

VLIV KMENE KVASNIC NA SENZORICKOU STABILITU PIVA

THE EFFECT OF YEAST STRAIN ON FLAVOUR STABILITY OF BEER

GABRIELA BASAŘOVÁ, MARTIN BLÁHA, PETR VESELÝ, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

Klíčová slova: oxid siřičitý, kvasničný kmen, senzorická stabilita

Keywords: sulphur dioxide, strain of brewing yeast, flavour stability

1 ÚVOD

Vlastnosti kmene kvasnic jsou vedle kvality surovin a podmínek technologie odpovědné za chuťové vlastnosti a podílejí se i na tzv. přirozené koloidní stabilitě piva. Během kvašení produkují kvasinky řadu typických základních buketních látek, jako jsou estery, vyšší alkoholy a mastné kyseliny. Jednotlivé kmeny mají rozdílné genetické předpoklady k tvorbě těchto látek, ale i k náchylnosti na změny metabolických cest jejich vzniku způsobené podmínkami výrobního procesu. Koloidní a senzorickou stabilitu piva ovlivňují kvasinky metabolismem sirmých sloučenin, jehož výsledkem je produkce oxidu siřičitého. Zachování čerstvé chuti po dobu skladování podporují dále enzymové aktivity kvasnic, kterými jsou schopné redukovat karbonylové látky mladiny. V obou případech se jedná o vlastnosti, které se mohou u jednotlivých kmenů lišit vzhledem k jejich genetické dispozici, ale současně i vlivem citlivosti na podmínky kvašení.

Oxid siřičitý svými antioxidačními a redukčními vlastnostmi chrání pivo z velké části před negativním vlivem rozpuštěného kyslíku a řady karbonylových sloučenin [1, 2, 3]. Je schopen inhibovat chemiluminiscenci, z čehož vyplývá schopnost „vychytávat“ aktivní kyslík a tím zpomalovat radikálové reakce [4, 5]. Hodnota oxidu siřičitého v pivu se pohybuje nejvýše do 20 mg.l⁻¹, nepojive do 15 mg.l⁻¹. Koncentrace nad 30 mg.l⁻¹, které se však v praxi běžně nevyskytují, by již narušily chuťové vlastnosti piva [2]. Tvorba oxidu siřičitého je velmi závislá na genetických vlastnostech použitého kmene kvasnic [6]. Zvyšuje ji koncentrace a vyšší hodnota pH mladiny, obsah sirmých aminokyselin a sulfátů v mladině a podle některých autorů i vyšší násadní dávka kvasnic. Nižší hladiny podporuje vyšší provzdušnění a vyšší koncentrace nenasyčených lipidů v mladině [7, 8, 9, 10].

Kmeny kvasnic se liší schopností redukce mladinyových karbonylů, které se vytvořily již při sladování a varním procesu, nejčastěji v rámci Maillardových reakcí aminokyselin a sacharidů. Streckerovy degradace aminokyselin a enzymové i neenzymové degradace lipidů [11]. Tyto aldehydy jsou substráty pro kvasničné reduktasy, které je degradují na alkoholy. Jsou známy dva enzymové

systémy těchto vlastností: alkoholreduktasa katalyzující redukci pentanalu a pentenalu a aldoreduktasa specifická pro 3-methylbutanal a pentanal [12]. K charakterizaci jednotlivých reduktas tohoto typu byla v předešlých pracích našeho pracoviště vyvinuta a postupně zdokonalena metoda purifikace kvasničné NADPH 3-methylbutanal reduktasy a pomocí specifické elektroforetické detekce prokázána existence dvou kvasničných NADPH reduktas specifických pro 3-methylbutanal [13].

V tomto článku jsou shrnuty výsledky výzkumu vlastností tří kmenů kvasnic používaných v provozu českých pivovarů z hlediska tvorby oxidu siřičitého a aktivity reduktas aldehydů a souvislost těchto vlastností s rozdíly v průběhu růstové křivky, míry hydrofobicity a absorpce aminokyselin. Byl rovněž sledován vliv kmene kvasnic na změny oxidačně-redukční kapacity a změny koncentrace polyfenolových sloučenin zkvašované mladiny.

2 MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ A METODY

2.1 Modelové kvašení

Modelové kvasné zkoušky se prováděly opakovaně v období tří let v 10 l kvasných válcích na 10% a 12% světelné mladině (zakvašovaný oves mladiny 35 l), odebrány vždy z provozu jednoho českého pivovaru. Příklady v publikaci uváděných výsledků pochází z kvasných zkoušek s 12% mladinou, při kterých byly pro daný pokus zajištěny pro testované kmeny zcela shodné technologické podmínky, tj. složení mladiny, provzdušnění (8,0 mg.l⁻¹ O₂), hlavní kvašení, které se vedlo vždy při teplotách 7 °C, 10 °C a 13 °C, stejný fyziologický stav a násadní dávka kvasnic (10 ml. buněk/ml). Proto lze zjištěné rozdíly výsledků analýz připisat genetické odlišnosti studovaných kmenů.

2.2 Kmeny kvasnic

Testovaly se tři kmeny kvasnic, označené podle sbírky VÚPS Praha: 1) kmen č. 2 – středně hluboko- až hlubokoprokvašující, dobře sedimentující, 2) kmen č. 7 – středně hlubokoprokvašující, velmi dobře sedimentující, 3) kmen č. 95 – hluboko prokvašující, dobře sedimentující.

2.3 Použité metody

2.3.1 Stanovení 3-methylbutanal reduktaové aktivity

Princip

Při přenosu vodíku kofaktorem NADPH vzniká aromatický charakter jeho pyrimidinového kruhu, a tím se charakteristicky mění absorpce v UV oblasti [14].

Přístroje a zařízení

Spektrofotometr Shimadzu UV 2100, křemenná 1 cm kyveta.

Dezintegrátor Bio Neb.

Roztoky

Směs Triton-aldehyd: 7,5 ml 0,1 M MES (kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová) pH 7,0, 300 µl Triton, 100 µl 3-methylbutanal, 16,8 ml destilovaná voda, 8,3 mg NADPH v 1 ml destilované vody, 100 mM β-sulfanylethanol.

Příprava vzorku

Z kvasného válce se odebere 1000 ml rozkvašené mladiny, ze které se odstředí při 1000 otáčkách za minutu získá podíl hustých kvasnic. Množství 1 g kvasnic se resuspenduje 0,1 M MES v tlumivém roztoku o pH 7,0, který obsahuje 1 mM β-sulfanylethanolu, 1 mM fenylmet-hylsulfonfyl fluoridu a 0,2 mM sorbitolu, a směs se rozdělí v tlakovém dezintegrátoru. Pro další práci se použije supernatant získaný odstředěním po dobu 20 min při 10 000 otáčkách za minutu.

Pracovní postup

Do 1 cm křemenné kyvety se napietuje: 1,5 ml roztok Triton-aldehydu, 30 µl kofaktoru NADPH, 30 µl 100 mM β-sulfanylethanolu, 1 ml destilované vody a 0,5 ml kvasničního supernatantu.

Na UV spektrometru se měří absorpance při 340 nm po dobu 4 minut.

Výpočet a vyhodnocení

Výsledná 3-methylbutanalreduktaová aktivita se vyjadřuje v µmol NADPH kofaktoru oxidovaného za hodinu vztahených na mg proteinu, jehož množství se v kvasnicích stanoví metodou podle Folina.

2.3.2 Ostatní použité metody

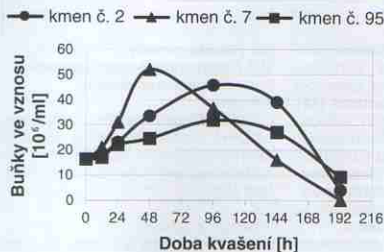
Stanovení kvasničných polysacharidů se provádělo extrakcí metodou podle Trevellyana a Harrisona [15, 16],

glykogen ještě stanovením fluorescence akriflavinu [17], měření hydrofobicity buněčných povrchů podle Hinciliffe et al. [16, 18], oxidačně-redukční kapacita zkvašované mladiny podle Kanedy [19, 20], Chapona [20, 21] a MEBAK [20, 22], histogramy velikosti (FSC) a granularity (SSC) na průtokovém

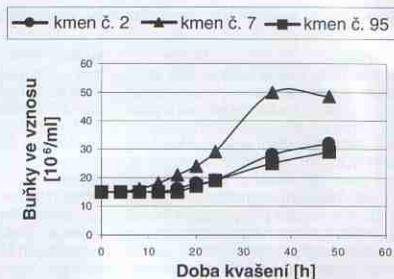
cytometru PARTEC – Pas-III [23, 24]. Růstová křivka, stanovení oxidu siřičitého destilačně, stanovení celkových, oxidovaných, oxidovatelných polyfenolů a anthokyanogenů, jednotlivých aminokyselin na automatickém analyzátoru T339, bylo prováděno podle běžných popsáných postupů [22].

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

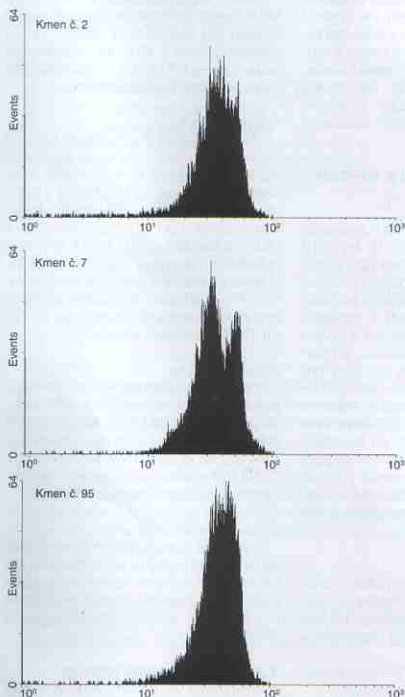
Tvorba vedlejších metabolitů kvasničními kmeny a dispozice v enzymových aktivitách během fermentace úzce souvisí s geneticky kódovanou metabolickou schopností, související s rychlostí a mírou pomnožení buněk i sedimentační schopností. Tyto vlastnosti rovněž



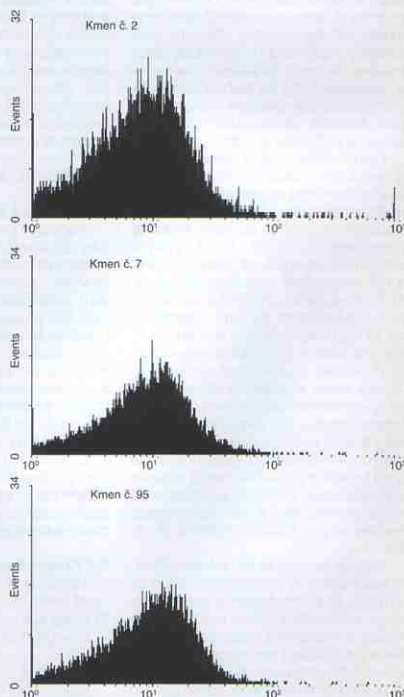
Obr. 1 Růstové křivky tří kmenů kvasnic (mladina 12 % E, teplota kvašení 10 °C)



Obr. 2 Počátek růstové křivky tří kmenů kvasnic (mladina 12 % E, teplota kvašení 10 °C)



Obr. 3 Histogramy velikosti buněk (FSC) tří kmenů kvasnic v 72. hodině kvašení (T 10 °C)



Obr. 4 Histogramy povrchů buněk (SSC) tří kmenů kvasnic v 72. hodině kvašení (T 10 °C)

patří mezi dědičné znaky buněčné populace.

3.1 Rozdíly průběhu růstové křivky u testovaných kmenů

Kvasničný kmen č. 7 vykazoval na růstové křivce v porovnání s kmeny č. 2 a č. 95 kratší lag fázi, strmější fázi exponenciální s dřívějším, ale nižším maximem počtu buněk ve vznohu, dřívější aglutinaci a sedimentaci (obr. 1 a 2). Kmeny č. 2 a č. 95 měly maximum růstové křivky ve stejné době kvašení. U kmene č. 2 bylo opakovaně při různých podmínkách kvašení maximum růstové křivky vyšší a sedimentace registrovaná úbytkem počtu buněk ve vznohu důraznější než u kmene č. 95.

Tyto rozdíly v průběhu růstových křivek porovnávaných kmenů korelovaly s odlišnostmi histogramů velikosti (FSC) a granularity (SSC) buněk. Histogram vyjadřuje závislost jedné veličiny na množství buněk prošlých kyvetou průtokového cytometru za danou dobu.

Na příkladu histogramu velikosti buněk ze 72. hodiny kvašení (obr. 3) je u kmene č. 7 patrný výskyt dvou vrcholů, zatímco u kmene č. 2 a č. 95 je vrchol pouze jeden. To dokazuje, že v dané

době kvašení se vyskytovaly u kmene č. 7 dvě subpopulace. Buňky velikostně větší, tedy buňky s pupenem, jsou reprezentovány vrcholem, který je na horizontální ose více vpravo. Histogramy granularity vyjadřují povrchové vlastnosti buněk, např. zvrásnění povrchu způsobené jizvami po pučení. V 72. hodině kvašení lze pozorovat na histogramu (obr. 4) nižší střední hodnotu vrcholu především u kmene č. 2, což svědčí o menším množství dělicích se buněk v dané době v porovnání především s kmenem č. 7.

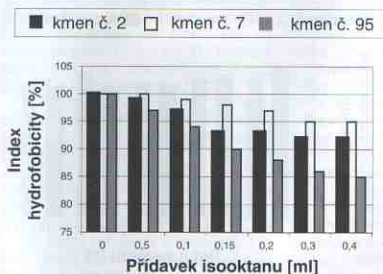
3.2 Rozdíly kvasničných kmenů v tendenci k hydrofobicitě buněčných povrchů

Všechny kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces uvarum* vykazují v interakci mezi prostředím a povrchem buněk v zásadě hydrofilní charakter [16, 18, 25]. Kvasinky svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* mají vlastnosti hydrofobní. Index hydrofobicity HI je poměr mezi hodnotami absorpce vodní a uhlovodíkové fáze s kvasničnou populací měřené při 660 nm. U kvasinek svrchního kvašení je HI menší než 50 %, u „spodních kvasinek“ větší než 50 %.

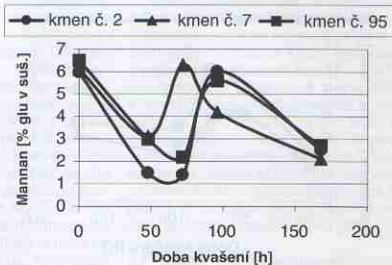
Měření hydrofobicity potvrdilo, že kmeny č. 2, č. 7 a č. 95 patří do skupiny hydrofilních mikroorganismů, protože naměřené hodnoty HI byly větší než 50 % (obr. 5). Prokázalo se však, že i v případě kmenů spodního kvašení se vyskytuje tendence k adhezi některých buněk k oxidu uhlíkatému a část kvasinek se vznášá po přidání organických látek (hexanu, isooktanu, diethyletheru apod.). V tomto směru vykazoval největší tendence k hydrofobitě kmen č. 95, což korelovalo s jeho mírně horší sedimentační schopností v porovnání s kmenem č. 2 a především s kmenem č. 7.

3.3 Rozdíly v degradaci a syntéze polysacharidů buněčných stěn u testovaných kvasničných kmenů během kvašení

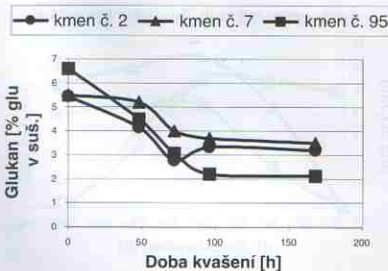
Flokulační a sedimentační schopnost spodních kvasinek je podle dnešních poznatků geneticky podmíněna [26]. Je však ovlivňována i vlastnostmi kultivačního prostředí a metabolickou činností kvasnic [27, 28]. Mezi faktory, které ovlivňují flokulaci a sedimentaci kvasinek a tím i míru metabolické činnosti, patří změny hladin polysacharidů buněčných stěn, především mannanu (obr. 6), méně



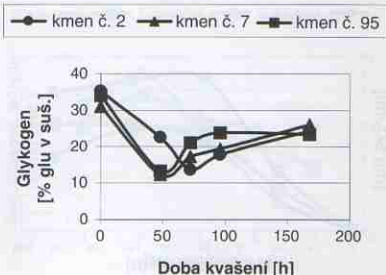
Obr. 5 Změny indexu hydrofobicity (HI) tří kmenů kvasnic během molasových fermentací (T 10 °C)



Obr. 6 Změny hladiny polysacharidu buněčných stěn mannanu u tří kmenů kvasnic během kvašení (T 10 °C)



Obr. 7 Změny hladiny polysacharidu buněčných stěn glukanu u tří kmenů kvasnic během kvašení (T 10 °C)



Obr. 8 Změny hladiny rezervního polysacharidu glykogenu u tří kmenů kvasnic během kvašení (T 10 °C)

glukanu (obr. 7) [29]. Obecně se udává, že hůře flokulující a sedimentující prachové kvasnice mají v buněčných stěnách více mannanu než kvasnice dobře sedimentující, tzv. krupičkovité. Rozdíly v obsahu mannanu v buněčných stěnách testovaných kmenů kvasnic a jeho změny během kvašení nebyly výrazné, což souviselo se skutečností, že za stejných podmínek nebyla sedimentační schopnost příliš odlišná (obr. 6). Na počátku kvašení hodnota mannanu nejdříve poklesla, následoval nárůst a další pokles. Počátek flokulace a sedimentace koreloval v souladu s údaji v odborné literatuře [29] s dobou kvašení, kdy byla koncentrace mannanu v buněčných stěnách nejnižší. Kmen č. 7 se vyznačoval dřívějším docílením maxima koncentrace glukanu v buněčných stěnách během fermentace v porovnání s kmenem č. 2 a č. 95. Naopak po docílení maxima následoval u kmene č. 7 prudký pokles hladiny mannanu, zatímco u dalších dvou hodnotených kmenů byla degradace pozvolnější. S tím zřejmě do určité míry souvisí i zjišťované mírné rozdíly v době a rychlosti sedimentace kmene č. 7 v porovnání s kmeny č. 2 a č. 95.

3.4 Rozdíly v degradaci a syntéze buněčných polysacharidů u testovaných kvasničných kmenů během kvašení

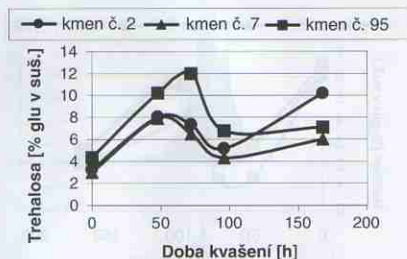
Základní rezervní látkou, využívanou kvasinkovou buňkou k získání energie pro pomnožení a metabolickou činnost zvláště na počátku růstu, je glykogen [30]. U kmene č. 7 se stanovily extrakční metodou v porovnání s kmenem č. 2 a č. 95 ve všech šetřeních mírně vyšší hladiny buněčných rezervních polysacharidů, zejména glykogenu (obr. 8), ale i disacharidu trehalosy (obr. 9). U všech tří kmenů hladina glykogenu během kvašení nejdříve poklesla a následně se opět zvýšila vzhledem k syntéze glykogenu buňkami. Tyto poznatky se v současnosti potvrdily metodou založenou na principu měření fluorescence akřilavinu, jejíž hodnoty odpovídají aktuální koncentraci glykogenu v buňkách [17] (obr. 10). Tendence výraznějšího využití glykogenu kmenem č. 7 v prvních 48 až 72 hodinách kvašení a vyšší míra jeho syntézy v další fázi kvašení umožňuje v následujícím nasazení rychlejší pomnožení, protože v lag fázi mají buňky k dispozici bohatší energetický zdroj pro syntézu sterolů a mastných kyselin.

3.5 Rozdíly v rychlosti a míře absorpce aminokyselin mláďiny

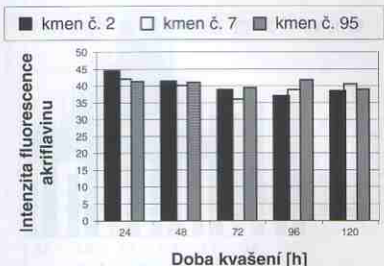
Kvasinky absorbují aminokyseliny mláďiny postupně. Jednotlivé skupiny mohou užívat vždy až po poklesu dříve využitelných sloučenin, především threoninu a serinu k určité hranici [31].

O rozdílu kmenů v absorpci aminokyselin mláďiny včetně kmene č. 2 a č. 7 jsme již publikovali více prací [32, 33, 34, 35, 36]. V rámci testování kmenů diskutovaného v tomto článku se starší výsledky potvrdily. Kmen č. 7 vzhledem k rychlejšímu pomnožení syntetizuje ve zvýšené míře aminokyseliny, které nemůže v době potřeby ještě využívat z mláďiny, především větvené aminokyseliny jako lysin. Toto zjištění vysvětluje inklinaci piv vyrobených s kmenem č. 7 k vyšším hladinám diacetylů, protože jeho buňky exkretují do zvařovaného média větší množství meziproductu syntézy lysinu α -acetalaktátu v porovnání s ostatními testovanými kmeny. Vyloučený α -acetalaktát se pak neenzymovou cestou mění na diacetyl.

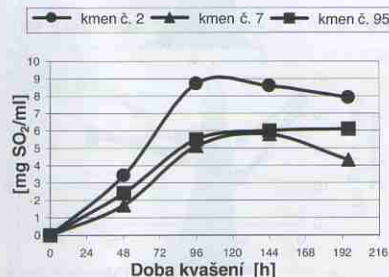
Pokles lysinu na 50 % původního množství v 12% mláďině během kvašení při 10 °C byl zjištěn u kmene č. 95 v 40. hodině, u kmene č. 2 v 45. hodině



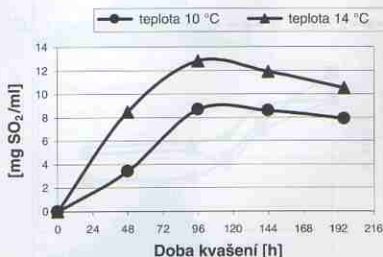
Obr. 9 Změny rezervního disacharidu trehalosy u tří kmenů během kvašení (T 10 °C)



Obr. 10 Změny intenzity fluorescence akřilavinu třemi kmeny (koreluje s obsahem glykogenu) (T 10 °C)



Obr. 11 Tvorba oxidu siřičitého třemi kmeny kvasnic během fermentace (T 10 °C)



Obr. 12 Vliv teploty kvašení na tvorbu oxidu siřičitého při kvašení s kmenem č. 2

a u kmenů č. 7 až v 48. hodině. U kmenů č. 7 byla stanovena pomalejší rychlost i míra utilizace všech aminokyselin mladiny. To může do určité míry ovlivňovat obsah zbytkových aminokyselin v pivu vyrobeném s tímto kmenem. Během pasterace i skladování je možné u takového piva předpokládat vznik většího množství tzv. komponent staré chuti piva typu aldehydů z degradace aminokyselin.

3.6 Rozdíly v průběhu tvorby oxidu siřičitého během kvašení

Tvorba oxidu siřičitého závisí na řadě faktorů, které ovlivňují růst a fyziologický stav kvasinek [37]. Dominantní vliv kmenové kvasnice jsme již prokázali dříve [1, 38]. Nejvyšší tvorbu SO_2 dosahovaly všechny tři kmeny po docílení maxima růstové křivky (obr. 17). Pak následovaly mírný pokles způsobený jednak interakcí v komplexech s karbonyly, jednak možným mírným strháváním s oxidem uhličitým do kvasných plynů [39].

Názor na vliv teploty kvašení na produkci oxidu siřičitého není jednotný [40, 41]. Uchida a Ono [42] se domnívají, že vliv teploty může být odlišný v závislosti na kmeni a fyziologickém stavu kvasnic. Podle Kanedy et al. [41] se tvorba SO_2 snižuje s rostoucí teplotou kvašení, zatímco Nordlov [40] uvádí, že optimální teplota fermentace pro tvorbu SO_2 se pohybuje mezi 14 až 16 °C. Aplikace tlaku od počátku kvašení inhibuje růst kvasnic a urychluje tvorbu SO_2 [1].

V našich výzkumech dříve i v současnosti jsme zjišťovali nárůst maxima tvorby SO_2 se zvýšením teploty kvašení (zkoušeno 7 °C, 10 °C, 13 °C a 18 °C) u všech tří kmenů č. 2, č. 7 a č. 95, ale i intenzivnější následující pokles, jak je patrné z příkladu kvašení s kmenem č. 2 při dvou teplotách (obr. 12).

Na rozdíl od jiných autorů [42, 43], kteří uvedli, že se vyšší násadní dávka kvasnic tvorba SO_2 mírně roste, jsme u žádného z testovaných kmenů nezjistili průkazný rozdíl při použití dávek od

10 do 25 milionů buněk na ml (obr. 13).

Tvorbu SO_2 významně ovlivňuje fyziologický stav kvasnic. Hladovění nebo stárnutí kvasnic před nasazením ji zvyšuje. Během stárnutí kvasinek se snižuje hladina glykogenu v buňce. Pickerell et al. [44] zjistili souvislost mezi jeho obsahem v následných kvasnicích a hladinou SO_2 ke konci fermentace. Procedury způsobující vyčerpání glykogenu, např. zvýšená teplota nebo dlouhá skladování, mají za následek zvýšenou produkci SO_2 .

Nejvyšší maximum tvorby SO_2 opakovaně vykazoval při všech podmínkách kvašení kmen č. 2, mírně nižší kmen č. 95 a nejnižší kmen č. 7, u kterého se zjistila inklinace k vyššímu obsahu buněčného glykogenu.

Protože se ve všech pokusech porovnávaly kmeny ve stejném fyziologickém stavu, lze rozdíly v tvorbě SO_2 přislat mírně odlišným genetickým vlastnostem sledovaných kmenů kvasnic v utilizaci síry.

Siřičitany jsou intermedie při anabolismu síry do sirných aminokyselin methioninu a cysteinu. Zdrojem síry pro kvasničnou buňku jsou anorganické sírany, které jsou přenášeny permeasou do buňky a přeměňovány ATP-sulfurylasou (ATP. EC 2.7.7.4) na adenylylsulfát (APS) a dále APS-kinasou na fosfoadenylylsulfát (PAPS), který je PAPS-reduktafou převeden na siřičitan. Účinkem sulfidu reduktaf (S-R, EC 1.8.9.91) je siřičitan redukován na sulfid, který je využit k syntéze cysteinu, methioninu a S-adenosylmethioninu (SAM). Poslední z nich transkripčně reprimuje většinu genů, pokud ne všechny, které se podílí na utilizaci síry [45]. Dráha utilizace síry je pod metabolickou a genetickou kontrolou. Z toho plyne, že exkrece sulfidu musí být způsobena nerovnováhou mezi produkcí a spotřebou siřičitanu nebo interakcí s další sloučeninou. Akumulace v kvasince pak může vést k úniku volného i vázaného siřičitanu cytoplazmatickou membránou do kvasící mladiny.

Brewer a Fenton [46] zjistili, že během doby maximální produkce SO_2 je poměr aktivit enzymů APS/sulfidreduktafasi třikrát až šestkrát nižší u kmenů s nízkou produkcí SO_2 oproti kmenům s produkcí vysokou. Druhou možností je, že sulfid je odčerpáván tvorbou aduktů s acetaldehydem. Tím dochází k nedostatku methioninu a je aktivována absorpce a redukce síranu [39]. Aktivní kvasička kvasinka je předpokladem pro exkreci sulfidu, která ustává na konci fermentace, kdy jsou vyčerpány zdroje energie pro konverzi síranu. Na počátku fermentace začíná exkrece po lag-fázi a rychle roste poté, co je téměř vyčerpán methionin z média. Rozhodující je růst mezi lag fází a koncem fermentace. Dokud pokračuje růst, jsou vyšší požadavky na sirné aminokyseliny a exkrece sulfidu zůstává na nízké úrovni. Jakmile je růst ukončen, první část fetechce, která vede ke konverzi síranu na siřičitan, je stále aktivní, zatímco snížená potřeba sirných aminokyselin a nižší aktivita sulfidreduktafasi způsobují jeho akumulaci a exkreci, dokud je přítomen zkusitelný extrakt. Proto je exkretováno do média tím více sulfidu, čím více extraktu je zkvašeno po ukončení růstové fáze [37].

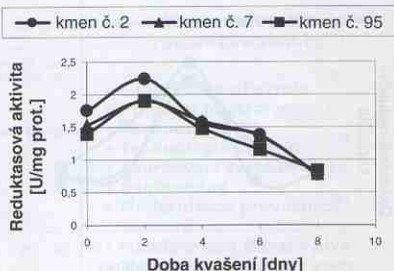
Kmen č. 7 se strmým nárůstem buněčné populace v exponenciální fázi vyčerpává energeticky potenciál a po docílení maxima růstové křivky aglutinuje a sedimentuje dříve než kmeny č. 2 a č. 95. Proto není schopen ve stejné míře v této fázi zkvašovat zbylý extrakt a produkce SO_2 je u něj nižší. Kromě toho se zřejmá budou u sledovaných kmenů i mírně lišit genetické dispozice odpovídající za iniciaci příslušných enzymů v metabolismu sirných sloučenin, což je podrobně popsáno např. v literární řeserši diplomové práce VŠCHT [20].

3.7 Rozdíly v 3-methylbutanal reduktasové aktivitě kvasničných kmenů během fermentace

Enzym 3-methylbutanalreduktaf



Obr. 13 Vliv násadní dávky kvasnic na tvorbu oxidu siřičitého při kvašení s kmenem č. 2 (T 10 °C)



Obr. 14 Vývoj aktivity 3-methylbutanal reduktasy při kvašení s třemi kmeny kvasnic (T 10 °C)

umožňuje kvasinkové populaci redukovat komponenty staré chuti příslušných aldehydů. Při stejné teplotě kvašení vykazoval nejvyšší aktivitu enzymu 3-methylbutanal reduktasy kmen č. 2, nejnižší kmen č. 7 (obr. 14). Maxima dosahovala tato aktivita v exponenciální fázi růstu kvasničných buněk, poté byl zaznamenán mírný pokles. Z příkladu kvasné zkoušky s kmenem č. 2 je patrné, že maximum reduktařské aktivity se zvýšilo při teplotě kvašení 13 °C v porovnání s kvašením při teplotě 10 °C, ale následný pokles v důsledku rychlejší inhibice enzymové aktivity byl důraznější (obr. 15). Při teplotě kvašení 7 °C nebyly rozdíly v aktivitě 3-methylbutanal reduktasy u všech tří kmenů výrazné během celé fermentace, aktivita byla celkově nižší, ale tendence vzestupu a poklesu se zachovaly.

3.8 Vliv kmene kvasnic na změny oxidačně-redukční kapacity zkvašované mladiny

Hodnota oxidačně-redukční kapacity vyjadřuje stav mladiny či piva z hlediska odolnosti vůči oxidačním změnám některých látek extraktu. Udává jakýsi poměr substancí v oxidované a redukované formě příslušných vratných reakcí.

Chapon a Kretschmer [47] prokázali určitou souvislost mezi redukční schopností a koloidní a senzickou stabilitou piva. Jejich výzkumy např. potvrdily význam fenolických sloučenin jakožto přirozených antioxidantů piva. Uchida a Ono [48] se domnívají, že senzická stabilita piva je determinována endogenní oxidační kapacitou, která je ovlivněna každým krokem pivovarského procesu od surovin po stažení. Výsledky stanovení oxidačně-redukční kapacity v mladině zkvašované paralelně kmeny č. 2, č. 7 a č. 95 metodami podle Kanedy [19], Chapona [21] a MEBAK [22], z nichž každá registruje rozdílné skupiny látek, neprokázaly vliv kmene kvasnic na toto kritérium (obr. 16, 17, 18). Neprokázal se ani významný vliv teploty kvašení. Nárůst oxidačně-redukční kapacity v prvních 28 hodinách kvašení lze spojit s nárůstem biomasy a spotřebou rozpouštěného kyslíku v mladině.

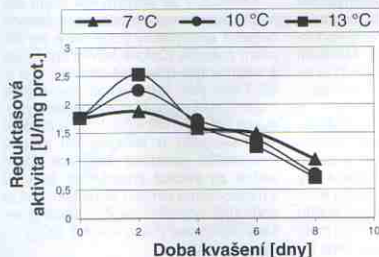
Z uvedených výsledků vyplynulo, že dominantní vliv na oxidačně-redukční vlastnosti piva má podíl sloučenin v redukované formě, pocházejících ze surovin, tj. sladu a chmele, a jejich změny způsobené podmínkami technologického procesu.

3.9 Průběh změn polyfenolů během pokusných fermentací

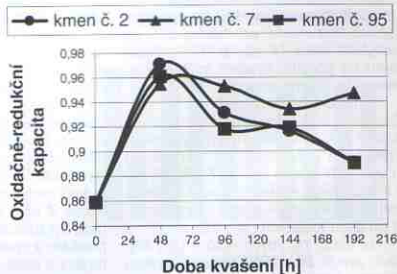
Polyfenolové sloučeniny piva mají významnou pozitivní i negativní účast ve fyzikálně-chemických a senzických vlastnostech piva [49]. Oxidované polyfenoly přispívají v různých reakcích k tvorbě koloidních zákalů i k „staré“ chuti piva. Naopak redukované formy podporují dlouhodobé uchování čerstvosti i „čerstvé“ chuti piva [50].

Účelné vysrážení v roztoku nestabilních, především oxidovaných polyfenolů a jejich vyloučení během chlazení mladiny a kvašení, je jedním z předpokladů zvýšení odolnosti piva proti tvorbě koloidních zákalů i senzických změn. Tento čírlí proces je do značné míry závislý na změnách pH a oxidačně-redukční kapacity fermentačního média, což jsou kritéria, která ovlivňují kromě technologických podmínek i vlastnosti použitého kmene kvasnic.

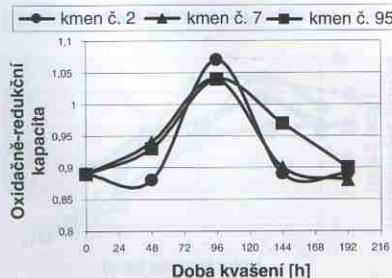
Z provedených modelových fermentací lze usuzovat na vliv teploty při poklesu hodnot celkových polyfenolů. Při vyšší průměrné teplotě hlavního kvašení se zaznamenal hlubší pokles hodnot celkových polyfenolů. Podobný závěr lze vyslovit pro snížení hladiny oxidovaných polyfenolů



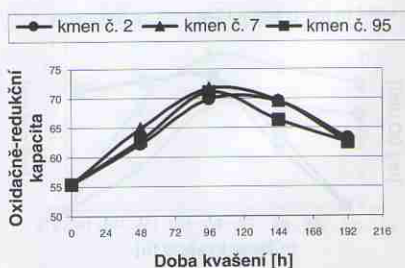
Obr. 15 Vliv teploty kvašení na změny aktivity 3-methylbutanalreduktasy u kmene č. 2 během fermentace



Obr. 16 Vývoj oxidačně-redukční kapacity zkvašované mladiny třemi kmeny kvasnic (metoda podle Kanedy, T 10 °C)



Obr. 17 Vývoj oxidačně-redukční kapacity zkvašované mladiny třemi kmeny kvasnic (metoda podle Chapona, T 10 °C)



Obr. 18 Vývoj oxidačně-redukční kapacity zkvašované mladiny třemi kmeny kvasnic (metoda podle MEBAK, T 10 °C)

v průběhu kvašení. Pokles oxidovaných polyfenolů při teplotě kvašení 13 °C dosahoval hodnot okolo 80 % v porovnání s koncentrací ve výchozí mladině. Vliv teploty kvašení na změny oxidovatelných polyfenolů se nepotvrdil. Nebyl zjištěn podstatný rozdíl v hodnotách poklesu sledovaných skupin polyfenolových sloučenin při fermentaci s kmeny č. 2, č. 7 a č. 95 za stejných technologických podmínek, což naznačuje, že vlastnosti použitého kmeny kvasnic nemají významnou roli v procesu snižování hladin polyfenolových sloučenin během kvašení.

4 ZÁVĚR

Správný výběr kmeny kvasnic a jeho fyziologický stav ovlivňují nejen plynulý průběh technologie a docílení základních chemických a biochemických znaků a typického buketu daného druhu piva, ale mohou přispět i k oddálení tvorby koloidních zákalů a senzorických změn výrobku během skladování.

Literatura

- [1] Basařová, G., Vernerová, J., Ševčík, L., Janoušek, J.: Kvasný Prum. 43, 1997, s. 164.
- [2] Ilett, D. R.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am., 32, 1995, s. 213.
- [3] Fernandes S. M., V., Rangel, A. O. S. S.: J. Inst. Brew. 104, 1998, s. 203.
- [4] Kaneda, H. et al.: J. Inst. Brew. 97, 1991, s. 105.
- [5] Kaneda, H.: Proc. 24th EBC, Oslo, 1996, s. 116.
- [6] Hansen, J., Kjelland-Brandt, M. C.: Proc. 25th EBC, Brussels, 1995, s. 319.
- [7] Vernerová, J., Mikyška, A., Basařová, G.: 29, 1983, s. 121.
- [8] Narzias, L.: Brauwelt 45, 1995, s. 2286.
- [9] Basařová, G., Mikyška, A.: Kvasný Prum. 28, 1982, s. 218.
- [10] Forster, C., Back, W.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 37, 2000, s. 59.
- [11] Debouq, A., Laurent, M., Goossens, E., Borremans, E., Van de Winkel, L., Masschelein, C. A.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 52, 1994, s. 100.
- [12] Van Nederveelde, L., Verlinden, D., Philipp, D., Debouq, A.: Proc. 26th EBC, Maastricht, 1997, s. 447.
- [13] Veselý, P., Van Nederveelde, L.: Purifikace kvasnic 3-methylbutanol reduktasy a její vliv na redukci aldehydů během hlavního kvašení, 30. Pivovarsko-sládařský seminář, Plzeň, 4. – 5. 10. 2000.
- [14] Laurent, M., Geldorf, B., Van Nederveelde, L., Dupire, S., Debouq, A.: Proc. 25th EBC, Brussels, 1995, s. 337.
- [15] Trevelyan, W. E., Harrison, J. S.: J. Biochem. 63, 1956, s. 23.
- [16] Kovaly A.: Metody výběru, posouzení a zavádění nových kmenů pivovarských kvasinek do praxe, Disertační práce kandidáta věd (CSc.), VŠCHT, Praha, 1992.
- [17] Hutter, K. J., Remot, M., Müller, S.: Monatsschr. Brauwiss. 53, 2000, s. 68.
- [18] Hinchliffe, E., Box, W. G., Walton, E. F., Appleby, M.: Proc. 20th EBC, Helsinki, 1985, s. 323.
- [19] Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusako, S., Sahara, H., Koshino, S.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 32, 1995, s. 90.
- [20] Želízková, Z.: Vliv kmeny kvasnic na oxidačně-redukční vlastnosti piva. Diplomová práce VŠCHT, Praha, 2002.
- [21] Chapon, L., Louis, C., Chapon, S.: Proc. 13th EBC, Estoril, 1971, s. 307.
- [22] Basařová, G.: kol.: Pivovarsko-sládařská analytika 1, 2, 3, Merikanta, Praha, 1992 (1.díl), 1993 (2. a 3. díl).
- [23] Boyd, A.: J. Inst. Brew. 106, 2000, s. 319.
- [24] Šližová, M.: Aplikace fluorescenčních metod ke studiu morfologických a fyziologických vlastností pivovarských kvasinek, Diplomová práce VŠCHT, Praha, 2001.
- [25] Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E.: FEMS Mikrobiol. Lett. 9, 1980, s. 29.
- [26] Kobayashi, O., Hayshi, N., Sone, H.: Proc. 25th EBC, Brussels 1995, s. 361.
- [27] Teixeira, J. M., Teixeira, J. A., Mata, M., Manuela, M., Guerra, B., Machado Cruz, J. M., Sá Almeida, A. M.: Proc. 23th EBC, Lisbon, 1991, s. 241.
- [28] Wataci, J., Takata, V., Muramori, J., Koshino, S.: Genetic Engineering (EBC 1991) s. 297.
- [29] Masschelein, C., A., Jeunehomme – Ramos, Cl., Castiau, C., Dewreux, A.: J. Inst. Brew. 69, 1963, s. 332.
- [30] Steward, G. G., Russel, I.: J. Inst. Brew. 92, 1986, s. 540.
- [31] Basařová, G.: Studie racionalizace a modernizace postupů zvýšení koloidní stability piva. Disertační práce doktora technických věd (DrSc.), VŠCHT, Praha, 1977.
- [32] Basařová, G., Černá, I.: Kvasný Prum. 18, 1972, s. 55 a s. 78.
- [33] Basařová, G., Černá, I.: Kvasný Prum. 18, 1972, s. 145.
- [34] Basařová, G.: Brauwissenschaft 27, 1974, s. 244.
- [35] Basařová, G., Janoušek, J.: Kvasný Prum. 46, 2000, s. 46.
- [36] Basařová, G.: Kvasný Prum. 48, 2002, s. 61.
- [37] Crumple, R., D'Amore, T., Slaughter, C., Steward, G. G.: Proc. 24th EBC, Oslo, 1993, s. 267.
- [38] Bláha, M., Veselý, P., Basařová, G.: Vliv kmeny kvasnic na tvorbu oxidu siřičitého při pivovarském kvašení, Pivovarsko-sládařské dny Brno 2000 (poster), Kvasný Prum. 46, 2000, příloha s. 15.
- [39] Van Haecht, J. L., Dufour, J. F.: Cerevisia 20, 1995, s. 51.
- [40] Nordio, H.: Proc. 20th EBC, Helsinki 1985, s. 291.
- [41] Kaneda, H., Kimura, T., Kano, Y., Kashimo, S., Osawa, T., Kawakishi, S.: J. Ferment. Bioeng. 72, 1991, s. 26.
- [42] Uchida, M., Ono, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 58, 2000, s. 8.
- [43] Narzias, L., Reicheneder, E., Nothoff, H.: Brauwelt 122, 1982, s. 627.
- [44] Pickrell, A. T. W., Hwang, A., Axcell, B. C.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 49, 1991, s. 87.
- [45] Hansen, J., Kjelland – Brandt, M. C.: Proc. 25th EBC, Brussels, 1995, s. 319.
- [46] Brewer, J. D., Fenton, M.: Proc. 16th Int. Conv. Inst. Brew. (Aust. N.Z. Sect.), 1980, s. 155.
- [47] Chapon, L., Kretschmer, K. F.: Monatsschr. Brauwiss. 54, 2001, s. 181.
- [48] Uchida, M., Ono, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 46, 1996, s. 198.
- [49] Basařová, G.: Food Microstructure 9, 1990, s. 155.
- [50] Wackerbauer, K., Anger, H. M.: Monatsschr. Brauwiss. 34, 1984, s. 153.

PRŮTOKOVÁ PASTERACE



DN 50	75 - 150 hl/h
DN 65	115 - 230 hl/h
DN 80	180 - 360 hl/h
DN 100	275 - 550 hl/h

REGOM INSTRUMENTS s.r.o.



Tel.: 241 402 206
Fax: 241 400 290

www.regom.cz
regom@regom.cz

- Laboratorní přístroje
- Procesní přístroje
- Technologie CO₂
- Technologie kvasnic
- Vzorkovací systémy
- Engineering
- Modernizace provozních souborů
- Membránová filtrace piva
- Membránová úprava vody
- Souborův PT