

# VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ FLUORESCENČNÍ CYTOMETRIE PRO CHARAKTERIZACI ZÁKALŮ PIVA

## THE APPLICATION OF FLUORESCENT FLOW CYTOMETRY FOR CHARACTERIZATION OF BEER HAZE

PAVEL DOSTÁLEK, JAROMÍR FIALA, JAN NOVÁK, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství  
Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha

**Klíčová slova:** pivo, zákal, průtoková fluorescenční cytometrie, fluorescenční mikroskopie, analýza

**Keywords:** beer, haze, fluorescent flow cytometry, fluorescent microscopy, analysis

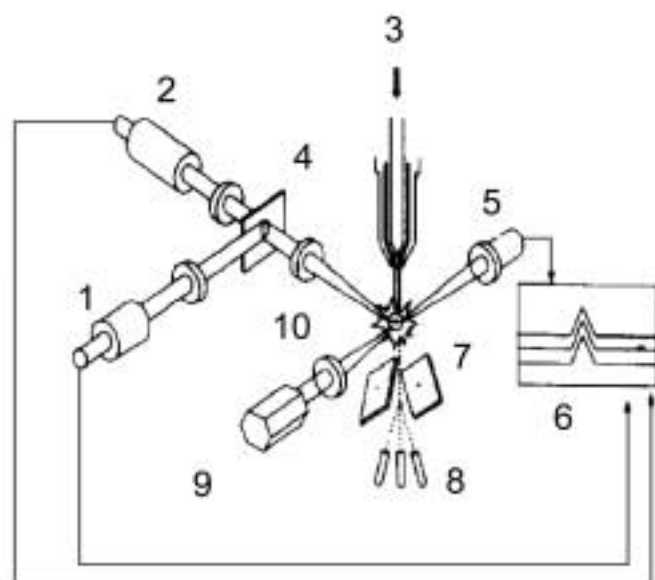
### 1 ÚVOD

Průtoková cytometrie je optická metoda, s níž lze získat informace o velmi malých částicích (mikronových a submikronových) v roztoku. Tato metoda se běžně používá na hodnocení intracelulárních komponent mikroorganismů [1]. Umožňuje pochopit a kontrolovat například dynamiku buněčného metabolismu a růstu, a díky tomu popsat kvašení. Touto metodou lze sledovat i buněčný cyklus, sledovat změny rychlosti růstu kvasinek, změny populace vyvolané mutacemi, měřit velikost a počet buněk nebo intracelulární pH. Použitím průtokové cytometrie lze zjistit poruchy kvašení ve velmi krátkém časovém intervalu [2, 3]. Podle našich zkušeností lze tuto metodu aplikovat také na hodnocení částic zákalu piva.

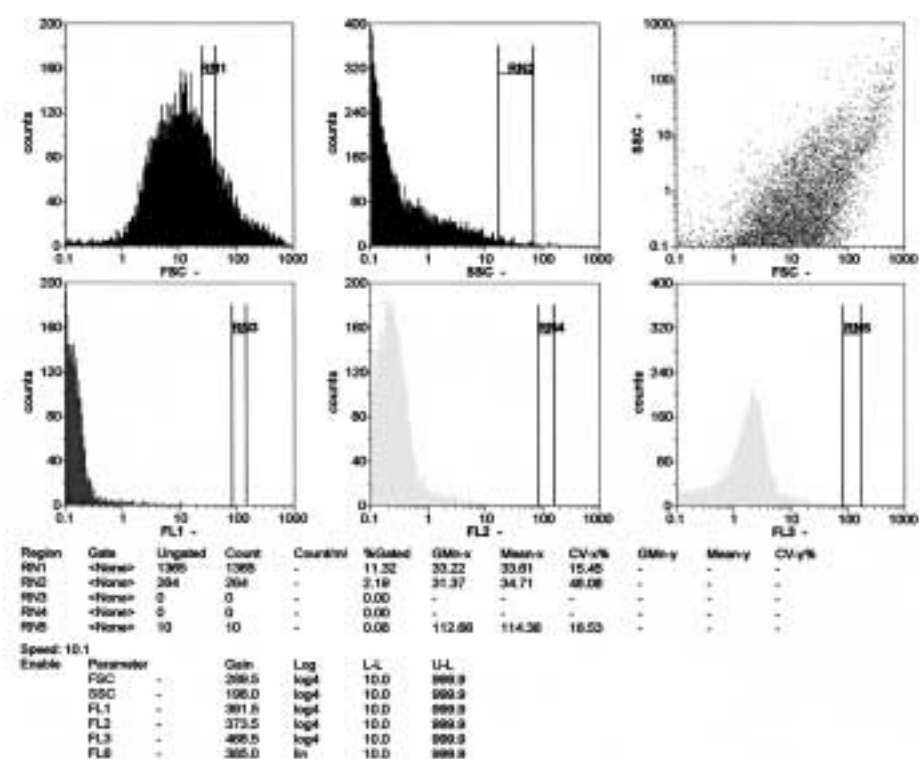
Průtoková cytometrie může být aplikována pouze na vzorky bez shluků částic. Vzorek je unášen v proudu tekutiny (voda, solný roztok, tlumivý roztok) a poté transportován trysek rovnoměrnou rychlostí do měřicí cely, kde je ozářován rtuťovou lampou nebo laserovým paprskem, který lze nastavit na požadovanou vlnovou délku. Rychlost toku tekutiny je 10 m.s<sup>-1</sup>, což umožňuje analyzovat 2 000 až 10 000 částic za sekundu. Oba světelné zdroje (HBO rtuťová lampy a argon-iontový laser nebo He-Ne-laser) mohou být použity k simultánní excitaci [4]. Částice dopadající světlo rozptýlí, odrazí nebo fluoreskují při určité vlnové délce, měří se tedy veličiny: úhel rozptylu, snímáný v přímém směru od světelného zdroje (Forward Angle – FSC) a odpovídající velikosti částic, úhel rozptylu, snímáný pod úhlem 90° od světelného zdroje (Side Angle SSC), popisující granularitu buňky, a fluorescence pro různé vlnové délky (fluorescence je také snímána pod úhlem 90° od světelného zdroje). Z těchto měřených veličin získáme informace o počtu procházejících částic, jejich tvaru, velikosti, morfologii a dalších vlastnostech [5, 6, 7, 8, 9].

Obdržené signály lze detekovat jedním nebo více detektory. Většina přístrojů má dva detektory rozptylu světla:

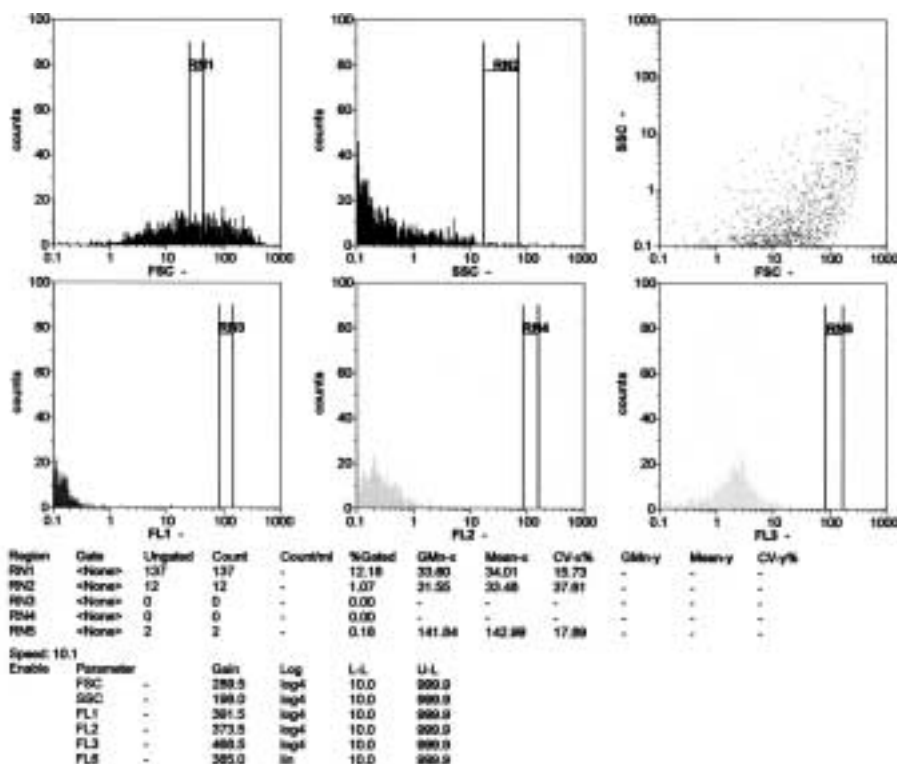
LAS (Low Angle Scatter) detektor, snímající malý úhel rozptylu a HAS (High Angle Scatter) detektor, snímající velký úhel rozptylu. LAS detektor snímá záření vzniklé rozptylem světla na povrchu částice, měří tedy velikost částic, zatímco HAS detektor snímá záření vzniklé rozptylem paprsku světla po průchodu částicí, čímž podává informace o vnitřní struktuře buňky. Při použití těchto detektorů mohou být částice obarveny fluorescenčními barvami, která



Obr. 1 – Schéma průtokového cytometru (1 – senzor fluorescence, 2 – senzor fluorescence, 3 – suspenze buněk, 4 – průtoková komůrka, 5 – senzor rozptylu, 6 – zpracování signálu, 7 – odchylovací destičky, 8 – sběrače buněk, 9 – laser, 10 – snímací prostor)



Obr. 2 – Záznam z cytometru – pivo nefiltrované přes membránový filtr 0,2 μm



Obr. 3 – Záznam z cytometru – pivo filtrované přes membránový filtr 0,2 µm

jsou specifická pro různé struktury částic, nebo je fluorescence závislá na aktivitě částice (propustnost pro fluorescenční barviva). Fluorescence je pak měřena jako autofluorescence nebo jako fluorescence molekul značkovací látky.

Měřená světelná intenzita je převedena detektorem na pulsy napětí, které jsou tříděny ve vzrůstajícím pořadí do elektrických kanálů záznamových ploch. Pulsy napětí jsou často velmi slabé, a musí být proto zesíleny.

Výsledky analýzy mohou být vyjádřeny mnoha způsoby, např. vynesením odezvy LAS detektoru proti distribuci intenzity fluorescence nebo relativního počtu částic proti distribuci intenzity fluorescence. Výsledky lze vyjádřit též dvou- a třidimenzionálně his-

togramem nebo bodovým diagramem pro dvě charakteristiky. Každý bod diagramu odpovídá jedné měřené částici. Mezi nejčastěji používaný bodový diagram v průtokové cytometrii patří tzv. dotplots diagram, který udává závislost dvou korelujících parametrů (vlastností buněk), např. popisuje závislost velikosti buněk (FSC) na jejich granularitě (SSC).

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Filtrace vzorku

Pro filtraci vzorku piva byla použita membránová filtrace. Vzorek byl filtrován přes membránový filtr 0,2 µm, 0,45 µm podle potřeby pro zakoncentrování zákalu. Pro svou inertnost byl použit teflonový mikrofiltr.

### 2.2 Barvení vzorku

Pro specifické barvení komponentů zákalu byl použit fluorescein isothiokyanát (FITC) – barvení bílkovin, Fluostain I – barvení polyfenolů a Fura-2 – barvení vápníku.

### 2.3 Průtoková fluorescenční cytometrie

Byl použit průtokový cytometr PAS III, výrobce Partec. Získané výsledky byly zpracovány programem WinMDI 2.8. Schéma průtokového fluorescenčního cytometru je znázorněno na obr. 1.

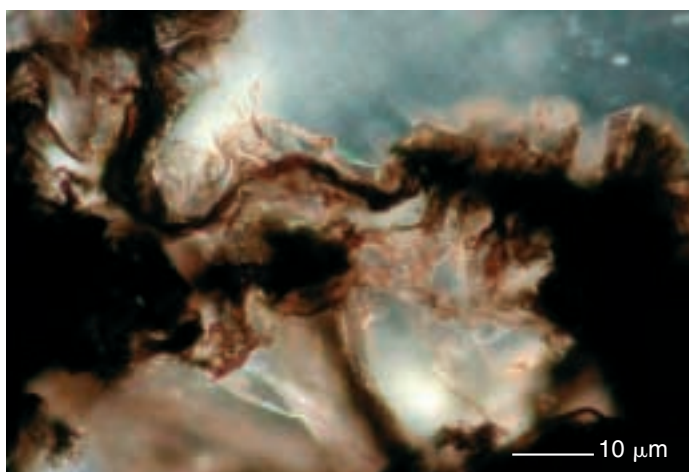
### 2.4 Fluorescenční mikroskopie

Zákalotvorné částice byly mikroskopovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX-51 s digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-300Zoom. Byla použita speciální fluorescenční kostka (filtr) pro zobrazení polyfenolických a bílkovinných částic. Zvětšení 100 až 400x.

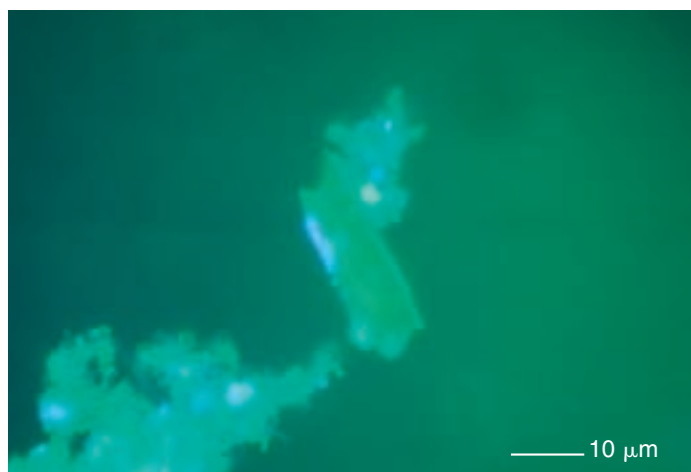
## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí fluorescenčních metod byly analyzovány nebiologické zákalu piva. Pro velmi jemné částice zákalu jsme použili průtokovou fluorescenční cytometrii. Pivo jsme přímo dávkovali do cytometru a měřili FSC a SSC při excitační vlnové délce 488 nm argon-iontového laseru – a to v přímém průchodu a při úhlu 90°, zároveň se snímala fluorescence na třech barevných kanálech. Označení RN je rozpětí latexových kalibračních částic o průměru 3 µm. Příklad měření pro nefiltrované pivo je uveden na obr. 2. Příklad měření filtrovaného piva (filtrované přes membránu o velikosti pórů 0,2 µm) je na obr. 3. Takto lze vyhodnocovat zákal, pokud nejsou v roztoku velmi velké částice.

Jestliže chceme charakterizovat větší částice, musíme použít fluorescenční mikroskopii. Sraženinu můžeme zakoncentrovat membránovou filtrací. Podle množství částíček zákalu pak



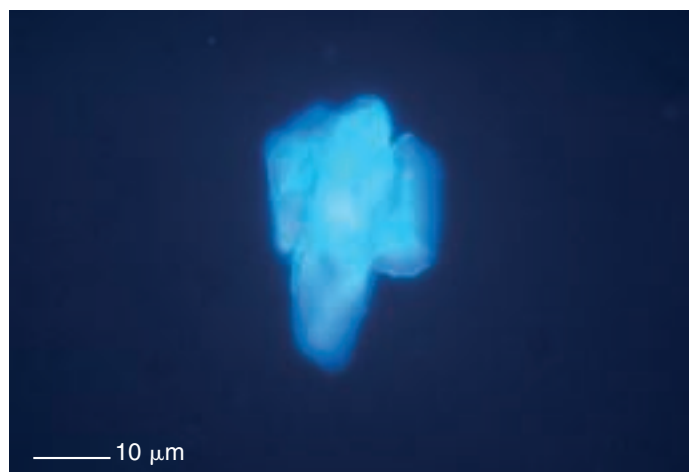
Obr. 4 – Mikrofotografie zákalu



Obr. 5 – Mikrofotografie zákalu – barveno FITC – specifické fluorescenční barvivo pro bílkoviny



Obr. 6 – Mikrofotografie zákalu – barveno barvivem Fluostain I – specifické fluorescenční barvivo pro polyfenoly



Obr. 7 – Mikrofotografie zákalu – barveno barvivem Fura-2 – specifické fluorescenční barvivo pro vápník

volíme objem piva, který budeme filtrovat. Pro filtraci je vhodný membránový filtr o průměru pórů 0,45 μm. Při membránové filtraci je zachycena sraženina a zákal na filtru. Detail zákalu je zobrazen na obr. 4. Na tomto obrázku je nativní masivní zákal bez fluorescenčního barvení. Pro zvýšení specifity a pro určení složení zákalu můžeme, stejně jako v případě fluorescenční průtokové cytometrie, použít specifické fluorescenční barvení. Částičky byly charakterizovány barvením pomocí FITC (obr. 5) a Fluostainu I (obr. 6) na bílkovinný a polyfenolický materiál.

Specifické barvení je možné i u oxalátových zákalů. Příklad mikrofotografie je na obr. 7, kde byly pomocí sondy Fura-2 prokázány vysoké koncentrace vápníku v oxalátu vápenatém.

#### 4 ZÁVĚR

- Fluorescenční barvení je velmi účinným nástrojem pro přesnou charakterizaci zákalů piva.
- Distribuce velikosti částic a jejich charakter doplňuje charakterizaci zákalu.
- Charakterizaci zákalu a zjištění jeho příčiny je možné využít při použití průtokové fluorescenční cytometrie, případně fluorescenčního mikroskopu s analýzou obrazu pro doplnění informace.
- Je možné i zakoncentrování částic na speciálních membránách.

#### Literatura

- [1] Hutter, K.L., Schärfe, J.: Biomonitoring in praxis mit fluoreszenzoptischen Verfahren. VI. Mitteilung: Zellzahl- und Zellvolumenanalysen. Monatsschr. Brauwiss. **50**, 1997, s. 4-11.
- [2] Hutter, K. J., Mueller, S., Herber, M.: Biomonitoring of working yeasts in practice by the fluorescence optical method. Part 3. Functionality tests of yeast cells. Monatsschr. Brauwiss. **49**, 1996, s. 164-70.
- [3] Müller, S. et al.: Flow-Cytometric Investigation of Sterol Content and Proliferation

Activity of Yeast. Acta Biotechnol. **12**, 1992, s. 365-375.

- [4] Hutter, K. J.: Flusszytometrische Prozesskontrolle untergäriger Bierhefen, Monatsschr. Brauwiss. **54**, 2001, s. 13-27.
- [5] Hollerová I.: Rychlé metody stanovení kontaminace piva. Kvasny Prum. **44**, 1998, s. 67.
- [6] Porro, D. et al.: Analysis of the respiratory activity in growing budding yeast by flow cytometry. Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, Elsevier Science B.V., 1994, s. 577-580.
- [7] Edwards, C. et al.: Flow Cytometry and Microbiology. SGM Quarterly **33**, 1992, s. 105-108.
- [8] Deere, D. et al.: Flow Cytometry and Cell Sorting for Yeast Viability Assessment and Cell Selection. Yeast **14**, 1998, s. 147-160.
- [9] Fiala, J., Lloyd, D. R., Rychtera, M., Kent, C. A., Al-Rubeai, M.: Evaluation of cell numbers and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by different counting methods. Biotechnol. Tech. **13**, 1999, s. 787-795.

Zpracováno na základě přednášky  
na 31. Pivovarsko-sladařském semináři  
25.-26. 9. 2002 v Plzni  
Do redakce došlo 3. 3. 2003

**Dostál, P. – Fiala, J. – Novák, J.: Využití průtokové fluorescenční cytometrie pro charakterizaci zákalů piva.** Kvasny Prum. **49**, 2003, č. 4, s. 90-93.

Průtoková cytometrie je optická metoda, s jejíž pomocí můžeme získat různé informace o částicích s velmi malým průměrem (mikronových a submikronových částicích). Obvykle se používá pro charakterizaci růstových a morfologických charakteristik buněčných populací včetně jejich intracelulárního složení. Na téma aplikace průtokové cytometrie na pivovarské kvasinky již bylo publikováno několik článků. Její pomocí můžeme monitorovat a řídit dynamiku růstu a metabolismu pivovarských kvasinek a můžeme také daleko lépe popsat zakvašování a kvašení piva. S výhodou lze použít i fluorescenční barvení některých specifických složek a látek.

Využili jsme průtokovou cytometrii k analýze vzorků pivovarských zákalů. Měřili jsme počet částic zákalu, jejich průměr a jejich distribuci. Protože zákal piva sestává z částic, které obsahují také různé látky, zkusili jsme

aplikovat fluorescenční barvení také na částice zákalu piva. Pro charakterizaci částic většího průměru jsme použili fluorescenční mikroskopii. Pro toto barvení jsme použili FITC, Fluostain I a Fura-2, což jsou specifická fluorescenční barviva pro bílkoviny, fenolické látky a vápník.

**Dostál, P. – Fiala, J. – Novák, J.: The Application of Fluorescent Flow Cytometry for Characterization of Beer Haze.** Kvasny Prum. **49**, 2003, No. 4, p. 90-93.

Flow cytometry is an optical method. Results obtained by this method contain different information about particles with very small diameters (micron and submicron particles) in solution. This method is usual applied to evaluation of growth and morphological characteristics of cell populations included their intracellular components and compounds. There are several papers dealing with application of flow cytometry to brewing yeast cells. We can monitor and control dynamics of yeast cell growth and metabolism by flow cytometry and we can more detailed describe brewing fermentation and yeast pitching. We can use also fluorescent staining for some specific components and substances.

We analysed samples of beer hazes by these methods. We measured number of haze particles, their diameters and distribution. As beer haze consist particles, which contain also several substances we tried to apply fluorescent staining for characterization of beer hazes. We applied also fluorescent microscopy for characterization of beer hazes consist from particles with the greater diameters. We used FITC, Fluostain I and Fura-2 for staining of particles. These dyes were fluorescent specific bounded to proteins, phenolic substances and calcium.

**Dostál, P. – Fiala, J. – Novák, J.: Applikation der Durchfluss-Fluoreszenz-Cytometrie zur Charakteristik der Biertrübungen.** Kvasny Prum. **49**, 2003, Nr. 4, S. 90-93.

Die Durchfluss-Cytometrie ist eine optische Methode, die ermöglicht, verschiedene Informationen über Partikel mit einem sehr kleinen Durchmesser (Mikron- und Submikronpartikel) zu gewinnen. Gewöhnlich wird diese Methode zur Charakteristik der Wachstums- und morphologischen Eigenschaften von Zellenpopulationen einschliesslich ihrer intrazellulären Zusammensetzung ange-



wand. Zum Thema der Applikation der Durchfluss-Cytometrie auf die Brauerei-Hefen wurden bereits einige Mitteilungen veröffentlicht. Mittels dieser Methode können wir die Wachstums- und Metabolismus-Dynamik der Brauereihefen monitorieren und regeln; sie hilft weiter auch dazu, die Angärung und Gärung des Bieres besser zu beschreiben. Mit Vorteil kann auch die Fluoreszenz-Färbung einiger spezifischer Komponenten und Substanzen appliziert werden.

Die Autoren benutzen die Durchfluss-Cytometrie zur Analyse der Biertrübungen. Es wurde die Zahl der Trübungspartikel, ihr Durchmesser und ihre Distribution gemessen. Weil Biertrübungen aus Partikeln bestehen, die auch verschiedene Substanzen enthalten, versuchten die Autoren, die Fluoreszenz-Färbung auch auf die Partikel der Biertrübungen zu applizieren. Zur Charakterisierung der Partikel von grösserem Durchmesser wurde die Fluoreszenz-Mikroskopie angewandt. Für diese Färbung wurde FITC, Fluostain I und Fura-2 benützt – spezifische Fluoreszenz-Färbungsmittel für Eiweissstoffe, phenolische Substanzen und Kalzium.

**Досталек, П. – Фиала, Й. – Новак, Й.: Использование проточной флуоресцентной цитометрии для характеристики помутнения пива.** Kvasny Prum. 49, 2003, No. 4, стр. 90–93.

Проточная цитометрия представляет оптический метод, с помощью которого можно получить разную информацию о частицах очень малого диаметра (частицы порядка микронов и субмикронов). Обыкновенно применяется для характеристики свойств роста и морфологии совокупности клеток, включая их внутриклеточный состав. По теме использования проточной цитометрии в области пивоваренных дрожжей было опубликовано много статей. Ее помощью можно проводить мониторинг и управлять динамикой роста и метаболизма пивоваренных дрожжей и намного лучше описать разбраживание и брожение пива. Выгодным является использование флуоресцентного крашения некоторых специфических компонентов и веществ.

Авторы использовали проточную цитометрию для анализа образцов помутнения пива. Были измерены количество частиц помутнения, их диаметр и состав. Так как помутнение пива состоит из частиц содержащих также разные вещества, проверялась возможность применения флуоресцентного крашения частиц помутнения пива. Для характеристики частиц большего диаметра была использована флуоресцентная микроскопия. Для крашения был использован FITC, Флуостайн I и Фура-2 – специфические флуоресцентные красящие вещества для белков, фенольные вещества и кальция.

## Pivo a sklo, sklo a pivo

Pivo a sklo – to bylo téma dalšího z kulatých stolů, neformálních setkání s novináři, které pravidelně pořádá Český svaz pivovarů a sladoven. Nejednalo se tentokrát o mnohokrát již diskutovanou, ale stále palčivou a nedořešenou otázku sklo versus plast (myslím, že většina příznivců dobrého piva má v této věci zcela jasno!), čili transport ke spotřebiteli, ale o problematiku podávání nápoje, vlastně o kulturu pití piva.

Jediným přednášejícím, ovšem nadmíru povolaným, byl ředitel společnosti Sahm, s.r.o. Ing. Pavel Bobošik. Záměrně uvádím přednášejícím, protože vystoupení Ing. Bobošika bylo odbornou, ale velmi poutavou přednáškou, která ukázala přítomným novinářům, že vztah nápoje a nádoby, ze které je konzumován, je velmi těsný, a že navrhování designu pivního skla je skutečně věda.

Jistě, existují situace, kdy i fajnšmekři uhasí palčivou žízeň pivem přímo z lahve, plechovky nebo (není-li zbytlí) z papírového kelímku, ale určitě není třeba nikoho přesvědčovat, že pohled na čerstvě načepované pivo v tvarově krásné, čisté sklenici probudí ty nejlíbivější pocity. Koneckonců snad žádná reklama na pivo se neobejde bez pohledu na ušlechtilý nápoj v živých tónech obalu. Čiré sklo dává vyniknout barvě, propustí odlesky, které ukáží, jak živý a krásný je nápoj uvnitř, umožní pozorovat rej stoupajících bublinek, hustá čepice pěny při postupném upíjení zanechává na stěnách bílé kroužky. Vizuální vjemy jsou trvalejší a mnohem důraznější než slovní popisy.

Zdálo by se, že pivo a sklo k sobě patří odjakživa. Překvapí proto, že pivní sklenice se vlastně začaly vyrábět až na počátku minulého století. I když, to překvapení vlastně nemusí být až tak velké, vezmeme-li v úvahu přinejmenším dva faktory: náročnost výroby skla (a tudíž jeho cenu) a také charakter výroby a distribuce piva v minulosti. Dokud se pivo pilo nefiltrované, tedy více či méně zakalené, mnohem lépe jeho konzumentům vyhovovaly kameninové nebo mrazné nádoby.

Teprve když se začalo pivo filtrovat (z důvodů estetických i kvůli delší trvanlivosti), vstoupili do hry mistři sklářského řemesla. Vývoj prošel několika fázemi, během nichž se zvyšoval význam pivního skla pro podporu konzumace a budování příznivého image piva. V současné době, kdy je kvalita piv na vysoké úrovni, piva jsou si chuťově do značné míry podobná, hůře rozeznatelná, je pivní sklo velmi významným marketingovým nástrojem pro budování značky.

Možnosti pivního skla jsou velké (mimo jiné lze tvarem sklenice ovlivnit vnímání sensorických vlastností téhož piva, jak dokázal test, který provedla firma SAHM v Německu) a problematika velmi zajímavá. Určitě se k ní v některém z příštích čísel Kvasného průmyslu vrátíme.

(več)

## Technologie UV

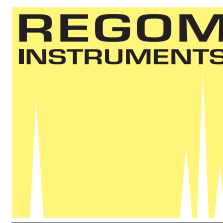
**Hanovia**  
WORLD CLASS UV

Biologická čistota. Technologie UV záření jsou používány k čištění vody, odpadních vod, vzduchu a pro široké spektrum materiálů zahrnující potravinářskou výrobu. Potřebná biologická čistota se především týká vody a aplikací s vodou spojených, např. pitná voda, opakované použití odpadních vod, příprava vysoce čisté vody pro výrobu polovodičů a fotolýza pesticidů. Taktéž je UV záření značně používáno pro desinfekci vzduchu v klimatizačních jednotkách a prostorech tanků stejně jako pro odstranění zápachu nebo ošetření povrchu potravin.



**REGOM INSTRUMENTS s.r.o.**

*Váš spolehlivý partner*



**BRABCOVA 2 / 1159**

**147 00 PRAHA 4**

**Tel.: 241 402 206**

**Fax: 241 400 290**

**www.regom.cz**  
**regom@regom.cz**