

DOI: 10.18832/kp2016024

Kvasinky non-Saccharomyces a jejich význam v pivovarském průmyslu. I. část – *Brettanomyces* (Dekkera)

Non-Saccharomyces Yeasts and Their Importance in the Brewing Industry Part I - Brettanomyces (Dekkera)

Tatiana KOCHLÁŇOVÁ¹, David KIJ¹, Jana KOPECKÁ¹, Petra KUBIZNIAKOVÁ², Dagmar MATOULKOVÁ²¹Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita / Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, e-mail: 376098@mail.muni.cz, 223187@mail.muni.cz²Mikrobiologické oddělení, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., / Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague

e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz, matoulkova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed Paper

Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Kvasinky non-Saccharomyces a jejich význam v pivovarském průmyslu. I. část – *Brettanomyces* (Dekkera). Kvasny Prum., 62(7–8), s. 198–205

Kvasinky jiných rodů než *Saccharomyces* se v historii výroby piva vyskytovaly jako součást spontánního kvašení. Nyní jsou považovány většinou za kontaminaci produkující nežádoucí senzoryicky aktivní látky a CO₂. Výjimkou jsou speciální pivní styly (např. lambik a gueuze), kde je metabolická činnost non-Saccharomyces kvasinek (zejména rodů *Brettanomyces* a *Dekkera*) klíčovým prvkem. V článku je uvedena charakteristika a taxonomické zařazení kvasinek *Brettanomyces* a *Dekkera* a popsány jsou základní mikrobiologické aspekty výroby piva lambik a gueuze.

Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Non-Saccharomyces yeasts and their importance in the brewing industry. Part I – *Brettanomyces* (Dekkera). Kvasny Prum., 62(7–8), pp. 198–205

In the history of beer production, yeasts of genera other than *Saccharomyces* occurred as part of a spontaneous fermentation. They are now mostly regarded as contaminants producing undesirable sensorially active substances and CO₂. Exceptions are special beer styles (e.g. lambic and gueuze), in which the metabolic activity of non-Saccharomyces yeasts (in particular genera *Brettanomyces* and *Dekkera*) is a key element. The article gives the characteristics and taxonomy of *Brettanomyces* and *Dekkera* yeast and describes the basic microbiological aspects of brewing lambic and gueuze.

Kochláňová, T., Kij, D., Kopecká, J., Kubizniaková, P., Matoulková, D., 2016: Die nicht-Saccharomyces Hefe und ihre Bedeutung in der Brauindustrie. I. Teil – *Brettanomyces* (Dekkera). Kvasny Prum., 62(7–8), S. 198–205

In der Geschichte des Bieres wurden auch die anderen Hefestämme außer Stamm *Saccharomyces* betrachtet, weil die einen Teil der Spontangärungshefe darstellen. Zur Zeit werden als eine Kontamination betrachtet, weil die eine unerwünschte sensorische Aktivstoffe und CO₂ verursachen. Die Ausnahme tun die spezielle Biertypen (z. B. Bier Lambic und Gueuze) wo die metabolische Tätigkeit von *Nicht-Saccharomyces* Hefe (insbesondere die Stämme *Brettanomyces* und *Dekkera*) stellt ein Schlüsselement dar. Im Artikel werden die Charakteristik und eine taxonomische Einordnung von Stämmen *Brettanomyces* und *Dekkera* angeführt und grundmikrobiologische Aspekte der Lambik- und Gueuze Bierherstellung beschrieben.

Klíčová slova: *Brettanomyces*, *Dekkera*, lambik, gueuze, non-Saccharomyces, spontánní kvašení**Keywords:** *Brettanomyces*, *Dekkera*, lambic, gueuze, non-Saccharomyces, spontaneous fermentation

1 ÚVOD

Výroba piva je založena na řízeném využití kulturních kvasinek rodu *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* a *S. pastorianus*). Kvasinky patří do jiných rodů, tzv. non-Saccharomyces, jsou považovány za kontaminanty piva, vína a dalších nápojů. Kvasinky obecně netvoří samostatný taxon, radíme je do oddělení askomycety (vřekovýtusné houby, např. *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* atd.) a basidiomycety (stopkovýtusné houby, např. rody *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* atd.) (Johnson, 2013a; Johnson, 2013b; Steensels a Verstrepen, 2014).

Kvasinky non-Saccharomyces patří mezi jednobuněčné eukaryotické organismy s velikostí buňky 3–15 μm. Přirozeně se vyskytují volně v prostředí. Evolučně se většina kvasinek non-Saccharomyces vyvíjela nezávisle od rodu *Saccharomyces*. Vytvořily si speciální mechanismy na přežití v extrémních environmentálních podmínkách – osmotoleranci (*Zygosaccharomyces rouxii*), termotoleranci (*Kluyveromyces marxianus*), toleranci na vyšší koncentrace ethanolu (*Dekkera bruxellensis*) atd. (Souciet et al., 2009).

Non-Saccharomyces kvasinky prochází dvěma stádii – vegetativním (anamorfa) a pohlavním (teleomorfa). Ve vegetativní formě se kvasinky reprodukcují pučením nebo dělením, při pohlavním rozmnožování tvoří spory. Pohlavní reprodukce u askomycet spočívá v tvorbě haploidních askospor v asku. U basidiomycet probíhá redukční

1 INTRODUCTION

Beer production is based on the controlled use of cultural *Saccharomyces* yeasts (*S. cerevisiae* and *S. pastorianus*). Yeasts belonging to other genera, i.e. non-Saccharomyces, are considered as contaminants of beer, wine and other beverages. Yeasts generally do not form a separate taxon, they are classified in the divisions Ascomycetes (for example *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia* etc.) and Basidiomycetes (for example genera *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* etc.) (Johnson, 2013a; Johnson, 2013b; Steensels a Verstrepen, 2014).

Non-Saccharomyces yeasts belong among unicellular eukaryotic organisms with cell sizes from 3 to 15 μm. They occur naturally free in the environment. Most non-Saccharomyces yeasts developed evolutionarily independently from the genus *Saccharomyces*. They have developed special mechanisms to survive in extreme environmental conditions – osmotolerance (*Zygosaccharomyces rouxii*), thermotolerance (*Kluyveromyces marxianus*), tolerance to higher concentrations of ethanol (*Dekkera bruxellensis*) etc. (Souciet et al., 2009).

Non-Saccharomyces yeasts pass through two stages – vegetative (anamorph) and sexual (teleomorph). In the vegetative form the yeasts reproduce by budding or division, in sexual reproduction they form spores. Sexual reproduction in ascomycetes lies in the forma-

dělení v basidiu nebo v teliospoře, na kterých se tvoří haploidní basidiospory (Kurtzman et al., 2011).

Mezi potencionálně technologicky využitelné non-*Saccharomyces* kvasinky lze zahrnout např. rody *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* a *Zygosaccharomyces*, které patří do řádu Saccharomycetales, viz tab. 1 (Clemente-Jimenez et al., 2004; Pretorius et al., 1999). V pivovarském průmyslu nachází uplatnění zejména rody *Dekkera*, *Brettanomyces* a *Torulaspota*. Článek se dále věnuje kvasinkám rodů *Dekkera* a *Brettanomyces*.

Tab. 1 Taxonomické zařazení vybraných technologicky významných non-*Saccharomyces* kvasinek (Kurtzman et al., 2011, upraveno) / Table 1 Classification of selected technologically important non-Saccharomyces yeasts (Kurtzman et al., 2011, modified)

Říše / Kingdom Fungi

Kmen / Phylum Ascomycota

Podkmen / Subphylum Taphrinomycotina

Třída / Class Schizosaccharomycetes

Řád / Order Schizosaccharomycetales

Čeleď / Family Schizosaccharomycetaceae

Rod / Genus *Schizosaccharomyces*

Podkmen / Subphylum Saccharomycotina

Třída / Class Saccharomycetes

Řád / Order Saccharomycetales

Čeleď / Family Debaryomycetaceae

Rod / Genus *Meyerozyma*

Rod / Genus *Schwanniomyces*

Čeleď / Family Dipodascaceae

Rod / Genus *Galactomyces*

Čeleď / Family Pichiaceae

Rod / Genus *Brettanomyces*

Rod / Genus *Dekkera*

Rod / Genus *Pichia*

Čeleď / Family Saccharomycetaceae

Rod / Genus *Kluyveromyces*

Rod / Genus *Torulaspota*

Rod / Genus *Zygosaccharomyces*

Rod / Genus *Ogataea*

Čeleď / Family Saccharomycodaceae

Rod / Genus *Hanseniaspora*

Rod / Genus *Saccharomycodes*

Čeleď / Family Wickerhamomycetaceae

Rod / Genus *Wickerhamomyces*

„Incertae sedis“

Rod / Genus *Candida*

Kmen / Phylum Basidiomycota

Podkmen / Subphylum Pucciniomycotina

Třída / Class Agaricomycetes

Řád / Order Sporidiobolales

„Incertae sedis“

Rod / Genus *Rhodotorula*

2 ROD BRETTANOMYCES (TELEOMORFA DEKKERA)

Název *Brettanomyces* pochází původně z roku 1904, kdy byla tato kvasinka poprvé izolována N.H. Claussenem v dánském pivovaru Carlsberg. Název pochází z řeckých slov Brettano (britský) a Myces (houba) podle první izolace, která byla provedena z anglického piva, u něhož byla tato doposud neznámá kvasinka zodpovědná za sekundární kvašení a charakteristické aroma. Později (ve 20. letech) byla *Brettanomyces* izolována také z belgických pív typu lambik (*Brettanomyces bruxellensis*) a dalších anglických a belgických pív. Zajímavostí je, že izolace kvasinky *Brettanomyces* vedla k historicky prvnímu patentovanému mikroorganismu na světě. V nárocích patentu bylo mimo jiné ochráněno použití nového mikroorganismu nazvaného *Brettanomyces* při výrobě anglických pív jako je ale, stout a porter (Steensels et al., 2015).

Klasifikace kvasinek byla původně založena pouze na vegetativním stádiu buněk, tj. na morfologii a fyziologii buněk rozmnožujících se nepohlavně, pučením (anamorfní stadium). Později (ve 40. letech) však byla u některých kmenů zjištěna tvorba askospor a jako pohlavní (teleomorfní) stadium byl k rodu *Brettanomyces* zaveden rod *Dekkera* (Van der Walt, 1984). V současném systému klasifikace jsou jako *Brettanomyces* označovány nesporující (anamorfní) kvasinky,

čímž se redukuje dělení v basidiu nebo v teliospoře, na kterých se tvoří haploidní basidiospory (Kurtzman et al., 2011).

Potentially technologically useful non-*Saccharomyces* yeasts can include e.g. genera *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* and *Zygosaccharomyces* which belong to the order *Saccharomycetales*, see Tab. 1 (Clemente-Jimenez et al., 2004; Pretorius et al., 1999). In particular, genera *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Torulaspota* find application in the brewing industry. This article focuses on yeast genera *Brettanomyces* and *Dekkera*.

2 GENUS BRETTANOMYCES (TELEOMORPH DEKKERA)

The name *Brettanomyces* originates from 1904, when the yeast was first isolated by N.H. Claussen in the Danish Carlsberg brewery. The name comes from the Greek words Brettano (British) and Myces (fungus) based on the first isolation, which was made from British ale, in which this previously unknown yeast was responsible for secondary fermentation and characteristic aroma. Later (in the 20's) *Brettanomyces* was also isolated from Belgian ales of the lambic type (*Brettanomyces bruxellensis*) and other British and Belgian beers. It is interesting that the isolation of *Brettanomyces* led to the world's first patented microorganism. The patent claims protected *inter alia* the use of a new microorganism called *Brettanomyces* for manufacturing British ales such as ale, porter and stout (Steensels et al., 2015).

The classification of yeast was originally based only on the vegetative stage of cells, i.e. on the morphology and physiology of cells reproducing asexually by budding (anamorphic stage). However, later (in the 40's) some strains were found to form ascospores and the genus *Dekkera* was introduced as a sexual (teleomorph) stage of the genus *Brettanomyces* (Van der Walt, 1984). In the current classification system *Brettanomyces* is referred to as nonsporulating (anamorphic) yeast while *Dekkera* genus includes sporulating (teleomorph) variety of this yeast. The names *Brettanomyces* and *Dekkera* are often cited as synonyms, sometimes it is possible to find in the literature the name *Brettanomyces/Dekkera* or the somewhat more familiar „Bret“ (Steensels et al., 2015). Here we use designation *Brettanomyces* or *bretanomycetes*, which is more established in technology.

Fig. 1 shows the reclassification of the *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts that have ever been isolated from beer. The names of some species have been canceled (e.g. *Brettanomyces lambicus* and *B. abstinens*) and were included in other species. Five species of *Brettanomyces* are currently recognized based on molecular analysis of DNA: anamorphs *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* and *B. nanus*, with teleomorph varieties (i.e. capable of sexual reproduction) only in the first two mentioned types – *Dekkera bruxellensis* (anamorph: *B. bruxellensis*) and *D. anomala* (anamorph: *B. anomalus*) (Kurtzman et al., 2011).

The cells of the genus *Brettanomyces* have a spherical to ellipsoidal shape and are often ogival (Fig. 2). They reproduce asexually by multilateral budding, forming rarely pseudomycelium. Sexual stages form asci without conjugation and contain 1-4 hat-shaped ascospores. Colonies are usually white or creamy, and may have a smooth and shiny or wrinkled surface (Fig. 3). *Brettanomyces* cells grow slowly, have mostly a short life span (due to the production of acetic acid) and have a high requirement of nutrients, requiring thiamine and biotin in the medium (Kurtzman et al., 2011; Němec and Matoušková, 2015). They are common in fruit (grape wine) and are taken as unwanted contaminants of wine, cider, beer and carbonated soft drinks. They were also isolated from kefir, yogurt, feta cheese and olives (Kurtzman et al., 2011).

The species *B. anomalus* and *B. bruxellensis* produce sensorially active substances which may in some types of wines be desirable, and are essential for the production of lambic, American coolship ale and other types of beer and the Kombucha beverage (Bokulich et al., 2012; Vanderhaegen et al., 2003).

Brettanomyces ferments glucose and to a lesser extent fructose, maltose, galactose and sucrose and the range of sugars used is strain specific (Steensels et al., 2015). Due to the presence of β -glucosidase some strains cleave and subsequently ferment cellobiose contained in the wood of barrels used for beer maturation (Vanderhaegen et al., 2003), and help release flavoring compounds from fruits during the refermentation of fruit beers (Daenen et al., 2008).

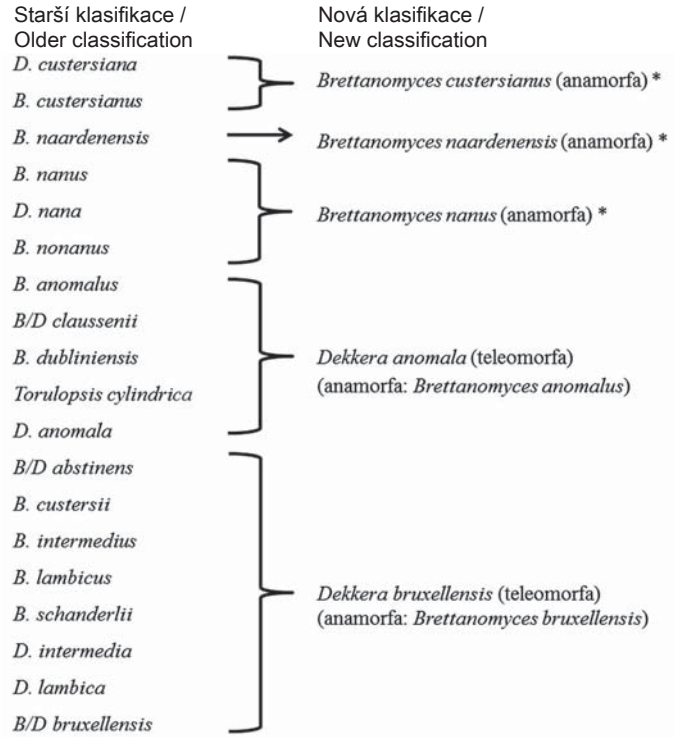
zatímto rod *Dekkera* zahrnuje sporující (teleomorfní) variety těchto kvasinek. Názvy *Brettanomyces* a *Dekkera* jsou často uváděny jako synonyma, někdy je v literatuře možné najít i označení *Brettanomyces/Dekkera*, případně poněkud familiárnější „Bret“ (Steensels et al., 2015). V našem článku používáme označení *Brettanomyces*, případně *bretanomycety*, které jsou v technologii více zavedené.

Na obr. 1 je uvedena reklasifikace kvasinek *Dekkera* a *Brettanomyces*, které byly kdy izolovány z piva. Názvy některých druhů byly zrušeny (např. *Brettanomyces lambicus* a *B. abstinens*) a byly zahrnuty do jiných druhů. V současné době je tedy, na základě molekulárních analýz DNA, uznáváno pět druhů *Brettanomyces*: anamorfy *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* a *B. nanus*, s teleomorfy (tedy variantami schopnými i pohlavního rozmnožování) pouze u prvních dvou jmenovaných druhů – *Dekkera bruxellensis* (anamorfa: *B. bruxellensis*) a *D. anomala* (anamorfa: *B. anomalus*) (Kurtzman et al., 2011).

Buňky kvasinek rodu *Brettanomyces* mají sférický až elipsoidní tvar, často jsou ogivální (obr. 2). Rozmnožují se nepohlavně multilaterálním pučením, zřídka tvoří pseudomycelium. Pohlavní stádia vytvářejí asky bez konjugace a obsahují 1–4 kloboukovité askospory. Kolonie jsou většinou bílé nebo krémové, a mohou mít hladký a lesklý nebo vrásčitý povrch (obr. 3). *Bretanomycety* rostou pomalu, žijí většinou krátce (dáno produkcí kyseliny octové) a jsou náročné na živiny – v prostředí vyžadují thiamin a biotin (Kurtzman et al., 2011; Němec a Matoulková, 2015). Běžně se vyskytují na ovoci (hroznovém víně) a jsou brány jako nežádoucí kontaminanty vína, cideru, piva a sycených nealkoholických nápojů. Izolovány byly i z kefíru, jogurtu, feta sýru nebo oliv (Kurtzman et al., 2011).

Druhy *B. anomalus* a *B. bruxellensis* produkují sensoricky aktivní látky, které mohou být u některých druhů vína žádoucí, zároveň jsou tyto kvasinky esenciální při výrobě lambiku, American coolship ale a dalších druhů piv a nápoje Kombucha (Bokulich et al., 2012; Vanderhaegen et al., 2003).

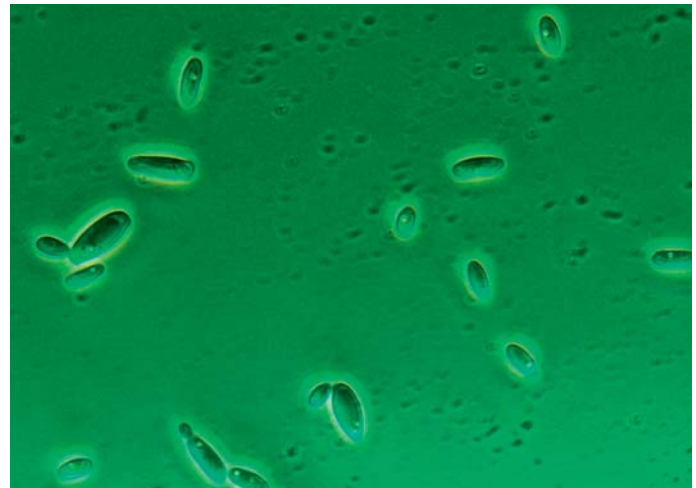
Brettanomyces zkvašuje glukosu, v menší míře fruktosu, maltozu, galaktosu a sacharosu, spektrum využívaných cukrů je kmenově



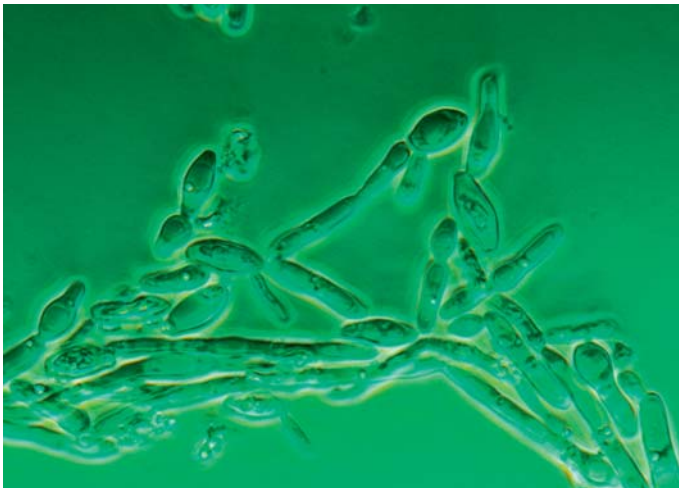
Obr. 1. Přehled reklasifikace kvasinek *Brettanomyces* a *Dekkera* izolovaných z piva. *Neexistuje teleomorfní stadium (Kurtzman et al., 2011, upraveno) / Fig. 1 Reclassification of *Brettanomyces* and *Dekkera* yeasts isolated from beer. *Teleomorphic stage does not exist (Kurtzman et al., 2011, modified)



A



B



C



D

Obr. 2 Buňky kvasinek *Dekkera anomala* (A, B), *D. bruxellensis* (C, D) / Fig. 2 Cells of yeast *Dekkera anomala* (A, B), *D. bruxellensis* (C, D)

specifické (Steensels et al., 2015). Některé kmeny díky β -glukosidase štěpí a následně fermentují celobiosu obsaženou v dřevě sudů, kde dochází k zrání piva (Vanderhaegen et al., 2003), a pomáhají uvolňovat aromatické látky z ovoce při refermentaci ovocných piv (Daenen et al., 2008). Pomocí α -glukosidasy dokáží zpracovat maltodextriny, které v mladém pivě zůstávají po primární fermentaci (Kumara et al., 1993).

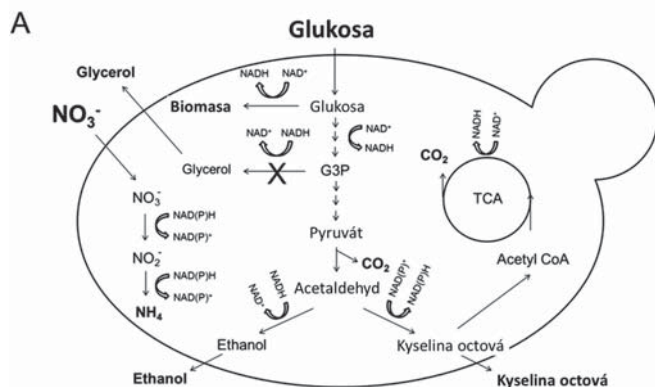
Optimální teplota pro růst *Brettanomyces* je mezi 25–28 °C, růst probíhá i při nízkém pH (Blomquist et al., 2010). Tolerují až 15 % (v/v) ethanolu, nicméně citlivost k alkoholu je kmenově specifická a je ovlivňována podmínkami prostředí (Sturmet al., 2014). Za vysoké koncentrace sacharidů upřednostňují alkoholovou fermentaci před respirací i za aerobních podmínek (tzv. Crabtree efekt) a akumulují ethanol, který zabraňuje růstu kompetitivním mikroorganismům. Po vyčerpání glukosy pak respirují ethanol za produkce kyseliny octové (Steensels et al., 2015, De Deken, 1966).

Brettanomyces jsou podobné jako kvasinky rodu *Saccharomyces* fakultativně anaerobní. Oproti *Saccharomyces* kvasinkám, které upřednostňují energeticky výhodnější respiraci před fermentací (tzv. Pasteurův efekt), se u *Brettanomyces* alkoholové kvašení glukosy při anaerobiose (tedy v nepřítomnosti kyslíku) zastavuje a je stimulováno kyslíkem. Přeměna glukosa-3-fosfátu (G3P) na glycerol je u *Brettanomyces* nízká, nebo neprobíhá vůbec, díky snížené nebo žádné aktivitě enzymu G3P-fosfatasy. Tomuto jevu se říká negativní Pasteurův efekt, nebo také Custerův efekt (obr. 4).

Princip Custerova efektu spočívá v dočasné inhibici alkoholového kvašení za absolutní anaerobiosy. Kvasinky *Brettanomyces* jsou schopné produkovat octovou kyselinu a ethanol z glukosy, přičemž paralelně dochází k redukci NAD^+ (nikotinamidadeninindinukleotid, oxidovaná forma) na NADH (redukováná forma NAD) (Barnett et al., 2005; Carrascosa et al. 1981; Leite et al., 2013). Za aerobních podmínek se koenzym NAD reoxiduje pomocí respiračního řetězce, ale za anaerobních podmínek chybí akceptor H^+ (acetoin, aceton, dihydroxyaceton) a i malé množství vyprodukované octové kyseliny je závislé na poklesu poměru NAD^+/NADH , a následkem toho je glykolysa zastavena v reakci katalysované glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasou (Scheffers a Nanninga, 1977). Přítomnost organických akceptorů H^+ zmírňuje Custerův efekt prostřednictvím obnovy oxidačně-redukční rovnováhy (Gaunt et al., 1988). Octová kyselina je produkována oxidací acetaldehydu za činnosti enzymu NAD^+ aldehyddehydrogenasy. Aktivita NAD^+ aldehyddehydrogenasy je potlačována přítomností glukosy, avšak v exponenciální fázi růstu a na začátku stacionární fáze, kdy koncentrace glukosy klesá, dochází k rychlému zvýšení aktivity tohoto enzymu. Současně se akumuluje octová kyselina v buňce (Carrascosa et al., 1981). Asimilace nitrátu a jeho redukce na amoniak Custerův efekt ruší (Steensels et al., 2015).

Aromatický profil látek produkovaných *Brettanomyces* je popisován rozmanitými termíny, např. chuť a vůně po hřebíčku, kořeněná, po myšíně, kouřová, plastová, fenolová, medicínální, leukoplastová, kovová, po vlhké kůži, sušenková, zpocená, jablečná, tropická, citrusová, palčivá atd., souhrnně je často označována jako „Brett flavour“ (De Keersmaecker, 1996; Steensels et al., 2015).

Estery jsou důležité sensoricky aktivní látky produkované kulturními kvasinkami. Dávají pivu ovocné a květinové aroma. Malé rozdíly v koncentraci esterů mohou mít velký vliv na výslednou chuť piva



Obr. 4 Schematický přehled hlavních faktorů ovlivňujících oxidačně-redukční rovnováhu v buňce kvasinky *D. bruxellensis* (Steensels et al., 2015, upraveno)



Obr. 3 Kolonie *Brettanomyces* spp. na sladivém agaru / Fig. 3 Colonies of *Brettanomyces* spp. on wort agar

Using α -glucosidase they can metabolize maltodextrins, which remain in young beer after primary fermentation (Kumara et al., 1993).

Optimal temperature for *Brettanomyces* growth is between 25–28 °C and the growth occurs even at low pH (Blomquist, et al., 2010). Experiments in synthetic media indicate that 15 % (v/v) of ethanol is likely to be the upper limit that allows *Brettanomyces* to grow. However, it depends on the strain and on environmental factors (Sturmet al., 2014). Under high concentrations of carbohydrates the yeast prefers alcoholic fermentation over respiration even under aerobic conditions (the so-called Crabtree effect) and accumulates ethanol, which prevents the growth of competitive organisms. After depletion of glucose they respire ethanol and produce acetic acid (Steensels et al., 2015; De Deken, 1966).

Like *Saccharomyces*, *Brettanomyces* is facultatively anaerobic. Compared to *Saccharomyces* yeast, which favors energetically favorable respiration before fermentation (i.e. the Pasteur effect) alcoholic fermentation of glucose in *Brettanomyces* during anaerobiosis (i.e. in the absence of oxygen) stops and is stimulated by oxygen. The conversion of glucose-3-phosphate (G3P) to glycerol in *Brettanomyces* is low or absent due to the reduced or absent activity of G3P phosphatase. This phenomenon is called a negative Pasteur effect or Custer effect (Fig. 4).

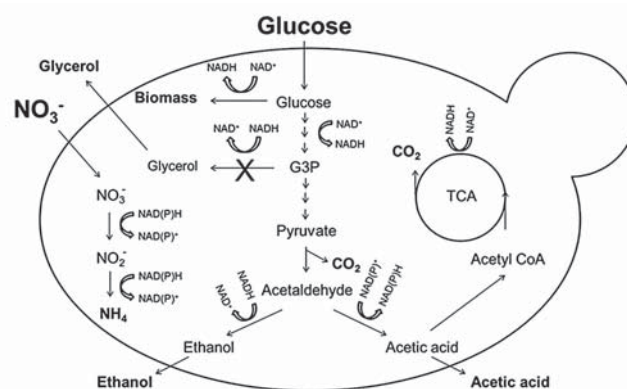


Fig. 4 Schematic overview of the main factors influencing the cell redox balance in *D. bruxellensis* (Steensels et al., 2015, modified).

The principle of Custer effect is based on temporary inhibition of alcoholic fermentation under anaerobic conditions. *Brettanomyces* species are able to produce acetic acid and ethanol from glucose, while reducing in parallel NAD^+ to NADH (Barnett et al., 2005; Carrascosa et al., 1981; Leite et al., 2013). Under aerobic conditions the NAD^+ coenzyme is reoxidized in the respiratory chain, but under anaerobic conditions the hydrogen acceptor (acetoin, acetone, dihydroxyacetone) is lacking and a small amount of produced acetic acid depends on the drop of the NAD^+/NADH ratio; for this reason glycolysis is stopped in the reaction catalyzed by glyceraldehyde-3-phos-

(Verstrepen et al., 2003). Při kvašení mladiny *brettanomycetami* je produkováno značné množství ethylkaprylátu, ethylkaprátu, ethylaklátu a ethylacetátu. Naopak množství esterů kyseliny octové (např. isoamylacetátu) je menší než při fermentaci kvasinkami *Saccharomyces*. Buněčné esterasy *brettanomycet* tyto estery během kvašení hydrolyzují (Steensels et al., 2015).

Důležitou skupinou látek produkovanou *brettanomycetami* jsou fenolové sloučeniny. Jejich vysoká koncentrace negativně ovlivňuje kvalitu vína, ale může být žádoucí u piva typu lambik (Steensels et al., 2015). Jedná se převážně o 4-ethylfenol (medicínální aroma) a 4-ethylguajakol (aroma hřebíčku, kořeněné), v menší míře je produkován 4-vinylguajakol (hřebíčková) a 4-vinylfenol (fenolová, medicínální); 4-vinylfenol a 4-vinylguajakol vznikají dekarboxylací organických kyselin, následnou redukcí jsou pak tvořeny ethylfenolové sloučeniny (Conterno et al., 2013).

Z mastných kyselin jsou produkovány zejména kyseliny kaprylová, kaprynová a laurová podílející se na typickém aroma lambiku a gueuze (Spaepen et al., 1978). *Brettanomyces* jsou producentem isovalerové kyseliny, která má „sýrové“ aroma narušující organoleptické vlastnosti vín (Oelofse et al., 2008).

Brettanomyces dále produkují dusíkaté heterocykly, jejichž chuť je popisována jako po myšíně nebo chuť krekrů nebo pražené kukuřice, při nízkém pH je hořká nebo metalická. Tyto látky byly izolovány z vína (Oelofse et al., 2008). Jedná se o 2-acetyltetrahydroxypyridin (ATHP) a 2-ethyltetrahydroxypyridin (ETHP). Jejich vznik u kvasinek dosud není popsán, ale byl prostudován u bakterií mléčného kvašení. Základem pro ATHP je zkvasitelný cukr a aminokyselina, EHP vzniká redukcí ATHP (Romano et al., 2008).

3 PIVO LAMBIK A GUEUZE

Některé rody divokých kvasinek non-*Saccharomyces* mají potenciál pro výrobu piv se zajímavými sensorickými atributy a některé jsou přímo esenciální pro výrobu speciálních pivních stylů jako je např. belgický lambik, pivo gueuze nebo americká obdoba lambiku – American coolship ale (Bokulich et al., 2012; Spitaels et al., 2014; Verachtert a Iserentant, 1995). Výroba těchto piv je založena na spontánní fermentaci mladiny, na které se podílí desítky druhů divokých kvasinek (např. *Brettanomyces*, *Candida*) a některých bakterií.

Piva lambik a gueuze se tradičně vaří v Belgii, převážně v oblasti zhruba 500 km² okolo Bruselu a v regionu Payottenland, v údolí řeky Senne (De Keersmaecker, 1996). Sladina se připravuje ze směsi, kterou tvoří zhruba z 60 % ječný slad a z 40 % nesladovaná pšenice. Následně se vaří se starým chmelem, který oxidací ztratil svou hořkost, ale zachoval si své konzervační účinky (Guinard, 1990). Spontánní kvašení není iniciováno přidáním kulturních kvasinek, ale děje se za účasti mikroorganismů z prostředí a/nebo z předchozí várky piva. Uvařená mladina se přes noc ochladí v mělkých otevřených nádobách a během ochlazování probíhá její inokulace („infekce“) ze vzduchu nad káděmi. Následující den je takto zakvašená mladina převedena do dřevěných sudů a kvašení probíhá až dva roky při teplotě 0–25 °C; teplota v místnostech, kde probíhá kvašení, není regulována – je tedy závislá na průběhu ročních období (Van Oevelen et al., 1977). Výsledný produkt se nazývá lambik. Refermentaci lambiku v lahvích pak vzniká gueuze (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert a Iserentant, 1995).

Sudy, ve kterých probíhá kvašení, obsahovaly původně víno nebo předchozí várku piva – na kvašení se tedy podílí mikroorganismy ze stěny sudů pocházející z předchozích fermentací (De Keersmaecker, 1996). Kvašení mladiny se účastní desítky až stovky druhů mikroorganismů. Výroba je většinou zahajována v chladnějších měsících v roce, aby během ochlazování mladiny v otevřených nádobách nedošlo k její kontaminaci nežádoucími mikroorganismy. Sezóna vaření lambiku tak začíná v září a končí v dubnu následujícího roku (Guinard, 1990). Celková doba kvašení lambiku může trvat až tři roky. Pokud následuje výroba gueuze (smícháním starších a mladších lambiků a sekundární fermentací v lahvích), probíhá kvašení dalších 6 až 12 měsíců, dokud nedojde k nasycení piva oxidem uhličitým (Van Oevelen et al., 1976).

Výrobu lambiku (a gueuze) lze rozdělit do pěti základních fází (Verachtert a Iserentant, 1995):

1) Enterobakteriální fáze – během ochlazování mladiny a v průběhu prvního měsíce kvašení převažují enterobakterie (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Citrobacter*) společně s kvasinkami, které nezkašují maltosu (např. *Kloeckera apiculata*), mléčné a octové bakterie jsou zastoupeny jen minimálně (obr. 5); převládá

phate dehydrogenase (Scheffers and Nanninga, 1977). Gaunt et al. (1988) confirmed that the presence of organic H⁺ acceptor reduces the Custer effect by restoring redox balance. Acetic acid is produced in oxidative reaction of acetaldehyde mainly by the enzyme aldehyde dehydrogenase. The function of NAD⁺ aldehyde dehydrogenase is repressed by the presence of glucose and the drop of glucose concentration during the exponential phase and in the early stationary phase is accompanied by a rapid increase of activity of the enzyme and a concomitant accumulation of acetic acid in the cells (Carrasco et al., 1981). Assimilation of nitrate and its reduction to ammonia cancels the Custer effect (Steensels et al., 2015).

Aromatic profile of the substances produced by *Brettanomyces* is described by multiple terms, e.g. the taste and aroma of cloves, spicy, mousy, smoky, plastic, phenolic, medicinal, plaster, metal, wet-skin-like, biscuit, sweaty, apple, tropical, citrus, pungent etc., collectively often referred to as “the Brett flavor” (De Keersmaecker 1996; Steensels et al., 2015).

Esters are important sensorially active substances produced by cultural yeast. They impart the beer with fruity and floral aromas. Small differences in the concentration of esters can have a big impact on the final taste of beer (Verstrepen et al., 2003). The fermentation of wort by *Brettanomyces* is accompanied by the production of considerable amounts of ethyl caprylate, ethyl caprate, ethyl lactate and ethyl acetate. Conversely, the amount of acetic acid esters (e.g. isoamyl acetate) is lower than during the fermentation by *Saccharomyces*. Cellular esterases of *Brettanomyces* hydrolyze these esters during fermentation (Steensels et al., 2015).

An important group of substances produced by *Brettanomyces* are phenolic compounds. Their high concentration negatively affects the quality of the wine, but it may be desirable in lambic type beer (Steensels et al., 2015). They include mainly 4-ethylphenol (medicinal aroma) and 4-ethylguajakol (clove aroma, spicy) and, to a lesser extent, 4-vinylguajakol (clove) and 4-vinylphenol (phenolic, medicinal); 4-vinylphenol and 4-vinylguajakol are formed by decarboxylation of organic acids, the following reduction then forms ethyl phenol compounds (Conterno et al., 2013).

The produced fatty acids include especially caprylic, caprynic and lauric, which are involved in the typical aroma of lambic and gueuze (Spaepen et al., 1978). *Brettanomyces* is a producer of isovaleric acid, which has a “cheesy” aroma distorting the organoleptic properties of wine (Oelofse et al., 2008).

Brettanomyces also produces nitrogen heterocycles whose taste is described as mousy or the taste of crackers or popcorn, and is bitter or metallic at low pH. These substances have been isolated from wine (Oelofse et al., 2008). They include 2-acetyltetrahydroxypyridine (ATHP) and 2-ethyltetrahydroxypyridine (ETHP). Their formation in yeast has not been described, but has been studied in lactic acid bacteria. The basis for ATHP is a fermentable sugar and an amino acid, ETHP is formed by reduction of ATHP (Romano et al., 2008).

3 LAMBIK BEER AND GUEUZE

Some genera of non-*Saccharomyces* wild yeasts have the potential to produce beers with interesting sensory attributes and some are in fact essential to the production of special beer types such as e.g. Belgian lambic beer, gueuze or US lambic equivalent – American coolship ale (Bokulich et al., 2012; Spitaels et al., 2014; Verachtert and Iserentant, 1995). Production of these beers is based on the spontaneous fermentation of wort, which is jointly performed by tens of species of wild yeasts (e.g. *Brettanomyces*, *Candida*), and some bacteria.

Lambic beer and gueuze are traditionally brewed in Belgium, mainly in the area of about 500 km² around Brussels and in the Payottenland region, in the valley of the Senne River (De Keersmaecker, 1996). The wort is prepared from a mixture consisting of roughly 60% barley malt and 40% unmalted wheat. The subsequent boiling proceeds with old hops that has lost its bitterness due to oxidation, but keeps its preservative effects (Guinard, 1990). Spontaneous fermentation is initiated by adding yeast culture, but is performed by microorganisms from the environment and/or from the previous brew. Boiled wort is cooled overnight in shallow open vessels and its inoculation occurs during cooling (“infection”) from the air above the vessels. On the following day the inoculated wort is transferred to wooden barrels and fermentation takes place for up to two years at 0-25 °C; the temperature in the fermentation rooms is not regulated and is therefore dependent on the seasons (Van Oevelen et

produkce butandiolu, dimethylsulfidu, formiátu, méně ethanolu a octové a mléčné kyseliny.

2) Saccharomyces fáze – po vyčerpání glukosy kvasinky nezkvašující maltosu vymizí a snížením pH pod 4,4 a zvýšením koncentrace ethanolu nad 2 % je zároveň zcela inhibována aktivita enterobakterií. Nastává fáze hlavního alkoholového kvašení, které dominují kvasinky rodu *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus*). Saccharomycety jsou zodpovědné za hlavní alkoholové kvašení a mají hlavní podíl na celkovém prokvašení mladiny (z 60–64 %). Kvašení není tak intenzivní jako v případě normálního spodně či svrchně kvašeného piva, což může být způsobeno např. tím, že na začátku kvašení jsou z mladiny enterobakteriemi spotřebovány různé aminokyseliny a peptidy (Verachtert et al., 1989); převládá produkce ethanolu, vyšších alkoholů a esterů.

3) Acidifikační fáze – nastává po cca 3–4 měsících kvašení – ve větším množství se v mladině objevují mléčné bakterie (zejména *Pediococcus damnosus*) a octové bakterie (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) produkující kyselinu mléčnou respektive octovou. Nejvyššího počtu buněk mléčných bakterií je dosaženo cca mezi 6. a 8. měsícem kvašení, což je běžně v období přechodu jara do léta; tyto mikroorganismy vyžadují vyšší růstové teploty (Van Oevelen et al., 1976). Kvasinky *Saccharomyces* jsou přibližně v osmém měsíci kvašení nahrazeny kvasinkami rodu *Brettanomyces*, které jsou zastoupeny zejména druhem *B. bruxellensis* (ve starší literatuře jsou uváděny druhy *B. bruxellensis* a *B. lambicus*). *Brettanomyces* se ve vyšších počtech vyskytují v kvasícím lambiku dalších přibližně 8 měsíců a jsou zodpovědné za další prokvašení mladiny (až 63–83 %); silná produkce kyseliny mléčné a ethyllaktátu, nižší produkce acétátu a ethylacetátu, diacetylu, isobutyryátu.

4) Fáze zrání – nastává po přibližně 10 měsících kvašení – počet mléčných i octových bakterií postupně klesá a později také dochází ke snížení aktivity *Brettanomyces*. Zkvašení vyšších dextrinů, odbourání diacetylu a dimethylsulfidu. Fáze zrání trvá přibližně dvanáct měsíců, během kterých postupně narůstá počet mléčných bakterií, v souvislosti s rostoucí teplotou (přechod do teplejších letních měsíců druhého roku kvašení).

5) Refermentační fáze v lahvích (výroba gueuze) – převládá aktivita kvasinek *Brettanomyces* a mléčných bakterií. Přítomny jsou kvasinky dalších rodů – *Pichia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis* a další. Refermentací směsi zpravidla tříletého a mladého lambiku v lahvích vzniká pivo gueuze. S mladým lambikem je do fermentujícího piva přidáno více cukrů a výsledný produkt je více nasycen oxidem uhličitým (Verachtert a Iserentant, 1995). Při refermentaci roste v pivu podíl kyseliny mléčné a ethyllaktátu, naopak klesá množství isoamylacetátu a ethylkaproátu (Spitaels et al., 2014).

Lambik je základem i pro další druhy piva. Do sudů se zrajícím lambikem se v některých případech přidává ovocná šťáva nebo celé ovoce. Díky zvýšenému obsahu cukrů je znovu spuštěna fermentace a aroma a chuť z ovoce jsou extrahovány do piva. Ovocný lambik s višněmi se nazývá Kriek, s malinami Framboise (Daenen et al., 2008). Obsah alkoholu v gueuze se pohybuje v rozmezí 5,3–6,2 %

al., 1977). The resulting product is called lambic. Refermentation of bottled lambic then gives rise to gueuze (Van Oevelen et al., 1977; Verachtert and Iserentant, 1995).

Barrels in which fermentation takes place have initially contained wine or a previous brew of beer – fermentation thus takes place through the action of microorganisms on the barrel walls from previous fermentations (De Keersmaecker, 1996). Fermenting wort is performed by dozens to hundreds of species of microorganisms. Production is usually initiated in the colder months of the year to prevent wort contamination by undesirable microorganisms during its cooling in open containers. The season of lambic brewing thus begins in September and ends in April next year (Guinard, 1990). The total duration of lambic fermentation can take up to three years. If it is followed by the production of gueuze (by mixing older and younger lambic and a secondary fermentation in bottles), the fermentation takes place another six to twelve months until the saturation of the beer with carbon dioxide (Van Oevelen et al., 1976).

Production of lambic (and gueuze) can be divided into five basic stages (Verachtert and Iserentant, 1995):

1) Enterobacterial phase – *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Citrobacter*) predominate during wort cooling and during the first month of fermentation together with yeasts that do not ferment maltose (e.g. *Kloeckera apiculata*), lactic acid bacteria are represented only minimally (Fig. 5); the production of butanediol, dimethyl sulfide and formate prevails; with lower production of ethanol, acetic and lactic acid.

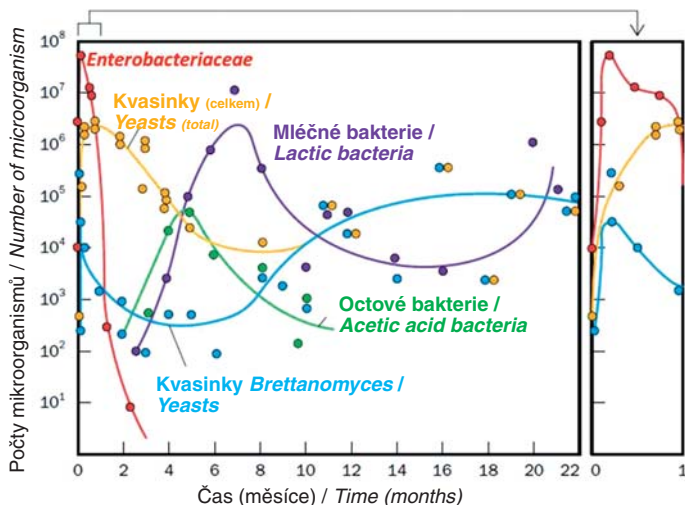
2) Saccharomyces phase – the yeasts that do not ferment maltose disappear after glucose depletion, and pH reduced below 4.4 and increasing ethanol concentration above 2% completely inhibits the activity of enterobacteria. Now enters the main stage of alcoholic fermentation, which is dominated by *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus*). *Saccharomyces* yeasts are responsible for major alcoholic fermentation and have a major share in the total attenuation of the wort (from 60–64%). Fermentation is not as intense as in the case of normal bottom- or top-fermented beer, which may be caused e.g. by the fact that enterobacteria have consumed various amino acids and peptides at the start of the fermentation of the wort (Verachtert et al., 1989); the production of ethanol, higher alcohols and esters prevails.

3) Acidification phase – it occurs after about 3–4 months of fermentation – lactic bacteria (particularly *Pediococcus damnosus*) and acetic acid bacteria (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) appear in the wort in large quantities, producing lactic or acetic acid. The number of cells of lactic acid bacteria peaks between about 6 and 8 months of fermentation, which is normally during the transition of spring to summer; these microorganisms require higher growth temperatures (Van Oevelen et al., 1976). In approximately the eighth month of fermentation *Saccharomyces* yeasts are replaced by genus *Brettanomyces*, which is represented mainly by *B. bruxellensis* (older literature mentions *B. bruxellensis* and *B. lambicus*). *Brettanomyces* yeast occurs in higher numbers in fermenting lambic for approximately another 8 months and is responsible for the further fermentation of wort (up to 63–83%); strong lactic acid production and ethyl lactate, lower production of acetate and ethyl acetate, diacetyl and isobutyrate.

4) Maturation phase occurs after approximately 10 months of fermentation – the number of lactic bacteria gradually decreases and the activity of *Brettanomyces* later also decreases. Fermentation of higher dextrins and reduction of diacetyl and dimethyl sulfide takes place. Maturation takes approximately twelve months; during this time the number of lactic acid bacteria gradually increases in connection with increasing temperature (transition into the warmer summer months, the second year of fermentation).

5) Refermentation phase in bottles (production of gueuze) – predominant activity of *Brettanomyces* yeast and lactic acid bacteria. Present are yeasts of other genera – *Pichia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, and others. Refermentation of bottled mixtures of usually three-year and young lambic yields gueuze. Along with young lambic, the fermenting beer is supplied with more sugars and the resulting product is more carbonated (Verachtert and Iserentant, 1995). The refermentation enhances the proportion of lactic acid and ethyl lactate in beer while decreasing the quantity of isoamyl acetate and ethyl caproate (Spitaels et al., 2014).

Lambic is the basis for other types of beer. Barrels with maturing lambic are in some cases supplied with fruit juice or whole fruit. Thanks to increased sugar content the fermentation is restarted and fruit aromas and flavors are extracted into the beer. Fruit lambic with cherries is called Kriek, with raspberries Framboise (Daenen et al., 2008). The alcohol content in gueuze ranges from 5.3 to 6.2% (v/v),



Obr. 5 Změny v mikrobiální populaci v průběhu kvašení lambiku (De Keersmaecker, 1996, upraveno) / Fig. 5 Changes in microbial population during lambic fermentation (De Keersmaecker 1996, modified)

(v/v), u ovocných lambiků je průměrně 6,5 % alkoholu (Van Oevelen et al., 1976).

Technologie výroby lambiku se využívá i v některých amerických pivovarech pro pivo s názvem „American coolship ale“. Rody mikroorganismů podílející se na jednotlivých fázích kvašení jsou přibližně stejné jako u tradičního belgického lambiku, mírně se však liší jednotlivé druhové složení (Bokulich et al., 2012).

Dekkera bruxellensis byla také studována pro výrobu bezlepkového piva za použití sladu z prosa jako základní suroviny. Výsledkem fermentace při 18 °C je pivo s nízkým pH, obsahem alkoholu kolem 3,2 % (v/v) a vysokou koncentrací vyšších alkoholů a esterů (Zarnkow et al., 2010).

PODĚKOVÁNÍ

Článek byl zpracován s podporou Specifického výzkumu Masarykovy univerzity (MUNI/A/1013/2015) a projektu Výzkumné senzorycké centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Barnett, A. J., Entian K.D., 2005: A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22: 835–894.
- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J., Passoth, V., 2010: Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1487–97.
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., Mills, D.A., 2012: Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American Coolship Ale. *PLoS ONE* 7: e35507. DOI: 10.1371/journal.pone.0035507.
- Carrascosa, J.M., Viguera, M.D., Nuez de Castro, I., Scheffers, W.A., 1981: Metabolism of acetaldehyde and Custer effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 47: 209–215.
- Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F., 2004: Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 21: 149–155.
- Conterno, L., Aprea, E., Franceschi, P., Viola, R., Vrhovsek, U., 2013: Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomic approaches. *Food. Res. Int.* 51: 670–678.
- Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F.R., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2008: Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Res.* 8:1103–1114.
- De Deken, R.H., 1966: The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44: 149–156.
- De Keersmaecker, J., 1996: The mystery of lambic beer. *Sci. Am.* 275: 74–81.
- Dujon, B., 2010: Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* 11: 512–524.
- Gaunt, D.M., Degn, H., Lloyd, D., 1988: The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast* 4: 249–255.
- Guinard, J., 1990: *Lambic*, Brewers Publications, Boulder, Colorado, USA, ISBN 0937381225.
- Hawksworth, D.L., 2012: Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *Mycosphere*, 3: 52–64; IMA Fungus 3: 15–24.
- Johnson, A.E., 2013a: Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 503–517, doi: 10.1007/s00253-012-4497-y.
- Johnson, A.E., 2013b: Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7563–7577, doi: 10.1007/s00253-013-5046-z.
- Kumara, H.M.C.S., De Cort, S., Verachtert, H., 1993: Localization and characterization of alpha-glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2352–2358.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011: *The Yeast*, a taxonomic study, 5th edition, Elsevier, Burlington, USA, 2384 s. ISBN 978-0-444-52149-1.
- Leite, F.C.B., Basso, T.O., WdB, P., Gombert, A.K., Simões, D.A., Morais, M.A., 2013: Quantitative aerobic physiology of the yeast in fruit lambic it is on average 6.5% alcohol (Van Oevelen et al., 1976).
- Lambic production technology is also used in some American breweries for beer called “American coolship ale”. The genera of microorganisms involved in the various stages of fermentation are about the same as in traditional Belgian lambic while individual species composition slightly differs (Bokulich et al., 2012).
- Dekkera bruxellensis* has also been studied for the production of gluten-free beer using malt from millet as the primary ingredient. The result of fermentation at 18 °C is a beer with a low pH, alcohol content of around 3.2% (v/v) and high concentrations of higher alcohols and esters (Zarnkow et al., 2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

The article was prepared with the support of Specific research at Masaryk University (MUNI/ A1013/2015) and the project Research Sensory Center in Prague and Research and Development Brewery – Sustainability and Development (LO1312).

Dekkera bruxellensis, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res.* 13: 34–43.

Němec, M., Matoulková, D., 2015: *Základy obecné mikrobiologie*, 1. vyd., Masarykova univerzita, Brno, 256 s. ISBN 978-80-210-7923-6.

Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008: Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29: 128–144.

Pretorius, I.S., Van Der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999: Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. Enol. Vitic.* 20(2): 61–74.

Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008: Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1577–1585.

Scheffers, W.A., Nanninga, G.L., 1977: The anaerobic inhibition of fermentation (Custers effect) in *Brettanomyces*. *EUCHEM Conference on Metabolic Reactions in the Yeast Cell in Anaerobic and Aerobic Conditions* (Helsinki, Finland) p. 53–55.

Souciet, J.L., Dujon, B., Gaillardin, C., et al., 2009: Comparative genomics of protoplid Saccharomycetaceae. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 19: 1696–1709, doi: 0.1101/gr.091546.109.

Spaepen, M., Van Oevelen, D., Verachtert, H., 1978: Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 84: 278–282.

Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P., 2014: The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS ONE*, 9, e95384. DOI: 10.1371/journal.pone.0095384.

Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015: *Brettanomyces* yeasts – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206: 24–38.

Steensels, J., Verstrepen, K.J., 2014: Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* 68: 61–80, doi: 10.1146/annurev-micro-091213-113025.

Sturm, M., Arroyo-López, F., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L., Ramirez, M., Combina, M., 2014: Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. *Int. J. Food Microbiol.* 170: 83–90.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., 2003: Bioflavoring and beer refermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 140–150.

Van der Walt, J.P., 1984: *Dekkera*. In: Kreger-van Rij, N.J.W. (Ed.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 3th edition Elsevier Science, Amsterdam, pp. 146–150.

Van Oevelen, D., Delescaille, F., Verachtert, H., 1976: Synthesis of aroma components during spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 82: 322–326.

Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P., Verachtert, H., 1977: Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 83: 356–360.

Verachtert, H., Dawoud, E., Kumara, H., 1989: Interactions between *Enterobacteriaceae* and *Saccharomyces cerevisiae* during wort fermentation. *Yeast* 5: 67–72.

Verachtert, H., Iserentant, D., 1995: Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The production of gueuze and related refreshing acid beer. *Cerevisia, Belgian J. Brew. Biotechnol.* 20: 37–41.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R., 2003: Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 96: 110–118.

Zarnkow, M., Faltermaier, A., Back, W., Gastl, M., Arendt, E.K., 2010: Evaluation of different yeast strains on the quality of beer produced from malted proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 231: 287–295.

Do redakce došlo / Manuscript received: 28/5/2016
Přijato k publikování / Accepted for publication: 22/6/2016