

# Z výzkumu a praxe

## MĚŘENÍ AKTIVITY PIVOVARSKÝCH KVASINEK

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

**Klíčová slova:** kvasinky, technologická aktivita, kvašení, viabilita, vitalita

### 1. STANDARDNÍ PRŮBĚH KVAŠENÍ A DOKVAŠOVÁNÍ

Snaha po zajištění vyrovnané kvality piva vede k záměru dosahovat reprodukovatelného průběhu výrobních operací, včetně průběhu kvašení a dokvašování. Je také známo, že při standardním kvašení a dokvašování je rozptýl obsahu těkavých i netěkavých senzoričtí aktivních látek menší. Prodloužení doby kvašení může naopak způsobit různé obtíže, např. pomnožení kontaminujících mikroorganismů, nedostatečné odbourávání diacetylu, nevyrovnanou hořkost apod.

Standardní průběh hlavního kvašení a dokvašování ovlivňují vlastnosti mladiny, hodnoty procesních parametrů a množství i vlastnosti várečných kvasnic.

Vlastnosti mladiny závisejí na kvalitě sladu, průběhu varního procesu a nastavení vstupních parametrů, např. teploty a obsahu rozpuštěného kyslíku. Kvalitu mladiny lze popsat několika znaky a sledovat jejich kolísání v jednotlivých várkách nástroji statistické procesní kontroly (SCP). Standardnost průběhu kvašení se hodnotí podle odchylek růstové, kvasné a sedimentační křivky, předepsané pro tento proces.

Operátor procesu upravuje průběžně pro-

cesní parametry tak, aby dosáhl v předepsané době výstupních parametrů kvality, mezi něž se např. zahrnuje stupeň prokvašení, obsah kvasničných buněk, koncentrace diacetylu apod.

Protože rozptýl výstupních hodnot závisí na nastavení vstupních parametrů, lze jejich změnou v určitých mezích také ovládat standardnost procesu. Z tohoto důvodu se musí volit pro každý vstupní znak povolené pásmo hodnot, ve kterém je možno se podle potřeby pohybovat. Pro řízení procesu se proto dává přednost použití klasického modelu založeného na skokové funkci před Taguchiho principem. V něm se naopak spoléhá na optimální hodnotu parametrů a každá odchylka od této hodnoty se považuje za ztrátu.

### 2. VLASTNOSTI VÁREČNÝCH KVASNIC

Z technologického hlediska se za kvalitní zpravidla považují kvasnice, které rychle kvasí, sedimentují dobře, ale nikoliv předčasně, poskytují dostatečnou sklizeň a udělají pivo vhodný senzoričtí profil piva. Senzoričtí profil piva závisí mimo jiné také na schopnosti kvasnic redukovat karbonylové látky mladiny, např. 3-methylthiopropionaldehyd, který zodpovídá za mladinovou chuť

piva [1]. Dobrá redukční vlastnost kvasnic je také nutná k odbourání nežádoucích produktů, vznikajících kvašením, např. diacetylu.

Průběh kvašení ovlivňuje také koncentrace kvasinek při zakvašení. K jejímu přesnému nastavení se používají automatické zakvašovací přístroje, které se většinou zakládají na optickém nebo elektrickém principu [2].

Potřebné množství kvasnic pro zakvašení ovšem závisí na jejich aktivitě. U várečných kvasnic se přitom rozlišuje **viabilita**, související s reprodukční schopností

buněk a **vitalita**, kterou určují fyziologický stav kvasnic i jejich metabolická aktivita. Schopnost kvasnic splňovat technologické požadavky se často zahrnuje pod technologickou aktivitu. Ačkoliv v literatuře se termínem aktivita někdy označuje spojení vitality a viability, v tomto sdělení se aktivitou vždy rozumí **technologická aktivita**.

### 3. MĚŘENÍ VIABILITY A VITALITY KVASNIC

Viabilita kvasnic se nejčastěji měří kultivačními testy v tekutých nebo ztužených živných půdách podle počtu kolonií nebo mikrokolonií. Někdy se do této skupiny zahrnují také barvicí metody, ačkoliv správně náležejí k metodám stanovujícím vitalitu.

Vitalita kvasnic se posuzuje mikroskopickými metodami podle vzhledu buněk, obsahu vakuol, barvením ve viditelné oblasti a fluorescenčním barvením [3]. K barvení ve viditelné oblasti se používají různá barviva, např. methylenová modř, methylenová violet, methylenová modř v kombinaci se safraninem, Ponceau červeně aj. (tab. 1).

Jako fluorescenční barviva se používají akridinová oranž, diacetát fluoresceinu, rhodamin, erythrosin, primulin, hořečnatá sůl kyseliny 1-anilin-8-naftalensulfonové aj. [4–7].

Barvení fluorescenčními barvivy umožňuje stanovení jednotlivých buněčných složek, nevýhodou je vysoká cena fluorescenčního mikroskopu. Ještě dražší je průtokový cytometr, s nímž lze získat informace o intracelulárních komponentech kvasinek, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny aj. v celé populaci buněk [8,9].

Nejširší skupinu testů představují tzv. metabolické testy kvasnic, které zahrnují stanovení jednotlivých složek nebo stavu kvasnic, a fyziologické testy. Rozhraní mezi oběma skupinami není ostré a některé z nich by bylo možné zařadit do obou skupin (tab. 2).

Mezi důležité kvasničné sacharidy náleží glykogen a trehalosa. Odbourávání glykogenu poskytuje energii pro syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin, trehalosa působí jako antistresový faktor [10].

Steroly a nenasycené mastné kyseliny jsou důležité pro správnou činnost kvasničných membrán, obzvláště za anaerobních podmínek. Proto může být obsah těchto látek mírou viability kvasinek [11].

Intercelulární pH (ICP) je rovněž dobrým

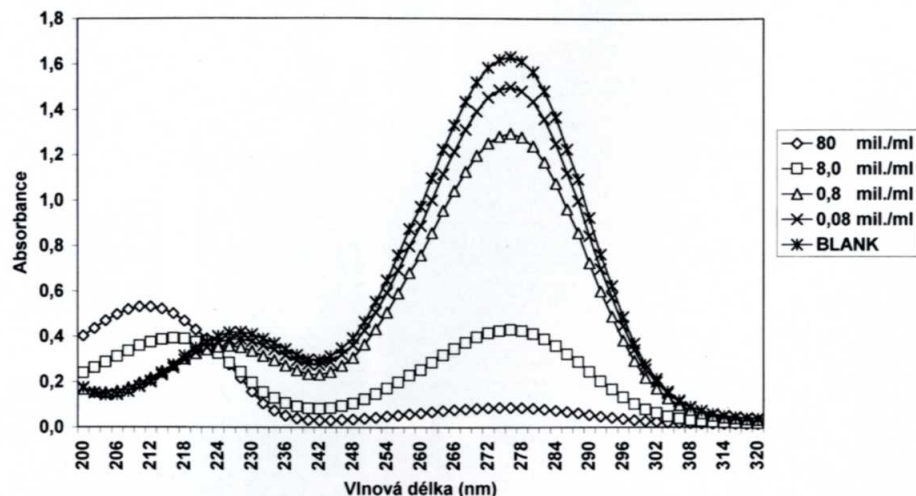
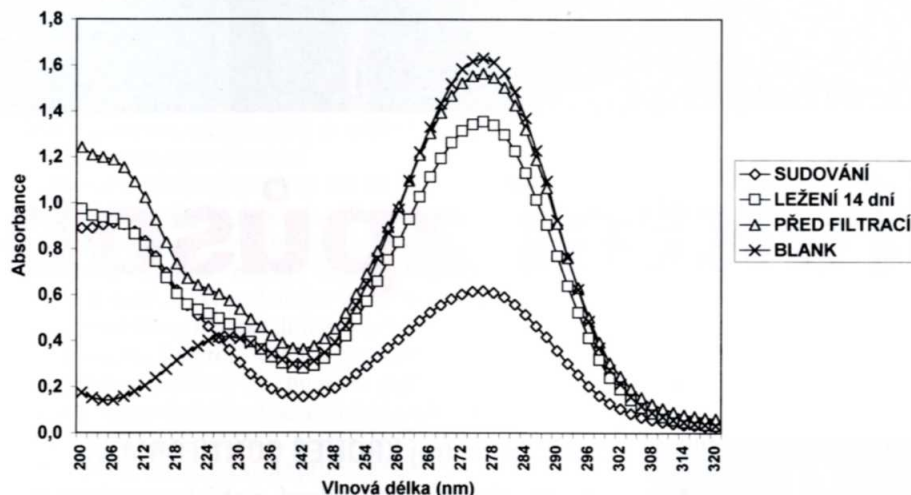
Tab. 1 Barvicí metody

Barvení ve viditelné oblasti	Fluorescenční barviva
Methylenová modř	Akridinová oranž
Methylenová modř + safranin O	Bromkresolová zeleň
Ponceau červeně	Diacetát fluoresceinu
Methylenová violet	Isothiokyanát fluoresceinu
	Rhodamin B
	Erythrosin B
	Primulin
	Mg sůl kys. 1-anilin-8-naftalensulfonové
	Eosin Y
	Viablue

Tab. 2 Fyziologický stav a metabolické testy kvasnic

Stanovení složek, nebo stavu buňky	Fyziologické testy
Sacharidy	Spotřeba kyslíku
Mastné kyseliny	Tvorba oxidu uhličitého
Lipidy	Mg <sup>++</sup> test (MRT)
Steroly	Acidifikační test
ATP	Deflokulační test
NADH	Redukce TTC
Intercelulární pH	Redukce karbonylových látek
Proteasy	
Esterasy	
pH sedimentu	
Kapacitance (radiofrekvenční senzor)	



Obr. 1 Redukce furfuralu ( $c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vářečnými kvasnicemiObr. 1 Redukce furfuralu ( $c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v dokvašovaném pivu

ukazatelem viability kvasnic, neboť jeho hodnoty závisejí na správné funkci protonové pumpy kvasinek. Ke stanovení ICP se používá esterifikovaný 5(6)-karboxyfluorescein, který se po vstupu buňky rozštěpí a z intenzity fluorescence, závislé na hodnotě ICP, se usuzuje na viabilitu kvasničných buněk [12]. Cytoplazmatické pH se také může měřit  $^{31}\text{P}$ -NMR analýzou [13].

Aktivita esteráz se měří s použitím barvivem značených substrátů, např. p-nitrofenyl, nebo  $\beta$ -naftyl-esterů, známá je metoda s diacetátem fluoresceinu [14].

V poslední době opět vzrůstá zájem nejen o měření intercelulárního pH, ale také o jednoduché a rychlé testy, jako jsou měření pH kvasničního sedimentu nebo test na proteázy. Samostatnou část tvoří radiofrekvenční metoda, měřící současně koncentraci i aktivitu kvasnic [2].

Měření vitality se může využít k získání dalších důležitých informací. Proteázový test např. vznikl původně při testování schopnosti kvasnic vylučovat proteolytické enzymy, štěpící proteiny, které podporují pěnívost piva. Také je možné tyto testy vzájemně kombinovat [15].

Mezi fyziologické testy náleží např. elektrochemické měření spotřeby rozpuštěného kyslíku [16]. Měření úniku oxidu uhličitého je oblíbenou metodou, na které se zakládají různé laboratorní fermentory pro testování vitality i viability kvasnic. Z hmotnostního úbytku kvasnicí nádoby lze spočítat okamžité hodnoty základní analýzy piva [17]. Vývin oxidu uhličitého lze také měřit elektronicky jako tlakový nárůst v uzavřené nádobce, nebo jako okamžitou hodnotu jeho průtoku [18]. S vývinem oxidu uhličitého souvisí také podstata deflokulačního testu, který se zakládá na optickém měření zpětně rozptýlených sedimentovaných kvasinek do mladiny, nebo syntetického živného média [18].

V poslední době uveřejněný test uvolňování hořečnatých iontů z kvasnic (Magnesium Release Test - MRT) se zakládá na měření koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  iontů, uvolněných z buněk ihned po zakvašení [19].

Acidifikační test, který se zakládá na měření extracelulárního pH po smíšení kvasnic s roztokem glukosy, se rozšířil zejména v anglosaských zemích, ačkoliv ho původně vyvinuli čeští autoři [20]. Měření redukce tri-

fenyltetrazoliových solí (TTC) stanoví současně aktivitu i koncentraci buněk na základě měření aktivity D-glyceraldehyd-3-fosfát:NAD oxidoreduktasy (EC 1.2.1.12) [21].

Schopnost redukovat karbonylové látky mladiny a mladého piva náleží nyní k důležitým vlastnostem kvasnic. Pro výzkumné účely se původně zkoumala *in vivo* i *in vitro* schopnost redukovat typické aldehydy, vyskytující se v pivu [22].

Novou možnost poskytuje měření rychlosti redukce furfuralu. Tento postup se zakládá na smíšení vzorku s kvasnicemi s roztokem furfuralu a jejich kultivaci při teplotě  $28^\circ\text{C}$  po dobu 15 až 60 min. Po zvolené době expozice se furfural i vzniklý furfurylalkohol izolují rychlým přeháněním vodní párou a stanoví se přímou spektrofotometrií v UV oblasti (obr.1,2). Tato strategie lze využít i při redukci dalších aldehydů, např. benzaldehydu, a při měření ve viditelné oblasti také např. při redukci diacetylu.

#### 4. MĚŘENÍ TECHNOLOGICKÉ AKTIVITY KVASNIC

Technologická aktivita se měří modelovými testy, které napodobují průběh hlavního kvašení. Patří sem metoda kvasných válců, nebo vázková analýza kvašení [17]. Tyto metody se nejvíce blíží provoznímu kvašení, jejich výsledky však ovlivňuje geometrie kvasných nádobek a především jsou příliš zdlouhavé [23].

Neřídná metoda stanovení aktivity kvasnic se zakládá na využití softwarových senzorů. V reálném čase se přitom sledují snadno měřitelné veličiny (např. teplota, zdánlivý extrakt, rychlost uvolňování oxidu uhličitého) a na základě modelu se další hodnoty dopočítávají a předpovídá se tak budoucí průběh hlavního kvašení. Nejvhodnější je rychlé měření hustoty kvasícího piva. Nejjednodušší jsou čidla měřící tlakový rozdíl v dvou nebo třech místech kvasného tanku, popř. tenzometrické měření síly plováku [24,25].

Modely kvašení se zakládají jak na klasickém kinetickém modelování, tak na modelech s umělou inteligencí. Prostředky umělé inteligence (Artificial Intelligence - AI) zahrnují jak expertní systémy (ES), tak prostředky umělých neuronových sítí (ANN). Často se tyto možnosti kombinují do tzv. hybridních modelů [26].

#### 5. ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat, že přes velké množství metod měření aktivity kvasnic se v praxi používá relativně nespolehlivá, ale rychlá a jednoduchá metoda barvení methylenovou modří. Tato situace se pravděpodobně nezmění, přes stále rostoucí kritiku metody, ani se zaváděním nových metod barvení [7,27].

Přesto se mohou nové metody uplatnit ve speciálních případech, zejména při pátrání po příčinách závad hlavního kvašení, snaze standardizovat kvasný proces a zpomalit nežádoucí senzorké změny při stárnutí.

## LITERATURA

- [1] PERPETE, P., COLLINS, S.: EBC Brew. Sci. Group Bull. 1998, s. 241
- [2] BOULTON, C.A., BESFORD, R.P.: EBC Monograph XX. Copenhagen 1992, s. 81
- [3] HUTTER, K.J., SCHARFE, J.: Monatsschr. Brauwiss. **50**, 1997, s. 4
- [4] IMAI, T.: Tech. Report of Kirin No. 35, 1995-1997, s. 34
- [5] JONES, R.P.: Process Biochem. **22**, 1987, s. 118
- [6] LENTINI, A.: Ferment **6**, 1993, s. 321
- [7] SMART, K.A., et al.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **57**, 1999, s. 18
- [8] HUTTER, K.J.: Monatsschr. Brauwiss. **46**, 1993, s. 444
- [9] JESPERSEN, L.: J. Inst. Brew. **100**, 1994, s. 399
- [10] O'CONNOR-COX, E.S.C., et al.: Ferment **9**, 1996, s. 321
- [11] O'CONNOR-COX, E.S.C., et al.: J. Inst. Brew. **102**, 1996, s. 19
- [12] BACK, W., et al.: Monatsschr. Brauwiss. **51**, 1998, s. 189
- [13] FUKUBO, S.: Proc. Eur. Brew. Conv., Maastricht 1997, s. 423
- [14] GULDFELD, L.U., et al.: J. Inst. Brew. **104**, 1998, s. 333
- [15] MOCHABA, F., O'CONNOR-COX, E.S.C., AXCELL, B.C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. **56**, 1998, s. 1
- [16] PEDDIE, F.L., SIMPSON, W.J., KARA, B.V.: J. Inst. Brew. **97**, 1991, s. 21
- [17] ŠAVEL, J.: Kvasny Prum. **39**, 1993, s. 226
- [18] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny Prum. **40**, 1994, s. 325
- [19] MOCHABA, F.M., O'CONNOR-COX, E.S.C., AXCELL, B.: J. Inst. Brew. **103**, 1997, s. 99
- [20] KARA, B.V., SIMPSON, W.J., HAMMOND, J.R.M.: J. Inst. Brew. **94**, 1988, s. 153
- [21] BÄRWALD, G.: Brauwissenschaft **25**, 1972, s. 192
- [22] Van NEDERVELDE, L., et al.: EBC Brew. Sci. Group Bull. 1998, s. 128
- [23] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M.: Kvasny Prum. **40**, 1994, s. 198
- [24] SIEBER, M.: Brauwelt Intern. **17**, 1999, s. 130
- [25] BROWN, W.A.: Tech.Q. Master Brew.Assoc.Am. **35**, 1998, s. 151
- [26] BEIL, S., et al.: Monatsschr. Brauwiss. **45**, 1992, s. 196
- [27] O'CONNOR-COX, E, S.C., et al.: Tech.Q. Master Brew.Assoc.Am. **34**, 1997, s. 306

*Podle přednášky na XII. konferenci  
„Racionalizace fermentačních  
procesů a ekonomické informace“,  
květen 1999, Plzeň  
Do redakce došlo 3. 6. 1999*