

# POUŽITÍ REFRAKTOMETRIE PRO SLEDOVÁNÍ PRŮBĚHU KVAŠENÍ

## CONVENIENT MONITORING OF BREWERY FERMENTATION COURSE BY REFRACTOMETRY

JAN ŠAVEL<sup>1</sup>, PETR KOŠIN<sup>1</sup>, ADAM BROŽ<sup>1</sup>, KAREL SIGLER<sup>2</sup> – Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice, e-mail: savel@original-budweiser.cz, <sup>2</sup>Mikrobiologický ústav AVČR, 142 20 Praha

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A. – Sigler, K.: Použití refraktometrie pro sledování průběhu kvašení.** Kvasny Prum. 55, 2009, č. 4, s. 94–99.

Průběh kvašení mladiny se nejčastěji sleduje měřením hustoty ponorným sacharometrem nebo digitálním hustoměrem, často se také analyzují vzorky klasickou analýzou, nebo automatickým analyzátozem. Jinou možností je měření refrakce v průběhu kvašení. Při znalosti původní refrakce nebo původního extraktu mladiny refrakce určuje jednoznačně zdánlivý extrakt nebo stupeň prokvašení. Podobně jako při měření sacharometrem, opatřeným stupnicí v hmotnostních procentech sacharosy, lze použít refraktometr se stupnicí ve stupních podle Brix. V rozsahu 0–16 % hm. sacharosy a 0–8 % ethanolu je refrakce lineární funkcí jejich koncentrace, což umožňuje vypočítat koncentraci alkoholu, skutečného extraktu a posléze i zdánlivého extraktu v průběhu kvašení z hodnot aktuální a původní refrakce. Uvádějí se příklady měření i kalibrace přístroje. K měření lze použít jednoduché a levné refraktometry s výpočetní kompenzací vlivu teploty.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A. – Sigler, K.: Convenient Monitoring Of Brewery Fermentation Course By Refractometry.** Kvasny Prum. 55, 2009, No. 4, p. 94–99.

The course of wort fermentation is most often monitored by measuring density by immersion saccharometer or digital densitometer; other methods include classical analysis or automatic analyzers. Another possibility is the measurement of refraction in the course of fermentation. When the original refraction or wort extract is known, refraction unambiguously determines the apparent extract or degree of attenuation. A refractometer with a scale in Brix degrees can be used similarly as a saccharometer having a scale in mass percent of sucrose. In the range of 0–16 mass % sucrose and 0–8 % ethanol refraction is a linear function of concentration; this allows us to calculate concentration of ethanol, real extract and also an apparent extract in the course of fermentation from the values of actual and original refraction. Examples are given of measurement and instrument calibration. The measurements can be done with simple and inexpensive refractometers with computing compensation of the effect of temperature.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A. – Sigler, K.: Die Refraktometrie anwendung für die Verfolgung des Gärungsprozesses.** Kvasny Prum. 55, 2009, Nr. 4, S. 94–99.

Für eine Verfolgung des Gärungsprozesses werden am meisten eine Dichtemessung mittels Eintauchrefraktometers oder digitalen Dichtigkeitsmessers angewandt, sonst werden auch Messungen mittels klassischen Analysen oder automatischen Analysators durchgeführt. Eine Refraktionsmessung im Laufe der Hauptgärung stellt jedoch die andere Möglichkeit dar. Mit der Kenntnis des ursprünglichen Refraktionswertes oder Würzeextrakts kann die Refraktion den scheinbaren Extrakt oder Vergärungsgrad eindeutig bestimmen. Ähnlich, wie bei der Messung mit dem Saccharimeter kann auch ein Refraktometer mit der Brix's Skala angewandt werden. Im Bereich 0–16 % (gew.) Saccharose und 0–8 % Ethylalkohol ist die Refraktion eine Linearfunktion der ihrer Konzentration, was aus den Werten ursprünglicher und aktueller Refraktion eine Rechnung der Ethylalkoholkonzentration, wirkliches Extraktes und später auch des scheinbaren Extraktes ermöglicht. In dem Artikel werden Beispiele der Messung und der Eichung des Gerätes beigeführt. Zur Messung der Refraktion können auch die einfachen und billigen Geräte mit einer Rechnung der Temperaturkompensation angewandt werden.

**Klíčová slova:** mladina, kvašení, refraktometrie, extrakt

**Keywords:** wort, fermentation, refractometry, extract

### 1 ÚVOD

Sledování průběhu kvašení je nutné v laboratorních testech i při výrobě piva. Pro řízení kvasného procesu mají rozhodující význam stupeň zdánlivého nebo skutečného prokvašení a jejich změny při kvašení. Průběh kvašení jedné kvasné dávky se známou původní koncentrací mladiny se často sleduje pouze pravidelným měřením hustoty ponorným sacharometrem.

Původní Ballingův sacharometr se zakládal na údajích Ballingovy tabulky, uvádějící závislost koncentrace sacharosy na hustotě cukerného roztoku při 17,5 °C. Tuto závislost později opravil Brix a vzniklé Brixovy stupně se rozšířily zejména v cukrovarnictví. Ballingovy stupně (°Bg) v pivovarství upravil Plato, což vedlo k dosud užívaným stupním Plato (°P, Plato). Naštěstí se tyto stupnice vzájemně liší jen málo, takže lze v současnosti použít společný údaj v hmotnostních procentech koncentrace roztoku sacharosy. Měření ponorným sacharometrem je oblíbené zejména v malých pivovarech nebo při domácí výrobě piva.

V podstatě lze při výrobě piva vystačit s dvěma přístroji, teploměrem a ponorným sacharometrem. Většinou se z kvasných nádob odebírají vzorky kvasícího média a v nich stanovují zdánlivý extrakt nebo stupeň prokvašení, popř. při podrobnější kontrole i další hodnoty, jako počet buněk, pH, barva, koncentrace diacetylů apod. Přes jednoduchost měření sacharometrem je nutné zvážit i jeho nevýhody, neboť pro přesnější měření se vzorky musí filtrovat a dekarbonizovat.

Tyto nedostatky se eliminují postupy bez odběru vzorku nebo měřením přímo v kvasné nádobě. Mezi měření bez odběru vzorku patří měření průtoku uvolněného množství oxidu uhličitého a jeho integrace, měření rozdílu tlaku v různých výškách kvasící mladiny, nebo přímo obsahu alkoholu v unikajícím kvasném plynu. Také je možné průběžně cirkulovat vzorek mezi kvasnou nádobou a vhodným čidlem, např. digitálním hustoměrem.

### 1 INTRODUCTION

Monitoring of fermentation course is needed both in laboratory tests and in brewery. Factors decisive for controlling and directing the fermentation are the degree of apparent or actual wort attenuation and their changes during the fermentation process. The course of fermentation of a single fermentation batch with known initial (original) wort concentration is often checked merely by regularly measuring the wort gravity by immersed saccharometer.

The original Balling's saccharometer was based on the data in Balling's table, which gives the dependence of sucrose concentration on the density of a sugar solution at 17.5 °C. This dependence was later corrected by Brix and the resulting Brix degrees became widely used mostly in sugar production. Balling degrees (°Bg) in brewery were modified by Plato; this gave rise to the still used degrees Plato (°P, Plato). Fortunately, these two scales differ only marginally and it is thus possible to use the sucrose concentration in solution in mass percent. Measurement by immersion saccharometers is widely used especially in smaller breweries and in homebrewing.

In brewing, one can make do basically with two instruments – a thermometer and a saccharometer. Usually, samples of the fermenting wort are collected from fermentation vessels and the apparent extract or degree of attenuation is determined; other data gathered in more detailed monitoring modes include, e.g., cell count, pH, color, diacetyl concentration, and other parameters. Though simple, the use of saccharometer has its problems because for more exact measurements the samples have to be filtered and decarbonized.

These drawbacks are eliminated by using procedures without sampling or measurements directly in the fermentation vessel. Measurements without sampling include the determination of the flow rate of liberated carbon dioxide and its integration, measurement of a difference in wort pressure at different wort heights, or direct measure-

K tomuto účelu také slouží tzv. vážková analýza kvašení, umožňující kontinuální stanovení požadovaných hodnot podle změny hmotnosti kvasné nádoby [1]. Tato metoda je použitelná pro velké i malé kvasné objemy, její nevýhodou je o něco nižší přesnost ve srovnání s klasickými metodami.

V současnosti je destilační stanovení alkoholu a hustoty piva základem metodou pivovarské analýzy [2]. Klasickou destilací lze výrazně zkrátit postupy s přeháněním vodní párou [3]. S vývojem rychlých a přesných digitálních hustoměrů je nyní možné v kombinaci se spektrometrií v blízké infračervené oblasti (NIR) nebo alkoholovým senzorem stanovit rychle a přesně základní hodnoty, odvozené od Ballingova vzorce [4]. Pro sledování průběhu hlavního kvašení postačuje i přímé měření ponornou sondou NIR spektrometru.

V malých pivovarech se průběh kvašení nejčastěji sleduje ponorným hustoměrem, výsledky však závisejí na obsahu oxidu uhličitého a požaduje se relativně velké množství vzorku. Místo klasického ponorného sacharometru lze použít ruční denzitometr s automatickou korekcí hodnot na teplotu vzorku, jeho cena je však výrazně vyšší.

Při dalším poklesu objemu kvasných dávek v laboratorním nebo domácím kvašení je již měření sacharometrem nemožné. Kromě již zmíněné vážkové analýzy kvašení lze využít i refraktometrii, pracující i s objemy vzorku okolo 1 ml a méně. Postup se zakládá na stejné strategii jako při měření sacharometrem a měří refrakci odebraných vzorků při znalosti původního extraktu nebo refrakce vzorku před kvašením [5].

Kromě kontroly hustoty sacharometrem se refraktometrie v pivovarské kontrole tradičně používala, ale později ji vytlačila denzitometrie. V současnosti se refraktometrie může uplatnit zejména jako rychlá, jednoduchá a relativně levná metoda. K dispozici jsou malé refraktometry bez temperace vzorku, ale korigující výsledek měření podle jeho teploty.

Účelem tohoto článku je navrhnout metodu měření průběhu kvašení v laboratorních podmínkách s použitím levného refraktometru udávajícího přímo koncentraci extraktu v hmotnostních procentech sacharosy (stupně podle Brixu nebo Plato) s využitím jednoduchých výpočetních vztahů.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Teoretická část

Základní veličinou refraktometrie je index lomu  $n$ , související s povahou a hustotou měřené látky nebo jejího roztoku a závisející také na teplotě a tlaku. Nejčastěji se udává hodnota indexu lomu při přechodu světla ze vzduchu do kapaliny při teplotě 20 °C. Index lomu rovněž závisí na vlnové délce použitého světla.

Index lomu látky je důležitá fyzikální veličina, sloužící k charakterizaci chemického individua. Tzv. specifická refrakce látky souvisí s její hustotou podle vztahu:

$$(1) \quad f(n) = R_s \cdot \rho$$

kde  $n$  je index lomu,  $R_s$  je specifická refrakce a  $\rho$  je hustota. Specifická refrakce nezávisí na teplotě a tlaku. Povahu funkce  $f(n)$  stanovil již Newton a později teoreticky zdůvodnil Laplace v Newton-Laplaceově vztahu:

$$(2) \quad R_s = \frac{n^2 - 1}{\rho}$$

Jiní autoři uvedli další modifikace funkce  $f(n)$ , např. podle Gladstone-Daleova vztahu:

$$(3) \quad R_s = \frac{n - 1}{\rho}$$

popř. podle vztahu Lorentze-Lorentze:

$$(4) \quad R_s = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho}$$

Přehled těchto a dalších vztahů uvádí známá monografie, zabývající se refraktometrií [6]. V praxi mají velký význam diagramy indexu lomu/složení pro binární směsi, zejména roztoky sacharosy a ethanolu. Tvar křivek závisí na povaze roztoků, na jejich vzájemné interakci při tvorbě roztoku a způsobu vyjádření koncentrace těchto látek. Tyto křivky mohou být lineární, mít extrémy, zlomy (singulární body), nebo inflexní body. Příklady křivek pro roztoky sacharosy a ethanolu

ment of alcohol content in the released fermentation gasses. Another possibility is to circulate the sample continuously between the fermentation vessel and a suitable sensor such as digital densitometer.

A useful method in this context is the gravimetric analysis of fermentation, which permits a continuous determination of fermentation parameters from changes in the weight of the fermentation vessel [1]. The method can be used with both large and small volumes; its disadvantage is a somewhat lower accuracy when compared to classical methods.

At present, distillation determination of alcohol and measurement of beer density represent the basic methods of brewery analysis [2]. Classical distillation can be substantially shortened by using steam distillation [3]. The currently available fast and accurate digital densitometers make it possible, in combination with near infrared (NIR) spectrometry or alcohol sensor, to determine rapidly and accurately the basic values derived from the Balling formula [4]. The course of main fermentation can be monitored with sufficient precision by a direct measurement with an immersion probe of a NIR spectrometer.

In small breweries, the course of fermentation is most often monitored by hydrometer. The results of the measurement then depend on the content of carbon dioxide and the measurement requires a relatively large sample volume. The classical saccharometer can be replaced by manual densitometer with an automatic correction for sample temperature. This instrument is, however, substantially more expensive.

When the sample volumes are further reduced, whether in homebrewing or in the laboratory, saccharometer can no longer be used. Apart from the weight analysis mentioned above one can use refractometry that requires samples of 1 ml volume or less. The procedure is basically identical with the strategy used for saccharometer measurements and includes measuring the refraction of collected samples, with the knowledge of original extract or refraction of the samples prior to fermentation [5].

Refractometry has traditionally been used in monitoring brewery fermentations but has been later superseded by densitometry. At present, refractometry can be employed as a fast, simple and relatively low-cost method. Available are, e.g., small refractometers without sample temperature control that, however, correct the results of the measurement according to sample temperature.

We propose here a method for monitoring the course of fermentation under laboratory conditions by using an inexpensive refractometer that provides direct information on extract concentration in mass percent of sucrose (Brix or Plato degrees) based on simple calculations.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Theoretical background

The basic quantity in refractometry is refractive index  $n$  that is associated with the nature and density of the measured pure substance or its solution, and depends also on temperature and pressure. The most frequently used refractive index value is that for transition of light from air to a fluid at 20 °C. Refractive index depends also on the wavelength of the light.

The refractive index of a substance is an important physical quantity that serves for characterizing a chemical species. The so-called specific refraction of a substance is related to its density by the formula:

$$(1) \quad f(n) = R_s \cdot \rho$$

where  $n$  is the refractive index,  $R_s$  is specific refraction and  $\rho$  is density. Specific refraction does not depend on temperature and pressure. The nature of the function  $f(n)$  was determined by Newton and later theoretically defined by Laplace in the Newton-Laplace formula:

$$(2) \quad R_s = \frac{n^2 - 1}{\rho}$$

Other authors provided further modifications of the  $f(n)$  function, e.g. in the Gladstone-Dale equation:

$$(3) \quad R_s = \frac{n - 1}{\rho}$$

or the Lorentz-Lorentz formula:

$$(4) \quad R_s = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho}$$

uvádí obr. 1, pro porovnání jsou znázorněny také hustoty těchto roztoků (obr. 2).

V ideálních soustavách (při jejichž vzniku nedochází ke změně objemu a polarizovatelnosti složek) je závislost indexu lomu na složení velmi blízká přímkové, jestliže je složení vyjádřeno v objemových zlomcích a platí pravidlo o aditivě indexu lomů [6].

V pivovarství se změřené hodnoty udávají přímo v hodnotách indexu lomu (RI – Refractive Index), u starších ponorných refraktometrů byla běžná tzv. Zeissova stupnice (100 dílků), nebo se přímo zobrazovaly Brixovy stupně, udávající hmotnostní koncentraci sacharosy a přibližně se rovnající stupňům Plato.

Mezi dílky Zeissovy stupnice a indexem lomu platí vztah:

$$(5) \quad y = 2964,563 - 7007,752 \cdot x + 3596,889 \cdot x^2$$

kde  $x$  je index lomu roztoku při 20 °C a  $y$  jsou dílky Zeissovy stupnice [7].

Refraktometr se stupnicí v Zeissových dílcích se nastavoval na refrakci destilované vody při 20 °C, které odpovídá hodnota 14,5, u některých přístrojů také 15,0 dílku. Proti této hodnotě se zaznamenávala odečtená refrakce roztoku a z ní počítala koncentrace rozpuštěné látky.

Pro výpočet analýzy piva se používaly různé vzorce, vyjadřující vztah mezi hustotou a refrakcí vzorku [6, 8]. Analytica EBC např. uvádí obecný vzorec ve tvaru:

$$(6) \quad \text{Alkohol (\%obj.)} = A(SR - WR) - B(PG) - C$$

kde  $SR$  je refrakce v empirické stupnici Zeissova refraktometru při 20 °C,  $WR$  je refrakce destilované vody,  $PG = 1000 \cdot (SG - 1)$ , kde  $SG$  je relativní hustota vzorku 20/20 °C. Hodnoty konstant  $A$ ,  $B$ ,  $C$  se získají multilineární regresí dat ze souběžných refraktometrických a destilačních analýz.

Pro sledování průběhu kvašení většinou postačuje nižší přesnost výsledků, a proto je možné použít pro výpočet zjednodušujících předpokladů, např. platnosti lineární aditivní závislosti mezi příspěvky refrakce pocházející od sacharosy i ethanolu podle vztahu:

$$(7) \quad R = k_1 \cdot E_R + k_2 \cdot A$$

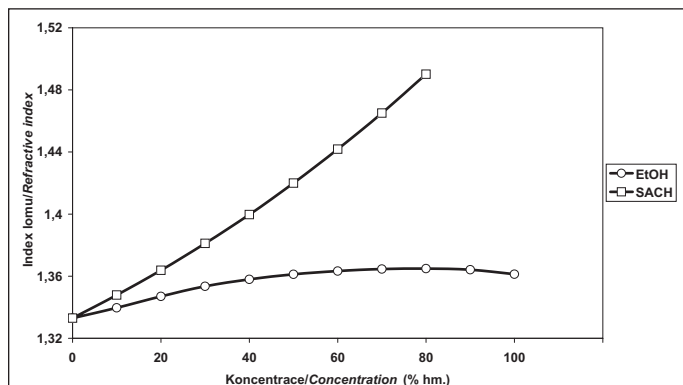
kde  $R$  je refrakce roztoku v Brixových stupních (koncentrace sacharosy v % hm.),  $E_R$  je skutečný extrakt,  $A$  je alkohol v hmotnostních procentech a  $k_1$ ,  $k_2$  jsou konstanty úměrnosti. Grafické znázornění koncentračních závislostí rozdílů indexu lomu roztoků a destilované vody pro sacharosy a ethanol uvádí obr. 3. Podle těchto dat měl podíl směrníc přímk pro ethanol (0 až 8 % hm.) a sacharosy (0 až 16 % hm.), odpovídající konstantě  $k_2$ , hodnotu asi 0,45, konstanta  $k_1$  by měla mít ve stupnici Brixu hodnotu 1.

Vhodnější je stanovit hodnoty  $k_1$  a  $k_2$  experimentálně se standardními roztoky sacharosy, ethanolu i vzorky sladiny a mladiny přímo používaným refraktometrem. V dalším postupu se využívá lineární závislosti (7), zamýšlené pro sledování průběhu kvašení jednoduchým refraktometrem bez temperace vzorku.

Podle Ballingova vzorce platí:

$$(8) \quad (P - E_R) \equiv e \cdot A$$

kde  $P$  je původní extrakt v % hm.,  $E_R$  je skutečný extrakt,  $A$  je alkohol a  $e$  je výtěžnostní koeficient extrakt/alkohol (podle Ballinga je  $e = 2,0665$ ). Původnímu extraktu  $P$  odpovídá původní refrakce mladiny  $R_0$  podle:



Obr. 1 / Závislost indexu lomu na koncentraci ethanolu a sacharosy při 20 °C / Fig. 1 Dependence of refractive index on ethanol and sucrose concentration at 20 °C

All these and other equations are given in a well-known monograph on refractometry [6]. Important for practical use are the diagrams of refractive index versus composition of binary mixtures, especially sucrose and ethanol solutions. The shape of the curves depends on the nature of the solutions, mutual interaction of solution components and the manner of expression of their concentrations. The curves can be rectilinear, or can have extremes, breaks (singularity points) or inflection points. Fig. 1 shows examples of the curves for sucrose and ethanol solutions; the densities of the solutions are given in Fig. 2 for comparison.

In ideal systems, whose formation is not accompanied by changes in volume and polarizability of the components, the dependence of refractive index on composition is very nearly linear if the composition is expressed in volume fractions and the refractive index additivity rule holds [6].

In brewing, the measured values are presented directly as RI – Refractive Index, older immersion refractometers were equipped with so-called Zeiss scale (100 divisions) or showed directly Brix degrees that give the mass concentration of sucrose and are approximately equal to degrees Plato.

The divisions of the Zeiss scale are related to the refractive index by the formula:

$$(5) \quad y = 2964.563 - 7007.752 \cdot x + 3596.889 \cdot x^2$$

where  $x$  is the refractive index of a solution at 20 °C and  $y$  are Zeiss scale divisions [7].

A refractometer with the Zeiss scale was adjusted to the refraction of distilled water at 20 °C, which corresponded mostly to the value of 14.5, in some instruments also 15.0 divisions. The solutions refraction read on the instrument was plotted against this value and the concentration of the dissolved substance was calculated from it.

Different formulas expressing the relationship between sample density and refraction have been used in brewing [6, 8]. For instance, Analytica EBC gives the general formula:

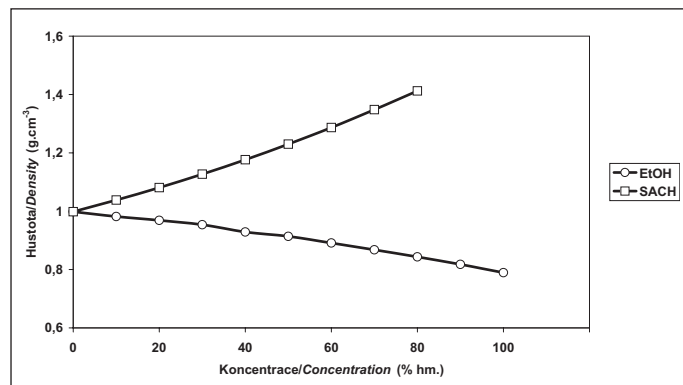
$$(6) \quad \text{Alcohol (\%vol.)} = A(SR - WR) - B(PG) - C$$

where  $SR$  is refraction in the empirical scale of the Zeiss refractometer at 20 °C,  $WR$  is refraction of distilled water,  $PG = 1000 \cdot (SG - 1)$ , where  $SG$  is a relative density of the sample at 20/20 °C. The constants  $A$ ,  $B$  and  $C$  are obtained by multilinear regression of data from refractometric and distillation analyses.

Monitoring of fermentation course is usually satisfactory even with lower-accuracy data and the calculation can therefore be done by using simplifying assumptions of, e.g., linear additive relationship between the contributions of refraction due to sucrose and that due to ethanol, according to the formula:

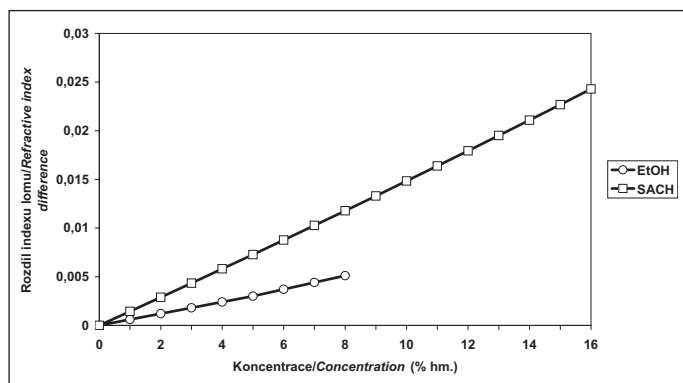
$$(7) \quad R = k_1 \cdot E_R + k_2 \cdot A$$

where  $R$  is refraction of the solution in Brix degrees (sucrose concentration in mass %),  $E_R$  is the real extract,  $A$  is alcohol in mass percent and  $k_1$ ,  $k_2$  are proportionality constants. Graphical illustration of concentration dependences of the differences between the refractive indices of sucrose and ethanol solutions and distilled water is given in Fig. 3. According to these data the ratio of slopes of lines for ethanol (0 to 8 mass %) and sucrose (0 to 16 mass %), corresponding



Obr. 2 / Závislost hustoty na koncentraci ethanolu a sacharosy při 20 °C / Fig. 2 Dependence of density on ethanol and sucrose concentration at 20 °C





Obr. 3 / Závislost rozdílu indexu lomu roztoků a destilované vody pro ethanol a sacharosu při 20 °C / Fig. 3 Concentration dependence of a difference between the refractive index of solutions and distilled water for ethanol and sucrose at 20 °C

$$(9) R_0 = k_1 \cdot P$$

Z těchto vztahů plynou vzorce pro zpětný výpočet alkoholu a skutečného extraktu z hodnot původní a naměřené refrakce:

$$(10) A = \frac{R_0 - R}{e \cdot k_1 - k_2}$$

$$(11) E_R = \frac{e}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R - \frac{k_2}{k_1(e \cdot k_1 - k_2)} \cdot R_0$$

kde  $R$  je refrakce roztoku v Brixových stupních,  $R_0$  je refrakce zavařeného mladiny,  $k_1$  a  $k_2$  jsou konstanty úměrnosti podle vztahu (7) a  $e$  je výtěžnostní koeficient extrakt/alkohol.

Z těchto vztahů plyne lineární závislost mezi obsahem alkoholu nebo skutečného extraktu a hodnotou  $R$  v průběhu kvašení mladiny se stejnou počáteční refrakcí  $R_0$ . Ze zjištěných hodnot  $A$  a  $E_R$  se snadno vypočte stupeň skutečného prokvašení:

$$(12) p_s = 100 \cdot \frac{P - E_R}{P}$$

kde  $p_s$  je stupeň skutečného prokvašení, ostatní symboly stejné jako v předcházejícím vztahu.

Z předchozích vztahů také vyplývá pro stupeň skutečného prokvašení vztah:

$$(13) p_s = 100 \cdot \frac{e \cdot k_1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot \left( \frac{R_0 - R}{R_0} \right)$$

Z hodnot  $A$  a  $E_R$  lze také spočítat hodnoty zdánlivého prokvašení podle postupu uvedeného v článku o vázkové analýze. Ze získaných hodnot alkoholu a skutečného extraktu podle (10) a (11) se s použitím polynomiálních vztahů vypočtou jejich příslušné relativní hustoty, z nichž relativní hustota vzorku podle Tabarie a posléze zdánlivý extrakt a stupeň zdánlivého prokvašení [1].

Vzorce (10) a (11) lze použít při znalosti hodnoty refrakce nezavařeného mladiny, často je však místo toho známa hodnota původního extraktu, ze které je možné vypočítat všechny potřebné parametry průběhu kvašení s použitím vztahu (9)

$$(14) A = \frac{k_1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot P - \frac{1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R = \alpha \cdot P - \beta \cdot R$$

$$(15) E_R = \frac{e}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R - \frac{k_2}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot P = \gamma \cdot R - \delta \cdot P$$

Ke kalibraci metody se použijí vzorky z kvašení mladiny s různou původní koncentrací a ze známých výsledků analýz se lineární regrese získají konstanty  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  umožňující vypočítat průběh kvašení z měření refrakce. Hodnoty kalibračních konstant umožňují vypočítat i základní konstanty  $k_1$  a  $k_2$ , které lze také odhadnout podle multilineární regrese v datech ze souboru kvasících mladiny přímo podle vztahu (7).

U obou postupů se předpokládá pro uvažovaný úsek kvašení platnost vztahu (7) s nulovou refrakcí i koncentracemi alkoholu a skutečného extraktu v počátku. Při omezeném rozsahu měření mimo počátek lze přidat do vzorce (7) aditivní konstantu, a tím zpřesnit výpočet. Podobně lze lineární závislosti (14,15) nahradit polynomic-

to constant  $k_2$  is about 0.45, constant  $k_1$  should be equal to 1 in the Brix scale.

The values of  $k_1$  and  $k_2$  are more suitably determined experimentally with standard solutions of sucrose, ethanol and wort by using the refractometer employed for monitoring. Further procedure includes using the linear function (7) intended for monitoring the course of fermentation by a simple refractometer without sample temperature control.

According to the Balling formula it holds:

$$(8) (P - E_R) \equiv e \cdot A$$

where  $P$  is original extract in mass %,  $E_R$  is the real extract,  $A$  is alcohol and  $e$  is the extract/alcohol yield coefficient (according to Balling  $e = 2.0665$ ). The original extract  $P$  corresponds to original wort refraction  $R_0$  according to:

$$(9) R_0 = k_1 \cdot P$$

These relationships yield formulas for the back calculation of alcohol and real extract levels from the values of original and measured refraction:

$$(10) A = \frac{R_0 - R}{e \cdot k_1 - k_2}$$

$$(11) E_R = \frac{e}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R - \frac{k_2}{k_1(e \cdot k_1 - k_2)} \cdot R_0$$

where  $R$  is refraction of the solution in Brix degrees,  $R_0$  is refraction of fermenting wort,  $k_1$  and  $k_2$  are proportionality constants according to formula (7) and  $e$  is the extract/alcohol yield coefficient.

These equations give rise to a linear relationship between the content of alcohol or real extract and the value of  $R$  in the course of fermentation of wort with the same initial refraction  $R_0$ . The values  $A$  and  $E_R$  so found then serve for a simple calculation of the degree of real attenuation:

$$(12) p_s = 100 \cdot \frac{P - E_R}{P}$$

where  $p_s$  is the degree of real attenuation, other symbols are the same as in the preceding formula.

Based on the above relationships the degree of real attenuation is given by the formula:

$$(13) p_s = 100 \cdot \frac{e \cdot k_1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot \left( \frac{R_0 - R}{R_0} \right)$$

The values  $A$  and  $E_R$  can also be used to calculate the values of apparent attenuation by using the procedure described in the paper about weight analysis [1]. Using polynomial relationships, the values for alcohol and real extract obtained according to (10) and (11) can be used to calculate the corresponding relative densities, from them the relative sample density according to Tabarie and then the apparent extract and degree of apparent attenuation [1].

Formulas (10) and (11) can be used when the refraction of unfermented wort is known. However, the parameter usually known instead is the value of the original extract, from which all necessary parameters of the fermentation course can be calculated by using formula (9)

$$(14) A = \frac{k_1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot P - \frac{1}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R = \alpha \cdot P - \beta \cdot R$$

$$(15) E_R = \frac{e}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot R - \frac{k_2}{e \cdot k_1 - k_2} \cdot P = \gamma \cdot R - \delta \cdot P$$

Calibration of the method can be done by using samples from fermentations of worts with different original concentration. Using known results of analyses, linear regression can be employed to obtain constants  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  that make it possible to calculate the course of the fermentation from refraction measurements. The calibration constants allow the calculation of basic constants  $k_1$  and  $k_2$ , which can also be directly estimated by multilinear regression of data from the set of fermenting worts according to formula (7).

For both procedures, the formula (7) with zero initial refraction and

kými vztahy, což je zejména výhodné u přesných refraktometrů s temperací vzorků, neboť se tím výrazně zvýší celková přesnost analýzy.

## 2.2 Přístroje

Analýzátor piva

Automatický analyzátor piva SCABA 5610 (Foss, Dánsko).

Refraktometr

Digitální ruční laboratorní refraktometr DR 301-95, bez temperace vzorku, ale s výpočetní korekcí, umožňující přepočet refrakce měřené při teplotě vzorku na 20 °C s rozsahem přístroje 0 až 95 % hm. a udávanou přesností měření  $\pm 0,1$  °Brix (A. Krüss Optronic, Německo).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Kalibrace přístroje

Ke kalibraci se použilo několik desítek provozních vzorků výčepních pív a ležáků, denně odebíraných z cylindrokónických tanků, v nichž se stanovovaly hodnoty původního, zdánlivého i skutečného extraktu a souběžně zaznamenávaly další hodnoty, např. stupně skutečného a zdánlivého prokvašení. Vzorky se před měřením zfiltrovaly a zbavily oxidu uhličitého vytřepáním.

Tento datový soubor se zpracoval multilineární regresí programem Microsoft Excel. Dosazením kalibračních konstant  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  do vztahů (14) a (15) se získaly jednoduché vzorce pro zpětný výpočet hodnot alkoholu a skutečného extraktu (16,17) a z nich i stupně zdánlivého a skutečného prokvašení.

$$(16) \quad A = 0,67062 \cdot P - 0,66091 \cdot R$$

$$(17) \quad E_R = 1,27582 \cdot R - 0,29388 \cdot P$$

Číselné konstanty ve vztahu (16) by teoreticky ( $k_1 = 1$ ) měly mít stejné hodnoty, odchylky jsou způsobeny vyrovnáváním regresivní metodou s cílem dosáhnout co nejlepší shody výsledků. Podobně se na stejném souboru získaly hodnoty konstant  $k_1 = 1,01355$  a  $k_2 = 0,44552$ , což je blízké již odhadnutým konstantám pro koncentrační závislost roztoků sacharosy ( $k_1 = 1$ ) a ethanolu ( $k_2 = 0,45$ ).

Zdánlivý extrakt a zdánlivé prokvašení se z hodnot  $A$ ,  $E_R$  vypočítaly převedením na odpovídající hustoty a z nich se ze vzorce podle Tabarie získaly zdánlivá hustota a zdánlivý extrakt podle dříve uveřejněného postupu [1]. K verifikaci těchto hodnot se vypočtené konstanty použily pro podobný soubor sestavený po dvou měsících provozu.

Ačkoliv Analytica EBC kromě klasické destilační metody stanovení alkoholu (metoda 9.2.1 připouští i jeho refraktometrické stanovení (metoda 9.2.3), je zřejmé, že úplný rozbor piva vyžaduje stanovení hustoty piva, nebo zbytku po destilaci [2]. Kombinace měření hustoty a refrakce je oblíbenou technikou, její výsledky se však nikdy přesně neshodnou s klasickým destilačním a pyknometrickým měřením [8]. Tyto odchylky se částečně odstraní použitím odlišných hodnot konstant ve výpočtových vzorcích pro různé druhy piva, nebo zahrnutím korekčních faktorů.

Stupeň prokvašení se při kvašení v jedné nádobě vypočítává dvojím způsobem, buď s použitím stálé původní koncentrace mladiny, nebo z výsledků analýz jednotlivých odebraných vzorků, v nichž se však vypočtené hodnoty původního extraktu z opakovaných měření z různých fází kvašení poněkud liší.

Protože se uvedená data získávala z úplných analýz každého vzorku, pro porovnání se použil původní extrakt vypočtený pro každý vzorek. Tento postup je např. vhodný při chybějící kontrole průběhu kvašení automatickým analyzátozem např. o svátcích nebo v noci, kdy automatický analyzátor není v činnosti.

Přes značné pokroky v konstrukci digitálních hustoměrů se refraktometrie udržela jak v laboratorní, tak provozní praxi. Přispěl k tomu vývoj moderních refraktometrů se softwarovou eliminací nežádoucích vlivů a s Peltierovými články, nevyžadujícími vnější temperační lázeň. Kromě toho je refraktometrie na rozdíl od denzitometrie relativně málo citlivá na obsah rozpuštěného oxidu uhličitého, což umožňuje analyzovat i neúplně dekarbonizované vzorky.

Zvláště výhodná je refraktometrie pro měření v malých objemech vzorků, neboť v krajním případě lze index lomu měřit z jedné kapky vzorku. Tato vlastnost je důležitá v laboratorních kvasných testech, u nichž odběr většího množství vzorku může zkreslit průběh kvašení.

Pro tento účel se s úspěchem ověřovala refraktometrická metoda analýzy malých objemů (1–2 ml) vzorků levným refraktometrem bez vlastní temperace, ale s výpočetní korekcí na teplotu. Běžnou alternativou tohoto postupu je použití levného digitálního denzitometru, jeho cena je však asi dvojnásobná. Při kontrole průběhu kvašení se

alcohol and real extract concentrations is assumed to hold for the measured fermentation period. When the measurement is carried out outside the initial period, an additive constant can be added to formula (7) to make the calculation more accurate. The linear functions (14, 15) can likewise be replaced by polynomial functions; this is especially advantageous when using exact refractometers with sample temperature control, since it substantially improves the accuracy of the analysis.

## 2.2 Instrumentation

Beer analyzer

Automatic beer analyzer SCABA 5610 (Foss, Denmark).

Refractometer

Digital manual laboratory refractometer DR 301-95 (A. Krüss Optronic, Germany) without sample temperature control but with computing correction permitting the conversion of measured refraction to a sample temperature of 20 °C. The instrument has the range of 0 to 95 mass % and declared precision of measurement  $\pm 0,1$  °Brix.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Instrument calibration

Calibration was done using several tens of brewery samples of lagers (original gravity 10 and 12 °P) collected daily from cylindroconical vessels. The parameters determined in these samples included original, apparent and real extract and, in parallel, other quantities such as the degree of real and apparent attenuation. The samples were filtered and degassed by shaking before measurement.

This set of data was processed by multilinear regression using the Microsoft Excel software. Introducing calibration constants  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  into formulas (14) and (15) gave simple equations for back computation of alcohol and real extract levels (16,17) and, from them, the degrees of apparent and real attenuation.

$$(16) \quad A = 0,67062 \cdot P - 0,66091 \cdot R$$

$$(17) \quad E_R = 1,27582 \cdot R - 0,29388 \cdot P$$

The numerical constants in formula (16) should theoretically (for  $k_1 = 1$ ) be identical; the differences between them are caused by the adjustment done by the regression method that aims at obtaining the best agreement among the results. Similarly, the same set of data gave constants  $k_1 = 1,01355$  and  $k_2 = 0,44552$ , which are near the estimated constants for the concentration dependence of sucrose ( $k_1 = 1$ ) and ethanol ( $k_2 = 0,45$ ) solutions.

Apparent extract and apparent attenuation were calculated from  $A$ ,  $E_R$  by conversion to corresponding densities. The Tabarie formula was then used to obtain apparent density and apparent extract by the procedure described in [1]. To verify these values we used the constants calculated in this way for evaluating a similar set of data gathered after 2 months of operation.

Analytica EBC, in addition to the classical distillation method of alcohol determination, (method 9.2.1) permits also refractometric determination (method 9.2.3); however, a complete analysis of beer obviously requires the determination of density of beer or the distillation residue [2]. A combination of density and refraction measurements is a popular technique but its results never exactly fit in with the classical distillation pycnometric measurements [8]. These differences can partially be eliminated by using different constants in the calculation formulas for different beer types or by introducing correction factors.

With fermentations in a single vessel, the degree of attenuation can be calculated either by using a constant original wort concentration or from the results of analyses of individual samples. In these, the calculated values of original extract obtained by repeated measurements in different phases of fermentation somewhat differ.

Since the above data were obtained from complete analyses of each sample, the original extract calculated for each sample was used for comparison. This procedure is more suitable when checking fermentation course by an automatic analyzer is not available, e.g. on bank holidays or at night when the automatic analyzer does not operate.

Despite the considerable progress in the construction of digital densitometers, refractometry is still in use both in the laboratories and in industrial practice. This is partly due to the developments of advanced refractometers with software elimination of undesirable influences and with Peltier cells, which do not require external thermosta-

využívá skutečnost, že výsledky rozboru lze získat měřením jedné veličiny (refrakce nebo hustoty) za předpokladu, že je známa počáteční refrakce nebo původní extrakt mladiny před zakvašením.

Sledování průběhu kvašení měřením hustoty se historicky prosadilo díky snadší dostupnosti ponorného sacharometru se stupnicí, udávající koncentraci sacharosy, lze si však představit podobný postup, využívající údaje refraktometru, opět se stupnicí koncentrace sacharosy. Základním údajem by byla počáteční refrakce  $R_0$ , ze které by se také počítal refraktometrický stupeň prokvašení podle vztahu (13).

Dosavadní výsledky prokázaly použitelnost metody tam, kde není k dispozici automatický analyzátor a vyžaduje se nižší přesnost, postačující k spolehlivému měření stupně prokvašení, nutnému pro další technologická opatření, např. pro sudování. Metoda je také zcela akceptovatelná pro sledování průběhu kvašení v malých objemech vzorků. Vzorky se zbaví oxidu uhličitého krátkým protřepáním, pak se zfiltrují nebo odstředí, což je výhodné zejména u malých objemů.

Současná přístrojová technika nabízí pro rychlé měření stupně prokvašení také přesné váhy s ponorným tělískem, ruční digitální hustoměr a ruční digitální refraktometr, oba s korekcí na teplotu vzorků. Řádově dražší přístroje jsou vybaveny temperací, ještě dražší využívají kombinace různých měřicích principů. Porovnání metod a postupů uvádí tab. 1. V tabulce je nutné přihlídnout k tomu, že některé přístroje jsou součástí běžného vybavení laboratoře. Proto se také nezapočítává cena filtrace nebo odstředování.

V tabulce se uvádí doba měření jednoho vzorku, neboť produktivita práce silně závisí na množství zpracovávaných vzorků. Proto se do uvedené doby nezahrnuje doba odběru a přípravy vzorku.

#### Literatura / References

1. Košin, P., Šavel, J., Brož, A., Sigler, K.: Control and Prediction of the Course of Brewery Fermentations by Mass Analysis. *Folia Microbiol.* (v tisku/in print).
2. Analytica EBC. Verlag Hans Carl, Getränke-Fachverlag Nürnberg, Germany ISBN 3-418-00759-7. Metoda 9.2.1 Alcohol in beer by distillation, 9.2.3 Alcohol in beer by refractometry, 9.4 Original, real and apparent extract and original gravity of beer.
3. Šavel, J.: Význam destilace a přehánění vodní párou v pivovarské laboratoři. *Kvasny Prum.* **44**, 1998, 292–293.
4. Zanker, G.: Analytical device for measuring the ethanol concentration in beer based on NIR absorption. *Brauwelt Int.* **22**, 2004, 110–112.
5. Šavel, J.: Rychlá a jednoduchá metoda k stanovení hodnot zdánlivého extraktu v průběhu kvašení. *Kvasny Prum.* **17**, 1971, 53–56.
6. Ioffe, B. V.: *Refraktometrické metody v chemii*. Vyd. 1, SNTL, Praha, 1983.
7. Brautechnische Analysenmethoden Band 2, Mebak, Freising-Weihenstephan, 3. Auflage 1993. Metoda 2.13.5 Refraktionsanalyse.
8. Gerogiannaki-Christopoulou, M., Kyriakidis, N.V., Athanasopoulos, P.E.: New refractive index method for measurement of alcoholic strength of small volume samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **86**, 2003, 1232–1235.

ting baths. Moreover, in contrast to densitometry, refractometry is relatively little affected by the content of dissolved carbon dioxide and permits therefore the analysis of incompletely decarbonized samples.

Refractometry is especially advantageous for measurements of small sample volumes as it can be, when needed, performed in a single sample drop. This is important in laboratory fermentation tests in which the repeated sampling collection of larger volumes may negatively affect the outcome of the fermentation.

We have successfully used refractometric analysis of small sample volumes (1–2 ml) using an inexpensive refractometer without temperature control but with a computational temperature correction. A common alternative of this procedure is the use of low-cost digital densitometer, which is, however, twice as expensive. The monitoring of fermentation course is based on the fact that satisfactory results can be obtained by measuring a single quantity, either refraction or density, provided the original refraction or original wort extract before fermentation are known.

Monitoring the course of fermentation by measuring wort density has become wide-spread due to the easy availability of immersion saccharometers with scales in sucrose concentration. One can envisage also a similar procedure based on using refractometers, again with scales calibrated in sucrose concentration. The basic data would be the original refraction  $R_0$ , which would provide the basis for calculating the refractometric degree of attenuation according to formula (13).

Our results clearly show the usefulness of the method in cases when automatic analyzer is not available and a lower precision is sufficient for determining reliably the degree of attenuation needed for introducing further technological measures, e.g. in vatting. The method is also highly suitable for monitoring fermentation course in small sample volumes. The samples are freed of carbon dioxide by short shaking, filtered or centrifuged and measured.

Instruments currently available for fast measurement of attenuation degree include high accuracy scales with immersed body (glass sinker) based on buoyancy method, manual digital densitometers and manual digital refractometers, both with sample temperature correction. Considerably more expensive instruments are then equipped with temperature control and still more expensive ones make use of a combination of different measurement principles. Various methods and procedures are compared in tab. 1. It should be kept in mind that some of these instruments are parts of conventional laboratory equipment. The costs of filtration and/or centrifugation are therefore not included.

The table gives the duration of measurement of a single sample since the work productivity depends strongly on the number of processed samples. The time therefore does not include sample collection and preparation.

Translated by Karel Sigler

Do redakce došlo 24. listopadu 2008  
Lektoroval Ing. Jiří Čulík, CSc.

Tab.1 Porovnání metod a přístrojů pro měření průběhu hlavního kvašení / Comparison of methods and instruments for monitoring the course of main fermentation

Metoda/přístroj Method/Instrument	Přesnost zdánlivého extraktu / Accuracy of apparent extract (%)	Objem vzorku / Sample volume (ml)	Doba rozboru / Time of analysis (s)	Relativní cena přístroje / Relative price of instrument
Ponorný hustoměr / Immersion densitometer	± 0,15	500	30	1
Digitální ruční refraktometr / Digital manual refractometer	± 0,15	2	20	6
Digitální ruční hustoměr / Digital manual densitometer	± 0,15	5 až 10	20	10
Vázková analýza / Gravimetric analysis	± 0,25	0	10	10
Váhy s ponorným tělískem / Scales with immersed body	± 0,10	100	40	40
Stolní přístroje s temperací / Benchtop instruments with temperature control	± 0,05	2 až 5	20	100
Analyzátoři piva / Beer analyzers	± 0,05	50	180	500