Pivovarství a sladařství

Citlivost kvasinek ke „smrtícím" kmenům

582.282.232
663.45

Prof. Dr. OLGA BENDOVÁ, CSc. a Ing. BLANKA PARDONOVÁ
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský Praha

Některé kmeny kvasinek mají „smrtící" účinek na kvasinky, které jsou k nim senzitivní. Existence a účinek tohoto jevu byly poprvé popsány u *Saccharomyces cerevisiae* jako typ „smrtící" reakce (killer reaction) [1]. Tato reakce byla zjištěna u kvasinek *pivovarských* [2], *vinných* [3], *pekařských* a později i u příslušníků jiných rodů, např. *Hansenula, Pichia, Debaryomyces, Kluyveromyces, Candida* a *Torulopsis* [4].

Příčinou reakce je schopnost kmenů vylučovat do prostředí tzv. „smrtící faktor" (killer factor). Jde o vysokomolekulární glykoprotein, jehož syntéza je určována mimochromosomálními elementy, představovanými dvouřetězcovými RNA (dsRNA) s molekulovou hmotností $1{,}4 \times 10^6$ (označenými jako typ M). V buňkách byly zjištěny i další typy dsRNA s různou molekulovou hmotností L — $2{,}5 \times 10^6$, XL — $3{,}0 \times 10^6$ aj. „Smrtící" reakce je však kontrolována jadernými geny [5, 10]. V současné době se stále více uplatňuje názor, že zde jde o projev tzv. mykovirů, i když toto označení není zcela přesné [6, 7, 8, 9, 10].

V souvislosti se „smrtící" reakcí existují u kvasinek tři fenotypy:

1. „smrtící", 2. senzitivní, 3. neutrální.

„Smrtící" fenotyp produkuje toxin a je vůči působení jiných „smrtících" kvasinek imunní. Senzitivní fenotyp je toxinem usmrcován, zatímco u neutrálního fenotypu je toxin neúčinný.

Kromě uvedených fenotypů byly popsány i různé mutanty, které postrádají imunitu a schopnost produkovat toxin [5]. Jde o mutanty spontánní, mutanty indukované cykloheximidem a mutanty, které v diploidu suprimují toxickou schopnost. Některé mutanty ztratily pouze jednu vlastnost, např. imunitu, jiné jsou senzitivní k vyšší teplotě (30 °C). Existují i mutanty, které projevují oproti výchozímu kmenu větší míru toxického účinku (superkillers).

Mutanty pochopitelně vykazují změny v ds RNA [5]. Například všechny mutanty defektní ve funkci „smrtící" a imunitní neobsahují ds RNA typu M. Také množství ds RNA typu L je u nich do různé míry sníženo. Mutanty indukované cykloheximidem rovněž nemají ds RNA typu M, avšak obsahují více ds RNA typu L než standardní „smrtící" fenotyp. U suprimujících mutant byla vedla ztráty ds RNA typu M zjištěna přítomnost dalšího typu ds RNA (S) s nižší molekulovou hmotností (5×10^5). Podobný typ ds RNA byl popsán u mutanty, která ztratila immunitu. Mutanty typu superkiller obsahují kromě ds RNS typu L větší množství typu M.

Kmeny různých kvasinek se liší optimálními hodnotami pH pro „smrtící" účinek. *Philliskirk* a *Young* rozdělili soubor zkoumaných rodů a druhů do čtyř skupin pH různého rozmezí od 4,1 do 4,9 [4]. Zpravidla se však uvádí rozmezí pH 4,5 až 4,9 a teplota 20 až 24 °C. Při pH vyšším než 5 a také při vysokých teplotách se uvedená aktivita ztrácí.

„Smrtící kvasinky mohou působit při výrobě piva potíže. Tuto skutečnost poprvé zaznamenali angličtí autoři *Maule* a *Thomas* při kontinuální výrobě piva [2]. Rušivý vliv těchto kvasinek se může projevovat zpomalováním kvasného procesu, zvyšováním počtu mrtvých buněk v kultuře a nežádoucími změnami chuti a vůně piva [11].

Z tohoto pohledu bylo účelné posoudit citlivost kmenů pivovarských kvasinek, vedených ve sbírce VÚPS, k eventuální kontaminaci „smrtícími" kvasinkami.

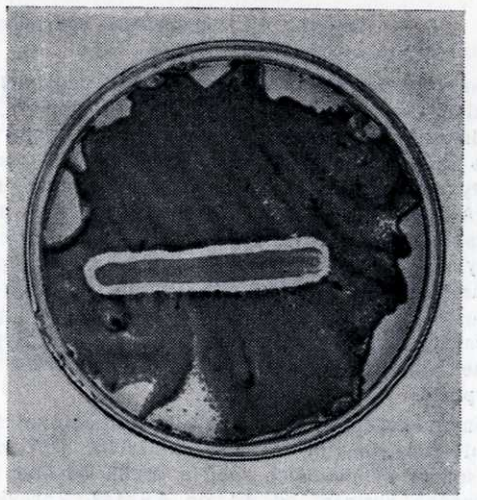
Smrtící reakce se prokazovala kultivací testovaných sbírkových kmenů na živném agaru s metylenovou modří o pH 4,7. *Philliskirk* a *Young* [4] uvádějí pro kmen č. 738 optimální rozmezí pH 4,1 až 4,5 při použití jiného testovacího média. Pro aplikaci uvedeného živného agaru u kmene č. 738 bylo experimentálně zjištěno optimum při pH 4,6 až 4,8 [13].

Tabulka 1. Laboratorní kvasné zkoušky — kmen č. 9 a killer-kvasinka č. 587

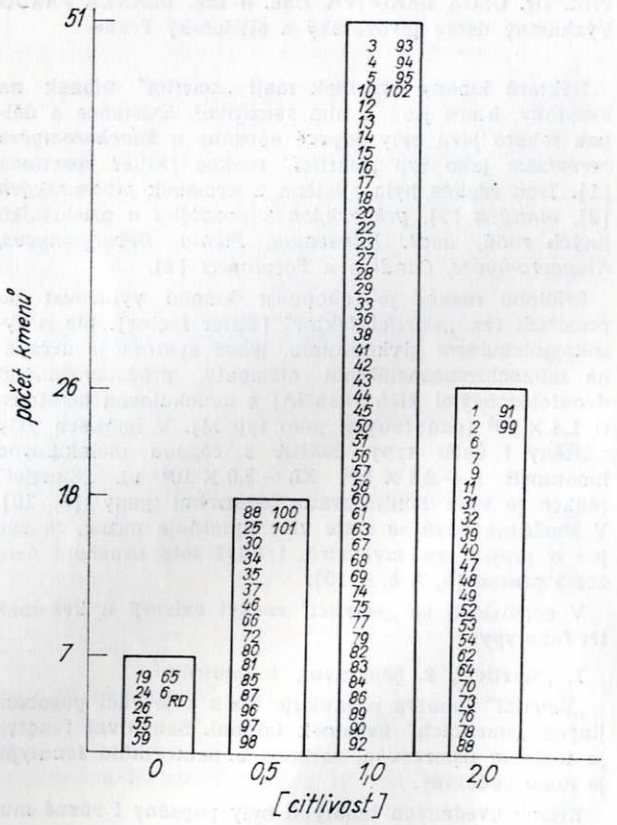
Den	Kontrolovaný kmen č. 9			1% kontaminace			3% kontaminace			10% kontaminace		
	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH
0	10,14	1,2	5,0	10,14			10,14		5,0	10,14		5,0
1	9,76	1,6	4,55	9,79	2,8	4,55	9,81	3,1	4,60	9,82	4,5	4,60
2	9,04	2,0	4,50	9,10	4,0	4,50	9,16	5,0	4,55	9,18	7,9	4,55
4	6,04	1,9	4,45	6,28	7,4	4,45	6,58	10,8	4,48	6,68	12,0	4,48
5	5,28	1,8	4,40	5,46	9,7	4,40	5,70	12,4	4,40	5,78	18,4	4,40
6	4,21	2,0	4,35	4,42	10,1	4,35	4,58	13,8	4,40	4,68	24,7	4,40
7	3,59	2,0	4,35	3,79	11,7	4,35	3,92	15,1	4,35	4,01	28,2	4,40
sediment (ml)	7,0			5,8			4,8			4,0		
zdánlivé prokvašení (%)	64,6			62,6			61,3			60,5		

Tabulka 2. Laboratorní kvasné zkoušky — kmen č. 96 a killer kvasinka č. 587

Den	Kontrolovaný kmen č. 96			1% kontaminace			3% kontaminace			10% kontaminace		
	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH	%E	MB%	pH
0	9,99	0,5	5,0	9,99		5,0	9,99		5,0	9,99		5,0
1	9,17	0,5	4,60	9,30	2,1	4,55	9,26	2,6	4,55	9,34	3,0	4,55
2	7,85	1,3	4,48	8,07	2,7	4,50	8,02	3,2	4,50	8,20	5,3	4,50
4	5,23	1,5	4,45	5,35	3,3	4,45	5,60	4,0	4,43	5,82	5,6	4,43
5	4,24	1,8	4,35	4,34	3,3	4,40	4,72	4,7	4,40	4,95	5,5	4,40
6	3,66	2,2	4,35	3,75	6,1	4,40	4,07	8,2	4,40	4,10	10,6	4,40
7	3,51	1,7	4,35	3,62	7,2	4,40	3,69	9,1	4,40	3,76	11,6	4,40
sediment (ml)	7,0			6,0			5,0			4,5		
zdánlivé prokvašení (%)	63,9			63,8			63,1			62,4		



Obr. 1. Inhibiční zóna nárůstu „smrtícího" kmene



Obr. 2. Citlivost kmenů (č. 1—102) ze sbírky VÚPS k „smrtícímu" kmenu č. 589

Po dvoudenní inkubaci při 20 °C vznikla při pozitivní reakci kolem nátěru „smrtícího" kmene průsvitná zóna [12]. Podle šířky této zóny se posuzovala míra „smrtící" reakce *(obr. 1)*.

Obrázky 2 a *3* uvádějí citlivost pivovarských kvasinek ke „smrtícím" kmenům. Je vidět, že sledované kvasinky jsou k oběma kmenům vesměs více či méně citlivé. Neutrální fenotyp se projevil při testech s kmenem č. 587 u sedmi kmenů a pouze u dvou kmenů při testech s kmenem č. 738. Z produkčních kmenů byl kmen č. 96 relativně nejméně citlivý, nejvyšší citlivost vykazoval kmen č. 9.

S oběma kmeny (č. 9 a 96) byly provedeny kvasné zkoušky v laboratorních podmínkách při 8 °C. Kulturní kvasinky byly kontaminovány kmenem č. 587 v různém procentním podílu (1, 3 a 10 %). Z *tabulky 1* a *2* a *obr. 4* a *5* je zřejmé, že se kvasný proces zpomalil již při 1% kontaminaci. Výraznější snížení intenzity kvašení se projevilo počínaje čtvrtým dnem při 3% kontaminaci. Působením „smrtícího" kmene se v kulturách významně zvýšil počet mrtvých buněk, a to větší měrou

Tabulka 3. Citlivost vybraných kmenů rodu Saccharomyces ke „smrtícím" kvasinkám č. 587 a 738

Původ	Č. kmene	Název	Citlivost	
			587	738
CCY	21-6-1	*Sacch. pastorianus*	2	3
CCY	21-6-2	*Sacch. pastorianus*	1	3
CCY	21-13-1	*Sacch. bayanus*	2	1
CCY	21-13-2	*Sacch. bayanus*	2	3
CCY	22-3-37	*Sacch. cerevisiae*	1	0,5
CCY	21-4-4	*Sacch. cerevisiae*	2	2
CCY	21-11-1	*Sacch. chevalieri*	3	3
CCY	21-24-1	*Sacch. globosus*	0,5	0,5
CCY	21-33-2	*Sacch. italicus*	3	3
CCY	21-9-1	*Sacch. exiguus*	2	2
CCY	21-31-5	*Sacch. heterogenicus*	0,5	0,5
CCY	21-46-1	*Sacch. aceti*	0,5	1
CCY	21-47-1	*Sacch. oleaginosus*	3	3
CCY	21-21-2	*Sacch. oviformis*	0,5	0,5
CCY	21-35-1	*Sacch. coreanus*	0	0,5
CCY	21-5-1	*Sacch. kluyveri*	0	0
CCY	48-76	*Sacch. uvarum*	3	3
CCY	48-78	*Sacch. uvarum*	3	3
CCY	48-80	*Sacch. uvarum*	2	2
RIFIS	92	*Sacch. cerevisiae Hansen*	2	1
RIFIS	96	*Sacch. cerevisiae Hansen*	2	1
RIFIS	119	*Sacch. cerevisiae Hansen*	2	1

Tabulka 4. Citlivost kmenů divokých kvasinek ke „smrtícím" kvasinkám č. 587 a č. 738

Původ	Č. kmene	Název	Citlivost	
			587	738
CCY	38-1-1	*Hansenula anomala*	0	0
CCY	38-4-1	*Hansenula saturnus*	0	0
CCY	34-1-2	*Saccharomycodes ludwigii*	0	0
CCY	41-2-1	*Debaryomyces globosus*	0	0
CCY	26-7-1	*Torulopsis colliculosa*	0	0
CCY	20-1-6	*Rhodotorula mucilaginosa*	0	0
CCY	29-38-17	*Candida utilis*	0	0
CCY	17-1-2	*Cryptococcus neoformans*	0	0
CCY	30-5-1	*Trichosporon cutaneum*	0	0
CCY	39-1-3	*Pichia membranaefaciens*	0	0
CCY	29-39-1	*Candida mycoderma*	0	0
RIBM	T4	*Torulopsis utilis*	0	0
CCY	31-1-2	*Brettanomyces anomalus*	0	0
CCY	31-3-1	*Brettanomyces bruxellensis*	0	0

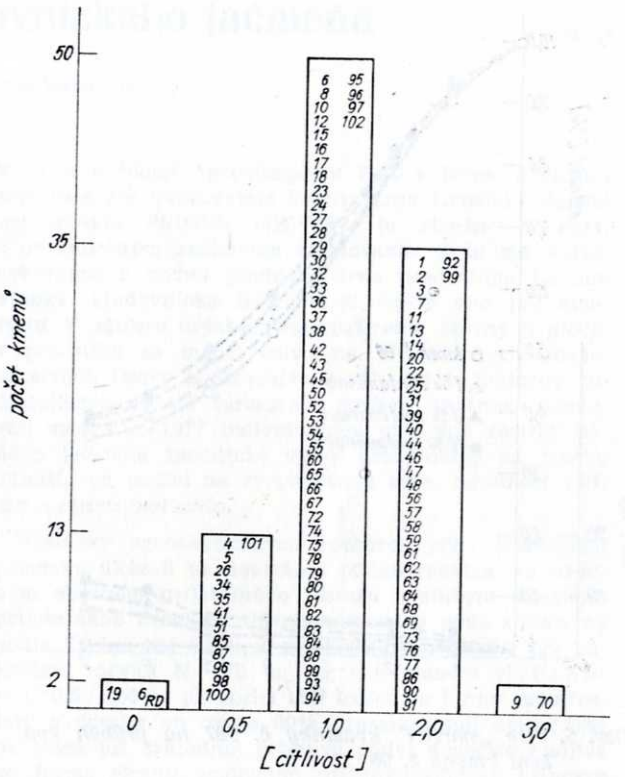
u kmene č. 9, zejména při 10% kontaminaci. Současně byla zaznamenána i klesající sedimentační schopnost kontaminovaných kvasnic.

Výsledky uvedených zkoušek svědčí o tom, že při hledání příčin poruch ve spilce je třeba uvažovat také možnost kontaminace „smrtícími" kmeny.

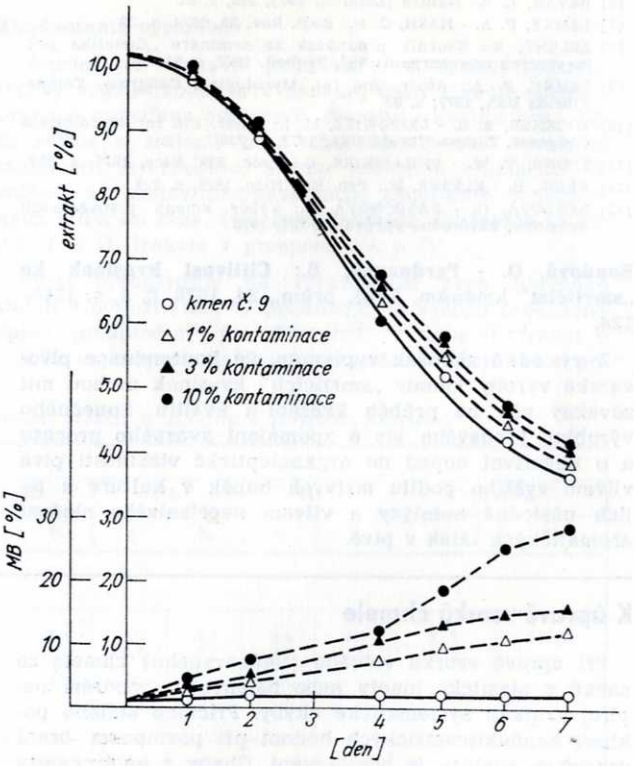
„Smrtící kvasinky působí s některými výjimkami letálně i na příslušníky jiných druhů rodu *Saccharomyces*. Naproti tomu se „smrtící" reakce zřejmě většinou neuplatňuje ve vztahu k zástupcům jiných rodů. Tuto skutečnost dokumentují výsledky stanovení citlivosti kvasinek k „smrtícím" kmenům uvedené v *tab. 3* a *4* (testované kmeny pocházely ze sbírky kvasinek v Chemickém ústavu SAV vedené Dr. A. *Kockovou-Kratochvílovou,* DrSc.).

Prakticky se tyto výsledky shodují s údaji *Kreila* a *Klebera* [12], kteří provedli obdobné zkoušky, avšak s minimálním zastoupením příslušníků rodu *Saccharomyces*. Tito autoři však zjistili senzitivnost u dvou ze 12 kmenů rodu *Candida* a u jednoho kmene *Hansenula anomala* a *Kloeckera corticis*. Toto zjištění lze plně chápat za předpokladu, že se naopak např. mezi senzitivními pivovarskými kvasinkami nacházejí kmeny neutrální.

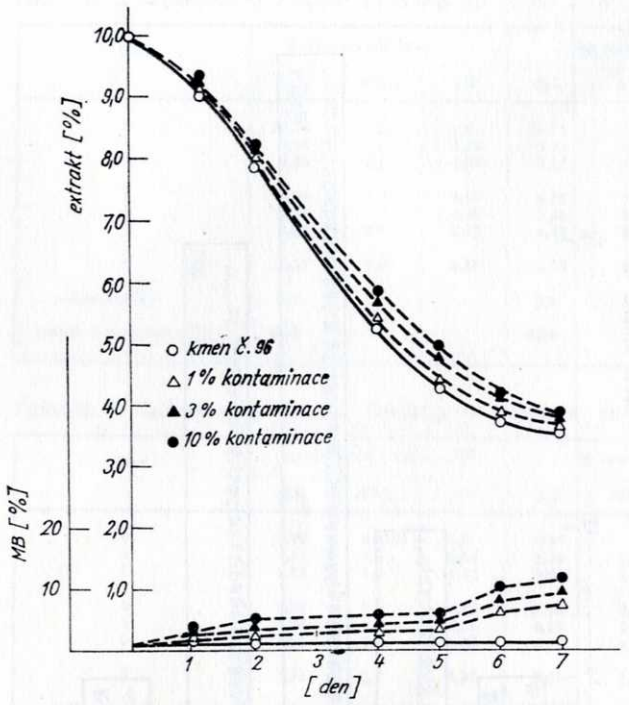
Při těchto testech se však současně zjistilo, že oba používané „smrtící" kmeny postrádají výraznou imunitu k vzájemnému letálnímu působení, protože se u nich projevila slabě pozitivní reakce. Lze tedy u nich předpokládat mutaci.



Obr. 3. Citlivost kmenů (č. 1—102) ze sbírky VÚPS k „smrtícímu" kmenu č. 738



Obr. 4. Vliv „smrtící" kvasinky č. 587 na průběh kvašení kmene č. 9



Obr. 5. Vliv „smrtící" kvasinky č. 587 na průběh kvašení kmene č. 96

Literatura

[1] BEVAN, E. A. - MAKOWER, M.: Proc. 11th Int. Congr. Genet. I, 1963,s.1902
[2] MAULE, A. P. - Thomas, P. D.: J. Inst. Brew. **79**, 1973, s. 137
[3] NAUMOV, G. I. - THURINA, L. V. - BURJAN, N. I. - NAUMOVA, T. I.: Biol. Nauki, **16**, 1973, s. 103
[4] PHILLISKIRK, G. - YOUNG, T. W.: Antonie van Leeuwenhoek **41**, 1975, s. 147
[5] VODKIN, M. - KATTERMAN, F. - FINK, G. R.: J. Bact. **117**, 1974, s. 681
[6] BEVAN, E. A.: Nature (London) 1973, 245, s. 81
[7] LEMKE, P. A. - NASH, C. H.: Bact. Rev. **38**, 1974, s. 29
[8] ZELENÝ, K.: Sborník přednášek ze semináře „Genetika průmyslových mikroorganismů", Třeboň, 1977, s. 91
[9] LEMKE, P. A.: Abstr. 2nd Int. Mycological Congress, Tampa-Florida USA, 1377, s. 92
[10] WICKNER, R. B. - LEIBOWITZ, M. J.: Abstr. 2nd Int. Mycological Congress, Tampa-Florida USA, 1977, s. 738
[11] YOUNG, T. W. - PHILLISKIRK, G.: Proc. EBC Nice, 1975, s. 333
[12] KREIL, H. - KLEBER, W.: Pro. EBC Nice, 1975, s. 323
[13] BENDOVÁ, O. - PARDONOVÁ, B.: Výběr kmenů pivovarských kvasinek, závěrečná zpráva OÚ 5/2, 1978

Bendová, O. - Pardonová, B.: Citlivost kvasinek ke „smrtícím" kmenům. Kvas. prům., **24**, 1978, č. 6, s. 121—124.

Z výsledků zkoušek vyplynulo, že kontaminace pivovarské výroby kmeny „smrtících" kvasinek mohou mít závažný vliv na průběh kvašení i kvalitu konečného výrobku. Především jde o zpomalení kvasného procesu a o negativní dopad na organoleptické vlastnosti piva vlivem vyššího podílu mrtvých buněk v kultuře a jejich následné autolýzy a vlivem nepříznivého složení aromatických látek v pivě.

Experimentálně bylo zjištěno, že „smrtící" faktor účinkuje i proti jiným druhům rodu *Saccharomyces*, zatímco kvasinky jiných rodů a jejich druhů jsou k němu zřejmě neutrální.

Бендова, О. — Пардонова, Б.: Чувствительность дрожжей к деятельности убивающих штаммов. Квас. прум. **24**, 1978, № 6, стр. 121—124.

Из результатов экспериментального исследования можно вывести заключение, что заражение сусла или пива в любовой фазе процесса убивающими штаммами дрожжей влияет отрицательно как на сбраживание, так и на качество конечного продукта. Процесс сбраживания замедляется и органолептические качества пива снижаются. Основными причинами этого являются увеличение доли мертвых клетов в культуре, их автолиз и неблагоприятный состав ароматических соединений.

Было установлено, что убивающее влияние распространяется также на другие виды дрожжей Saccharomyces, в то время как на остальные дрожжи оно не действует.

Bendová, O. - Pardonová, B.: Sensitivity of Yeast to „Killer yeast" Strains. Kvas. prům., **24**, 1978, No. 6, pp. 121—124.

The results of a comprehensive series of experiments disclose, that the presence of „killer" strains in some stages of brewing process can affect very unfavourably fermentation, as well as the quality of final product. They slow down fermentation process and deteriorate organoleptic properties of beer, which is due to a high proportion of dead cells in the culture, their autolysis and unfavourable composition of aromatic compounds present in beer.

The research work also confirms that the „killer" factor can destroy even other species of the Saccharomyces kind, whereas other yeasts are to it quite resistant.

Bendová, O. - Pardonová, B.: Empfindlichkeit der Hefen gegen „Killer-Stämme". Kvas. prům. **24**, 1978, No. 6, S. 121—124.

Die Versuchsergebnisse zeugen davon, daß die Kontamination der Bierherstellung durch „Killer-Hefestämme" einen grundsätzlichen Einfluß auf den Verlauf der Gärung und die Qualität des Endproduktes haben kann. Es wurde vor allem die Verlangsamung des Gärprozesses und die Beeinträchtigung der organoleptischen Eigenschaften des Bieres festgestellt. Dieser negative Einfluß auf den Geschmack hängt mit dem höheren Anteil der toten Zellen in der Kultur und ihrer nachfolgenden Autolyse sowie auch mit der ungünstigen Zusammensetzung der aromatischen Stoffe im Bier zusammen.

Experimental wurde festgestellt, daß der Killerfaktor auch gegen andere Arten der Gattung Saccharomyces wirksam ist, wogegen sich die Hefen anderer Genera und ihrer Arten zu ihm neutral verhalten.

K úpravě vzorků chmele

Při úpravě vzorků volného (nelisovaného) chmele ze sáčků z plastické hmoty nebo balených v modrém papíru, vznikají systematické chyby. Příčinou stálého poklesu konduktometrických hodnot při postupném braní vzorků k analýze je odměšování. Chyby z heterogenity při braní vzorků se považovaly až dosud za chyby nahodilé.

Úprava vzorků chmele mletím a automatickým dělením je proto zvláště u chmelů nelisovaných zcela nezbytná, má-li se získat jeden nebo více reprezentativních vzorků k analýze.

Je popsáno zařízení k mletí a dělení vzorků v jediném pracovním postupu.

FORSTER, A.: Probenaufbereitung von Hopfen. Brauwissenschaft, **30**, 1977, č. 11, s. 333—337.

Lhotský