiatkowski, M.J., Høj, P.B., Henschke, P.A., 2000: The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine R.*, 6(3): 190–196. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00178.x
- Fisk, D.G., Ball, C.A., Dolinski, K., Engel, S.R., Hong, E.L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., Cherry, J.M., 2006: *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast*, 23: 857–865. DOI: 10.1002/yea.1400
- François, J., Parrou, J.L., 2001: Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25(1): 125–145. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574
- Fukuhara, H., 2003: MiniReview: The Kluver effect revisited. *FEMS Yeast Res.*, 3(4): 327–331. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00112-0
- Furdiková, K., Malík, F., 2007: Influence of yeast on the aroma profile of wine. *Kvasny Prum.*, 53(7–8): 215–221. DOI: 10.18832/kp2007013
- Gary, J.D., Sato, T.K., Stefan, C.J., Bonangelino, C.J., Weisman, L.S., Emr, S.D., 2002. Regulation of Fab1 Phosphatidylinositol 3-Phosphate 5-Kinase pathway by Vac7 Protein and Fig4, a polyphosphoinositide phosphatase family member. *Mol. Biol. Cell*, 13(4): 1238–1251. DOI: 10.1091/mbc.01-10-0498
- Gasch, A.P., 2003: The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. *Yeast stress responses*. Springer Berlin Heidelberg, 11–70.
- Gawel, R., Sluyter, S.V., Waters, E.J., 2007: The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Aust. J. Grap. Wine Res.*, 13(1): 38–45. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2007.tb00070.x
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., Smart, K.A., 2007: Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31(5): 535–569. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00076
- Gibson, B.R., Liti, G., 2015: *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32: 17–27. DOI: 10.1002/yea.3033
- Gibson, B.R., Storgårds, E., Krogerus, K., Vidgren, V., 2013: Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast* 30(7): 255–266. DOI: 10.1002/yea.2960
- Gijs, L., Chevance, F., Jerkovic, V., Collin, S., 2002: How low pH can intensify β-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. *J. Agric. Food Chem.*, 50(20): 5612–5616. DOI: 10.1021/jf020563p
- Giudici, P., Zambonelli, C., Passarelli, P., Castellari, L., 1995: Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46: 143–147.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996: Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287): 563–567. DOI: 10.1126/science.274.5287.566
- González, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2008: Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(8): 2314–2320. DOI: 10.1128/AEM.01867-07
- Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., Werner-Washburne, M., 2004: “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2): 187–206. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.187-206.2004
- Gualtieri, T., Ragni, E., Mizzi, L., Fascio, U., Popolo, L., 2004: The cell wall sensor Wsc1p is involved in reorganization of actin cytoskeleton in response to hypo-osmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(13): 1107–1120. DOI:10.1002/yea.1155
- Van Haecht, J.L., Dufour, J.P., 1995: The production of sulfur compounds by brewing yeasts: a review. *Cerevisia*, 20: 51–64.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Dickinson, J.R., 2008: The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(8): 2259–2266. DOI: 10.1128/AEM.02625-07
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., Chen, L., 2014: Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *J. Inst. Brew.*, 120: 157–163. DOI: 10.1002/jib.145
- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, M.R.M., de Hulster, E.A.F., van de Broek, M., Pronk, J.T., Geertman, J., Daran, J., Daran-Lapujade, P., 2015: *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Res.*, 15(3): fov005. DOI: 10.1093/femsyr/fov005
- Hewitt, S.K., Donaldson, I.J., Lovell, S.C., Delneri, D., 2014: Sequencing and characterisation of rearrangements in three *S. pastorianus* strains reveals the presence of chimeric genes and gives evidence of breakpoint reuse. *PloS One*, 9(3): e92203. DOI: 10.1371/journal.pone.0092203
- Hilt, W., Wolf, D.H., 1992: Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.*, 6(17): 2437–2442. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01419
- Holt, S., Cordente, A.G., Williams, S.J., Capone, D.L., Jitjaroen, W., Menz, I.R., Curtin, C., Anderson, P.A., 2011: Engineering *Saccha-*

- Saccharomyces cerevisiae* to release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an *S. cerevisiae* gene, STR3, for improvement of wine aroma. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(11): 3626-3632. DOI: 10.1128/AEM.03009-10
- Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V., 2009: Application of some modern sample preparation procedures for quantitative determination of vicinal diketones in beer. *Kvasny Prum.*, 55 (3): 66–72. DOI: 10.18832/kp2009007
- Hu, C.K., Bai, F.W., An, L.J., 2003: Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg²⁺ via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1191–1194. DOI: 10.1023/A:1024583503274
- Chalker, D.L., Sandmeyer, S.B., 1992: Ty3 integrates within the region of RNA polymerase III transcription initiation. *Genes Dev.* 6(1): 117–128. DOI:10.1101/gad.6.1.117.
- Jackowetz, J. N., Dierschke, S., Mira de Orduña, R., 2011: Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.*, 44(1): 310–316. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.014
- Jenkins, C.L., Lawrence, S.J., Kennedy, A.I., Thurston, P., Hodgson, J.A., Smart, K.A., 2009: Incidence and formation of petite mutants in lager brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* (syn. *S. pastorianus*) populations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 67: 72–80. DOI: 10.1128/MMBR.00060-12.
- Kang, D., Hamasaki, N., 2002: Maintenance of mitochondrial DNA integrity: Repair and degradation. *Curr. Genet.*, 41: 311-322. DOI: 10.1007/s00294-002-0312-0
- Karlgren, S., Pettersson, N., Nordlander, B., Mathai, J.C., Brodsky, J.L., Zeidel, M.L., Bill, R.M., Hohmann, S., 2005: Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmotic stress signaling. *J. Biol. Chem.*, 280(8): 7186–7193. DOI: 10.1074/jbc.M413210200
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S., 2002: Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(3): 239-256. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613
- Klouda, P., 2013: Základy biochemie. Pavko, Ostrava, 107-113.
- Kobayashi, N., McEntee, K., 1993: Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13(1): 248-256.
- Krogerus, K., Gibson, B., 2013: Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(15): 6919–6930. DOI: 10.1007/s00253-013-4955-1
- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A., Sáez, M.J., 1982: Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.*, 152(1): 19-25.
- Larroy, C., Parés, X., Biosca, J.A., 2002: Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, 269(22): 5738-5745. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03296
- Lee, K., Hahn, J.S., 2013: Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, 88(6): 1120–1134. DOI: 10.1111/mmi.12246
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S., 2006: The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23(9): 641-659. DOI: 10.1002/yea.1382
- Linderholm, A.L., Olineka, T.L., Hong, Y., Bisson, L.F., 2006: Allele diversity among genes of the sulfate reduction pathway in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Viticult.*, 57: 431-440.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000: *Molecular Cell Biology*, sekce 16.1: Oxidation of glucose and fatty acids to CO₂. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21624>
- Lodolo, E.J., Kock, J.L.F., Axcell, B.C., Brooks, M., 2008: The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.*, 8: 1018–1036.
- van Loon, A.P., Young, E.T., 1986: Intracellular sorting of alcohol dehydrogenase isoenzymes in yeast: a cytosolic location reflects absence of an amino-terminal targeting sequence for the mitochondrion. *EMBO J.*, 5(1): 161-165.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G., Ruis, H., 1993: A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.*, 12(5): 1997-2003.
- Marinoni, G., Manuel, M., Petersen, R.F., Hvidtfeldt, J., Sulo, P., Piškur, J., 1999: Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J. Bacteriol.*, 181(20): 6488-6496.
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V., De Rouck, G., Aerts, G., Verstrepen, K.J., 2015: A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(23): 8202-8214. DOI: 10.1128/AEM.02464-15
- Monerawela, C., James, T.C., Wolfe, K.H., Bond, U., 2015: Loss of lager specific genes and subtelomeric regions define two different *Saccharomyces cerevisiae* lineages for *Saccharomyces pastorianus* Group I and II strains. *FEMS Yeast Res.*, 15(2): 1-11. DOI: 10.1093/femsyr/fou008
- Moir, M., 1992: The desideratum for flavour control. *J. Inst. Brew.*, 98: 215-220.
- Morrison, K.B., Suggett, A., 1983: Yeast handling, petite mutants and lager flavor. *J. Inst. Brew.* 89: 141–142.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., Ashikari, T., 2009: Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res.*, 16(2): 115–129. DOI: 10.1093/dnares/dsp003
- Nass, R., Rao, R., 1999: The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiol.*, 145: 3221-3228. DOI: 10.1099/00221287-145-11-3221
- Nookaew, I., Jewett, M.C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., Nielsen, J., Bhumiratana, S., 2008: The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Systems Biology*, 2:71. DOI: 10.1186/1752-0509-2-71
- Novák, J., Basařová, G., Fiala, J., Dostálek, P., 2006: Changes to yeast properties in brewing process and fast methods of their monitoring. *Kvasny Prum.*, 52(1): 3-6. DOI: 10.18832/kp2006032
- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., De Freitas, V., Silva, A.M.S., 2011: Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Inter.*, 44(5): 1115–1126. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.050
- Olaniran, A.O., Hiralal, L., Mokoena, M.P., Pillay, B., 2017: Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J. Inst. Brew.* in press, DOI: 10.1002/jib.389
- Omura, F., 2008: Targeting of mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* IIV5p to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing. *Appl. Microbiol. Biot.*, 78(3): 503-513. DOI: 10.1007/s00253-007-1333
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M., 1998: Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO J.*, 17(9): 2566-2573. DOI:10.1093/emboj/17.9.2566
- Pang, S.S., Duggleby, R.G., 2001: Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem. J.*, 357(3): 749–757. DOI: 10.1042/bj3570749
- Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vicente, A.A., 2014: Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(5): 1937-1949. DOI: 10.1007/s00253-013-5470-0
- Procopio, S., Brunner, M., Becker, T., 2014: Differential transcribed yeast genes involved in flavour formation and its associated amino acid metabolism during brewery fermentation. *Eur. Food Res. Technol.*, 239: 421-439. DOI: 10.1007/s00217-014-2236-6
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T., 2011: Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur. Food Res. Technol.*, 233: 721–729. DOI: 10.1007/s00217-011-1567-9
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H., Van Dijken, J.P., 1996: Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16): 1607–1633. DOI: 10.1038/167653b0
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., 2006: Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6): 3968-3974. DOI: 10.1128/AEM.02769-05
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003: *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.*, 96(1): 1–9.
- Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolini, L., 2012: *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in

- sweet wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(6): 1987-94. DOI: 10.1128/AEM.06768-11
- Romano, P., Suzzi, G., 1996: Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2): 309-315.
- van Rossum, H.M., Kozak, B.U., Niemeijer, M.S., Duine, H.J., Luttk, M.A.H., Boer, V.M., Kötter, P., Daran, J.M.G., van Maris, A.J.A., Pronk, J. T., Nielsen, J., 2016: Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 16(3): fow017. DOI: 10.1093/femsyr/fow017
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Dijck, P.V., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R., 2008: Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(2): 454-461. DOI: 10.1128/AEM.01616-07
- Saint-Prix, F., Bönquist, L., Dequin, S., 2004: Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP+-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading, England)*, 150: 2209-2220. DOI: 10.1099/mic.0.26999-0.
- Sakamoto, K., Konings, W. N., 2003: Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89(2-3): 105-124. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00153-3
- Shimizu, C., Araki, S., Kuroda, H., Takashio, M., Shinotsuka, K., 2001: Yeast cellular size and metabolism in relation to the flavor and flavor stability of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 59(3), 122-129. DOI: 10.1094/ASBCJ-59-0122
- Sigler, K., Matoulková, D., 2011: Stress responses in brewing yeast. *Kvasny Prum.*, 57(7-8): 277-284. DOI: 10.18832/kp2011032
- Smart, K.A., 2017: Yeast stress and brewing fermentations. In: *Brewing Microbiology, Current Research, Omics and Microbial Ecology* (Eds. Bokulich, N.A., Bamforth, C.W.), Caister Academic Press, UK. ISBN: 978-1-910190-61-6
- Spiropoulos, A., Bisson, L.F., 2000: MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10): 4421-4426. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4421-4426.2000
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine R.*, 11(2): 139-173. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
- Swiegers, J.H., Kievit, R.L., Siebert, T., Lattey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., King, E.S., Pretorius, I.S., 2009: The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiol.*, 26(2): 204-211. DOI: 10.1016/j.fm.2008.08.004
- Tamás, M.J., Rep, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S., 2000: 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(1): 159-165. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01445-9
- Teusink, B., Passarge, J., Reijenga, C.A., Esgalhado, E., van der Weijden, C.C., Schepper, M., Walsh, M.C., Bakker, B.M., van Dam, K., Westerhoff, H.V., Snoep, J.L., 2000: Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur. J. Biochem.*, 267(17): 5313-5329. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01527.x
- Thomas, D., Surdin-Kerjan, Y., 1997: Metabolism of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 503-532.
- Trabalzini, L., Paffetti, A., Scaloni, A., Talamo, F., Ferro, E., Coratza, G., Bovalini, L., Lusini, P., Martelli, P., Santucci, A., 2003: Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 370(Pt 1): 35-46. DOI: 10.1042/BJ20020140
- Waterhouse, A.L., Laurie, V.F., 2006: Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57(3): 306-313.
- Wendland, J., 2014: Lager yeast comes of age. *Eukaryot. Cell*, 13: 1256-1265. DOI: 10.1128/EC.00134-14
- Winter, G., Van Der Westhuizen, T., Higgins, V. J., Curtin, C., Ugliano, M., 2011: Contribution of cysteine and glutathione conjugates to the formation of the volatile thiols 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Aust. J. Grape Wine R.*, 17(2): 285-290. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2011.00127.x
- Xu, H., Boeke, J.D., 1987: High-frequency deletion between homologous sequences during retrotransposition of Ty elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(23):8553-7.
- Xu, T., Bharucha, N., Kumar, A., 2011: Genome-wide transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Methods Mol. Biol.*, 765:207-24. DOI: 10.1007/978-1-61779-197-013
- You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C., 2003: Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3): 1499-1503. DOI: 10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003
- Yuan, D.S., 2000: Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by transposon tagging. *Genetics*, 156(1):45-58.
- Zhao, X., Procopio, S., Becker, T., 2015: Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *J. Food Sci. Technol.*, 52: 75-88. DOI: 10.1007/s13197-015-1977-y
- Zou, S., Kim, J.M., Voytas, D.F., 1996: The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 influences the organization of chromosome ends. *Nucleic Acids Res.*, 24(23): 4825-4831. DOI: 10.1093/nar/24.23.4825

Do redakce došlo / Manuscript received: 19/05/2017
Přijato k publikování / Accepted for publication: 20/06/2017