

Pivovarství a sladařství

Imobilizované pivovarské kvasinky

Ing. MICHAELA POLEDNÍKOVÁ, Ing. HELENA ŠEDOVÁ, Ing. MIROSLAV KAHLEK, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Pokusy konané v rámci výzkumného úkolu, jehož cílem je využití vázaných kvasinek k výrobě piva, byly v první fázi zaměřeny na výběr vhodného nosiče, a proto zatím nepřekročily laboratorní měřítko. Aby mohly být imobilizované buňky úspěšně využity v pivovarském průmyslu, musí vykazovat řadu vlastností, které běžně používané várečné kvasnice nemají, např. dlouhodobé zachování dobrého fyziologického stavu, mnohonásobně opakované využití, omezení autolyzačních pochodů, tvorby nežádoucích vedlejších metabolitů apod. Vedle těchto požadavků musí být vlastní imobilizace jednoduchá, levná a nevyžadující nákladné zařízení. K našim pokusům jsme vybrali několik způsobů vazby buněk, a to nejen podle vlastností získaného buněčného biokatalyzátoru, nýbrž i podle ceny výchozích surovin a jejich dostupnosti.

Imobilizaci buněk lze uskutečnit několika způsoby. Rozhodujícím faktorem pro zvolený způsob imobilizace jsou požadavky na konečné vlastnosti získaného biokatalyzátoru. Obecně se rozdělují metody vázání buněk podle toho, zda se vážou na nosič pouze fyzikálně (van der Waalovy síly mezi nepolárními molekulami), nebo fyzikálně chemickými interakcemi, popřípadě kovalentní vazbou [1]. Kromě základních forem imobilizace lze tyto rozdělit ještě podle typu použité metody:

1. Adsorpce buněk na nosič
2. Agregace buněk flokulací
3. Zabudování buněk v polymeru
 - a) spolusrážení buněk s polymery nerozpustnými ve vodě,
 - b) zachycení buněk v gelech rozpustných za tepla ve vodě,
 - c) zapolymerování buněk,
 - d) mikroinkapsulace buněk
4. Kovalentní zesíťování mikrobuněčného obsahu
5. Kovalentní nebo fyzikálně chemická vazba buněk na nosič

- a) vazba buněk na organický nosič umělého původu,
 - b) vazba buněk na anorganický nosič umělého původu,
 - c) vazba buněk na nosič přírodního původu
6. Kovalentní vazba buněk na buňky

ad 1.

Nejjednodušším způsobem vazby mikrobiálních buněk nebo enzymů je adsorpce buněk na nosič. Jde v principu o polární nebo fyzikální adsorpci buněk na povrchu částic nosiče, popřípadě jejich kombinaci. Jako nosiče se nejčastěji používá měničů kationtů a aniontů na bázi derivátů celulosy, různých iontoměnných pryskyřic nebo silika elu. Je zřejmé, že adsorpce závisí na chemické povaze povrchu buněčné stěny, respektive na jejích funkčních skupinách. V pivovarství se této metody používá při imobilizaci β -glukanasy [2].

ad 2.

Agregace buněk flokulací účinkem flokulantu vede k tvorbě agregátů buněk, založené na principu fyzikálně chemické interakce, převážně polární [3]. Buňky nejsou jen na povrchu, nýbrž i uvnitř částic preparátu. Vhodnými a účinnými flokulačními činidly bývají sloučeniny, které jsou schopny ovlivnit povrchový náboj buněk, např. minerální hydrokoloidy, iontoměniče, různé elektrolyty atd.

ad 3.

Mechanické zachycení (zabudování buněk v polymeru) je velmi často používaná metoda. Při spolusrážení buněk s polymerem nerozpustným ve vodě se smísí vodná suspenze buněk s polymerem rozpuštěným ve vhodném organickém rozpouštědle a směs se poté nechá vysrážet buď ve vodě, nebo v jiném rozpouštědle, někdy pouhým působením vzduchu. K zachycení buněk se používá řada polymerů — např. nitráty celulosy, polyuretan, polyvinylalkohol [3], di- a triacetát celulosy [4, 5], α -celulosa [7], polystyren [7, 8] aj.

Vazbou kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* v alginátovém gelu se zabývali Kierstan a Bucke [9], kteří sledovali množství etanolu tvořeného imobilizovanými buňkami při zkvašování glukosy. Maximální dosažená účinnost systému byla 90 % z teoretického maximálního výtežku.

Brodelius, Nilsson a Mosbach využili buněk *Trigonopsis variabilis* zachycených v alginátovém gelu v reaktoru pro výrobu α -ketokyselin příslušných D-aminokyselin.

Obdobně jako v alginátovém gelu mohou být mikrobiální buňky vázány i v jiných gelovitých látkách, jako jsou např. želatina, carragenany, deriváty celulósy — karboxymethylcelulósa [10] aj. Například Deo et al. [11] popsali produkci patulinu buňkami *Penicillium urticae* vázanými na carragenan.

Carragenanový gel používali pro vazbu buněk i Mori, Suzue, Osuga a Wada [12], kteří na něj imobilizovali buňky *Acetobacter aceti* pro výrobu octa. White a Portno [13] využili imobilizovaných pivovarských kvasinek při kontinuálním kvašení. Kvasinky byly navázány v gelu alginátu vápenatého a pro imobilizaci byl vybrán neseďimentující kmen *Saccharomyces cerevisiae*. Kvašení probíhalo v laboratorní kvasné věži. Systém byl nepřetržitě v činnosti 7 měsíců bez jakéhokoli nepříznivého poklesu kvasné schopnosti kvasinek. Prokvašení mladiny, nárůst buněčné hmoty i hodnoty těkavých aromatických látek byly v podstatě shodné s kontrolním „batch“ pokusem, u kterého se použil stejný kmen nevázaných kvasinek.

Při zapolymerování buněk v síti polymeru se místo hotového polymeru použije ve směsi s buňkami vhodný monomer a síťovací činidlo. Pro tento způsob lze použít gelů jak organických, tak i anorganických. Nejčastěji se používá zapolymerování buněk do polyakrylamidového gelu [14].

Zapolymerování buněk do polyakrylamidu je metoda již dokonale propracovaná a hojně využívaná. Průmyslová aplikace začala v r. 1973. Řada pracovníků popsala několik metod využití vázaných buněk při kontinuální výrobě L-citrulinu [15], kyseliny asparagové [16, 17, 18], kyseliny glutamové [19] a koenzymu A [20]. K imobilizaci využili buněk *Pseudomonas putida*, *Achromobacter liquidum*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium ammoniagenes*.

Mikroinkapsulace se provádí nejvíce metodou fázové separace a mezropovrchové polymerace. Margaritis a Rowe [21] imobilizovali buňky *Zymomonas mobilis* mikroinkapsulací v semipermeabilní membráně nitrátu celulósy. Mikroinkapsule byly naplněny do kolony a používány jako kontinuální bioreaktor na výrobu etanolu z glukosy.

ad 4.

Kovalentního zesíťování vnitrobuněčného obsahu jednotlivých buněk se dosáhne chemickou reakcí buněk, respektive některých buněčných komponentů (zvláště bílkovin) s polyfunkčními činidly. Síťovacím polyfunkčním činidlem může být látka, jejíž reaktivní skupiny dostatečně rychle reagují se skupinami složek buněčné stěny, cytoplasmatické membrány a cytoplasmu; jsou to především aminoskupiny, hydroxyskupiny a merkaptoskupiny. Kovalentní zesíťování stabilizuje buňky proti autolýze a hlavně fixuje aktivitu enzymů. Polyfunkčními síťovacími činidly jsou především dialdehydy odvozené od dikarboxylových kyselin (glutaraldehyd), dále polydiazosloučeniny, diizokyanáty, reaktivní chlorované deriváty triazinu apod. [1]. Čulík et al. [22] vypracovali metodu pro kovalentní zesíťování vnitrobuněčného obsahu. Celé buňky vysokoprodukčního kmene *Escherichia coli* CCM 2843 s obsahem penicilinacylasy byly zesíťovány účinkem

polyfunkčních aldehydů a použity k semikontinuální přípravě 6-aminopenicilánové kyseliny hydrolýzou benzylpenicilinu.

ad 5.

Vazba buněk na organický nosič umělého původu se provádí smíšením vodné suspenze buněk s částicemi polymeru. Částice polymeru jsou nejčastěji sférického tvaru a obsahují chemicky aktivní skupiny, které reagují s buňkami za vzniku komplexů polymer—buňka. Buňky jsou na jednotlivé částice polymeru poutány převážně kovalentní vazbou. Jako nosiče se nejčastěji používají polymery na bázi glycidylmethakrylátu s reaktivními epoxidovými skupinami, nebo methakrylaldehydu s reaktivními aldehydovými skupinami. Gulaya et al. [23] popsali imobilizaci buněk *Saccharomyces paradoxus* na hydroxylalkyl-methakrylátový gel. Obdobný gel — Separon 1000 byl modifikován několika různými způsoby. Vznikly tak nosiče s různými prostorovými spojkami — „spacery“. Tyto modifikované separony byly dále aktivovány glutaraldehydem nebo karbodiimidem. Vlastní imobilizační proces probíhá tak, že suspenze buněk ve fosfátovém pufru se třepe s aktivovaným nosičem při 22 °C po stanovenou dobu (1 až 14 dní).

Kennedy [24] imobilizoval buňky *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* a některé kmeny rodu *Acetobacter* na uměle vzniklé polymerní komplexní hydroxidy Zr^{IV} a Ti^{IV} .

Vieth a spol. [25, 26] vyvinuli imobilizační metodu, při které jsou celé buňky fixovány na rekonstituované kolagenové membráně.

ad 6.

Kovalentní vazba buněk na buňky má za následek tvorbu mikrobiálních buněčných agregátů. Buňky jsou vázány buď vzájemně, nebo na buněčné nosiče různých druhů prokaryontních nebo eukaryontních organismů kovalentními vazbami pomocí polyfunkčních činidel. Tyto mikrobiální buněčné agregáty jsou kovalentně zesíťované, jsou nerozpustné a mají dobrou sedimentační schopnost [27]. Takto byly vázány buňky *Escherichia coli* CCM 2843 s vysokým obsahem enzymu penicilinacylasy.

1. Experimentální část

K imobilizaci kvasinek jsme použili několika způsobů a v laboratorním měřítku jsme posoudili vlastnosti získaných biokatalyzátorů. Postupně jsme navázali kvasinky těmito metodami:

1. Zapolymerování buněk v polymeru
2. Zachycení buněk v gelech rozpustných za tepla ve vodě
3. Spolusrážení buněk s polymery rozpustnými ve vcdě
4. Kovalentní vazba buněk na nosič
5. Kovalentní zesíťování vnitrobuněčného obsahu

1. Zabudování buněk v polymeru se velmi často aplikuje při imobilizaci bakteriálních buněk. Aktivita biokatalyzátoru závisí na relativní koncentraci buněk a na stupni zesíťování polymeru. Hustota příčných vazeb v polymeru ovlivňuje jeho difuzibilitu.

K zapolymerování kvasinek se použil 2-hydroxyethylmethakrylát. Polymerace probíhala při teplotě v rozmezí 5 až 10 °C ve vodném prostředí. Reakce byla zahájena přidáním redoxiniciátorů. Koncentrace monomerů se volila tak, aby se získal gel různě porézní (malá síťová hustota). Změnou koncentrace síťovačů v polymerační směsi se regulovala poréznost gelu. Před vlastní polymerací se nejdříve polymerační směs důkladně promyla dusíkem. Doba polymerace byla vždy 24 h a získaný biokatalyzátor se potom promýval několik dní vodou.

2. Pro tento způsob imobilizace jsme připravili 2,5%

roztok agaru při teplotě 40 °C, ke kterému se přidaly kvasinky promyté fyziologickým roztokem. Po dokonalé homogenizaci se směs vstříkovala do roztoku toluenu a dichlormethanu, vychlazeného na -10 °C. Vzniklé kapčky agaru jsou nerozpustné ve vodě.

Tabulka 1. Kvasné zkoušky s vázanými kvasinkami v alginátu vápenatém

Označení sledovaných ukazatelů	Kvašení při 20 °C		Kvašení při 7 °C	
	vázané buňky	kontrola	vázané buňky	kontrola
1. Doba kvašení — dny	3	3	6	6
Koncentrace kvasinek v mladině m ³ suš./100 g	+	56,0	+	62,4
P _z mladého piva %	80,8	81,9	48,9	70,2
Koncentrace kvasinek v mladém pivě m ³ suš./100 g	6,4		0	289,3
Isosloučeniny mg/1000 ml	16,8	14,2	24,5	16,1
2. Doba kvašení — dny	2	2	6	6
Koncentrace kvasinek v mladině m ³ suš./100 g	+	43,0	+	46,5
P _z mladého piva %	80,0	84,7	80,0	69,9
Koncentrace kvasinek v mladém pivě m ³ suš./100 g	17,7		0	310,5
Isosloučeniny mg/1000 ml	19,2	18,6	15,3	13,3
3. Doba kvašení — dny	2	2	7	7
Koncentrace kvasinek v mladině m ³ suš./100 g	+	45,0	+	45,3
P _z mladého piva %	78,4	80,5	79,7	62,6
Koncentrace kvasinek v mladém pivě m ³ suš./100 g	17,4		0	193,5
Isosloučeniny mg/1000 ml	15,7	15,2	15,5	16,9
4. Doba kvašení — dny	2	2	6	6
Koncentrace kvasinek v mladině m ³ suš./100 g	+	60,5	+	68,0
P _z mladého piva %	85,9	85,5	87,1	50,9
Koncentrace kvasinek v mladém pivě m ³ suš./100 g	20,0		3,9	229,5
Isosloučeniny mg/1000 ml	19,1	18,5	14,5	13,2
Koncentrace mladiny % 9,38				
Isosloučeniny mg/1000 ml 30,5				

Pozn.: + množství vázaných kvasinek v peletkách použitých pro kvasné zkoušky odpovídá asi 70 mg suš./100 ml mladiny

3. Při této metodě vazby buněk se velmi často aplikuje alginát sodný v koncentračním rozsahu 1 až 15 %. V připraveném roztoku alginátu sodného se rozmíchají kvasinky a tato homogenní směs se potom vstříkuje do roztoku chloridu vápenatého. Výměnou sodíkových iontů za vápenaté vzniká gelovitá nerozpustná forma. Získa-

Tabulka 2. Změna hmotnosti neošetřených a ošetřených peletek vlivem nabobtnání

Varianta vázaných buněk	Hmotnost čerstvě připravených peletek [g]	Hmotnost peletek po 11. kvasném cyklu [g]
Neošetřený povrch peletek	19,3	35,0
Ošetřený povrch peletek	19,3	22,0

Tabulka 3. Průběh opakovaného zakvašování neošetřenými a ošetřenými alginátovými peletkami

Kvasný cyklus	Doba kvašení dny	Neošetřené peletky		Ošetřené peletky	
		P _z %	buňky v ml.10 ⁶	P _z %	buňky v ml.10 ⁶
1.	2	84,5	4,1	79,1	16,5
2.	2	84,4	5,8	84,0	36,8
3.	3	84,9	6,9	84,5	42,4
4.	2	83,7	5,7	83,6	38,2
5.	2	83,7	9,9	83,9	48,1
6.	3	84,4	15,0	84,4	32,1
7.	2	83,9	14,6	83,5	28,1
8.	2	84,2	30,6	83,9	37,3
9.	3	84,0	24,3	85,0	19,1
10.	2	84,2	27,4	84,2	20,5
11.	2	84,9	14,4	84,4	27,8
12.	3	84,4	14,1	84,3	41,7
13.	1	83,2	7,5	83,3	26,4
14.	1	83,4	10,9	82,3	32,1
15.	1	83,4	22,2	83,2	39,8
16.	1	82,5	9,0	84,0	15,1
17.	3	81,0	11,5	84,6	21,4
18.	1	83,0	18,6	83,2	14,9
19.	1	81,8	15,1	82,7	27,8
20.	1	82,4	9,7	82,6	20,3
21.	1	83,7	11,8	82,7	10,6
22.	3	84,3	8,5	84,3	19,3
23.	1	82,7	3,5	83,1	18,8
24.	1	82,6	15,6	82,4	14,1
25.	1	83,2	11,6	81,3	6,9
26.	1	82,3	12,7	81,9	7,1
27.	1	82,9	11,5	83,4	9,4
28.	1	82,6	5,6	82,4	11,6
29.	—	—	—	82,6	7,5
30.	—	—	—	81,8	6,1

né peletky alginátu vápenatého jsou pružné a poměrně pevné. Průměr peletek závisí na průměru kapiláry při vstříkovaní výchozí suspenze do roztoku chloridu vápenatého. Vytvrzené peletky se důkladně promyjí ve vodě.

4. Dalším zkoušeným způsobem imobilizace byla vazba kvasinek na umělý nosič. K pokusům jsme použili polyfenylenoxidu, který se před imobilizací nejdříve aktivoval glutaraldehydem. S aktivovaným nosičem se potom třepala suspenze kvasinek 24 až 48 hodin. Připravený biokatalyzátor se důkladně promyje vodou.

Obdobným způsobem se vázaly kvasinky na modifikovaný Separon. K dispozici jsme měli dva typy s různými prostorovými spojkami, a to tetramethyldiamin — Separon (B₁T) a ethyldiamin — Separon. Oba nosiče se aktivovaly opět glutaraldehydem. Další postup přípravy biokatalyzátoru byl stejný jako při zpracování polyfenylenoxidu.

5. V poslední zkoušené skupině se sledoval vliv kovalentního zesílení vnitrobuněčného obsahu. Jako sřřovacího polyfunkčního činidla jsme použili glutaraldehy-

du. Ke zvýšení propustnosti cytoplasmatické membrány se využil účinek tensidů, v našem případě to byl Slovafo 909. Doba působení zředěného roztoku glutaraldehydu byla vždy 20 min. S uvedeným tensidem se zesítněné buňky třepaly jednu hodinu. Takto upravené buňky se důkladně promyly vodou a použily ke kvasným zkouškám.

2. Použité analytické metody

Při kontrole vlivu kasného procesu na pevnost vazby a aktivity biokatalyzátoru v laboratorním měřítku se použily jednoduché metody, a to pyknometrické stanovení zdánlivého extraktu, konečného stupně prokvašení [28], a počtu uvolněných buněk v mladém pivě.

K zajištění stejného výchozího složení mladiny byla zkvašována sterilní mladina. Kvašení probíhalo při 20 °C. Po ověření nejvhodnějšího způsobu imobilizace se sledoval vliv průběhu kvasného procesu na senzorické vlastnosti piva ve čtvrtprovozním měřítku. Při těchto pokusech bylo analytické hodnocení rozšířeno o tyto metody:

2.1 Chemický rozbor piva [29]

2.2 Isosloučeniny se stanovily podle *Klopper* [29]. Výsledky jsou uvedeny v mezinárodních jednotkách hořkosti

2.3 Stanovení volného aminodusíku metodou TNBS [30]

2.4 Stanovení anthokyanogenů metodou *Harrise* a *Rickette*, upravenou *Moškem* [31]

2.5 Stanovení celkových polyfenolů podle *Jerumanise* [32]

2.6 Stanovení vyšších alkoholů, esterů a mastných kyselin plynovou chromatografií [33]

2.7 Stanovení karbonylových látek plynovou chromatografií po izolaci jako 2,4-dinitrofenylhydrazony [33].

3. Přehled výsledků a diskuse

Ze všech zkoušených nosičů pro imobilizaci kvasinek se nejlépe osvědčil alginát sodný a je zatím jediným nosičem, který by se mohl uplatnit v provozních podmínkách. U ostatních biokatalyzátorů byla velmi nízká aktivita, takže např. ani za tři dny nezačalo normální kvašení, nebo pevnost peletek byla nedostatečná (např. u vazby na agar), popř. nastávalo uvolňování buněk z nosiče a normální pomnožení buněk, jež přešly do substrátu, takže přírůstek biomasy byl prakticky stejný jako u srovnávacího kvašení.

Kvasná aktivita vázaných kvasinek v alginátových peletkách se ověřila kvasnými zkouškami, při kterých se vždy za 48 h zjistil stupeň prokvašení a množství volných kvasinek v prokvašeném substrátu. Peletky se propraly ve vodě a ihned se s nimi opět zakvasila mladina. Současně byly ke kontrolnímu kvašení vždy použity sebrané kvasnice. Kvasné cykly v uvedeném uspořádání se opakovaly čtyřikrát. Obdobné kvasné zkoušky se konaly při nízké teplotě (7 °C). Výsledky jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Z výsledků uvedených v *tab. 1* vyplývá, že teplota 20 °C při kvašení příznivě působí na fyziologický stav kvasinek, a to prakticky stejně u obou typů kvašení (vázané a volné buňky). U kontrolního kvašení se pohyboval stupeň prokvašení v rozsahu 80 až 85,5 %, zatímco u pokusného kvašení mezi 78 až 86 %. Pomnožení kvasinek u vázaných buněk bylo nepatrné, a proto se použilo ke zjištění jejich koncentrace místo vázkové metody (určení sušiny) počítání buněk. Částečný přírůstek vázaných kvasinek je způsoben pravděpodobně oddělením dceřiných buněk od mateřských, které jsou zachyceny na povrchu peletek. U normálního kvašení se zvýšila koncentrace kvasinek až šestnásobně. Ztráty isosloučenin byly u jednotlivých kvasných cyklů vyrovnané.

U pokusů vedených při nízké teplotě (7 °C) se prodloužila doba kvašení o 3 až 5 dní. Při prvním zakvašení vázanými kvasinkami prokvasila mladina pouze na 49 %, v dalších kvasných cyklech dosahovalo prokvašení hodnot konečného prokvašení. U kontrolního kvašení se stupeň prokvašení opakovaným nasazováním sebraných kvasnic snižoval a u posledního cyklu byl pouze 51 %. Pomnožení kvasinek u srovnávacího kvašení bylo průměrně trojnásobné. U vázaných kvasinek se nezjistil v prvních třech cyklech žádný přírůstek buněk, v posledním cyklu se pohybovala koncentrace volných kvasinek okolo 4 mil/ml.

Čerstvě připravené alginátové peletky v průběhu kvašení částečně nabobtnaly, a proto se v další části pokusů ošetřil povrch peletek proti bobtnání (*tab. 2*). Pro dlouhodobé využití vázaných buněk se porovnal vliv opakovaného zakvašování a účinek ošetření povrchu peletek na kvasnou aktivitu. Z provozního hlediska má omezení bobtnavosti velký význam, protože trvalé udržení malých rozměrů peletek umožňuje dostatečné využití plnicího objemu kvasné nádoby.

Dlouhodobé opakované použití obou typů vázaných kvasinek umožnilo posoudit trvanlivost připravených peletek. Zakvašovala se opět sterilní mladina. Výsledky jsou uvedeny v *tabulce 3*.

Při počítání buněk byl současně posouzen mikroskopicky i vzhled peletek, jejich povrch a pevnost. Nejnižší koncentrace volných buněk v mladém pivě byla na začátku kvasných pokusů (neošetřené peletky), během celé doby zkoušek se zvýšila asi o dvojnásobek, v průměru se pohybovala okolo 12 mil/ml. Stupeň prokvašení byl prakticky u všech kvasných cyklů stejný a odpovídal hodnotě konečného prokvašení. Po 23. cyklu se některé peletky rozpůlily a v mladém pivě se začaly objevovat nepatrné amorfní částečky alginátového gelu. Kvasné zkoušky se ukončily po 28. kvasném cyklu.

Peletky s ošetřeným povrchem byly rozměrově asi o polovinu menší než peletky neošetřené. Kromě 1. kvasného cyklu byl stupeň prokvašení u obou typů vázaných buněk stejný. Pomnožení volných buněk bylo u ošetřených peletek vyšší, avšak od 20. cyklu mělo postupně klesající tendenci, takže před ukončením zkoušek (32 cyklů) bylo mladé pivo téměř čiré. Pevnost ošetřených peletek byla lepší, nebylo pozorováno ani pūlení ani uvolňování částeček gelu do piva.

Na závěr první etapy laboratorních zkoušek připravilo se větší množství alginátových peletek, aby se mohlo posoudit složení piva, připraveného ve čtvrtprovozním měřítku. Zatím není ještě vypracován optimální technologický postup pro kvašení vázanými kvasinkami, a proto jsme zvolili pro tuto zkoušku zkrácený kvasný postup. Použili jsme peletky neošetřené a ošetřené. Celková výrobní doba byla 13 dní. Hlavní kvašení u neošetřených peletek trvalo 144 h (7 °C) a dokvašování 7 dní při 2 °C. U peletek s ošetřeným povrchem se ověřil vliv vysoké teploty při hlavním kvašení. Mladina se zakvasila při 20 °C a po 55 hodinách bylo mladé pivo zesudováno a dokvašováno 11 dní. Obě pokusná piva byla stočena současně. K této čtvrtprovozní zkoušce se použila provozní 10% mladina. Jako srovnávací pivo k analýzám se použilo běžně vyráběné výčepní 10% pivo. Výsledky rozborů piv jsou uvedeny v *tabulkách 4, 5, 6*.

Nejhlouběji prokvasilo pokusné pivo, vyrobeno z mladiny, zakvašené neošetřenými peletkami a nejnižší prokvašení bylo u srovnávacího piva. Rozdíl mezi zdánlivým prokvašením srovnávacího piva a pokusných piv byl v průměru 9,7 %. Pokles koncentrace volného aminodusíku byl největší u mladiny kvašené při 20 °C. Také ztráty isosloučenin byly u tohoto piva největší.

Tabulka 4. Chemický rozbor pív

Označení sledovaných ukazatelů	Srovnávací pivo	[mg/l]	
		Ošetřené peletky/hlavní kvašení při 20 °C	Neošetřené peletky/hlavní kvašení při 7 °C
Zdánlivý extrakt %	2,57	1,71	1,48
Skutečný extrakt %	3,92	3,15	3,02
Alkohol %	2,84	3,02	3,21
Původní koncentrace mladiny %	9,50	9,09	9,25
Zdánlivé prokvašení %	72,9	8,12	84,0
Skutečné prokvašení %	58,7	65,3	67,4
Konečné zdánlivé prokvašení %	83,4	82,5	83,9
Barva podle Branda	0,55—0,60	0,30—0,35	0,40—0,45
pH	4,20	4,60	4,25
Celkový dusík mg/1000 ml	51,4	35,4	38,9
Volný aminodusík mg/1000 ml	99,5	45,5	74,5
Anthokyanogeny mg/1000 ml	32,6	18,0	25,0
Polyfenoly mg/1000 ml	147,6	113,6	129,6
Isosloučeniny mg/1000 ml	19,4	13,6	15,7
MJH	21,8	17,1	18,9

Tabulka 5. Těkavé látky v hotových pivech

Označení těkavých látek	Srovnávací pivo	[mg/l]	
		Ošetřené peletky/hlavní kvašení při 20 °C	Neošetřené peletky/hlavní kvašení při 7 °C
Ethylacetát	4,2	4,7	2,7
Propylacetát	1,2	0,63	0,68
2-Methylpropylacetát	—	0,02	0,02
Propanol	0,51	0,03	0,49
2-Methylpropanol	1,7	4,6	3,0
3-Methylbutylacetát	0,82	1,1	0,51
Butanol	0,10	0,36	0,16
2- a 3-Methylbutanol	35,8	52,3	46,3
Ethylhexanoát	0,14	0,07	0,34
Ethyllaktát	—	0,02	—
Hexylacetát	—	0,02	0,02
Ethyl oktanoát	0,12	0,03	0,10
Kyselina octová	0,05	0,05	0,14
Oktylacetát	0,06	0,02	0,03
Kyselina propionová	—	0,02	0,02
Kyselina isomáselná	0,14	0,11	0,12
Ethyldekanoát	0,18	0,07	0,13
Kyselina isovalerová	1,1	0,88	1,3
Kyselina valerová	—	0,08	0,05
Ethylfenylacetát	—	0,06	0,02
Fenylethylacetát	—	—	0,02
Kyselina kapronová	3,4	3,2	2,8
Ethyl dodekanoát	0,02	0,11	0,08
2-Fenylethanol	6,0	13,1	7,9
3-Methylbutyldekanoát	0,02	0,04	0,03
Kyselina kaprylová	7,1	4,2	5,3
Ethyltetradekanoát	0,08	0,06	0,07
Kyselina kaprinová	0,85	0,10	0,36
Kyselina fenylloctová	0,33	0,14	0,27

Tabulka 6. Karbonylové látky v hotových pivech

Označení karbonylových látek	Srovnávací pivo	[mg/l]	
		Ošetřené peletky/hlavní kvašení při 20 °C	Neošetřené peletky/hlavní kvašení při 7 °C
Ethanal	9,9	7,9	9,5
Aceton	0,69	0,22	0,30
Propanal	0,03	0,02	0,05
2-Methylpropanal	0,24	0,11	0,18
Diacetyl	0,32	0,46	0,30
Butanal	0,18	0,61	0,81
2-Methylbutanal	0,80	0,17	0,11
2,3-Pentandion	0,16	0,11	0,19
Pentanal	0,08	0,04	0,05
Hexanal	0,07	0,06	0,12
Heptanal	0,02	0,02	—
Acetoin	2,9	2,0	5,2
Furfural	0,15	0,14	0,23
Oktanal	0,09	0,08	0,16
Dekanal	0,09	0,07	0,15

Zvýšená teplota (20 °C) při kvašení se projevila vyšší koncentrací 2-methylpropanolu, 2- a 3-methylbutanolu a 2-fenylethanolu. Také při nízké teplotě byl obsah jmenovaných sloučenin částečně zvýšený při porovnání se srovnávacím pivem. Ostatní sloučeniny (estery a mastné kyseliny) se pohybovaly u všech pív prakticky na stejné úrovni. Podstatně výraznější rozdíly byly zjištěny u karbonylových látek. Provozní srovnávací pivo obsahovalo poměrně vysoké množství 2-methylpropanolu a 3-methylbutanolu, jež obvykle signalizují nežádoucí oxidační změny při výrobě. Zvýšená koncentrace diacetylů u všech vzorků může být vyvolána skladbou použitých surogátů. U pokusných pív bylo naopak více butanolu, který způsobuje nasládlou až nakyslou vůni.

Literatura

- [1] VOJTIŠEK, V., ZEMAN, R., BARTA, M., ČULÍK, K., DROBNÍK, J., ŠVEC, F.: *Biolog. listy* **44**, 1979, s. 192
- [2] LINKO, Y. Y., KANTOLA, H., LINKO, P.: *Vith International Fermentation Symposium and Vth International Symposium on Yeasts*. London, Ontario, Canada 1980, Abstracts F-12, 124
- [3] LEUSCHNER, V.: *BRD - Patentový spis č. 1*. 227.855, 1966
- [4] KOLARIK, M. J., CHEN, B. J., EMERY, A. H. Jr., LIN, H. C., OLSON, A. C., COONEY, C. L.: *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, Plenum Press, New York, and London, 1974
- [5] DINELLI, D.: *Proc. Biochem.* **7**, 1972, s. 9
- [6] LINKO, Y. Y., POHJOLA, L., VISKARI, R., LINKO, M.: *FEBS Lett* **62**, 1976, s. 77
- [7] HACKEL, U., KLEIN, J., MEGNET, R., WAGNER, F.: *Europ. J. Appl. Microbiol.* **1**, 1975, s. 291
- [8] VORLOP, K. D., KLEIN, J., WAGNER, F.: *Vith International Fermentation Symposium and Vth International Symposium on Yeasts* London, Ontario, Canada 1980, Abstracts, F-12, 119
- [9] KIERSTAN, M., BUCKE, C.: *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1977, s. 387
- [10] KLEIN, J., HACKEL, U., SCHARA, P., ENG, H.: *Angew. Makromol. Chem.* **76/77**, 1977, č. 1141, s. 329
- [11] DEO, Y. M., COSTERTON, J. W., GAUCHER, G. M.: *Vith Ferm. Symp. and Vth Int. Symp. on Yeasts*, London, Ontario, Canada 1980 Abstracts, F-12, 128
- [12] MORI, A., SUZUE, H., OSUGA, J., WADA, M.: *Vith Ferm. Symp. and Vth Int. Symp. on Yeasts*, London, Ontario, Canada 1980 Abstracts, F-12, 129
- [13] WHITE, F. H., PORTNO, A. D.: *J. Inst. Brew.*, **84**, 1978, s. 228
- [14] JACK, T. R., ZAJIC, J. E.: *Adv. Biochem. Eng.* **5**, 1977, s. 125
- [15] YAMAMOTO, K., SATO, T., TOSA, T., CHIBATA, I.: *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1974, s. 1589, 1601
- [16] CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T.: *Applied Microbiol.* **27**, 1974, s. 878
- [17] TOSA, R., SATO, R., MORI, T., CHIBATA, I.: *Applied Microbiol.* **27**, 1974, s. 886

- [18] SATO, T., MORI, T., TOSA, T., CHIBATA, I., FURMI, M., YAMACHITA, K., SUMI, A.: *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 1975, s. 1797
- [19] SŁOWENSKI, W., CHARM, S. E.: *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 1973, s. 973
- [20] SCHIMIZU, S., MINOKA, H., TANI, Y., OGITA, K.: *J. Ferment. Technol.* **53**, 1975, s. 77
- [21] MARGARITIS, A., ROWE, G. E.: *Vith Int. Ferm. Symp. and Vth Int. Symp. on Yeasts*. London, Ontario, Canada 1980 Abstracts, F-12, 121
- [22] ČULÍK, K., VOJTIŠEK, V., ZEMAN, R., BĀRTA, M., PELZBAUER, J.: *Čs. přihláška vynálezu PV 3679-77*, 1977
- [23] GULAVA, V. E., TURKOVÁ, J., JIRKU, V., FRYDRYCHOVÁ, A., ČOUPEK, J., ANACHENKO, S. N.: *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 1979, s. 43
- [24] KENNEDY, J. F., BARKER, S. A., HUMPHREYS, J. D.: *Nature (London)* **261**, 1976, s. 242
- [25] VIETH, W. R., WANG, S. S., SAINI, R.: *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 1973, s. 563
- [26] VENKATASUBRAMANIAN, K., SAINI, R., VIETH, W. R.: *J. Ferm. Technol.* **52**, 1974, s. 268
- [27] VOJTIŠEK, V., ZEMAN, R., BĀRTA, R., ČULÍK, K., CHALOUPKA, J., KÁLAL, K., DROBNÍK, J., ŠVEC, F.: *Čs. přihláška vynálezu PV 5321-77*, 1977
- [28] Kirin's Test of Fermentability, Kirin Brewery Co., 1975
- [29] Kolektiv autorů: *Pivovarsko-sladařská analytika*, SNTL-Praha, 1966
- [30] BASAŘOVÁ, G., ČERNÁ, I.: *Kvasný průmysl* **18**, 1972, s. 101
- [31] MOŠTEK, J.: *Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie. I. Sladařství a pivovarnictví (Učební texty vysokých škol)* SNTL Praha, 1966
- [32] JERUMANIS, J.: *Brauwiss.* **25**, 1972, s. 313
- [33] KÄHLER, M., VOBORSKÝ, J.: *Vliv kvasného procesu na tvorbu chuťových látek. Závěreč. zpráva VÚPS OÚ 11/2*, 1978

Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Imobilizované pivovarské kvasinky. *Kvas. prům.*, **27**, 1981, č. 9, s. 193 až 198.

V první části tohoto výzkumného úkolu byly porovnány různé způsoby imobilizace kvasinek a vlastnosti získaných biokatalyzátorů. Nejlépe se osvědčil jako nosič alginát vápenatý, a to nejen z hlediska přípravy a pevnosti vazby, nýbrž i z hlediska udržení dlouhodobé vysoké kvasné aktivity. Postupně se určily základní parametry pro vazbu kvasinek a současně se vyzkoušel způsob potlačení bobtnavosti alginátových peletek. Některé prvky přípravy vázaných buněk jsou předmětem patentové přihlášky.

V další části řešení tohoto výzkumného úkolu je zaměřena pozornost na vliv kontaminace provozních mladin na průběh kvašení při aplikaci vázaných buněk a na vypracování nejvhodnějšího technologického postupu pro pokusy ve větším měřítku.

Поледникова, М. - Шедова, Е. - Калер, М.: Имобилизованные пивные дрожжи. *Квас. прум.*, **27**, 1981, № 9, стр. 193—198.

В первой части этого научно-исследовательского задания сопоставлялись разные способы иммобилизации дрожжей и свойства полученных биокатализаторов. Лучшее всех оправдал себя в качестве носителя альгинат кальция, и то не только с точки зрения его получения и

прочности связи, а также и с точки зрения сохранения долговременной высокой бродильной активности. Постепенно определились основные параметры для связи дрожжей и одновременно испытывался метод подавления набухаемости альгинатных пеллет. Некоторые приемы получения связанных клеток являются предметом патентного сообщения.

В следующей части решения этой научно-исследовательской задачи внимание направлено на влияние контаминации производственного суслу на течение брожения при применении связанных клеток и на разработку самого выгодного технологического способа для экспериментов в большем масштабе.

Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Immobilized brewing yeast. *Kvas. prům.* **27**, 1981, č. 9, s. 193—198.

In the first part of this research problem different manners of yeast immobilization and properties of the obtained biocatalysts were compared. As the best carrier the calcium alginate was found not only from the standpoint of preparation and bond strength but also from the point of view of maintenance of high fermentation activity. Principal parameters of yeast linkage were determined stepwise and at the same time the manner was tested how to suppress swelling capacity of alginate pellets suppression. Some steps of cell immobilization are the object of the patent registration.

The second part of this research problem concerns the influence of the large-scale wort contamination on fermentation, which in the immobilized cells are applied and the specification of the optimal technology of the fermentation process.

Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Immobilisierte Bierhefen. *Kvas. prům.* **27**, 1981, No. 9, S. 193—198.

In dem ersten Teil dieser Forschungsaufgabe wurden verschiedene Methoden der Immobilisierung der Hefen sowie auch die Eigenschaften der gewonnenen Biokatalysatoren verglichen. Als Träger bewährte sich am besten das Kalziumalginat, und zwar nicht nur mit Hinsicht zu der Aufbereitung und zu der Festigkeit der Bindung, sondern auch vom Standpunkt der Erhaltung einer langfristigen hohen Gärungsaktivität. Es wurden stufenweise die Grundparameter für die Hefenbindung bestimmt und zugleich Verfahren zur Hemmung des Quellungsvermögens der Alginatpellets erprobt. Einige Elemente der Zubereitung der gebundenen Zellen wurden zum Patent angemeldet.

In der weiteren Etappe der Forschungsarbeit wird die Aufmerksamkeit auf den Einfluß der Kontamination der Betriebswürzen auf den Gärungsverlauf bei der Applikation der gebundenen Zellen und auf die Ausarbeitung des geeignetsten technologischen Verfahrens für Versuche in einem größeren Ausmaß gerichtet.