VIABILITA A VITALITA KVASNIC V PROVOZNÍM KVAŠENÍ

YEAST VIABILITY AND VITALITY IN BREWERY FERMENTATION

PETR KOŠIN^{2,1}, JAN ŠAVEL¹, IRENA KOLOUCHOVÁ², ADAM BROŽ^{1,2}

¹ Budějovický Budvar, n. p., Karoliny Světlé 4, 370 21 České Budějovice,

² Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, FPBT VŠCHT, Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Košin, P. – Šavel, J. – Kolouchová, I. – Brož, A.: Viabilita a vitalita kvasnic v provozním kvašení. Kvasny Prum. 53, 2007, č. 2, s. 30–34.

Vybrané moderní metody měření viability kvasnic, ač jsou kvůli vyšší přesnosti vhodné pro speciální a výzkumné úkoly, neposkytovaly v běžné provozní praxi podstatné výhody proti dosud používanému barvení methylenovou modří. Při stanovení vitality kvasnic vykazoval acidifikační test vyšší přesnost, ale také pracnost ve srovnání s deflokulačním testem. Žádný z testů neumožňoval předpovědět průběh hlavního kvašení při používání kvasnic, uchovávaných a ošetřovaných podle zásad správné výrobní praxe. Uvádí se rychlá modifikace acidifikačního testu, založená na zkrácení počtu promývání kvasnic před přidávkou roztoku glukosy.

Košin, P. – Šavel, J. – Kolouchová, I. – Brož, A.: Yeast viability and vitality in brewery fermentation. Kvasny Prum. 53, 2007, No. 2, p. 30–34.

Selected modern methods for viability assessment, although are due to higher accuracy suitable in yeast research or in solving some of the special tasks in fermentation technology, did not bring any significant advantages to brewery routine compared to the conventional staining with methylene blue. Acidification power test showed to be more accurate but also more time consuming compared to deflocculation test. None of these vitality tests was able to predict fermentation performance of yeast at full scale brewery fermentation, when yeast were stored and treated according to principles of good manufacturing practice. Rapid modification of acidification power based on reduction of washing steps of analyzed yeasts test is shown.

Košin, P. – Šavel, J. – Kolouchová, I. – Brož, A.: Die Hefelebensfähigkeit und -Vitalitätsbestimmung während der Gärung in einer Bierbrauerei. Kvasny Prum. 53, 2007, Nr. 2, S. 30–34.

Die höhere Genauigkeit von modernen Messmethoden der Hefelebensfähigkeit und Vitalitätsbestimmung ist zwar für eine spezielle Zwecke oder für eine Forschung sehr geeignet, jedoch für die tägliche Betriebsbestimmung im Vergleich mit der üblich angewandte Methode der Methylenchloridfärbung nicht mehr so verteilhaft ist. Während der Hefelebensfähigkeitsbestimmung wies der Azidifikationstest im Vergleich mit einem Deflokulationstest zwar eine bessere Messgenauigkeit aber auch einen höheren Arbeitszeitaufwand auf. Keiner von diesen Testen konnte jedoch für eine Vorhersage des Hauptgärungsprozessverlaufes unter Anwendung recht gepflegten Heffe angewandt werden. Es wird eine Modifikation des schnellen Azidifikationstests auf Grund der Heffewaschzahlminderung vor der Glukoselösungszugabe beigeführt.

Кошин, П. – Шавел, Я. – Колоухова, И. – Брож, А.: Виабилита и виталита дрожжей в производственном брожении. Kvasny Prum. 53, 2007, No. 2, стр. 30–34.

Избранные современные метода измерения виабллиты дрожжей неоказывали в производственной практике значительные преимущества по сравнению с до сих пор практикуемым крашением метиленовой лазурью, хотя оны из-за точности удобные для специальных и исследовательских заданий. При определении виталиты дрожжей показывался АР-тест более точным, но трудоемким по сравнению с тестом дефлокуляции. Ни один тест не позволял предсказать течение брожения с применением дрожжей храненых на принципах правильной производственной практики. Вводится быстрая модификация АР-теста, основанная на сокращении числа промывок дрожжей перед добавкой глюкозы.

Klíčová slova: kvasinky, vitalita, viabilita

Keywords: yeast, vitality, viability

1 ÚVOD

Stav kvasnic nasazovaných v provozním kvašení má zásadní vliv na výslednou kvalitu produktu, proto je jeho kontrola nedílnou součástí každodenní pivovarské praxe. Provozní kvasnice se nejčastěji hodnotí stanovením viability a vitality, dále se například posuzuje mikrobiologická čistota. Viabilita je chápána jako podíl živých buněk a vitalita vyjadřuje fyziologický stav dané buněčné populace [1].

Pro hodnocení **viability** se v pivovarech běžně používá barvení methylenovou modří. V literatuře lze nalézt více variant této metody, které se liší v koncentraci barviva nebo v roztoku použitým pro rozpuštění barviva [1, 2, 3, 4]. Fosfátová methylenová modř o pH 4,6 se podle starších prací používá v koncentraci 0,02 % [3], později se doporučuje koncentrace 0,01 % [4]. Při použití koncentrovanějšího barviva lze po smíchání s kvasničnou suspenzí preparát ihned pozorovat pod mikroskopem [3], u 0,01 % barviva se zařazuje 1–5minutová inkubační doba [4]. Další rozšířenou metodou je barvení methylenovou modří rozpuštěnou na koncentraci 0,01 % v dvoupromcentním citrátovém ústojném roztoku. Metodu přípravy tohoto barviva lze nalézt v literatuře na mnoha místech [1, 2, 5, 6],

nikde ale není přesně specifikováno, jestli se jako ústojný roztok používá citrát monosodný, disodný nebo trisodný, ani pH výsledného roztoku. Pravděpodobně se jedná o dihydrát citrátu disodného, který má ze všech tří pH nejbližší k neutrálnímu. Jako další rozpouštědlo methylenové modří lze použít destilovanou vodu [1, 4].

Barvení kvasinek methylenovou modří je v literatuře vytykána nepřesnost při nižších hodnotách viability a nesnadné vyhodnocování výsledků [1, 2, 5]. Jako alternativa se doporučují přesnější fluorescenční barvicí metody, ať již ve spojení s fluorescenčním mikroskopem, nebo průtokovým cytometrem. Vhodná barviva mohou být například propidium jodid (PI), fluorescein diacetát (FDA) nebo 1-anilin-8-naftalen sulfonát hořečnatý (Mg-ANS), který je doporučován i analytickou komisí EBC [4]. PI je interkalační barvivo vážící se na nukleové kyseliny buněk s porušenou plazmatickou membránou [7], Mg-ANS se váže na bílkoviny stejných buněk [8] a FDA je elektroneutrální nefluorescenční substrát esteraz, který je po hydrolyze jako fluoreskující fluorescein díky náboji zadržován v neporušených buňkách [7].

Jako nefluorescenční alternativu methylenové modře lze použít methylenovou violet,

kteřá po obarvení poskytuje jasnější odlišení obarvených a neobarvených buněk, a tím i snadnější vyhodnocení výsledků [2].

Základním požadavkem pro jakoukoli analytickou metodu používanou v pivovarské praxi je nenáročnost provedení a rychlá dostupnost výsledků, proto nejsou pro stanovení viability v praxi příliš rozšířeny kultivační metody.

Pro posouzení **vitality** kvasinek bylo navrženo mnoho různých metod, jejichž základní dělení je na testy sledující metabolickou aktivitu (test acidifikační schopnosti, vitální titrace, měření intracelulárního pH atd.) a testy sledující obsah některé vnitrobuněčné komponenty (glykogenu, trehalosy, sterolů a nenasycených mastných kyselin atd.) [1]. Výsledek testů vitality má pomoci předpovídat výkon kvasnic při kvašení. Žádný z těchto testů se ve větší míře nerozšířil do provozních pivovarských laboratoří.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Mikroorganismy

Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*, kmen č. 2 podle sbírky VÚPS. Vzorky se odebíraly z kvasničných zásobních tanků pivovaru.

2.2. Chemikálie a roztoky

PBS (Phosphate buffer saline) se připravil rozpouštěním 8,5 g NaCl, 1,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,25 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 1 litru destilované vody.

Všechny ostatní chemikálie pocházely od Sigma Aldrich.

2.3 Barvení methylenovou modří a methylenovou violetí

K barvení se použila fosfátová methylenová modř o koncentraci 0,01 % nebo 0,02 %, popř. citrátová methylenová violet o koncentraci 0,01 % [2, 3, 4].

2.4 Barvení s PI a FDA

Propidium jodid se rozpustil v redestilované vodě na koncentraci 1 mg.ml⁻¹ a skladoval při teplotě 4 °C v temnu. Zásobní roztok FDA se získal rozpouštěním v acetonu na koncentraci 10 mg.ml⁻¹ a byl skladován v temnu při teplotě -20 °C. Ze zásobního roztoku se připravoval pracovní roztok FDA o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ ředěním acetonem.

Kvasničná suspenze se promyla odstředěním 10 min při 1460 g (3000 min⁻¹) a resuspendováním v PBS a naředila pomocí PBS na přibližnou koncentraci 2,5.10⁷ buněk.ml⁻¹. Do mikrozkuřavky se napipetovalo 1 ml kvasničné suspenze, 10 µl PI a 80 µl FDA. Po promíchání se mikrozkuřavka nechala inkubovat 10 minut v temnu. Pro pořizování mikrofotografií bylo nutné odstranit fluorescenci pozadí buněk odstředěním (1460 min⁻¹, 5 min) a resuspendováním obarvených buněk v PBS.

2.5 Barvení s Mg-ANS

Barvivo Mg-ANS (0,15 g) se rozpustilo v 1 ml absolutního ethanolu a doplnilo vodou do 50 ml na konečnou koncentraci 0,3 %. Buněčná suspenze (0,25 ml) o takové koncentraci, aby při pozorování mikroskopem bylo v pozorovacím poli mikroskopu přibližně 100 buněk, se v mikrozkuřavce smíchala s 0,25 ml Mg-ANS a nechala 5 minut inkubovat [4].

2.6 Deflokulační test

Neproprané kvasnice se odstředily (1460 min⁻¹, 10 min) ve válcové kyvetě a sediment se zředil pětkrát vodou, čímž vznikla

20% kvasničná suspenze. Kvasničná suspenze (1 ml) se smíchala s 4 ml roztoku sacharosy o koncentraci 10 % v další válcové kyvetě, která se odstředila 2 min při 1460 g. Po odstředění se kyveta ihned umístila do spektrofotometru a proměřila se závislost absorbance při 800 nm na čase [9]. Výsledek testu se vyjádřil jako rozdíl mezi absorbancí v 20. minutě a absorbancí na počátku testu.

2.7 Vitální titrace

Při testu se měří pokles pH alkalizovaného vzorku kvasnic, který je způsobený metabolicky aktivními kvasnicemi a odpovídá jejich vitalitě [10].

2.8 Test acidifikační schopnosti

Test se zakládá na měření poklesu pH kvasničné suspenze po přidavku sacharidického zdroje energie, který je přímo úměrný vitalitě kvasnic [11]. Provedení testu vycházelo z uspořádání dle Kara [12] a bylo mírně modifikováno pro urychlení stanovení (viz část 3.2).

2.9 Stanovení ústojné kapacity kvasničného supernatantu

Provozní kvasnice se odstředily, jejich supernatant odlil a titračně proměřila závislost jeho pH na přidavku 0,01 M HCl (tzv. první odstředění). Tento postup se třikrát opakoval po doplnění kvasničného sedimentu destilovanou vodou na původní objem a resuspendací (druhé, třetí a čtvrté odstředění).

2.10 Přístroje

Spektrofotometr CADAS 200 (Dr. B. Lange, Německo).

Fluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE 400 s fluorescenční kostkou Nikon B-2A (EX: 450 – 490 nm, DM 505 nm, BA 520 nm) (Japonsko).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Metody pro stanovení viability

Pro stanovení viability se porovnávalo pět různých technik barvení. Klasické světelné metody reprezentovalo barvení fosfátovou methylenovou modří (0,01 a 0,02 %) a citrá-

tovou methylenovou violetí. Fluorescenční techniky zastupovala kombinace barviv FDA + PI a barvení s Mg-ANS. Pro vyhodnocení barvení s fluorescenčními barvivy se použil fluorescenční mikroskop.

Pro porovnání metod se použily jen kvasnice běžně se vyskytující v pivovaru, tj. kvasnice o viabilitách 93–98 %. Kvasnice uměle usmrčené pro snížení viability se při těchto testech nepoužívaly. Pro rutinní využití barviva v pivovaru není důležitá schopnost přesně určit viabilitu kvasnic pod hranicí 90 %, jelikož kvasnice s podílem živých buněk pod 93 % se vyřazují. Pro rutinní využití je spíše důležitá rychlost a snadnost provedení testu, nenáročnost na přístrojové vybavení a cena barviva.

Výsledky barvení ukazuje obr. 1. Při hodnotách viabilit běžně se vyskytujících v pivovaru se mezi jednotlivými barvivy nezjistily statisticky významné rozdíly, výsledky se příliš nelišily ani v rozptylech.

Barvení s 0,02% methylenovou modří bylo ze všech metod nejrychlejší, jelikož odpadala nutnost jakékoli inkubace. Buňky byly výrazněji obarvené než při barvení s 0,01% methylenovou modří, ale vyhodnocování výsledků bylo mírně ztíženo častým výskytem intenzivně obarvených nečistot z kvasnic.

Barvení s 0,01% methylenovou modří bylo stále poměrně rychlé, oproti předchozímu barvení se doba přípravy vzorku prodloužila o 5minutovou inkubaci buněk s barvivem. Obarvené buňky byly méně výrazně obarvené, ale zároveň se ve vzorku méně obarvovaly nečistoty.

Nevýhodou práce s methylenovou modří bylo nesnadné vyhodnocení stavu částečně obarvených buněk, které se ale v jisté míře vyskytují u všech barvicích metod.

Barvení methylenovou violetí mělo stejné výhody, nevýhody i dobu přípravy jako barvení 0,01% methylenovou modří, při vyhodnocení výsledků měla tato technika širší interval spolehlivosti a tedy horší opakovatelnost.

Barvení s kombinací PI a FDA bylo oproti 0,02% methylenové modři časově náročnější (o přibližně 20 min) při dodržování přísnějších pravidel bezpečnosti práce, protože propidium jodid je mutagenní činidlo. Výhodou této techniky je jednoznačnost vyhodnocování obrazu, při správném postupu barvení se mrtvé buňky zbarví červeně a životaschopné zeleně, jen minimum buněk zůstane neobarveno.

Obraz získaný touto barvicí technikou zůstane výrazný jen po velmi krátkou dobu, jelikož fluorescein po excitaci rychle ztrácí své fluorescenční schopnosti (vysvěcuje se) a zelené buňky se odbarvují. Další nevýhodou fluoresceinu je, že se kvůli jeho slabému náboji rychle vyplavuje ven i z buněk s neporušenou plasmatickou membránou [7], a může tím zvyšovat fluorescenci buněčného pozadí. Proto je nutné se při práci vyhnout zbytečným prodáváním, což může být problém při analýze více vzorků najednou.

Příprava vzorku při barvení s Mg-ANS je podobně rychlá jako s 0,01% methylenovou modří a zároveň umožňuje snadné vyhodnocování výsledků jako při barvení s PI a FDA. Barvivo Mg-ANS navíc nepodléhá tak rychlému vysvěcování jako fluorescein. Nevýhodou této metody je poměrně časově náročné nastavení vhodného poměru intenzit dvou zdrojů světla, fluorescenčního (v episkopickém uspořádání) pro zviditelnění obarvených buněk, a světelného (v diaskopickém

Obr. 1 Porovnání hodnot viability kvasinek zjištěných jednotlivými barvicími technikami. (MM – methylenová modř, MV – methylenová violet, FDA+PI – fluorescein diacetát + propidium jodid, Mg-ANS – 1-anilin-8-naftalen sulfonát hořečnatý)

uspořádání) pro zviditelnění neobarvených buněk. Použitý mikroskop (Nikon ECLIPSE E 400) totiž neumožňoval v dostatečném rozsahu měnit intenzitu světelných zdrojů.

Ze dvou ověřovaných fluorescenčních metod se barvení s Mg-ANS zdá být výhodnější než s kombinací PI a FDA, jelikož je příprava vzorku rychlejší a Mg-ANS není mutagenní činidlo.

Pro rutinní použití v pivovaru se zdá být stále nejvhodnější methylenová modř, a to v její původní podobě o koncentraci 0,02 %, protože tato metoda je ze všech nejrychlejší a poskytuje srovnatelné výsledky jako moderní barvicí metody (obr. 1).

3.2 Metody pro stanovení vitality

Pro stanovení vitality kvasnic se pro rutinní využití v pivovaru ověřovaly tři metody: deflokulační test, vitální titrace a test acidifikační schopnosti.

Deflokulační test

Při deflokulačním testu se měří rychlost uvolňování kvasinek ze sedimentu měřením nárůstu absorbance vzorku nad sedimentem při 800 nm. Kvasinky se ze sedimentu uvolňují účinkem oxidu uhličitého a jejich koncentrace ve vznosu je přímo úměrná množství a aktivitě kvasinek [9]. Pro jednoduchost provedení se proti původní práci čirá mladina nahradila roztokem sacharosu o koncentraci 10 %.

Nejprve se stanovila citlivost testu, pětkrát v klasickém uspořádání testu s 4 ml 10% sacharosu a pětkrát s 4 ml roztoku, který obsahoval 10 % sacharosu a 10 % ethanolu pro oslabení aktivity kvasnic.

Test byl citlivý k oslabení kvasnic ethanollem. Příklad průběhu absorbance vzorku v čase pro neoslabené kvasnice a stejné kvasnice oslabené ethanollem ukazuje obr. 2. Nárůst absorbance v grafu odpovídá aktivitě kvasinek, které se bublinkami oxidu uhličitého uvolňují ze sedimentu. Pro urychlení testu se místo průběhu křivek porovnávaly pouze rozdíly absorbancí ve 20. minutě a na počátku testu.

Opakovatelnost metody se zjistila porovnáním výsledků z pěti měření a vypočtením intervalu spolehlivosti. Přes výrazné rozdíly výsledků deflokulačního testu u oslabených

Obr. 2 Závislost absorbance na čase při deflokulačním testu pro neupravené kvasinky a kvasinky oslabené 10 % ethanolu v prostředí

a neoslabených kvasnic byl rozptýl této metody dosti vysoký (obr. 3).

Vitální titrace

Test vitální titrace spočívá v alkalizaci kvasniční suspenze 0,1 M NaOH na pH 10 a měření času, který kvasinky potřebují na aktivní snížení pH na hodnotu 6,5. Podle literatury [10] se čas potřebný k okyselení vzorku kvasinkami o dobré vitalitě pohybuje okolo 20 minut.

Pro ověřování metody se použily kvasinky, které v testu acidifikační schopnosti a deflokulačním testu vykazovaly dobrou vitalitu. Při dvojnásobném opakování pokusu se ani po 90 minutách měření pH nesnížilo pod hodnotu 7,5, což mohlo být například způsobeno poškozením kvasinek přílišnou počáteční alkalizací.

Test acidifikační schopnosti (AP test)

Test v provedení podle Kara [12] je pro rutinní použití v pivovaru časově příliš náročný, proto se nejprve hledal způsob zkrácení doby testu, a to úpravou vzorku s redukcí trojnásobného promývání vzorku kvasnic před měřením. Nutnost promývání kvasnic před testem plyne mj. z přílišné ústojné kapacity

kvasničního prostředí. Při měření ústojné kapacity supernatantů po prostém odstředění kvasnic (tzv. první odstředění) a prvním, druhém a třetím promytí (tj. druhé, třetí a čtvrté odstředění) se ukazuje, že ústojná kapacita poklesne výrazně již po prvním odstředění a rozmíchání v destilované vodě (obr. 4).

Ústojná kapacita různých promytých vzorků se proměřovala pro dva extrémní vzorky, zahrnující kvasnice jednou nasazené a skladované v zásobním tanku 3 dny při 3 °C a kvasnice dvakrát nasazené v provozu a úmyslně skladované v zásobním tanku po dobu 12 dní při 3 °C. Tlumivé schopnosti supernatantů těchto kvasnic ukazuje obr. 4. Z grafu vyplývá, že přečištěním vzorků kvasnic o odlišných ústojných vlastnostech (1. odstředění v obr. 4) jedním odstředěním a rozmícháním ve vodě již lze získat vzorky s porovnatelnými zbytkovými ústojnými kapacitami (2. odstředění v obr. 4). Proto je možné časově náročné promývání vzorku kvasnic podle původního uspořádání testu nahradit pouhým odstředěním vzorku a resuspendací v destilované vodě.

Dalšího zrychlení bylo dosaženo zmenšením objemu všech činidel používaných při testu. Celý test se prováděl v jedné nádobce, čímž se ušetřil čas při ředění vzorku před měřením. Při vlastním stanovení se přibližně 7 g hustých várečných kvasnic pomocí injekční stříkačky vpravilo do zvážené plastové uzavírací vzorkovnice o přibližném objemu 50 ml. Nádobka se suspenzí se odstředila a supernatant vylil.

Zjistila se hmotnost získaného kvasničního sedimentu a do nádoby se přidalo desetinasobné množství destilované vody (podobné ředění jako v původním uspořádání testu). Sediment se resuspendoval, nádobka umístila na laboratorní magnetické míchadlo a do suspenze ponořila elektroda pH metru. Po ustálení se hodnota pH zaznamenala a k suspenzi se přidal roztok glukosy (20 %) v množství úměrném množství suspenze, tj. 0,55 ml.g⁻¹ sedimentu podobně jako v původní práci [12], a po deseti minutách se odečetl pokles pH.

V původním uspořádání trvalo provedení testu acidifikační schopnosti u jednoho vzorku přibližně 60 minut, v redukováném uspořádání testu trvalo proměření jednoho vzorku přibližně 25 minut.

Obr. 3 Citlivost a opakovatelnost deflokulačního testu pro neoslabené a ethanollem oslabené vzorky kvasnic

Obr. 4 Tlumivá schopnost supernatantů kvasnic skladovaných 12 dní a 3 dny po prostém odstředění (1. odstředění) a po promytí destilovanou vodou (2., 3. a 4. odstředění)

Výsledek AP testu se vyjadřoval podle rovnice:

$$ap = pH_0 - pH_{10},$$

kde ap je bezrozměrný výsledek testu, pH_0 je ustálená hodnota pH před přidáním glukosy a pH_{10} je hodnota pH po 10 minutách od přidání glukosy. Hodnota ap tedy odpovídá glu-

kosou indukované acidifikační schopnosti, spontánní acidifikaci nelze v zrychleném uspořádání testu měřit.

U testu se ověřovala jeho schopnost reagovat na vystavení kvasnic různým pozitivním či negativním vlivům. Při ověřování testu se proto ke kvasničné suspenzi nepřidávala samotná glukosa, ale glukosa s přidáním $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaNO_2$ nebo ethanolu tak, aby při zachování koncentrace glukosy byly výsledné koncentrace zinku $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, dusitanu 10 mg.l^{-1} a ethanolu 10 % obj.

Průběh pH v čase při testu acidifikační schopnosti pro ethanolom oslabené a neoslabené kvasnice ukazuje obr. 5. Opakovatelnost testu se určila vyhodnocením výsledků z pěti měření stejného vzorku a vypočtením intervalu spolehlivosti, který byl uspokojivě úzký (obr. 6).

Test byl dostatečně citlivý na přidání zinku a ethanolu, méně výrazně test reagoval na přidání dusitanu, přestože na tuto koncentraci dusitanu kvasnice při kvašení mladiny reagují citlivě.

Obr. 5 Průběh pH v čase při AP testu pro neoslabené a ethanolom oslabené kvasnice

Obr. 6 Citlivost AP testu k přidání různých činidel a opakovatelnost výsledků

3.3 Testy vitality a provozní kvašení

Pro modifikovaný test acidifikační schopnosti se ověřovala jeho schopnost předpovědět výkon kvasnic při provozním kvašení. Celkem u třinácti cylindrických kvasnic tanků se u kvasnic před zakvašením stanovila acidifikační schopnost a sledoval se průběh kvašení podle každodenních rozborů.

Mezi sledovanými parametry a výsledkem AP testu neexistovala výrazná korelace (obr. 7). Výsledek testu acidifikační schopnosti nebyl schopný dostatečně předpovědět výkon kvasnic při kvašení. Průběh provozního pivovarského kvašení je funkcí mnoha vlivů, z nichž aktuální stav nasazovaných kvasnic tvoří pouze určitou část. Na délku hlavního kvašení má vedle stavu kvasnic značný vliv například složení mladiny včetně obsahu stopových prvků, nebo přesný průběh teploty při kvašení, řízení obsluhou. Kvalita vyrobeného piva, zejména jeho chuťové vlastnosti a koloidní stabilita, závisí na mnoha faktorech kvasného procesu a lze ji jen obtížně stanovit z jediného rozboru [13].

Tyto výsledky se liší od podobné závislosti uváděné v literatuře [12] (obr. 8). V citované práci [12] se výkon kvasnic posuzoval u laboratorního kvašení a použily se kvasnice s širokou škálou vitality, od čerstvých až po respiračně deficientní mutanty, nebo kvasnice skladované 20 dní při 12°C . Kvasnice s AP

Obr. 7 Závislost mezi hodnotou AP a dobou hlavního kvašení do obvyklého stupně prokvašení při sudování

hodnotou pod 1,5 měly dokonce viabilitu určenou methylenovou modří pod 90 % [12]. Nasazení takovýchto kvasnic v provozu je krajně nepravděpodobné a využitelnost takto získané závislosti značně diskutabilní. Lze předpokládat, že po vyřazení silně poškozených kvasnic z grafu na obr. 8 by korelace byla podobná té námi naměřené.

4 ZÁVĚR

Vybrané moderní metody měření viability kvasnic, ačkoli je lze s výhodou vyšší přesnosti použít k řešení jednotlivých problémů speciálního a výzkumného charakteru, neposkytovaly v provozní praxi podstatné výhody oproti dosud používanému barvení methyle-

Obr. 8 Délka hlavního kvašení jako funkce výsledku AP testu, prezentovaná v literatuře [12]

novou modří. Pracnost a časové i finanční nároky fluorescenčních metod jsou pro běžnou praxi doposud vysoké. Při dodržování běžných zásad správné výrobní praxe pro úchovu a ošetřování kvasnic s podílem mrtvých buněk pod 7 % je metoda barvení s 0,02% methylenovou modří dosud nejvýhodnější.

Pro stanovení vitality kvasnic lze použít jak acidifikační, tak deflokulační test, který měl sice nižší reprodukovatelnost, ale také nižší pracnost. Acidifikační test mohl rozoznat působení inhibitorů i stimulatorů kvašení přidaných ke glukosovému roztoku pro jeho stanovení, ale neumožnil předpovědět průběh provozního kvašení. Příčinou je pravděpodobně nepostihnutí vlivů individuálního složení jednotlivých várek mladiny včetně jejich provzdušnění.

5 LITERATURA

- Heggart, H., et al.: Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. **37**, 2000, 409–430.
- Smart, A.K., et al.: Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 1999, 18–23.
- Šavel, J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech, 1. vydání, Praha, SNTL, 1980.
- Analytica-Microbiologica-EBC, Fachverlag Hans Carl, section 3.2, 2001.
- Zandycke, S.M., et al.: Determination of yeast viability using fluorophores. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **61**, 2003, 15–22.
- Pierce, J.: Institute of Brewing analysis committee: Measurement of yeast viability, *J. Inst. Brew.* **76**, 1970, 442–443.
- www.probes.com.
- McCaig, R.: Evaluation of the fluorescent dye 1-anilin-8-naphtalene sulphonic acid for yeast viability determination. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **48**, 1990, 22–25.
- Šavel, J., Prokopová, M.: Měření aktivity várečných kvasnic. *Kvasny Prum.* **40**, 1994, 327–329.
- Rodrigues, P.G., et al.: Vitaltitration: a new method for assesment of yeast vitality. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **41**, 2004, 277–281.
- Opekarová, M., Sigler, K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **27**, 1982, 395–403.
- Kara, B. V., Simpson, W.J., Hammond, J.R.M.: Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *J. Inst. Brew.* **94**, 1988, 153–158.
- Basařová, G., Bláha, M., Veselý, P.: Vliv kmene kvasnic na senzoricou stabilitu piva. *Kvasny Prum.* **49**, 2003, 1–9.

Lektoroval Ing. Jaromír Fiala, Ph.D.
Do redakce došlo 1. 11. 2006