

TECHNOLOGICKÉ A MIKROBIOLOGICKÉ ASPEKTY VÝROBY PIVA SO ZNÍŽENÝM OBSAHOM ALKOHOLU

RADOSLAV SELECKÝ a DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
daniela.smogrovicova@stuba.sk

Došlo 5.5.05, prepracované 4.1.07, prijaté 11.1.07.

Kľúčové slová: nealkoholické pivo, *Saccharomyces cerevisiae*, mutantné kvasinky, enzýmy cyklu trikarboxylových kyselín

Obsah

1. Úvod
2. Procesy používané na výrobu nealkoholických pív
 - 2.1. Odstránenie alkoholu z piva pomocou membránových a evaporáčnych techník
 - 2.2. Zastavená a limitovaná fermentácia
 - 2.3. Použitie mutantných kvasiniek
3. Genetika pivovarských kvasiniek
 - 3.1. Cyklus trikarboxylových kyselín a poruchy v génoch kódujúcich jeho enzýmy
 - 3.2. Genetické techniky využiteľné v pivovarníctve
 - 3.3. Mutagenéza pivovarských kvasiniek
4. Záver

1. Úvod

Podľa legislatívy platnej na území Slovenskej republiky je nealkoholické pivo také, v ktorom obsah alkoholu neprekročil 0,5 obj.% a pivo so zníženým množstvom alkoholu (ďalej nízkoalkoholické) s limitom maximálne 1,2 obj.% alkoholu¹.

Najväčším nedostatkom nealkoholických a nízkoalkoholických pív je stále ich chuťový profil. Vyčítajú sa im: kvasinková príchuť, nedostatočná plnosť, chyby v aromatických charakteristikách, alebo v horších prípadoch aj zápach po síre². Intenzívna chmeľová a sladová aróma môže byť odstránená použitím vhodných extraktov, no pivo určené na distribúciu na trh musí spĺňať isté kvalitatívne štandardy. Ich dosiahnutie je možné aj pomocou nasledujúcich metód³:

- použitím studeného vodného extraktu sladu získaného

pri 60 °C, aby sa zabránilo hydrolyze škrobu amylázami,

- vysokoteplotným rmutovaním, ktoré tiež obmedzuje aktivitu amyláz,
- „metódou použitého mláta“, t.j. opätovné rmutovanie použitého mláta s kyslou hydrolyzou alebo bez hydrolyzy^{3,4},
- použitím vysokokonzentrovaných mladín (high gravity brewing), pri ktorých kvasinky produkujú nepomerne viac esterov,
- Barretovou metódou, ktorá kombinuje pivo získané z nízko a vysoko koncentrovaných mladín, prevláda v ňom vôňa pochádzajúca z fermentácie vysoko koncentrovaných mladín⁴,
- využitím druhov kvasiniek neschopných skvasovať maltózu, napr. *Saccharomyces ludwigii*⁵.

Kosař a Procházka⁶ uvádzajú niektoré nežiaduce zmeny sensorického profilu nealkoholických pív produkovaných zastavenou alebo limitovanou fermentáciou. Je to najmä zvýšené pH piva, pretože pri prerušení kvasenia nedochádza k jeho prirodzenému poklesu, nižšia koncentrácia vytvoreného CO₂ a nedostatočná redukcia obsahu látok spôsobujúcich nezrelú, mladinovú vôňu a chuť piva. Nižšie pH je však možné dosiahnuť okysľovaním mladiny, obsah CO₂ sa dá zvýšiť dosycovaním hotového piva a vzniku mladinovej vône a chuti možno zabrániť vhodnou voľbou kmeňa kvasiniek, zložením surovín a premývaním s oxidom uhličitým.

Vďaka nízkemu množstvu etanolu sú nealkoholické piva omnoho náchylnejšie na kontamináciu. Jednou z možností, ako jej predísť, je okyslenie mladiny kyselinou mliečnou produkovanou fermentačne. Mliečne baktérie môžu byť imobilizované v reaktore ešte pred fermentáciou a slad, ktorý ním prechádza, je potom takto biologicky okyslený. Obvyklý charakter sladu je maskovaný a dosahuje sa vôňa typická po kyseline mliečnej⁷.

2. Procesy používané na výrobu nealkoholických pív

V súčasnosti sa pri výrobe nealkoholických a nízkoalkoholických pív uplatňujú prevažne nasledovné tri postupy^{3,8}:

- následné odstránenie etanolu z piva získaného obvyklou metódou kvasenia,
- prerušenie alebo obmedzenie kvasenia (zastavená alebo limitovaná fermentácia),
- použitie mutantných alebo inak defektných kmeňov pivovarských kvasiniek (nie však na génovej úrovni).

2.1. Odstránenie alkoholu z piva pomocou evaporačných a membránových techník

Odstránenie alkoholu z bežného piva môže byť uskutočňované technikami ako destilácia, vákuová destilácia, dialýza a reverzná osmóza⁹, ktorá sa v poslednom čase robí aj kontinuálnym spôsobom⁴. Dealkoholizáciou je možné získať pivo s koncentráciou 0,05 obj.% etanolu, toto však postráda typickú vôňu normálnych pív.

Na trhu sa výraznejšie presadila difúzia alkoholu cez membrány oproti vákuovej destilácii, pretože vykazuje absenciu termickej záťaže produktu. To však ešte nemusí znamenať, že membránové systémy sú v každom ohľade lepšie, a že ich použitím automaticky dostaneme kvalitnejšie nealkoholické pivo. Významné postavenie medzi membránovými technikami má dialýza. Vákuová destilácia sa javí ako výhodnejšia vzhľadom na vyššie náklady na membrány a vysokotlakové pumpy pri dialýze¹⁰, avšak môže podporovať syntézu zlúčenín zodpovedných za nežiaducu sladovú arómu a farbu.

Práca Zufalla a Wackerbauera¹⁰ predkladá výhody a nevýhody vyplývajúce z dialýzy pri rôznych spôsoboch použitia. Autori skúmali vplyv prietoku na oboch stranách membrán na efektívnosť procesu, spotrebu ohrevnej pary a chuťovú stabilitu piva. Z pôvodného piva s koncentráciou etanolu 4,8 obj.% vyprodukovali odalkoholizované pivo s koncentráciou 0,9 až 0,5 obj.% etanolu, čím ukázali, že dialýza je menej vhodnou metódou na dosiahnutie nízkych koncentrácií alkoholu v hotovom pive ako metóda prúdového odparovania.

Nealkoholické pivo zbavené alkoholu dialýzou mali vynikajúce senzorycké parametre, avšak ani zďaleka nedosahovali hodnoty východiskového piva. Takú kvalitu ani nie je možné dosiahnuť v dôsledku straty alkoholu. Niektoré pivovary kvôli zlepšeniu senzoryckých vlastností pív zmiešavajú dealkoholizované pivo s pivami vyprodukovanými z mladín s vyšším obsahom neskvastelných látok. Tieto sú len čiastočne skvasované a vzniknuté pivo sú nízkoalkoholické, majú plnú chuť, avšak často im chýba želaná sviežosť a rezkosť¹⁰.

2.2. Zastavená a limitovaná fermentácia

Najpoužívanejšou metódou na výrobu nealkoholických pív je tzv. limitovaná fermentácia. Je to modifikácia normálneho pivovarského fermentačného procesu, pri ktorom dochádza k nízkej produkcii etanolu (zvyčajne menej ako 0,5 obj.%). Na rozdiel od „limitovanej“ fermentácie, pri ktorej je potlačovaný metabolizmus kvasiniek, pri „zastavenej“ alebo „stop“ fermentácii sú kvasinky odstránené z mladého piva pred ukončením kvasenia. Väčšinou nie sú potrebné žiadne mimoriadne zariadenia alebo technológia, ale citlivá kontrola celého procesu.

Najrozšírenejším príkladom limitovanej fermentácie je metóda „Cold contact process“ alebo CCP, založená na

nasadení veľkého množstva kvasníc (až 135 mil. buniek/ml) a fermentácii pri teplote 0 až 1 °C počas niekoľkých dní. Proces umožňuje aj reguláciu chuti a vône piva, ktoré sa vyrába z klasických východiskových surovín. Kvasinky môžu mať pozmenený metabolizmus. V práci¹¹ sa uvádza, že koncentrácia karbonylov sa znížila v priebehu štyroch hodín, rozvetvených aldehydov po 24 hodinách. Koncentrácia 2,3-butandiínu a 2,3-pentandiínu sa zredukovala, pivo bolo bez mladinovej príchuti, vytvorili sa niektoré estery. Keď sa dosiahne požadovaná koncentrácia etanolu, fermentácia sa preruší odstránením kvasiniek.

V súčasnosti je CCP spôsob aplikovaný aj v reaktoroch s imobilizovanými kvasinkami s použitím mladiny s nízkou koncentráciou. Pri produkcii nízkoalkoholického piva imobilizačnou technikou sa teplota fermentácie (často pod 1 °C) a zdržný čas (menej ako 30 hodín) regulujú podľa požadovanej koncentrácie vytvoreného etanolu.

Kľúčovými zlúčeninami zodpovednými za prázdnu mladinovú príchuť piva vyrobeného CCP metódou sú aldehydy mladiny – 3-metylbutanal, 2-metylbutanal a 3-metyl-tiopropional. 3-Metylbutanal bol pri zakvasení dávkou 10⁷ buniek/ml v podmienkach CCP konvertovaný kvasinkami pri 0 °C na hodnotu 40 % pôvodnej koncentrácie, pri 28 °C to bolo 21 %. Alifatické aldehydy metional, pentanal a hexanal boli aj pri 0 °C odbúrané skoro úplne¹². Je to ovplyvnené aj prítomnosťou polyfenolov v silnejšie chmeľených pivách, ktoré môžu účinne viazať rozvetvené Streckerove aldehydy a zabraňovať tak ich metabolizovaniu kvasinkami. Keďže je známa ich obmedzená schopnosť odbúrať sa enzymaticky pri nižších teplotách, autori navrhujú pracovať najprv pri vyšších teplotách (20 °C) s geneticky modifikovanými kvasinkami, alebo znížiť obsah polyfenolov v mladine jej filtráciou na špecifických filtroch a kremeline s prídavkom polyvinylpyrrolidónu (PVPP). Pre imobilizované systémy môže byť výhodou aj skrátenie periódy medzi schladením mladiny a jej fermentáciou na zníženie obsahu polyfenolickej frakcie¹³.

Je tiež charakteristické, že v klasických alkoholických ležiakoch je aj prítomnosťou etanolu znížená tendencia Streckerových aldehydov, predovšetkým 3-metyl-tiopropión aldehydu, pretrvávajúť v mladine počas fermentácie, čím sa chuťové parametre hotového piva podstatne zlepšujú. V nealkoholických pivách je tento trend práve opačný vďaka prítomnosti mono- a disacharidov a absencii etanolu, čím je ich výroba z hľadiska chuťovej uspokojivosti podstatne náročnejšia^{14,15}.

Van Iersel a spol.¹⁶ skúmali možnosť použitia DEAE-celulózy ako nosiča pri výrobe nízkoalkoholického piva. Pri fermentácii kombinovali vysokú teplotu (15 až 20 °C) s krátkou dobou kvasenia (0,5 až 8 hodín), alebo nízku teplotu (0 až 5 °C) s dlhšou dobou kvasenia (nad 24 hodín). Zakvášalo sa vysokou koncentráciou buniek (10⁸/ml a viac), čo však môže byť nevýhodou, pretože už v samotnom inokuláte býva prítomné značné množstvo etanolu (až 6,5 %). Pri nehomogénnej zmesi mladiny a buniek môžu nastať také problémy, ako strata chute či smrť buniek. Preto bol vyvinutý tento imobilizovaný sys-

tém, ktorý umožňuje nárast účinnosti biomasy z 2 % na 15 %, čím sa skrúti čas fermentácie desaťnásobne. Nosič je z polystyrénu, na povrchu obalený DEAE-celulózu a kombinované stresové faktory (nízka teplota, anaeróbne podmienky) potláčajú rast a metabolizmus kvasiniek. Výsledná koncentrácia etanolu bola nižšia ako 0,08 obj.%. Neprítomnosť kyslíka ovplyvňuje redoxný potenciál kvasiniek a stimuluje produkciu esterov a vyšších alkoholov. Napriek stresovým podmienkam bol nárast biomasy zreteľný.

Podmienky prostredia ovplyvnili aj flokuláciu buniek. Najväčšia flokulácia nastala na konci exponenciálnej fázy rastu, naopak počas stacionárnej fázy sa rýchlo strácala. Nízke teploty zvyšovali flokulačné schopnosti 4-násobne, avšak optimálna teplota pre flokuláciu bola 25 °C. Ak nosičom bola DEAE-celulóza, zistilo sa, že vysoká flokulačná schopnosť stimuluje adhéziu buniek na DEAE-celulózu. Sledovala sa aj aktivita alkoholovej acetyltransferázy a tvorba esterov etylacetátu a izoamylacetátu počas limitovanej fermentácie s imobilizovanými kvasinkami v náplňovom kolónovom bioreaktore (packed-bed). Pri teplote 2 °C bola potlačená tvorba α -acetolaktátu. Uspokojujúca hladina bola dosiahnutá pri teplote 12 °C. Anaeróbne podmienky a nedostatočné množstvo nenasýtených mastných kyselín v mladine limitujú rast kvasiniek a tvorbu acetátových esterov. Zavedením aeróbných podmienok je možné dosiahnuť optimálny aromatický profil piva¹⁷. Autori vyrábali nealkoholické pivo v náplňovom kolónovom bioreaktore postupom opísaným v práci¹⁸.

Nealkoholické pivo vyrobené s použitím imobilizovaných kvasiniek, v porovnaní s pivom vyrobeným klasickou vsádzkovou fermentáciou, vykazuje lepšiu chuť aj konzistenciu. Bavaria BV z Holandska použila náplňový kolónový bioreaktor firmy Cultor s imobilizovanými kvasinkami na produkciu nealkoholického piva. Systém mal kapacitu 150 000 hl piva ročne a bolo to jedno z najlepších obchodných nealkoholických pív spoločnosti Bavaria. Viacero iných spoločností, menovite Faxe v Dánsku, Ottakringer v Rakúsku a nemenovaný pivovar v Španielsku, mali tiež zakúpenú túto technológiu a doteraz vyrábajú nealkoholické pivo imobilizovanými bunkami¹⁹.

Pivovar Beck & Co. z Bremeu testoval 60 litrový Schott reaktor s fluidizovanou vrstvou schopný produkovať 8 hl nealkoholického piva denne. Imobilizátom prechádza studená mladina s teplotou 0 °C a zdržný čas je nastavený tak, aby finálny produkt mal koncentráciu alkoholu pod 0,05 obj.%. Ten istý systém, len s modifikovanými podmienkami, bol navrhnutý na produkciu nízkoalkoholického piva¹⁹.

2.3. Použitie mutantných kvasiniek

V predošlom texte boli diskutované dva postupy, ktorými je možné získať nízkoalkoholické pivo: limitovaná fermentácia a odstránenie prebytočného etanolu použitím rôznych separačných techník. Nové trendy v tomto smere však uvažujú aj o priamych zásahoch do genómu pivovarských kvasiniek. Výsledkom by bolo rapidne ob-

medzenie nákladov na energiu, pretože aj destilácia, aj udržiavanie teploty okolo bodu mrazu pri limitovanej fermentácii sú energeticky značne náročné procesy.

Adachi a spol.²⁰ použili na výrobu nízkoalkoholického piva rekombinantný kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, ktorému chýbal gén pre pyruvátdekarboxylázu. Pri pH 4,5 v mikroaeróbných podmienkach dosiahli maximálnu koncentráciu etanolu 19,75 g l⁻¹, v anaeróbných podmienkach 14,14 g l⁻¹.

Nasadenie rekombinantných kmeňov sa však nezlučuje s potravinárskou legislatívou u nás, a tak jedinou možnosťou ako zasiahnuť do genómu kvasinky zostáva mutagenéza. Kmene mutantné v génoch pre enzýmy z cyklu trikarboxylových kyselín (TCA) majú schopnosť produkovať znížené množstvá etanolu na úkor tvorby kyselín, ktoré sú medziproduktami práve TCA cyklu, tu sú však produktami terminálnymi²¹.

Machnicka a spol.²² popísali skupinu mutantov schopných exkrécie protónov do vody bez tlmivého roztoku. Mutanty označované ako *aci* boli rozdelené do šestnástich komplementárnych skupín, mnohé z nich nemajú schopnosť rastu na glycerole a produkujú kyseliny TCA cyklu. Autori predpokladajú poruchy týchto kmeňov v TCA a glyoxylátovom cykle.

Mutantné kvasinky v TCA cykle sa môžu využívať na výrobu nealkoholických nápojov z mladiny, avšak stratou enzymovej aktivity TCA cyklu produkujú zvýšené množstvo organických kyselín. Jeden z týchto kmeňov bol použitý na produkciu kyseliny fumarovej²¹. Iné TCA mutanty nemajú aktivitu enzýmov malátdehydrogenázy, izocitrátdehydrogenázy, citrát syntetázy, akonitázy alebo oxoglutarátdehydrogenázového komplexu.

Navrátal a spol.²³ študovali produkciu nealkoholického piva použitím mutantných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Nerekombinantné kmene s defektom v syntéze enzýmov TCA cyklu boli použité a aplikované vo voľnej aj imobilizovanej forme (nosičom bol pektát vápenatý) vo vsádzkovej fermentácii alebo v kontinuálnom systéme s náplňovým reaktorom. Po fermentácii boli základné parametre piva vyrobeného piatimi mutantnými kmeňmi porovnané s pivom vyrobeným zo štandardných kmeňov pivovarnických kvasiniek. Výsledky ukazujú, že pivo vyrobené mutantnými kvasinkami bolo charakteristické nižšou hladinou celkových alkoholov, s koncentráciou etanolu 0,07 až 0,31 hm.%. Vytvorené organické kyseliny, špeciálne kyselina mliečna, v koncentrácii do 1,38 g l⁻¹, poskytovali silný ochranný efekt na mikrobiálnu stabilitu finálneho produktu.

Organické kyseliny predstavujú okrem konzervačného účinku aj významnú sensorickú zložku fermentovaných nápojov, zvlášť vín. V súvislosti s výrobou nízkoalkoholického piva by mohli slúžiť na prekrytie jeho prázdnej mladinovej chuti. Sukcinát je hlavný komponent produkovaný kvasinkami pri výrobe japonského ryžového vína saké. Arikawa a spol.²⁴ použili pri saké fermentácii rôzne kmene *Saccharomyces cerevisiae* s porušenými gémi citrátového cyklu. Pri aeróbných podmienkach produkoval mutant s vyradeným génom *KGDI* menej sukcinátu ako

rodičovský kmeň, kým mutant s prerušeným génom *SDHI* vykazoval naopak zvýšenú produkciu sukcinátu. Pri 15% obsahu glukózy v médiu boli aeróbnou cestou najviac tvorené kyseliny jantarová, jablčná a fumarová. Pri zmene metabolizmu na anaeróbny nebola zaznamenaná žiadna tvorba sukcinátu pri prerušení génu *SDHI*, uplatnili sa tu skôr mutanty s poruchou v *KGDI*. To vedie k záveru, že tieto kmene majú dve cesty pre tvorbu sukcinátu a to aeróbne, oxidáciou α -ketoglutarátu a anaeróbne, redukciou fumarátu.

Arikawa a spol.²⁵ disrupciou jednotlivých génov TCA cyklu kvasiniek získali rôzne mutanty *S. cerevisiae* vhodné pre produkciu saké. Mutant s prerušeným génom *ACO1* pre akonitázu tvoril dvakrát väčšie množstvo malátu a dvakrát menej sukcinátu ako pôvodný kmeň K901, mutant s vyradenou fumarátreduktázou (*OSMI*) produkoval 1,5-násobne viac sukcinátu. Vína vykvasené kmeňmi s vyradenou α -ketoglutarátdehydrogenázou (*KGDI*) a fumarázou (*FUM1*) obsahovali menej sukcinátu ako vína vykvasené ich rodičovskými kmeňmi.

Yano a spol.²⁶ geneticky charakterizovali mutantný kmeň kvasinky 2OG-R39, vyšľachtený z kvasinky na výrobu saké Kyokai (K-701). Mutant mal vyššie transkripčné hladiny génov TCA cyklu, aj génov oxidačnej fosforylácie a dýchacieho reťazca oproti pôvodnému kmeňu K-701. Exprezia týchto génov je regulovaná komplexom Hap2/3/4/5p, špeciálne génom *HAP4*. Po jeho zakomponovaní do plazmidu a vložení do pôvodnej kvasinky K-701, táto zintenzívnila dýchanie a produkovala viac malátu a sukcinátu.

Aplikácia kvasiniek mutantných v génoch kódujúcich enzýmy TCA cyklu sa tak javí ako vhodná alternatíva ku klasickým metódam na výrobu nealkoholického piva.

3. Genetika pivovarských kvasiniek

Chromozómy jadrovej DNA obsahujú 80–85 % celkovej DNA v bunke kvasinky. V haploidnej bunke nesú približne 15 000 génov a pred zmapovaním genómu bolo plne sekvenovaných iba približne 1000 génov zo 16 chromozómov jadrovej DNA²⁷. Celkový dnes známy genóm pozostáva z 13 392 kb DNA, z čoho 5901 pripadá na otvorené čítacie rámce (gény) a iba 50 % z nich vykazuje funkcie, ktoré im boli pripisované.

Extrachromozomálna DNA kvasinky pozostáva z 50 až 100 kópií 2 μ m DNA na bunku (perspektívnej z hľadiska rekombinantných techník), ďalej z 10–40 cyklických molekúl mitochondriálnej DNA o dĺžke 75 kbp a z dvojreťazcovej ds-RNA lokalizovanej v cytoplazme, v časticiach podobných vírusom. ds-RNA je vo väčšine prípadov prítomná v tzv. L-forme, M-formu obsahujú „killer“ kmene *Saccharomyces cerevisiae* a nesie informáciu pre produkciu toxínu, ako aj informáciu zodpovednú za produkciu imunitného faktora voči nemu²⁸.

Kmeň *S. cerevisiae* S288 a jeho diploidný derivát X2180 boli vyšľachtené začiatkom päťdesiatych rokov a 85 % ich genetického materiálu pochádza z vinnej kvasinky izolovanej v roku 1938 z hníjúcich fig v Kalifornii²⁹.

Tento kmeň bol vybraný pre tzv. „yeast genome project“ a jeho genóm je dnes kompletne sekvenovaný a charakterizovaný. Nevýhodou je však odlišnosť istých vlastností S288, ako laboratórneho kmeňa, od kmeňov vyšľachtených pre priemyselné účely.

3.1. Cyklus trikarboxylových kyselín a poruchy v génoch kódujúcich jeho enzýmy

Cyklus trikarboxylových kyselín (TCA cyklus) nazývaný tiež Krebsov alebo citrátový cyklus je lokalizovaný v mitochondriách a v spriahnutí s elektrón-transportným reťazcom a oxidatívnou fosforyláciou zabezpečuje tvorbu energie vo forme ATP, a medziproduktov pre ďalšie biosyntézy.

Z hľadiska regulácie cyklu sú dôležité tri miesta: Vstup acetylových zvyškov do citrátového cyklu a jeho rýchlosť reguluje hladina ATP v bunke. Syntéza citrátu z oxalacetátu a acetyl-CoA je prvým dôležitým regulačným miestom. ATP ako alosterický inhibítor citrát-syntetázy spôsobuje zvýšenie K_M hodnoty pre acetyl-CoA, čím sa zníži tvorba citrátu. Druhým úzkym miestom sú reakcie katalyzované izocitrátdehydrogenázou, ktorá je alostericky stimulovaná ADP tým, že zvyšuje jej afinitu k substrátom. Väzba izocitrátu, NAD^+ , Mg^{2+} a ADP je spolupôsobiaci, $NADH$ aj ATP pôsobia naopak inhibične. Tretie regulačné miesto v cykle trikarboxylových kyselín predstavuje 2-oxoglutarátdehydrogenázový komplex, ktorý inhibujú sukcinyl-CoA a $NADH$, produkty reakcie, ktorú katalyzuje³⁰.

Gény pre enzýmy TCA cyklu, ich umiestnenie, dĺžka ako aj fenotypové prejavy spojené s ich prerušením sú zhrnuté tabuľke I.

3.2. Genetické techniky využiteľné v pivovarníctve

Vo všeobecnosti je v pivovarníctve cieľom čo najvyššia efektívnosť využitia vstupných surovín, ako aj tomu zodpovedajúca produktivita bez znehodnotenia kvality výstupného produktu. Vlastnosti, ktoré sú z tohto uhla pohľadu dôležité pre pivovarské kvasinky, môžu byť zhrnuté do nasledujúcich bodov:

- schopnosť dostatočne hlbokého prekvasenia substrátu bez neočakávaných odchýliek v rýchlosti rastu,
- efektívna utilizácia maltózy a maltotriózy, spojená s ich konverziou na etanol,
- schopnosť vysporiadať sa so stresovými podmienkami navodenými koncentráciou alkoholu, teplotou a osmotickým tlakom,
- reprodukovateľná produkcia korektných hladín látok zodpovedných za chuť a arómu,
- ideálny flokulačný charakter zodpovedajúci zvolenému fermentačnému procesu,
- uchovanie si viability počas skladovania a transportu a
- genetická stabilita⁴⁵.

Tabuľka I

Gény kódujúce jednotlivé enzýmy cyklu trikarboxylových kyselín, ich dĺžka, lokalizácia a fenotypový prejav pozorovaný u mutantov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v dôsledku ich prerušenia

Enzým	Gén	Chromozóm	Dĺžka [bp]	Fenotypový prejav
Pyruvátdehydrogenázový komplex	<i>PDA1</i>	V.	1263	redukovaný rast na glukóze ³¹
	<i>PDH1β</i>	II.	1101	smrť ³²
	<i>LPD1</i>	VI.	1500	rast na glukóze, redukovaný rast na etanole, nerastú na acetáte a glycerole ³³
	<i>PDX1</i>	VII.	1233	-
Citrátsyntáza	<i>CIT1</i>	XIV.	1440	neschopnosť rastu na glycerole, acetáte a laktáte, auxotrofia na glutamát ³⁴
	<i>CIT2</i>	III.	1383	neschopnosť rastu na glycerole, acetáte a laktáte, auxotrofia na glutamát ³⁴
Akonitáza	<i>ACO1</i>	XII.	2337	neschopnosť rastu na glycerole, acetáte, laktáte a etanole, auxotrofia na glutamát ³⁵
NAD ⁺ -dependentná izocitrátdehydrogenáza	<i>IDH1</i>	XIV.	1083	redukovaná schopnosť rastu na glycerole, laktáte a pyruváte ³⁶
	<i>IDH2</i>	XV.	1110	redukovaná schopnosť rastu na glycerole, laktáte a pyruváte ³⁶
2-Oxoglutarát dehydrogenázový komplex	<i>KGD1</i>	IX.	3045	rast na glukóze, redukovaný rast na etanole, neschopnosť rastu na nefermentovateľných zdrojoch uhlíka ³⁷
	<i>KGD2</i>	IV.	1392	rast na glukóze, redukovaný rast na etanole, neschopnosť rastu na nefermentovateľných zdrojoch uhlíka ³⁷
	<i>LPD1</i>	VI.	1500	rast na glukóze, redukovaný rast na etanole, neschopnosť rastu na nefermentovateľných zdrojoch uhlíka ³⁷
Sukcinyl-CoA ligáza	<i>LSC1</i>	XV.	990	rast na glukóze a acetáte, redukovaný rast na pyruváte a glycerole ³⁸
	<i>LSC2</i>	VII.	1284	rast na glukóze a acetáte, redukovaný rast na pyruváte a glycerole ³⁸
Sukcinátdehydrogenáza	<i>SDH1</i>	XI.	1923	neschopnosť dýchať a rásť na glycerole ³⁹
	<i>SDH2</i>	XII.	801	neschopnosť dýchať a rásť na glycerole ³⁹
	<i>SDH3</i>	XI.	597	redukovaný rast na glycerole a etanole, neschopnosť rastu na laktáte ⁴⁰
	<i>SDH4</i>	IV.	596	neschopnosť rastu na glycerole ⁴¹
Fumaráza	<i>FUM1</i>	XVI.	1467	redukovaný rast na glycerole, auxotrofia na aspartát, asparagín a serín ⁴²
Malátdehydrogenáza	<i>MDH1</i>	XI.	1005	neschopnosť rastu na glycerole, laktáte a acetáte ⁴³
	<i>MDH2</i>	XV.	1272	neschopnosť rastu na glycerole, laktáte a acetáte ⁴³
	<i>MDH3</i>	IV.	1082	zníženie rýchlosti rastu na acetáte ⁴⁴

Na dosiahnutie týchto vlastností je možné využiť jednu z nasledujúcich techník zásahu do genetickej výbavy kvasinky. Každá z nich je spojená s určitými výhodami a nevýhodami, mnohé z nich sú bežne aplikované vo výskume, ich využiteľnosť v praxi je však často sporná. Jedná sa o mutáciu a selekciu, hybridizáciu, ojedinelé párova-

nie („rare mating“) spočívajúce v spárovaní laboratórneho kmeňa požadovaných vlastností s priemyselným mutantom s poruchou v dýchacom reťazci („petit mutant“), fúziu sféroplastov a metódy rekombinantnej DNA, zahŕňajúce najmä transformáciu s následnou stabilizáciou genómu a zabezpečením požadovanej expresie⁴⁵.

Techniky rekombinantnej DNA umožnili konštrukciu kmeňov, schopných utilizovať širšie spektrum sacharidov (zabudovaním glukozamyláz, bifunkčných amylolytických enzýmov, či β -glukanáz) a zvýšiť efektivitu fermentácie (zosilnením exprese skupiny *MAL* génov zodpovedných za skvasovanie maltózy a maltotriózy). Pomocou týchto technológií boli vyvinuté pivovarské kvasinky s proteolytickou aktivitou, antikontaminačnými vlastnosťami a modifikovanou flokuláciou (ovplyvnenie exprese skupiny génov s označením *FLO*). Nemenej dôležitá je eliminácia nevyhnutnosti chuťového dozrievania piva v ležiackych tankoch. Za týmto účelom boli vyvinuté kvasinky so zredukovanou schopnosťou produkovať diacetyl (vložením enzýmu acetolaktátdekarboxylázy), sírovodík, oxid siričitý (inaktíváciou génu *MET14*) a dimetylsulfid (disrupciou génu *MXR1*, kódujúceho metionínsulfoxidreduktázu). Zvýšenie produkcie aromatických zlúčenín je zase spojené so zvýšením produkcie oxidu siričitého a acetátových esterov, ktorých syntézu zabezpečujú alkoholacetyltransferázy, kódované skupinou génov *ATF1*, *LgATF1* a *ATF2* (cit.⁴⁵).

Za účelom zníženia obsahu etanolu v pive bol nadmerne exprimovaný gén *GPD 1*, kódujúci glycerol-3-fosfátdehydrogenázu v pivovarskej kvasinke *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*. Obsah glycerolu v experimente simulujúcom kvasenie na 11,38 % mladine vzrástol 5,6-krát, množstvo etanolu kleslo o 18 % oproti pôvodnému kmeňu z 37 na 30,4 g l⁻¹. Nedostatkom bol závažný nárast koncentrácie acetoínu, diacetylu a acetaldehydu⁴⁶.

S rozvojom techník genetickej modifikácie buniek vzrástol záujem vedcov o problémy kolonizácie životného prostredia geneticky modifikovanými organizmami, či nechcený prenos génov do voľne žijúcich organizmov. Postupne bola v jednotlivých krajinách vyvinutá legislatíva, ktorá zohľadňuje tieto riziká a zabezpečuje kontrolu. Všetky genetické techniky súvisiace s pivovarníctvom, však vždy spadali do nižších rizikových kategórií. Vo Veľkej Británii sa napríklad pred uvedením novej potraviny obsahujúcej GMO vyžaduje povolenie poradnej komisie pre nové potraviny a procesy (Advisory Committee on Novel Food and Processes – ACNFP), ktorá pracuje na základe nariadenia Európskej komisie EC 258/97 o nových potravinách (Novel Food Regulations) a je zložená z nezávislých expertov menovaných príslušným ministerstvom⁴⁷.

V Slovenskej republike je táto problematika zohľadnená v Zákone NR SR č. 152/1995 Z. z. o potravinách, v znení neskorších predpisov a v Zákone NR SR č. 151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov, ako aj vo vyhláske MŽP SR č. 252/2002, ktorou sa vykonáva tento zákon. Z uvedených noriem vyplýva, že spektrum povolených zásahov do genómu mikroorganizmov je značne široké, musí však spĺňať vymedzené bezpečnostné náležitosti a podliehať ustanoveným kontrolným mechanizmom. Najmä vďaka negatívnej publicite v médiách a verejnému záujmu je však zatiaľ v pivovarníckom priemysle vyvíjaná len malá aktivita, za účelom komerčného využitia geneticky modifikovaných kvasiniek.

Mutagenéza a následná selekcia (najmä fyzikálnymi mutagénmi) tak na základe svojej materiálno-technickej, ako aj inštrumentálnej nenáročnosti predstavuje ľahko aplikovateľnú metodiku v praxi a je schopná už v krátkej budúcnosti prelomiť bariéru zdráhania sa geneticky modifikované mikroorganizmy pri výrobe piva použiť.

3.3. Mutagenéza pivovarských kvasiniek

Mutácia je každá zmena génu, ktorá sa zachováva pri autoreprodukcii genetického materiálu, a to ešte aj vtedy, keď už prestal pôsobiť činiteľ, ktorý ju zapríčinil⁴⁸. Činiteľ, ktorý mutáciu zapríčinil, sa nazýva mutagén. V prírode sa vyskytujú mutácie s nízkou početnosťou, asi 10⁻⁴ až 10⁻⁸, ktorých príčina nám nie je známa. Nazývame ich samovoľné alebo spontánne mutácie⁴⁹. Indukované mutácie sú vyvolané cielene, pôsobením určitého mutačného činiteľa, alebo kombináciou viacerých. Základné členenie mutagénov je nasledovné:

- fyzikálne mutagény (ionizujúce a neionizujúce žiarenie, teplota...),
- chemické mutagény (rôzne alkylačné činidlá, farbivá, kyselina dusitá...).

Najpriateľnejšou formou mutácie buniek určených pre potravinársku výrobu je ich vystavenie účinkom UV žiarenia. UV žiarenie je zložkou slnečnej elektromagnetickej radiácie a na základe jeho vlnovej dĺžky sa dá rozdeliť na tri skupiny: UV-A (320–390 nm), UV-B (280–320 nm) a UV-C pod 280 nm (cit.⁵⁰). Najmä krátkovlnové ultrafialové žiarenie má letálny účinok a pôsobí predovšetkým na DNA. Ultrafialové žiarenie nemusí priamo pôsobiť na bunku. Stačí, keď sa ožiari živná pôda, na ktorej sa budú bunky pestovať. Tento mutačný účinok sa však prejaví len vtedy, ak sa v ožiarenej živnej pôde vyskytujú aminokyseliny. Ožiarené minerálne prostredie mutácie nezapríčiňuje. Intenzita mutagénneho účinku ožiareného prostredia je priamo úmerná obsahu vody. Mutagénny účinok UV žiarenia je podobne ako u ionizujúceho žiarenia zapríčinený vznikom aktívnych skupín, kedy tieto v prípade ionizujúceho žiarenia vznikajú ionizáciou vody, v prípade UV žiarenia pohlcovaním kvánt energie biologicky významnými molekulami, najmä aminokyselinami. Na bunkovej úrovni dochádza k zlomu v reťazci DNA, alebo k búraniu vodíkových väzieb, čo sa prejaví dimerizáciou pyrimidínov, spojením dvoch susedných tymínov, priečnou väzbou dvoch tymínov medzi závitnicami DNA, spájaním cytozín-tymín, uridín-tymín, alebo dvoch uridínov a hydratáciou cytozínu⁴⁹.

Mutagénne a inaktivačné účinky UV žiarenia vlnovej dĺžky 254 nm, spolu so zvýšenou teplotou (45–60 °C) na arteficiálny diploidný kmeň *S. cerevisiae* T1, heterozygotný pre gén *ADE2* (*ade 2-192/ade 2-45*) skúmali Petin a spol.⁵⁰. Simultánne pôsobenie hypertermie a UV svetla zvyšuje frekvenciu UV-indukovaných mitotických rekombinácií (crossing-over). Zosilňujúci účinok je funkciou intenzity žiarenia, pretože frekvencia rekombinácií bola oveľa vyššia pri svetelnom toku 1,5 W m⁻², ako pri 0,5 W m⁻². Percento prežívajúcich buniek sa naopak zni-

žovalo úmerne zvyšujúcej sa intenzite žiarenia. Zvýšená teplota pôsobí ako inhibítor opravných mechanizmov, preto výsledky pri stredných dávkach žiarenia a vyššej teplote sú relatívne blízke výsledkom dosiahnutým pri vyšších dávkach žiarenia a nižšej teplote.

UV žiarením indukované mutácie podliehajú v bunkách kvasiniek niekoľkým opravným mechanizmom. Jedná sa najmä o fotoreaktívny účinok, kedy sa mutagénny účinok na kvasinky zníži, ak sa kultúra po ožiarení vystaví účinku viditeľného svetla a mutagénne účinky radiácie sa môžu oslabiť aj tým, že ožiarené bunky sa pred vysiatím na živný agar udržiavajú istý čas v destilovanej vode, čo sa označuje ako LHR (liquid holding recovery). Iný opravný mechanizmus je rekombinácia. Jadrové mutanty, ktoré nemajú schopnosť rekombináciou spôsobom opravovať poruchy zapríčinené mutagénom, boli v literatúre označované ako *rec⁻*. Blokovaním génov zodpovedných za opravy DNA boli pripravené mutanty citlivé na žiarenie. Mutácie *rad1* až *rad22* sú kontrolované génni citlivými na UV žiarenie, *rad50* až *rad57* sú citlivé hlavne na röntgenové žiarenie. Okrem toho sú známe mutanty *rev1*, *rev2* (= *rev5*) a *rev3*, ktoré sa izolovali na zníženie počtu mutantov indukovaných ultrafialovým žiarením na lokuse *arg4-17* (cit.⁴⁹).

Brendel a spol.⁵¹ popisali 10 mutantov *Saccharomyces cerevisiae* citlivých na účinok psoralénov aplikovaných v dermatoterapii. Mutanty boli neschopné opráv na UV žiarením poškodené DNA. Zodpovedajúce gény rozdelili do troch kategórií. Prvá pozostáva zo siedmich génov prislúchajúcich všeobecným, alebo špecifickým opravám ľahkých poškodení DNA. Tri z nich, *PSO1/REV3*, *PSO8/RAD6*, a *PSO9/MEC3*, sú alelické k doteraz známym opravným génom, zvyšné tri (*PSO2/SNM1*, *PSO3/RNR4* a *PSO4/PRP19*) sú novo objavené. Druhú skupinu reprezentuje gén *PSO5/RAD16*, kódujúci DNA helikázu zabezpečujúcu nukleotidové excízne opravy DNA (NER) a do tretej skupiny patria gény *PSO6/ERG3* a *PSO7/COX11*, ktoré kódujú ergosteroldesaturázu, slúžiacu ako štruktúrálnej jednotky membrány, resp. zložku dýchacieho reťazca cytochróm c oxidázy. Oba enzýmy ovplyvňujú opravy DNA iba nepriamo.

V pivovarníckej praxi sa často využívajú spontánne mutácie meniace flokulačné charakteristiky kvasiniek. Tieto zmeny umožnili výrobu pív typu *ale* pomocou mutantov schopných spodného kvasenia, ktoré boli získané z príslušných kmeňov vrchného kvasenia, v cylindro-kónických tankoch. Boli tiež izolované kvasinky s redukovanou schopnosťou produkcie esterov a vyšších alkoholov, ako spontánne mutanty vykazujúce rezistenciu na glukozamín.

Indukovanou mutagenézou, použitím *N*-metyl-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidínu a UV žiarenia, boli pripravené mutanty auxotrofné na valín a metionín, so zníženou produktivitou nežiadúceho diacetylú a sírovodíka, v rôznych flokulačných variantoch. Cenné pre prax sú aj mutanty s rezistenciou na glukózový analóg 2-deoxyglukózu. Pri štandardných fermentačných podmienkach je dôsledkom katabolickej represie využívaná maltóza. Utiľzovať sa

začína vtedy, keď polovica z pôvodného obsahu glukózy v mladine je už zmetabolizovaná. Mutanty rezistentné voči 2-deoxyglukóze sú dereprimované a uťlizujú maltózu aj glukózu súčasne. Mutačné techniky môžu byť použité aj na prípravu geneticky značených kmeňov kvasiniek⁴⁵.

4. Záver

Pivá so zníženým obsahom alkoholu a nealkoholické pivá sa v prevažnej miere vyrábajú separáciou alkoholu z bežným spôsobom vykvasených pív, za použitia vákovej destilácie. Táto technika však v značnej miere tepelne zaťažuje produkt a prispieva k zhoršeniu vône a chute vyrobených pív. Šetnejší spôsob dealkoholizácie predstavuje reverzná osmóza, ktorou sú získavané nealkoholické pivá uspokojivej kvality. Alternatívnu možnosť predstavuje limitovaná fermentácia mladiny nízkej stupňovitosti pri teplotách blízkyh nule, alebo zastavená fermentácia, pri ktorej sa po vytvorení požadovaného množstva etanolu kvasinky odstraňujú.

Pivá so zníženým obsahom alkoholu sa však vyznačujú prázdnu mladinovou chuťou a sú náchylnejšie na bakteriálnu kontamináciu. Jednou z možností, ako tieto nedostatky odstrániť, je využitie kvasiniek mutantných v cykle trikarboxylových kyselín. Tieto produkujú počas svojej aeróbnej fázy kyseliny ako citrónová, jantárová, fumarová, či jablčná. V anaeróbnej fáze okrem malého množstva etanolu vytvoria aj kyselinu mliečnu, ktorá vďaka tomu, že poskytuje nízke pH, chráni produkt pred nežiaducou bakteriálnou kontamináciou. Produkované kyseliny obohacujú chuť pív, slúžia ako sensoricky významná zložka. Problematika nie je ešte do detailov zvládnutá, najmä z dôvodu nešpecifickosti UV mutácie, ktorá predstavuje potravinársky „najčistejšiu“ formu prípravy mutantných kvasiniek, preto je nevyhnutný ďalší výskum na génovej úrovni.

LITERATÚRA

1. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR z 10. augusta 2000 č. 2313/4/2000-100, ktorým sa vydáva hlava potravinového kódexu SR upravujúca nápoje; 3. Časť, osobitné požiadavky; XV. Hlava, nápoje; 3. Diel, pivo, §29 (7), (2000).
2. Kavanagh T. E., Clarke B. J., Gee P. S., Miles M., Nicholson B. N.: Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am. 23, 111 (1991).
3. Müller R.: Ferment 3, 224 (1990).
4. Perpete P., Collin S.: Cerevisia 1, 27 (1999).
5. Narziss L., Miedaner H., Kern E., Leibhard M.: Brauwelt Int. IV, 396 (1992).
6. Kosař K., Procházka S.: *Technologie výroby sladu a piva*. Výskumný ústav pivovarský a sladařský a.s., Praha 2000.
7. Pittner H., Back W., Swinkels W., Meersman K., Van Dieren Ch., Lommi H.: Eur. Brew. Conv., *Proceedings of the 24th Congress, Oslo, 1993*. 569 (1993).

8. Stein W.: MBBA Tech. l Quater. 30, 54 (1993).
9. Van Iersel M. F. M., Meersman E., Arntz M., Rombouts F. M., Abee T.: J. Inst. Brew. 104, 131 (1998).
10. Zufall C., Wackerbauer K.: Monatsschr. Brauwiss. 53, 164 (2000).
11. Schur F.: Eur. Brew. Conv., *Proceedings of the 19th Congress, London, 1983*. 353 (1983).
12. Perpete P., Collin S.: Food Chem. 66, 359 (1999).
13. Perpete P., Collin S.: Food Chem. 70, 457 (2000).
14. Perpete P.: Food Chem. 71, 379 (2000).
15. Nakanishi K., v knihe: *Yeast and Biocatalysis* (Verachter H., de Mot R., ed.), Marcel Dekker Inc., New York and Basel 1990.
16. Van Iersel M. F. M., Meersman E., Swinckels W., Abee T., Rombouts F. M.: J. Ferm. Bioeng. 77, 41 (1995).
17. Van Iersel M. F. M., Van Dieren B., Rombouts F. M., Abee T.: Enzyme. Microb. Technol. 24, 407 (1999).
18. Lommi H., Swinkels W., van Dieren B.: European Patent No. 0, 424, 794, A3, (1990).
19. Mensour N. A., Margaritis A., Briens, C. L., Pilkington H., Russell I.: J. Inst. Brew. 103, 363 (1997).
20. Adachi E., Torigoe M., Sugiyama M., Nikawa J., Shimizu K.: J. Ferment. Bioeng. 86, 284 (1998).
21. Kacliková E.: Bull. Potravin. Vysk. 3, 135 (1996).
22. Machnicka B., Grochowalska R., Boniewska-Bernacka E., Słomińska L., Lachowicz T. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 325, 1030 (2004).
23. Navrátil M., Dömény Z., Šturdík E., Šmogrovičová D., Gemeiner P.: Biotechnol. Appl. Biochem. 35, 133 (2002).
24. Arikawa Y., Kuroyanagi T., Shimosaka M., Muratsubaki H., Enomoto K., Kodaira R., Okazaki M.: J. Biosci. Bioeng. 87, 28 (1999).
25. Arikawa Y., Kobayashi M., Kodaira R., Shimosaka M., Muratsubaki H., Enomoto K., Okazaki M.: J. Biosci. Bioeng. 87, 333 (1999).
26. Yano S., Asano T., Kurose N., Hiramatsu J., Shimoi H., Ito K.: J. Biosci. Bioeng. 96, 332 (2003).
27. Mortimer R. K., Contopoulou C. R., King J. S.: Yeast 8, 817 (1992).
28. Wickner R. B.: Arch. Biochem. Biophys. 222, 1 (1983).
29. Mortimer R. K., Johnson J. R.: Genetics 113, 35 (1986).
30. Stryer L.: *Biochemistry*. 4. vyd. W. H. Freeman and Company, New York 1995.
31. Wenzel T. J., Van Den Berg M. A., Visser W., Van Den Berg J. A., De Steensma H. Y.: Eur. J. Biochem. 209, 697 (1992).
32. Miran S. G., Lawson J. E., Reed L. J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1252 (1993).
33. Dickinson J. R., Roy D. J., Dawes I. W.: Mol. Gen. Genet. 204, 103 (1986).
34. Burand J. P., Drillien R., Bhattacharjee J. K.: Mol. Gen. Genet. 139, 303 (1975).
35. Gandaloff S. P., Marguet D., Lauquin G. J. M.: Mol. Cell. Biol. 7, 3551 (1990).
36. Cupp J. R., McAlister-Henn L.: J. Biol. Chem. 267, 16417 (1992).
37. Mockovčiaková D., Janitorová V., Zigová M., Kacliková E., Zagulski M., Šubík J.: Curr. Genet. 24, 377 (1993).
38. Przybyla-Zawislak B., Dennis R. A., Zakharkin S. O., McCammon M. T.: Eur. J. Biochem. 258, 736 (1998).
39. Chapman K. B., Solomon S. D., Boeke J. D.: Gene 118, 131 (1992).
40. Daignan-Fornier B., Valens M., Lemire B. D., Fukuhara B.: J. Biol. Chem. 269, 15469 (1994).
41. Bullis B. L., Lemire B. D.: J. Biol. Chem. 269, 6543 (1994).
42. Wu M., Tzagaloff A.: J. Biol. Chem. 262, 12275 (1987).
43. McAlister-Henn L., Thompson L. M.: J. Bacteriol. 169, 5157 (1987).
44. Steffan J. S., McAlister-Henn L.: J. Biol. Chem. 267, 24708 (1992).
45. Hammond J. R. M., v knihe: *Brewing Microbiology*. 3. vyd. (Priest F. G., Campbell I., ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2003.
46. Nevoigt E., Pilger R., Mast-Gerlach E., Schmidt U., Freihammer S., Eschenbrenner M., Garbe L., Stahl U.: FEMS Yeast Res. 2, 225 (2002).
47. Hammond J., v knihe: *Genetic Modification in the Food Industry* (Roller S., Harlander S., ed.). Blackie, London 1998.
48. Klein J.: *Molecular Basis of Heredity*. Praha 1964.
49. Kocková-Kratochvílová A.: *Yeast and Yeast-Like Organisms*. VCH Publishers, Weinheim 1990.
50. Petin V. G., Kim J. K., Rassokhina A. V., Zhurakovskaya G. P.: Mutat. Res. 478, 169 (2001).
51. Brendel M., Bonatto D., Strauss M., Revers L. F., Pungartnik C., Staffi J., Henriques J.A.P.: Mutat. Res. 544, 179 (2003).

R. Selecký and D. Šmogrovičová (*Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava*):
Technological and Microbiological Aspects of Low-Alcoholic Beer Production

This is a review of the current state of technology of non-alcoholic and low-alcoholic beer production. In the first part, processes involving alcohol removal from partially or fully fermented beers are described. The advantages and disadvantages of different methods of beer de-alcoholisation, mainly membrane and evaporation technologies, are discussed. In the next part, methods of stopped and limited fermentation at low temperature as well as the use of mutant yeast strains are mentioned. The genetic background of the strains with a defect in the activity of the tricarboxylate-cycle enzymes and their use for the production of non-alcoholic and low-alcoholic beer are discussed in the last section. Particular aspects of this wide-range field can lead to improvement of properties of the non-alcoholic beer.