

# Z výzkumu a praxe

## STRESOVÉ FAKTORY KVASNIC

Doc. Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Budějovický Budvar, n. p., Č. Budějovice

**Klíčová slova:** kvasnice, stresové faktory, umělá inteligence, kvašení

### 1. ÚVOD

Pod pojmem stresové faktory kvasnic se obvykle rozumí nepříznivé podmínky a faktory, negativně ovlivňující činnost várečných kvasnic. Studium stresových faktorů je důležité pro úspěšné vedení hlavního kvašení a dokvašování. Průběh hlavního kvašení ovlivňují složení mladiny, stav kvasnic i nastavitelné parametry procesu kvašení (tab. 1).

V praxi se průběh kvašení řídí obecnými postupy, získanými na základě předchozích zkušeností. I při částečné znalosti stresových faktorů lze však předpověď kvašení zdokonalit použitím prostředků umělé inteligence.

Zatímco v obecné mikrobiologii se uvažují životní pochody kvasinek za optimálních podmínek, omezují podmínky technologických procesů do určité míry činnosti kvasinek, a jsou proto v určitém slova smyslu stresující. Obr. 1 znázorňuje rozdílné optimální teploty růstu svrchních a spodních pivovarských kvasinek v mladíně, přičemž provozní kvašení probíhají v obou případech při nižších teplotách.

Používání rozdílných teplot hlavního kvašení má své historické příčiny. Při výrobě svrchně kvašených pív umožnila technika kyselého praní kvasnic zvýšení jejich mikrobiologické čistoty, a tím i teplejší vedení s přijatelnou biologickou stabilitou.

Nízké teploty spodního kvašení byly výhodné ze dvou důvodů. Studené vedení omezovalo rozvoj kontaminace a umožnilo vyrábět piva s vysokým obsahem oxidu uhličitého, což obojí přispělo k zvýšení chu-

Tab. 1 Faktory, ovlivňující průběh kvašení a dokvašování

Vlivy působící na hlavní kvašení		
Zakvašovaná a kvasící mladina	Várečné kvasnice	Provozní parametry kvašení
obsah extraktu a kalů zdroj uhlíku a dusíku růstové faktory rozpuštěný kyslík lipidy a steroly kationty kovů, dusičnany oxid uhličitý	genetický základ obsah lipidů a sterolů rezervní látky kaly rozpuštěný kyslík aktivita kvasnic oxid uhličitý a ethanol	teplotní a extraktový režim sběr kvasnic ošetření a účhova kvasnic zakvašování mladiny provzdušňování sanitace filtrace mladiny

ťové stability piva. Současně se rozvoj kontaminace potlačoval vysokou dávkou chmele.

Z těchto skutečností se odvíjela technologie, a tím i současné pojetí stresových podmínek. Za stresové faktory kvasnic lze pokládat vše, co negativně ovlivňuje činnost kvasnic tak, že se nedosáhne požadovaného průběhu hlavního kvašení a dokvašování, popř. požadované kvality vyráběného piva [1].

### 2. STRESOVÉ FAKTORY

Pro některé faktory, negativně ovlivňující kvašení, se ujal označení „stresové faktory“, zatímco ostatní se obecně zahrnovaly pod příčiny závad kvasného procesu. Je proto účelné zabývat se všemi vlivy, omezujícími kvašení a dokvašování a vyznačit vlivy, pro které se toto označení používá (tab. 2).

Vysoká koncentrace mladiny se výrazně

uplatňuje v technologii HGB (High Gravity Brewing) a VHGB (Very High Gravity Brewing). Za těchto podmínek způsobují vysoké koncentrace mladiny osmotický stres kvasnic. Vhodným řešením je zvýšení obsahu kovů v zakvašené mladíně, popř. její obohacení o růstové faktory [2].

Důsledkem zkvašování vysokých koncentrací mladiny je vysoký obsah ethanolu. Jeho působení na kvasinky se označuje jako ethanolový stres. Jeho negativní projevy se mohou potlačit podobně jako u osmotického stresu [3].

Při zkvašování mladiny ve vysokých vrstvách působí inhibičně i oxid uhličitý, jehož koncentrace roste se stoupajícím tlakem. Hydrostatický tlak se proto rovněž často považuje za stresový faktor.

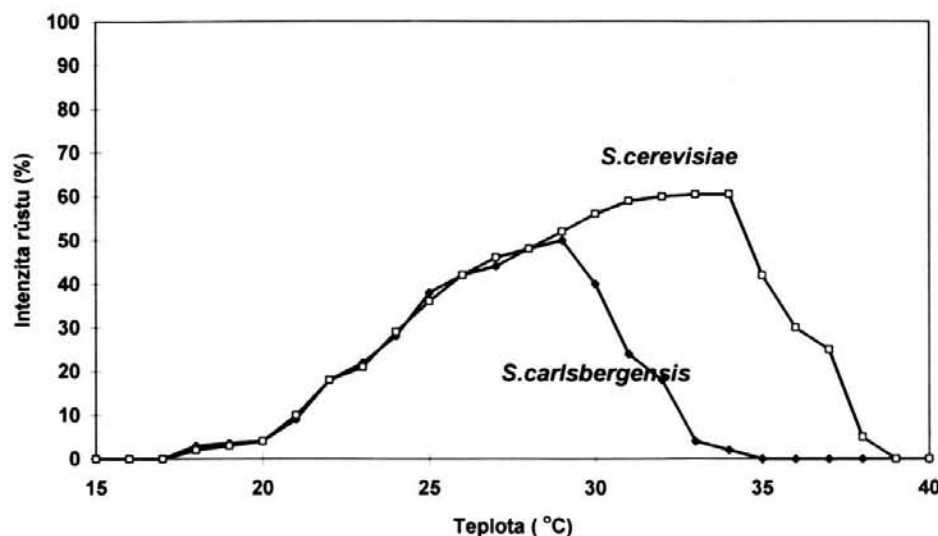
Oxidační stres se spojuje s působením aktivních forem kyslíku, které se mohou v buňce akumulovat a působit na ně negativním způsobem. Oxidační stres mohou indukovat různé sloučeniny, mimo jiné i vznikající ethanol [4].

### 3. VLIV SLOŽENÍ MLADINY

Kromě faktorů uvedených v kap. 2 ovlivňují kvašení v mladíně přítomné uhlikaté a dusíkaté zdroje, růstové faktory, lipidické frakce a steroly. Známé je negativní působení mladinových kalů.

Tab. 2 Druhy stresu kvasnic

osmotický stres
ethanolový stres
oxidační stres
teplotní stres
ostatní vlivy, neoznačené specifickým názvem stresu



Obr. 1 Závislost růstu *S. cerevisiae* (carlsbergensis) a *S. cerevisiae* (cerevisiae) v mladíně na teplotě



Nejčastější příčinou poruch hlavního kvašení bývá nízká koncentrace rozpuštěného kyslíku nebo kationtů kovů (např. zinku). Průběh hlavního kvašení silně závisí na koncentraci vodíkových iontů.

V poslední době se zjistil vliv tzv. flokulantních proteinů, přítomných v ječmeni a sladu, způsobujících předčasnou flokulaci kvasnic a tím nízké prokvašení piva.

V mladině přítomná kontaminace může využívat růstové faktory i rozpuštěný kyslík a tvorbou vysoce senzoryicky aktivních sloučenin (např. dimethylsulfidu) ovlivňovat senzoryické vlastnosti piva. Pivovarské kvasinky jsou vysoce citlivé k diacetylu a vyšším alkoholům, vznikajícím při kvašení.

Inhibiční působení dusitanů, vznikajících činností bakteriální kontaminace, je všeobecně známé a nebezpečné rovněž tvorbou netěkavých nitrosaminů.

Tab. 3 Metody měření aktivity kvasnic

barvení buněk
digitalizace obrazu buněk
tvorba mikrokolonií
intracelulární pH
acidifikační test
obsah ergosterolu
rezervní sacharidy
aktivita enzymů
obsah $Mg^{2+}$
spotřeba kyslíku
fotometrie
tvorba oxidu uhličitého
radiofrekvenční sensor

#### 4. VLIV VÁŘEČNÝCH KVASNIC

Druhá skupina faktorů zahrnuje vlivy, působící na vářečné kvasnice. Mnoho technologicky důležitých vlastností kvasnic je geneticky kódováno, často celou skupinou genů, jako např. flokulační schopnost.

Na předchozí historii kvašení a úchovy kvasnic závisí jejich chemické složení, které může ovlivňovat chování buněk v příštím nasazení kvasnic. Za přítomnosti kyslíku se syntetizují steroly a lipidické látky, které mohou částečně eliminovat přechodný nedostatek kyslíku v dalším kvašení [5]. Zásobní polysacharidy, např. trehalosa se v literatuře označují jako „antistresový faktor“ [6]. Některé ze stresových faktorů, zmíněných u složení mladiny, se uplatňují i při úchově kvasnic. Při kyselém praní kvasnic se může uplatnit inhibiční působení vodíkových iontů.

Průběh hlavního kvašení závisí na koncentraci kvasničných buněk a jejich aktivitě. Aktivita kvasnic je míra schopnosti splňovat technologické požadavky na činnost kvasnic za stanovených podmínek. Aktivní buňky mohou rychle prokvašovat substrát, asimilovat aminokyseliny, adsorbovat hořké látky a ovlivňovat spektrum těkavých látek v pivu. Stresové faktory snižují aktivitu kvasničných buněk.

Aktivita kvasničných buněk se může měřit různými způsoby (tab. 3). Přednost mají rychlé a levné metody, použitelné v malých i velkých pivovarech, nejlépe u všech nasazovaných dávek kvasnic. V praxi se nejčastěji používá barvení methylenovou modří, které je ovšem za změněných podmínek úchovy kvasnic značně nejisté [7].

Činnost kvasnic ovlivňují složení mladiny, její změny během kvašení, aktivita kvasnic a nastavitelné provozní parametry kvasného procesu.

#### 5. VLIV PROVOZNÍCH PARAMETRŮ

Poslední skupinu vlivů zahrnují technické parametry procesu kvašení, dokvašování, sběru a úchovy kvasnic. Z této skupiny jsou nejdůležitější příslušné teplotní režimy technologických operací. V této souvislosti se často literatura zmiňuje o teplotním stresu [1].

Působení chladového stresu se předpokládá zejména při styku kvasnic s chladicí plochou velkoobjemových kvasných nádob, nebo nádob na úchovu kvasnic, zejména při chlazení amoniakem. Stresové působení vyšších teplot na kvasnice se v pivovarství prakticky neuplatňuje.

Od chladového stresu tohoto druhu je nutné odlišit nevhodné působení nízké zakvašovací nebo maximální teploty hlavního kvašení, které způsobují nedostatečný vývoj oxidu uhličitého, promíchávání kvasící mladiny a tím předčasnou sedimentaci kvasnic. V pivovarském slangu se zpravidla hovoří o tzv. „podtrhnutí“, nebo „podražení“ kvasící várky.

Všechny druhy stresových faktorů se v současnosti studují na buněčné, biochemické a molekulární úrovni. Nově vyvinuté genové sondy mohou specificky rozeznat účinky různých stresových faktorů. Identifikují se specifické proteiny, vytvářející se při působení stresu.

Na působení stresových faktorů reagují kvasinky aktivním nebo pasivním způsobem. Při pasivní reakci je potlačení buněčných funkcí často trvalé a v krajním případě mohou kvasničné buňky hynout.

Při aktivní reakci může krátkodobé působení stresového faktoru indukovat adaptační mechanismy, které alespoň částečně dokáží eliminovat nežádoucí účinky stresových faktorů.

Jako příklad může sloužit krátké vystavení kvasnic nepříznivým vyšším teplotám, po němž se při opětovném nasazení kvasnic zvýšila rychlost kvašení. Podobný efekt lze např. pozorovat u indukované termorezistence.

#### 6. PŘEDPOVĚĎ PRŮBĚHU HLAVNÍHO KVAŠENÍ

Podle uvedeného výčtu může průběh hlavního kvašení ovlivňovat několik desítek různých faktorů, z nichž některé mohou trvale poškodit kvasničné buňky.

Mnohé z těchto vlivů je nemožné sledovat v reálném čase, a z tohoto důvodu je také přesná předpověď průběhu kvašení nemožná. Ale ani při znalosti všech vlivů a jejich okamžitých hodnot by nebylo možné přesně předpovědět průběh kvasné křivky. Průběh

kvašení se řídí většinou nelineárními rovnícemi, přičemž malá změna některé ze vstupních veličin může výrazně ovlivnit chování kvasného procesu.

Kromě toho nelze zajistit standardní počáteční podmínky parametrů pro každý kvasný tank. Při plnění tanku více várkami a průběžném zakvašování se kvasničné buňky pomnožují již během plnění a stav zakvašené mladiny po doplnění tanku je případ od případu odlišný. Nestandardní meziprodukt se získá i při stáčení piva po ležení, což způsobuje obtíže při filtraci.

Zajímavým způsobem řešení je instalace přeřadů u vertikálních tanků, jak je to možné pozorovat v pivovaru Radegast. Tím se zabrání vniknutí kvasnic do proudu stáčeného piva a odstraní se nestandardnost produktu.

Současné působení většího počtu drobných vlivů se projeví náhodným kolísáním sledovaného znaku, zatímco hrubé závady způsobují změny relativně malého počtu proměnných.

Technologové očekávají, že při nastavení vhodných počátečních podmínek a dodržení předepsaného průběhu teplot se získá mladé nebo hotové pivo vždy stejné kvality. Při relativně malém působení stresových faktorů lze např. pokles aktivity kvasnic upravit změnou hodnot technických parametrů.

V statistické kontrole jakosti proto představují horní a dolní meze jednotlivých znaků povolené hranice, připomínající spíše koncepci mezi kritických bodů v systému rizikové analýzy HACCP (Hazard analysis and critical control point), neboť dodržování předepsané střední hodnoty znaku je často nemožné.

Standardnost kvašení se hodnotí podle hodnot zdánlivého extraktu, popř. podle doby hlavního kvašení. Kvasné křivky přitom vykazují různá rozpětí v jednotlivých dnech kvašení. Standardní průběh hlavního kvašení zaručuje standardní vlastnosti vyráběného piva, což má význam pro udržení stejnoměrné kvality malých i velkých pivovarů.

#### 7. MODELOVÁNÍ PRŮBĚHU KVAŠENÍ A DOKVAŠOVÁNÍ

Modelování kvasných procesů v pivovarství se zakládá na klasických kinetických modelech a metodách, využívajících tzv. umělé inteligence. Podle již klasické definice Minského je umělá inteligence věda o vytváření strojů nebo systémů, které budou při řešení určitého úkolu užívat takového postupu, který bychom v případě, že by ho použil člověk, považovali za projev jeho inteligence. V pivovarské výrobě se tedy jedná o napodobení činnosti operátora střediska kvasných tanků.

Operátor střediska řídí kvašení na základě poznatků odborné literatury nebo podle předchozích zvyklostí pivovaru.

Před zavedením teploměru a sacharometru do pivovarství se kvašení řídilo pouze podle vzhledu kvasné deky, zákalu kvasící mladiny a smyslového posouzení. Kontrola měřením umožnila standardizovat kvašení, ale zároveň se fixovaly kvasné režimy, založené často na zjednodušeném, individuálním výkladu procesu a možnostech technologie v době jejich vzniku.



Ačkoliv např. nejsou podstatné námitky proti izotermnímu kvašení s následným ochlazením po ukončení kvašení, opírá se dosud nejvíce používaný režim o typickou teplotní křivku s počátečním vzestupem, teplotní prodloužením a poklesem teploty chlazením, převzatou z historických důvodů.

Další zdokonalení v řízení procesu lze očekávat doplněním dvojice teplota – prokvašení třetí charakteristickou veličinou, kterou se pravděpodobně stane počet kvasničných buněk a jejich aktivita. Měření by mohl např. zastávat známý radiofrekvenční senzor [8].

Analogická situace existovala v minulosti, kdy se průběh kvašení původně řídil podle vzhledu kvasné deky, chuti a zákalu kvasící mladiny. Měření teploty vedlo k standardnějšímu produktu a další zlepšení nastalo po použití sacharometru.

Mezi nástroje umělé inteligence se zpravidla zahrnují metody umělých neuronových sítí nebo tzv. expertní systémy [9]. Expertní systém např. považuje řízení hlavního kvašení za partii, v níž operátor udělá tah nastavením požadované teploty a sledovaný systém odpoví hodnotou zdánlivého extraktu v příštím měření, zpravidla následujícího dne. Cílem partie je dosáhnout v předepsaném čase požadovaného prokvašení.

Na rozdíl od reálného operátora si expertní systém ovšem dokonale pamatuje průběhy všech předchozích kvašení, neboli partií, a je proto v partii řízeného kvašení prokazatelně úspěšnější.

Expertní systém může z porovnání se záznamy z minulých kvašení rozeznat již v počátku výskyt závad, způsobených chybným rozhodnutím operátora a navrhnout individuální průběh teplot v jednotlivých dnech pro dosažení hledaného cíle, jímž jsou v tomto případě hodnoty teploty, zdánlivého extraktu a celkové doby kvašení.

Z praktického hlediska je ovšem nutné při dvouparametrickém řízení dostatečně přesně znát hodnoty teplot i zdánlivého extraktu jednou nebo vícekrát denně pro každou kvasnou nádobu. Měření teplot se technicky snadno realizuje, ale měření zdánlivého extraktu nebo prokvašení je obtížnější. Kromě laboratorní analýzy se může na prokvašení usuzovat z rychlosti vývinu oxidu uhličitého, tlakové

diference v mladině, koncentrace ethanolu v unikajícím plynu apod.

V minulém roce jsme popsali použití tzv. tlakového hustoměru pro levné měření zdánlivého extraktu kvasící mladiny. Tento systém ovšem požaduje předtlakování odběrové nádoby vzduchem nebo oxidem uhličitým. V současnosti ověřujeme systém umožňující rychlý odběr vzorku kvasící mladiny s rychlým odstraněním oxidu uhličitého a následným měřením zdánlivého extraktu hustoměrem s vysokou přesností bez potřeby předtlakování.

Naměřená data se zaznamenávají do databáze, která slouží pro hodnocení standardnosti kvašení i pro předpověď požadovaných změn teploty v každém okamžiku teplotní křivky. Podle dosud získaných zkušeností lze tímto způsobem získat pivo standardních vlastností, zrychlit jeho výrobu a snížit provozní náklady. Pro tento účel se navrhne speciální expertní systém, nebo se použije některý z již existujících systémů.

## 8. ZÁVĚR

Mnohaleté zkušenosti s pivovarskou výrobou ukázaly, že k zajištění standardního průběhu hlavního kvašení nestačí nastavit počáteční parametry procesu, jako jsou zá- kvasná dávka a teplota, obsah rozpuštěného kyslíku apod. a spoléhat na dodržování předepsané teplotní křivky.

Ačkoliv se v nedávné minulosti prohloubily poznatky o jednotlivých vlivech, působících v kvasném procesu, nestačí jejich znalost k uspokojivé předpovědi hlavního kvašení a dokvašování. Přesto tyto poznatky jsou velmi důležité pro rozeznání a lokalizaci závad hlavního kvašení. V průběhu výroby piva se tyto zkušenosti shromažďovaly a předávaly jako části technologických postupů.

Zajištění obliby a vysoké kvality piva se vázalo na procesní instrukce, přičemž ne vždy bylo snadné, nebo vůbec možné v manuálně vedených záznamech spolehlivě nalézt opakované výskyty průběhů jednotlivých kvašení. Tyto možnosti přináší teprve moderní výpočetní technika.

Protože nejistota v nastavení počátečních podmínek procesu a jeho nelinearita brání dosahování vysoké standardnosti výrobku, je nutné použít prostředky umělé inteligence.

Vychází se ze samozřejmé představy, že stejné kvasné křivky mají za následek piva stejných vlastností a není tudíž nezbytné korigovat kvalitu vzájemným „řežáním“ várek, popř. pak tzv. kroužkováním.

Expertní systém přitom napodobuje řízení procesu operátorem, který podle poznatků a literatury, místních zvyklostí a zkušeností s dosavadními průběhy kvašení se snaží dosáhnout požadovaného průběhu procesu.

V současnosti existují expertní systémy, schopné ze znalostí průběhu kvašení v minulosti včas rozeznat jejich závady a ze znalostí vlivů, působících na kvašení rychle závady identifikovat. Zvětšením počtu měřených veličin lze účinnost systému dále zvýšit. Expertní systém může přitom obsahovat pokyny znalce pro další testy, potřebné pro identifikaci pravděpodobné příčiny závad.

S použitím statistické kontroly procesu ve spojení s expertním systémem lze dosáhnout vysoké standardnosti těchto operací. Tyto programové prostředky se mohou využít ve velkých i malých pivovarech.

## LITERATURA

- [1] MÖNCH, D., KRÜGER, E., STAHL, U.: Mschr. Brauwiss. **48**, 1995, s.288
- [2] STEWART, G.G. et al.: Techn.Q.Master Brew. Assoc. Am. **25**, 1988, s. 47
- [3] REES, E.M.R., STEWART, G.G.: J. Inst. Brew. **103**, 1997, s.287
- [4] FERREIRA, P.M., COSTA, V., WOODFORD, D.: EBC Brew. Sci. Group Techn. Meeting Lisboa 1994, Zoeterwoude 1995.
- [5] OCONNOR-COX, E.S.C., MAJARA, M., AXCELL, B.C.: J. Am.Soc.Brew.Chem. **51**, 1993, s. 97
- [6] OCONNOR-COX, E.S.C., MAJARA, M., AXCELL, B.C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **54**, 1996, s. 97
- [7] OCONNOR-COX, E.S.C. et al.: Techn. Q. Master Brew. Assoc. Am. **34**, 1997, s. 306
- [8] BOULTON, C.A., BESFORD, R.P.: EBC Monograph XX, s.81
- [9] MAŘÍK, V., ŠTĚPÁNKOVÁ, LAŽANSKÝ, J.: Umělá inteligence 1 a 2. Academia, Praha 1997.

*Zpracováno podle přednášky  
na PS dnech, říjen 1997  
Do redakce došlo 18. 11. 1997*