

Ing. MIROSLAV KAHLE, CSC., Ing. BLANKA PARDONOVÁ, Ing. MICHAELA POLEDNÍKOVÁ, Ing. HELENA ŠEDOVIČOVÁ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

Klíčová slova: pivo, kvašení, dokvašování, aminokyseliny, diacetyl, estery, nižší mastné kyseliny, vázané kvasinky, vyšší mastné kyseliny, kvalita, senzorka

Současná snaha o zvýšení ekonomické efektivity výroby a snížení energie vyžaduje nejen modernizaci výrobního zařízení a plně automatizovaný provoz, nýbrž také aplikaci nových výrobních postupů. Na úseku kvasného procesu, který je nejdelší fází výroby piva, se podařilo zkrátit výrobní dobu o 55 % úpravou technologie při současném využití cylindrokónických tanků. Další zkrácení doby bez zřetelného zhoršení kvality piva změnou technologie není již v podstatě možné. Z tohoto důvodu byla proto obrácena pozornost na vázané kvasinky. Základní imobilizační metody celých buněk vycházejí z metod používaných při imobilizaci enzymů. Podstata jednotlivých metod a jejich aplikace je popsána v odborné literatuře [1, 2, 3, 4].

První zprávu o pokusném využití vázaných kvasinek pro výrobu piva uveřejnili v roce 1978 White a Portno [5]. V laboratorním měřítku ověřili možnost zkvašování mladiny kontinuálním způsobem kvasinkami vázanými v alginátu vápenatém. Průběh kvasné zkoušky, která trvala sedm měsíců, ukázal, že s postupem doby trvání kvasného procesu se zvyšoval obsah diacetylu a acetaldehydu, zatímco koncentrace ethylacetátu klesala. Ostatní sledované složky vedlejších metabolitů (vyšší alkoholy a estery) zůstaly na stejné kvantitativní úrovni. Další publikace uveřejněná v roce 1981 byla zaměřena na výrobu piva pro diabetiky [6]. Biokatalyzátor (kvasinky vázané v alginátu vápenatém) obsahoval koimobilizovanou amyloglukosidasu. Podle autorů je určitý vztah mezi obsahem diacetylu a ethyllaktátu. V roce 1983 použili stejní autoři k výrobě piva vázaných kvasinek s koimobilizovanou acetoindehydrogenasou, pro urychlení redukce diacetylu [7].

Na kongresu EBC v Helsinkách v roce 1985 byla problematika imobilizovaných systémů věnována značná pozornost. Linko uvedl obecné možnosti využití vázaných enzymů a celých buněk a upozornil na problémy výroby piva imobilizovanými kvasinkami [8], zejména na zvýšenou tvorbu vicinálních diketonů. Nakanishi *et al.* popsal nový systém rychlé výroby piva pomocí reaktoru s imobilizovanými kvasinkami [9]. Masschelein *et al.* poukázal na spojitost mezi kyslíkovou deficiencí a růstem a

velikostí vázaných buněk. Zabýval se příčinami změn metabolismu v souvislosti se zvýšeným obsahem diacetylu a nižšími hodnotami esterů a vyšších alkoholů při kvašení imobilizovanými kvasinkami. Podle jejich výsledků mají piva z diskontinuálního způsobu výroby příznivější složení [10].

Naše práce byla zaměřena na získání podkladů k vypracování návrhu poloproduční linky pro diskontinuální a kontinuální kvašení mladiny vázanými kvasinkami. Technologie pro oba způsoby byla vypracována na základě výsledků laboratorních pokusů, během nichž se sledoval vliv koncentrace kyslíku rozpuštěného v mladině a teploty na tvorbu vedlejších metabolitů. Z experimentálních výsledků byl stanoven stupeň zaplnění reaktoru biokatalyzátorem.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Navrhovaná technologie pro poloproduční linku byla nejdříve ověřena ve čtvrtprovozním měřítku. Čtvrtprovozní zkoušky probíhaly devět týdnů, jeden kvasný cyklus trval sedm dní. Kvašení i zrání piva se uskutečnilo v jedné nádobě. K tomu účelu byly použity devatenáctilitrové ležácké tanky. Zkvašovala se filtrovaná pasterovaná 10 % mladina. Základní teplota se pohybovala mezi 5,0 až 6,5 °C, maximální teplota nepřekročila 11 °C. Horká pasterovaná mladina (30 minut při 84 °C) se přelila do ležáckého soudku, zchladila se na 5 až 6 °C a zkvasila se vázanými kvasinkami uloženými v úzkých pytlích ze síťoviny. 1,8 l biokatalyzátoru odpovídalo 10 % zaplnění. Na počátku zkoušek 100 ml biokatalyzátoru obsahovalo 1,5 g sušiny kvasinek, po posledním kvasném cyklu obsahovalo totéž množství biokatalyzátoru 9,5 g sušiny kvasinek. Soudek se umístil do chladicího boxu, ve kterém se udržovala teplota v rozmezí 8 až 10 °C. Při dosažení zdánlivého prokvašení 60 až 62 % (obvykle po dvou dnech) se soudek zahradil. Zahrazené mladé pivo se nechalo jeden den při teplotě 8 až 10 °C a další čtyři dny se nechalo při 0 až 1 °C. Sedmý den se pivo zfiltrovalo a stočilo do lahví. Imobilizované kvasinky se po promytí vodou hned

použily k dalšímu zakvašení mladiny. Kromě běžných rozborů se sledoval obsah mastných kyselin a aminokyselin v kvasinkách a koncentrace vicinálních diketonů a těkavých látek v pivech. U každého kvasného cyklu se hodnotil také biologický stav mladiny a piva. Srovnávací piva k degustačním zkouškám se odebrala přímo z provozu.

Příprava biokatalyzátoru

K tříprocentnímu roztoku alginátu sodného (Protanal LF 10/60) se přidalo 5 % odstředěných kvasinek (sušina 20,1 %) a po dokonalém rozmíchání se tato homogenní suspenze vstříkovala do 2 % roztoku CaCl_2 . Vytvrzené peletky (24 hodin při 4 až 6 °C) se promyly vodou a přelily se pasterovanou mladinou. Teprve po tomto rozkvašení byl biokatalyzátor použit při sledovaných kvasných cyklech.

ANALYTICKÉ METODY

Chemický rozbor mladiny a piva [11]

Redukující látky podle Schoorla [12]

Volný aminodusík se stanovil pomocí kyseliny 2,4,6-trinitrobenzensulfonové. Kalibrační křivka se sestavila podle hodnot získaných měření roztoků alaninu o známé koncentraci [13].

Volné aminokyseliny v mladině nebo v pivě se izolovaly na katexu Dowex 50 W X8 a po esterifikaci a acylaci se stanovily plynovou chromatografií [14]. Z kvasinek se aminokyseliny extrahovaly po zmrazení horkou vodou [15] a další postup byl stejný jako při jejich stanovení v mladině. V případě vázaných kvasinek se nejdříve rozpustilo 10 až 20 ml peletek ve 3 % roztoku citronanu draselného a po důkladném promytí, odstředění a zmrazení uvolněných kvasinek následovala extrakce horkou vodou.

Těkavé látky se extrahovaly z destilátu piva směsí pentan-methylenchlorid (2:1). Po zahuštění extraktu se plynovou chromatografií určila koncentrace vyšších alkoholů, esterů a mastných kyselin [16].

Vyšší mastné kyseliny v kvasinkách se po zmýdelnění vyextrahovaly z okyseleného vzorku ethyletherem. Mastné kyseliny se potom převedly na methylestery a jejich koncentrace se stanovila plynovou chromatografií [15]. U vázaných kvasinek se opět nejdříve uvolnily buňky rozpuštěním peletek v 3 % roztoku citronanu draselného a po promytí se kvasinky zpracovaly stejným způsobem jako volné kvasinky.

Vicinální diketony se stanovily spektrofotometrickou metodou podle Gjertsen, upravenou Esserem a Kremkowem [17]

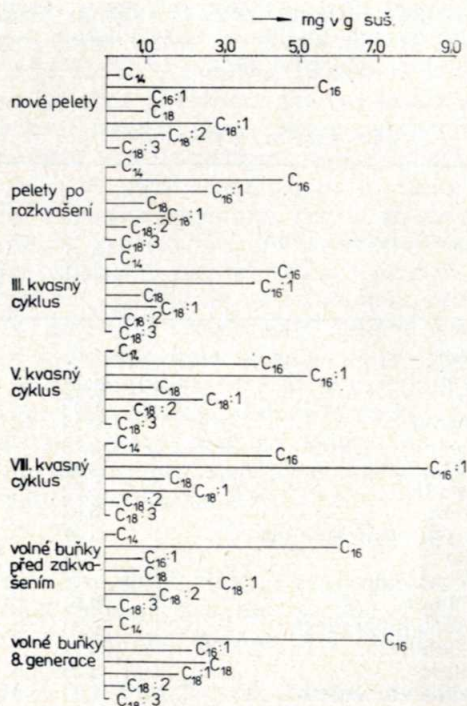
Sušina kvasinek se stanovila vázkově po filtraci křemelinou [18].

K degustačním zkouškám se použila trojúhelníková metoda [19].

Mikrobiologickými rozborů se sledoval počet koliformních bakterií a mléčných bakterií [20].

VÝSLEDKY A DISKUSE

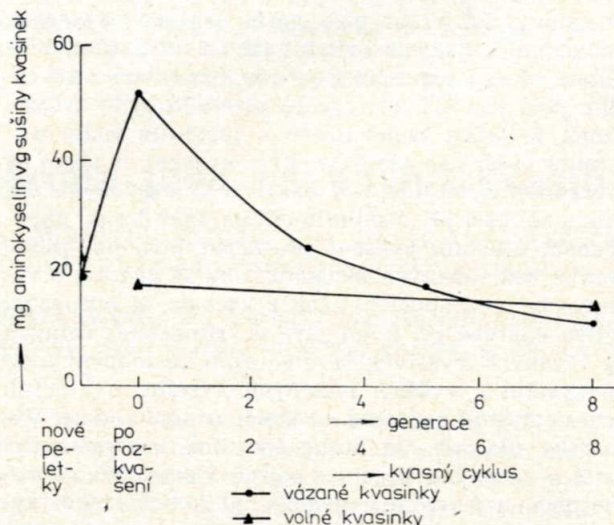
Týdenní interval výroby piva v malých ležáckých nádobách byl u všech kvasných cyklů rozdělen na tří denní kvašení a na čtyřdenní zrání piva. Určitým nedostatkem, který se nemohl z technických důvodů eliminovat, bylo zrání piva v přebytku vázaných kvasinek. Při zrání piva může exkrece některých sloučenin z kvasnic ovlivnit jeho chuť a vůni. Většinou působí exkreční pochody negativně na kvalitu piva [21, 22]. Při výrobě piva vázanými kvasinkami je jejich koncentrace v substrátu vždy podstatně vyšší než při klasickém kvašení, a proto se výrazněji uplatňuje vliv exkrece. Z uvedeného důvodu se musí při diskontinuálním způsobu po ukončení hlavním kvašení přečerpat pivo do jiného tanku bez vázaných kvasinek, aby se zabránilo vylučování nežádoucích látek z kvasnic. K posouzení vlivu exkrece při zrání piva v přítomnosti volných a vázaných kvasinek se sledovalo zastoupení aminokyselin a vyšších mastných kyselin, u kterých lze nejčastěji zaznamenat koncentrační změny. Výsledky ukázaly, že obsah kyseliny hexadecanové měl u vázaných kvasinek mírně klesající tendenci, zatímco u volných kvasinek byl koncentrační vývoj obrácený. Vázané i volné kvasinky hromadily kyselinu 9-hexadecenovou a společně s kyselinou hexadecanovou tvořily 52 až 75 % z celkového obsahu vyšších mastných kyselin. Koncentrace kyseliny 9-hexadecenové se zvyšovala u vázaných kvasinek se stoupajícím počtem kvasných cyklů podstatně rychleji než u volných buněk (obr. 1).



Obr. 1. Vyšší mastné kyseliny v kvasinkách

- C_{14} — kyselina tetradekanová
- C_{16} — kyselina hexadecanová
- $\text{C}_{16}:1$ — kyselina 9-hexadecenová
- C_{18} — kyselina oktadekanová
- $\text{C}_{18}:1$ — kyselina cis-9-oktadecenová
- $\text{C}_{18}:2$ — kyselina cis-9,12-oktadekadienová
- $\text{C}_{18}:3$ — kyselina 9,12,15-oktadekatrienová

Koncentrační změny aminokyselin uvnitř buněk odpovídaly v podstatě jejich bezprostřední absorpci ze substrátu. Vázané kvasinky obsahovaly po prvním rozkvašení nejvíce aminokyselin (obr. 2). V průběhu dalších kvasných cyklů se postupně celkové množství aminokyselin v kvasinkách snižovalo.



Obr. 2. Aminokyseliny v kvasinkách

Rozdíl mezi celkovým obsahem aminokyselin po rozkvašení a po ukončení čtvrtprovozních zkoušek (osm kvasných cyklů) byl 40,3 mg v g suš., což představuje 78 % snížení. Po prvním rozkvašení se zaznamenal přírůstek koncentrace u všech aminokyselin kromě histidinu, fenylalaninu, tryptofanu a cysteinu. Množství těchto aminokyselin se nao-

pak snížilo (tab. 1). Při porovnání výsledků z VIII. cyklu (vázané kvasinky) s výsledky z 8. generace (volné kvasinky) jsou patrné koncentrační změny a jejich průběh zejména u glycinu, threoninu, serinu, fenylalaninu, lysinu, histidinu a tryptofanu. Podle kvantitativních změn jednotlivých aminokyselin se podílejí pravděpodobně ve zvýšené míře na metabolismu vázaných kvasinek glycin, leucin, isoleucin, fenylalanin, kyselina glutamová, lysin a arginin, u volných buněk leucin, isoleucin, kyselina glutamová a histidin.

I při čtvrtprovozních pokusech se potvrdilo, že u vázaných kvasinek není žádný vztah mezi růstem buněk a tvorbou esterů a vyšších alkoholů (obr. 3).

Obsah esterů ve srovnávacích pivech byl průměrně trojnásobně vyšší. Zvýšené množství ethyldekanátu v pokusných pivech je způsobeno exkrecí při ležení piva v prostředí s nadměrným množstvím vázaných kvasinek. Kvantitativní rozdíly vyšších alkoholů byly ovlivněny především koncentrací 2-methylbutanolu a 3-methylbutanolu a 2-fenylethanolu. Jejich tvorba souvisí s biosyntézou valinu, isoleucinu a fenylalaninu.

Vázané kvasinky tvoří během kvašení více vicinálních diketonů než volné kvasinky. Dosavadní pokusy ukázaly, že tvorbu uvedených diketonů při aplikaci vázaných kvasinek lze potlačit nízkou zá-kvasnou teplotou a úpravou objemového poměru biokatalyzátoru k mladině.

Podle Masscheleina [10] se prekurzory diacetylů a 2,3-pentandionu tvoří při biosyntéze isoleucinu a valinu. Tento proces je ovlivňován velice silnou zpětnovazební inhibicí isoleucinu a valinu a současně přednostní absorpcí threoninu. Paralelně s tím se uplatňuje vliv sníženého růstu kvasinek vlivem

Tabulka 1. Aminokyseliny v kvasinkách

Označení aminokyselin	mg v g sušiny						
	Nové peletky	Peletky po rozkvašení	Kvasný cyklus			Volné buňky	
			III.	V.	VIII.	před zakvašením	8. generace
Alanin	1,8	5,8	4,5	3,8	2,1	1,6	2,3
Glycin	1,2	3,8	2,1	1,3	0,45	0,98	0,73
Valin	0,15	0,61	0,52	0,40	0,12	0,10	0,12
Threonin	0,14	0,99	0,60	0,41	0,44	0,16	0,66
Serin	0,76	1,0	0,47	0,30	0,28	0,68	0,15
Leucin	0,77	1,7	0,39	0,25	0,19	0,65	0,22
Isoleucin	0,72	0,73	0,30	0,26	0,08	0,71	0,17
Cystein	0,64	0,45	0,55	0,87	1,1	0,56	1,6
γ -NH ₂ -másečná kyselina	0,07	1,1	0,50	0,21	0,20	0,06	0,11
Prolin	0,21	0,98	0,95	0,69	0,53	0,30	0,55
Hydroxiprolin	—	0,08	0,06	0,09	0,09	—	0,03
Methionin	0,04	0,05	0,08	0,11	0,14	0,07	0,05
Kyselina asparagová	0,35	2,6	0,55	0,49	0,53	0,38	0,55
Fenylalanin	0,37	0,29	0,23	0,20	0,12	0,44	0,60
Ornithin	0,09	stopy	0,07	0,10	0,14	0,14	0,04
Kyselina glutamová	3,9	5,9	4,5	2,4	0,78	3,3	1,2
Tyrosin	0,12	2,7	1,9	1,2	0,56	0,09	0,69
Lysin	3,2	9,4	1,6	0,58	0,08	3,4	2,3
Arginin	3,6	12,0	2,9	2,3	1,4	2,7	0,96
Histidin	0,62	0,13	0,16	0,27	0,98	0,64	0,29
Tryptofan	0,34	0,23	0,41	0,66	0,59	0,37	0,37
Cystin	—	0,86	0,62	0,45	0,19	stopy	0,31
Celkové množství	19,1	51,4	24,0	17,3	11,1	18,1	14,0

Tabulka 2. Chemické a mikrobiologické rozborů, degustační zkouška

Označení pív		II. kvas. cyklus	IV. kvas. cyklus	Srovn. pivo	VI. kvas. cyklus	Srovn. pivo	VIII. kvas. cyklus
Koncentrace mladiny (% hm)		10,18	9,84	10,11	10,20	9,75	10,06
Zdánlivé prokvašení (%)		83,3	79,2	67,1	77,0	77,8	79,5
Dosažitelné prokvašení (%)		85,3	82,8	76,0	80,2	83,2	81,4
Celkový N (mg v 100 ml)		49,3	54,0	68,4	50,8	54,5	52,3
Hořkost (JH)		20,1	19,3	19,0	22,1	21,4	19,5
Diacetyl (mg . l ⁻¹)		0,22	0,20	0,16	0,24	0,09	0,21
Koliformní bakterie v 1 ml	mladina pivo	Ø	Ø	—	Ø	—	Ø
		Ø	Ø	—	Ø	—	95
Mléčné bakterie v 1 ml	mladina pivo	Ø	Ø	—	Ø	—	Ø
		Ø	Ø	—	Ø	—	Ø
Počet degustujících		10	10	—	10	—	10
Průkaznost	(%)	neprůkazné	99	—	neprůkazné	—	99,9
	počet správných odpovědí	6	8	—	6	—	9
Hodnocení jakosti (%) (lepší jakost)	pokusné pivo	33,4	37,5	—	50,0	—	62,5
	srovnáv. pivo	66,6	62,5	—	50,0	—	37,5

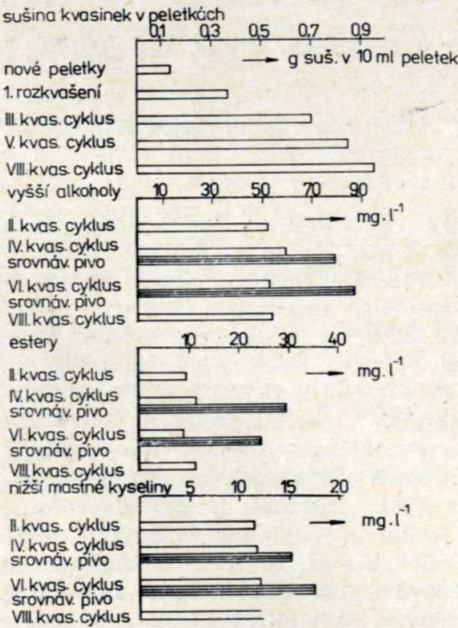
imobilizace na schopnost odstraňování isoleucinu a valinu. To vše vede k intenzivnější syntéze aceto-hydroxybutyrátu. Kromě uvedených závislostí se může zvýšit obsah diacetylů rovněž vlivem koncentrace kyslíku a sekundární kontaminace mladiny. Aby byl vyloučen vliv kontaminace, zkvašovala se pouze pasterovaná mladina.

Degustační zkoušky trojúhelníkovou metodou prokázaly, že kvalita pokusných pív se nelišila od kvality pív vyráběných klasickým způsobem (tab. 2). Méně příznivá vůně pokusných pív (po kvasnicích) byla způsobena ležením piva v přítomnosti nadměrného množství biokatalyzátoru. U posledních tří cyklů se pokusně snížil objem přidaného biokatalyzátoru při zakvašení mladiny. Tímto zásahem se výrazně zlepšil u pokusných pív charakter vůně.

K ověření výsledků laboratorních a čtvrtprovozních pokusů byl vypracován návrh poloprovozní linky pro diskontinuální a kontinuální kvašení vázanými kvasinkami. Předpokládaná kapacita poloprovozní linky při stacionárním kvašení je asi 33 hl piva za týden, při kontinuálním kvašení 75 až 90 hl za týden. Výsledky z poloprovozních pokusů budou rozhodující pro celkové posouzení ekonomické efektivity a kvality vyráběných pív.

Literatura

[1] JIRKŮ, V., BASAŘOVÁ, G.: Kvas. prům., **30**, 1984, s. 59.
[2] VOJTÍŠEK, V. et al.: Biól. listy, **44**, 1979, s. 192.
[3] FUKUI, S., TANAKA, A.: Ann. Rev. Microbiol., **36**, 1982, s. 145.
[4] CHIBATA, I., TOSA, T.: Ann. Biophys. Bioeng., **10**, 1981, s. 197.
[5] WHITE, F. H., PORTNO, A. D.: J. Inst. Brew., **84**, 1978, s. 228.
[6] GODTFREDSEN, S. E. et al.: Proc. EBC, 1981, s. 603.
[7] GODTFREDSEN, S. E. et al.: Proc. EBC, 1983, s. 161.
[8] LINKO, M.: Proc. EBC, 1985, s. 39.
[9] NAKANISHI, K. et al.: Proc. EBC, 1985, s. 331.
[10] MASCHLEIN, C. A. et al.: Proc. EBC, 1985, s. 339.



Obr. 3. Sušina kvasinek v peletkách a těkavé látky v pivech

- [11] VANČURA, M. et al.: Pivovarsko-sladařská analytika, SNTL, Praha, 1966.
- [12] MOŠTEK, J.: Analytické metody ke cvičení z kvasné chemie a technologie. I. Sladařství a pivovarství (učební texty VŠCHT), SNTL, Praha, 1966.
- [13] BASAŘOVÁ, G., ČERNÁ, I.: Kvas. prům., **18**, 1972, s. 101.
- [14] ŠEDOVÁ, H., KAHLER, M.: Kvas. prům., **26**, 1980, s. 193.
- [15] Kvasinky ve výzkumu a praxi. Ed. Vraná, D., Academia, Praha, 1986.
- [16] KAHLER, M. et al.: Kvas. prům., **24**, 1978, s. 73.
- [17] ESSER, K. D., KREMKOW, C.: Mschr. Brau., **23**, 1970, s. 11.
- [18] KAHLER, M., POLEDNÍKOVÁ, M.: Kontinuální propagace kvasinek. (Závěrečná zpráva), VÚPS, Praha, 1985.
- [19] Brautechnische Analysemethoden, Band II., MEBAK, Freising-Weihenstephan, 1979.
- [20] ŠAVEL, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech, SNTL, Praha, 1980.
- [21] VAN DE MEERSCHE, J. et. al.: Proc. EBC, 1979, s. 187.
- [22] MIEDANER, H. et. al.: Brauwelt, **122**, 1982, s. 666.

Kahler, M. - Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H.: Výroba piva vázanými kvasinkami. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 8—9, s. 262—266.

Ve čtvrtprovozním měřítku se ověřila možnost výroby piva vázanými kvasinkami diskontinuálním způsobem. Výsledky ukázaly, že kvalita pokusných piv je na stejné úrovni jako u srovnávacích piv. Nižší obsah esterů a vyšších alkoholů je výrazným znakem zkvašování mladiny vázanými kvasinkami. Koncentrace diacetylů v pokusných pivech nepřestoupila prahovou hodnotu vnímání. K ověření získaných výsledků ve větším měřítku byl vypracován návrh poloprovozní linky, která je instalována v Pražských pivovarech, k. p., závod Holešovice.

Калер, М. - Пардонова, Б. - Поlednikova, М. - Шедова, Г.: Производство пива связанными дрожжами. Квас. прум. **33**, 1987, № 8—9, стр. 262—266.

В масштабе стандового производства была исследована возможность производства пива связанными дрожжами прерывным процессом. Результаты, что качество экспериментальных пив находится на одинаковом уровне, как в случае сопоставляемых пив. Более низкое содержание сложных эфиров и высших спиртов является выразительным признаком сбраживания охмеленного сусла связанными дрожжами. Концентрация диацетила в экспериментальных пивах не превысила пороговую величину восприятия. Для испытания полученных результатов в большем масштабе был разработан проект полупроизводственной линии, которая введена в эксплуатацию в предприятии Пражские пивовары, к. п., завод Голешовице.

Kahler, M. - Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H.: Beer Production Using Immobilized Yeasts. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 8—9, pp. 262—266.

A beer production with immobilized yeasts using batch procedure was tested on a pilot plant scale. The results proved the same beer quality in comparison to the standard beers. The typical sign of wort fermentation with immobilized yeasts was a lower content of esters and higher alcohols. Diacetyl concentration in experimental beers did not cease the threshold value of the receptivity. The verification of the results on a large scale will be performed in the Prague Breweries in Holešovice.

Kahler, M. - Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H.: Biererzeugung durch immobilisierte Hefen. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 8—9, S. 262—266.

Im kleinbetrieblichen Ausmaß wurde die Möglichkeit der Biererzeugung durch immobilisierte Hefen in diskontinuierlichen Verfahren geprüft. Die Ergebnisse zeigten, daß die Qualität der Versuchsbiere auf dem gleichen Niveau wie der Vergleichsbiere war. Als ein markantes Merkmal der Vergärung der Würzen durch immobilisierte Hefen wurde ein niedrigerer Gehalt an Estern und höheren Alkoholen festgestellt. Die Diacetyl-Konzentration in den Versuchsbiere hat den Schwellenwert der Perception nicht überschritten. Zur Überprüfung der erzielten Ergebnisse in grösserem Ausmaß wurde ein Vorschlag einer halbbetrieblichen Anlage ausgearbeitet, die in den Prager Brauereien, Betrieb Holešovice, installiert wurde.