

# Výpočet tlaku při kvašení v uzavřené nádobce

## Calculation of Pressure Growth During Fermentation in a Closed Container

Jan ŠAVEL, Petr KOŠIN, Adam BROŽ

Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice / Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, CZ-370 21 České Budějovice

e-mail: jan.savel@budvar.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Výpočet tlaku při kvašení v uzavřené nádobce.** Kvasny Prum. 60, 2014, č. 9, s. 233–238

Měření přetlaku v kvasné nádobce lze využít pro měření aktivity kvasnic i zkvasitelnosti kvasného substrátu. Tlakové kvašení v uzavřené nádobce také eliminuje únik vlhkosti, ethanolu i  $\text{CO}_2$  při kvašení, čímž se zjednodušuje výpočet stupně prokvašení ze změřeného tlaku. Byl navržen výpočetní postup vyjadřující závislost mezi změřeným tlakem  $\text{CO}_2$  a složením kvasícího nápoje. Platnost vztahu se ověřovala při kvašení směsi substrátu s vysokou dávkou kvasnic i kvašení modelového roztoku sacharózy s přísadkou sladového výtažku. Výsledky měření umožňují odhad hodnot tlaku v uzavřené nádobě při známém stupni prokvašení substrátu. Kvašení pod tlakem  $\text{CO}_2$  lze potencionálně využít k měření inhibičního vlivu obsahu  $\text{CO}_2$  a ethanolu na aktivitu kvasnic, refermentace piva v láhvi i pro přípravu sycených nápojů s vysokým obsahem  $\text{CO}_2$  nebo účinku dezinfekčních prostředků.

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Calculation of pressure growth during fermentation in a closed container.** Kvasny Prum. 60, 2014, No. 9, pp. 233–238

The pressure measurement in the fermentation container can be used for the determination of the yeast activity or substrate fermentability. Pressure fermentation in sealed container also allows eliminating the influence of moisture, ethanol and  $\text{CO}_2$  escape during fermentation, which simplifies the calculation of the degree of attenuation or saturation of beverage from measured pressure. Calculation procedure expressing the dependence between the measured pressure of  $\text{CO}_2$  in a closed container and the composition of fermenting beverages was designed. The calculation was verified in the course of fermentation of sucrose with a high dosage of yeast and at fermentation of model sucrose solution with the addition of malt extract. The measurement allows the estimation of pressure in a closed vessel after reaching known attenuation degree of fermentation substrate. Fermentation under pressure of  $\text{CO}_2$  can potentially be used to measure inhibition effect of  $\text{CO}_2$  and ethanol on yeast activity, effect of disinfectant, calculate final pressure at beer refermentation in the bottle or prepare carbonated beverages having a high content of  $\text{CO}_2$ .

**Šavel, J. – Košin, P. – Brož, A.: Die Druckberechnung während der Gärung im geschlossenen Gefäß.** Kvasny Prum. 60, 2014, Nr.9, S. 233–238

Für die Messung der Hefeaktivität oder der Vergärbarkeit des Gärsubstrats ist es möglich, das Überdruckmessen in einem Gärbehälter anzuwenden. Das Überdruckmessen im geschlossenen Gefäß auch ein Entweichen von Feuchtigkeit, Ethanol und  $\text{CO}_2$  während der Gärung eliminiert, was aus dem gemessenen Druck die Berechnung des Vergärungsgrades vereinfacht. Es wurde ein die Abhängigkeit zwischen dem  $\text{CO}_2$  gemessenen Druck und der Zusammensetzung des gärenden Getränkes beschreibendes Berechnungsverfahren vorgeschlagen. Die Gültigkeit des Berechnungsverfahrens wurde während der Gärung eines mit hoher Hefedosis enthaltenen Substrats und auch bei der Gärung der Modelllösung der Saccharose mit Malzextrakts zugabe. Die Messungsergebnisse ermöglichen bei dem bekannten Substratsvergärungsgrad eine Schätzung des Druckes im geschlossenen Gefäß. Die unter  $\text{CO}_2$  Druck geführte Gärung kann zur Messung des  $\text{CO}_2$  Inhibitionsgehalts, Ethanol und ihren Einfluss auf die Hefeaktivität, auf die wiederholte Flaschenbieregärung und auch zur Herstellung der kohlenstoffhaltigen Getränke angewandt werden.

**Klíčová slova:** kvasnice, tlakové kvašení, měření přetlaku  $\text{CO}_2$ , výpočet složení substrátu, aktivita kvasnic

**Keywords:** yeast, pressure fermentation, closed container, yeast activity, degree of attenuation,  $\text{CO}_2$  saturation, disinfectant efficiency

## 1 ÚVOD

Při laboratorním kvašení se uvolňuje velké množství oxidu uhličitého, který obvykle uniká z kvasné nádoby. V uzavřené nádobce rychle narůstá tlak v závislosti na spotřebě kvasného substrátu, čehož je možné využít pro stanovení aktivity kvasnic, průběhu dokvašování, výpočtu stupně prokvašení i nasycení kvasícího substrátu oxidem uhličitým.

Měření kvasničné aktivity a koncentrace kvasnic se v pivovarství věnuje velká pozornost (Basařová a Šavel, 2010; Šavel a Prokopová, 1994a; Heggart a Margaritis, 2000). V poslední době se zejména pro sledování průběhu laboratorního kvašení v malých nádobkách objevily nové postupy a přístroje. Klasický odběr vzorků a jejich následná analýza automatickými analyzátory jsou nejpřesnějším řešením, ale změna objemu kvasícího substrátu opakovaným odběrem vzorku ovlivňuje kvašení narušením přirozeného míchání uvolňujícím se oxidem uhličitým. Proto byly vyvinuty neinvazivní metody, jako jsou refraktometrická metoda, vyžadující pouze malý objem vzorku, nebo vázková analýza kvašení (Košin a Šavel, 2008; Šavel a Košin, 2009a).

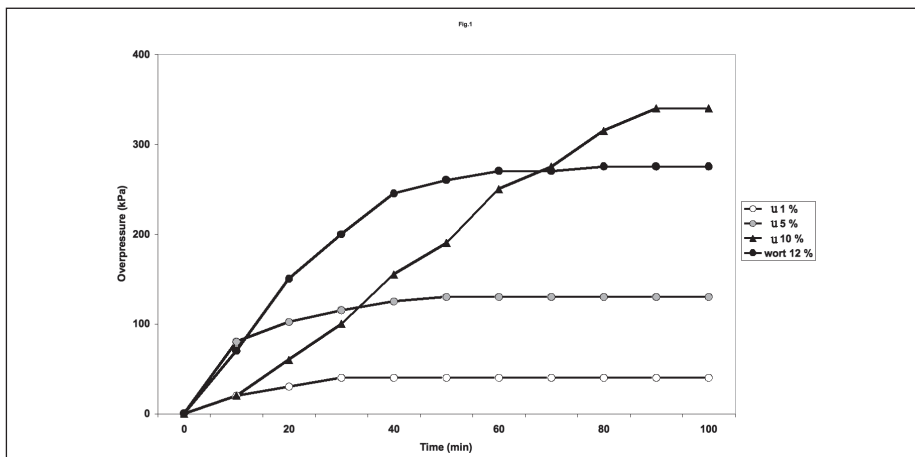
Vázková metoda měří změny hmotnosti kvasícího vzorku a vztahuje úbytek hmotnosti na změnu jeho extraktu. Problémem je vynášení ethanolu i vodních par proudem oxidu uhličitého, a zejména obtížné sledování průběhu dokvašování, kde jsou tyto metody nepřesné. Ke klasickým metodám sledování průběhu kvašení patří i měření průtoku unikajícího oxidu uhličitého, používané v laboratorní i provozní praxi (Šavel a Košin, 2009b).

## 1 INTRODUCTION

In a laboratory fermentation large amount of carbon dioxide is formed, which normally escapes from the fermentation container. In a closed container the pressure grows rapidly in relation to consumed substrate, which can be used to determine the activity of yeast, follow the course of fermentation and calculate the real degree of fermentation or saturation of the fermented substrate with carbon dioxide.

Great attention is paid to the measurement of yeast activity and concentration in the brewing industry (Basařová and Šavel, 2010; Šavel and Prokopová, 1994; Heggart and Margaritis, 2000). Recently, new processes and apparatus for monitoring the laboratory fermentation in small containers have appeared. Classical sampling with subsequent analysis by automatic analyzers is the most precise solution, but the volume of removed sample of fermenting substrate influences the course of the fermentation due to change of natural mixing condition caused and released carbon dioxide. Therefore, non-invasive methods have been developed, such as gravimetric fermentation analysis or refractive index method, requiring only a small sample volume (Košin and Šavel, 2008; Šavel and Košin, 2009a).

The gravimetric fermentation analysis measures weight changes of the container with fermenting sample and the mass loss is related to extract change in the fermenting liquid. The problem is stripping



Obr.1 Přetlak CO<sub>2</sub> tvořeného při kvašení roztoku sacharosy nebo mladiny (% hm.) v malé kvasné nádobce / Fig.1 The pressure of CO<sub>2</sub> produced during sucrose solution or hopped wort (%wt) fermentation in small container

V provozu se nejčastěji využívalo měření průtoku unikajícího oxidu uhličitého (Eyben, 1989; Daoud a Searle, 1990). Při kvašení vzniká relativně velké množství tohoto plynu, jehož měření na výstupu z tanku je snadné, přičemž se používá různých principů (Venturiho trubice, ochlazení termočlánku, ultrazvuk) (Kobayashi a Hiroshima, 2005).

Velmi výhodné jsou hmotnostní integrační průtokoměry, žádný z měřičů však neposkytuje stejné přesné výsledky jako analýza odebraných vzorků (Forrest, 1996). Kromě toho zůstává další oxid uhličitý rozpuštěný v kvasící mladině a toto množství silně vzrůstá při kvašení s přetlakem. Výpočtem jeho koncentrace se může sice tento vliv eliminovat, musí se však uvažovat tzv. supersaturace, která zvyšuje koncentraci rozpuštěného oxidu uhličitého nad rovnovážnou hodnotu (Pandiella a Garcia, 1995).

V laboratoři se původně k tlakovému měření používala klasická Warburgova metoda se skleněným mikromanometrem, později se měřil objem unikajícího oxidu uhličitého v tzv. fermentometrech, v nichž se unikající CO<sub>2</sub> jímá v plynové byretě naplněné okyseleným roztokem chloridu sodného, ve kterém se oxid uhličitý rozpouští jen v malé míře (Hlaváček et al., 1958).

Za určitý druh fermentometru lze označit kvasný válec podle Lietze, v němž se 750 ml zakvasilo poměrně velkou dávkou 20 g lisovaných kvasnic a po 24 h kvašení se stanovil konečný stupeň prokvašení (Müller, 1972). Množství produkovaného CO<sub>2</sub> při kvašení se spolu s měřením povrchového náboje kvasnic použilo k posouzení vitality pivovarských kvasnic. Objem CO<sub>2</sub> se jednoduše měřil v Einhornově nádobce, původně určené pro stanovení obsahu glukosy. Tato jednoduchá zkouška dobře rozeznala vliv různých stresových faktorů na vitalitu kvasnic (Müller-Auffermann a Hutzler, 2011).

Podle nárůstu tlaku oxidu uhličitého v uzavřené nádobce se v laboratorní praxi hodnotila kvasničná aktivita (Mück a Narziss, 1987a; Mück a Narziss, 1987b; Mück a Narziss, 1988; Šavel a Prokopová, 1994b). V poslední době se aktivita kvasnic měřila manometrickou metodou s bezdrátovým přenosem tlaku v kvasných nádobkách (Müller-Auffermann a Silva, 2014).

Aby se sledované tlakové změny mohly kvantifikovat, zabývá se tento článek výpočtem změn extraktu podle nárůstu tlaku v uzavřené kvasné nádobce.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Kvasný substrát

Jako kvasný substrát sloužily roztoky sacharosy (Sigma Aldrich, ČR) a provozní mladina.

### 2.2 Kvasné nádoby pro stanovení kvasničné aktivity

30 ml kvasné nádoby z PE (polyethylen) s mechanickým manometrem (0–400 kPa).

### 2.3 Přístroje

Laboratorní analyzátor piva Alcolyzer (Anton Paar, Rakousko), měřič obsahu CO<sub>2</sub> v pivu (1-CUBE, ČR).

### 2.4 Postup měření

Do nádoby se navázily lisované provozní kvasnice předtím promyté vodovodní vodou, přidal kvasný substrát, směs se protřepala

of ethanol and water vapor by the stream of carbon dioxide as well as small weight changes at secondary fermentation, where such methods are inaccurate. Classical methods for monitoring the laboratory or industrial fermentation use carbon dioxide flow rate measurement (Šavel and Košin, 2009b).

The most commonly way how to follow the industrial fermentation is the measurement of the flow rate carbon dioxide leaving fermentation vessel (Eyben, 1989; Daoud and Searle, 1990). When large amount of gas is formed the measurement is easy using various principles (Venturi tube, thermocouple flowmeter, ultrasound) (Kobayashi and Hiroshima, 2005).

Mass flowmeter is suitable tool although it does not provide accurate results comparable to the analysis of samples taken during fermentation (Forrest, 1996). In addition a lot of carbon dioxide is dissolved in the ferment-

ing liquid and this amount increases during overpressure fermentation. The mistakes can be eliminated by suitable calculation that should consider the influence of supersaturation, which increases the concentration of dissolved carbon dioxide above the equilibrium value (Pandiella and Garcia, 1995).

Initially the pressure was measured by classical Warburg method with glass micromanometer which was later replaced by various fermentometers in which CO<sub>2</sub> was collected in a gas burette filled with acidified saline solution with low CO<sub>2</sub> solubility (Hlaváček et al., 1958).

Fermentation cylinder according Lietz contained 750 ml of wort pitched by relatively large dosage of 20 g pressed yeast and the final attenuation was determined after 24 hours fermentation (Müller, 1972). The amount of CO<sub>2</sub> produced during fermentation together with the measurement of surface charge of yeast was used to assess the vitality of brewer's yeast. The volume of CO<sub>2</sub> was easily measured in Einhorn tube, originally designed for the determination of glucose. This simple test well recognized influence of different stress factors on yeast vitality (Müller-Auffermann and Hutzler, 2011).

Pressure growth measurement of carbon dioxide in a closed container was used to estimate yeast activity (Mück and Narziss, 1987a; Mück and Narziss, 1987b; Mück and Narziss, 1988; Šavel and Prokopová, 1994b). Recently, the yeast activity was measured according to pressure growth followed by wireless transmission in the fermentation flasks (Müller-Auffermann and Silva, 2014).

To quantify the pressure changes, this article deals with the calculation of the extract from the pressure growth in a closed small fermentation container.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Fermentation substrate

Sucrose (Sigma Aldrich, Czech Republic) solution and production wort were used.

### 2.2 Small container for the yeast activity determination

Cylindrical 30 ml fermentation container made of PE (polyethylene) with a mechanical gauge (0–400 kPa).

### 2.3 Instruments

Beer analyzer (Alcolyzer, Anton Paar, Austria) and manometric instrument for the CO<sub>2</sub> content measurement in beer (1-CUBE, Czech Republic).

### 2.4 The measurement procedure

Pressed yeast previously washed in running tap water was weighed, put into fermentation vessel, fermentation substrate was added and the pressure growth was recorded. Foam was suppressed by addition of 0.1 ml of silicone defoamer.

Sucrose solution with the addition of malt extract, providing growth factors for yeast was fermented in closed 0.5 l PET bottle to estimate the degree of attenuation and saturation. The bottle was shaken before pressure measurement.

a zaznamenával nárůst tlaku v závislosti na čase. Pěnivost se potlačila přidáním 0,1 ml silikonového odpěňovače.

Pro výpočet stupně prokvašení a nasycení kvasnicího roztoku se modelové roztoky sacharózy s přidáním sladového výtažku, poskytujícího růstové faktory kvasnic, kvasily v uzavřené 0,5 l PET láhvi. Před měřením tlaku se směs v nádobkách protřepala.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Teorie tlakového kvašení

Předpokládá se smísení kvasničné suspenze se známým obsahem sušiny se zvoleným objemem kvasného substrátu. Zpravidla se várečné kvasnice odstředí v nádobce s plochým dnem, přičemž relativní podíl vlhkého sedimentu slouží pro odhad obsahu kvasničné sušiny (Basařová a Šavel, 2010). Promytá kvasničná suspenze již zpravidla neobsahuje zkvasitelné cukry.

Hmotnost kvasničné sušiny a množství vody v ní se vypočte podle:

$$m_{dy} = m_{wy} \cdot w_{dy} \quad (1)$$

$$m_w = m_{wy} - m_{dy} \quad (2)$$

kde  $m_{dy}$  je hmotnost sušiny v kvasničné suspenzi,  $m_{wy}$  je hmotnost kvasničné suspenze,  $w_{dy}$  je hmotnostní zlomek její sušiny,  $m_w$  je hmotnost vody v kvasničné suspenzi. Hmotnostní zlomek sušiny v kvasničné suspenzi se může stanovit odstředěním podle hodnoty tzv. objemu vlhké biomasy. Řídké kvasnice obsahují 8-14 %, husté kvasnice 14-18 % a kvasnice vyliisované kvasničným lisem asi 30 % kvasničné sušiny ( $w_{dy} = 0,3$ ) (Basařová a Šavel, 2010).

Ke kvasničné suspenzi se přidá kvasný substrát se známým obsahem extraktu:

$$m_{E0} = m_s \cdot w_{E0} \quad (3)$$

kde  $m_{E0}$  je množství extraktu v přidaném roztoku o hmotnosti  $m_s$  s koncentrací udanou hmotnostním zlomkem extraktu  $w_{E0}$  a směs se homogenizuje. Zakvašený roztok v kvasné nádobce s volným hrdlovým prostorem  $V_g$  se skládá z roztoku extraktu a kvasničné suspenze.

$$m_0 = m_{wy} + m_s \quad (4)$$

kde  $m_0$  je celková navážka zakvašeného roztoku.

Zakvašeným substrátem se naplní kvasná nádobka s volným hrdlovým prostorem, v němž se po uzavření sleduje nárůst přetlaku v čase. Hrdlový prostor obvykle obsahuje vzduch, přibližně s okolním normálním tlakem 101,3 kPa, po spotřebě kyslíku kvasnicemi poklesne tlak nad substrátem o jednu pětinu, tj. asi na 79 kPa.

Nulový údaj přetlakového manometru může proto při začátku kvašení po spotřebě kyslíku a jeho náhradě oxidem uhličitým odpovídat absolutnímu tlaku 21 nebo 101,3 kPa oxidu uhličitého, podle toho, zda je hrdlový prostor vyplněn směsí dusíku a oxidu uhličitého nebo pouze  $\text{CO}_2$ . Teprve potom se začne přetlak zvyšovat nad nulovou hodnotu.

Při použití přetlakového manometru je tlak  $\text{CO}_2$ :

$$P_{\text{CO}_2} = p - P_i + P_{\text{atm}} \quad (5)$$

kde  $p$  je údaj přetlakového manometru,  $P_{\text{CO}_2}$  je parciální tlak oxidu uhličitého,  $P_{\text{atm}}$  je normální atmosférický tlak 101,325 kPa,  $P_i$  je parciální tlak plynů neobsahujících oxid uhličitý v hrdle nádoby, který je např. po spotřebě kyslíku kvasnicemi  $P_i = 79$  kPa, u lahví pouze s oxidem uhličitým v hrdlovém prostoru je  $P_i = 0$ .

Hmotnost oxidu uhličitého  $m_{\text{CO}_2g}$  v hrdlovém prostoru se vypočte ze stavové rovnice:

$$m_{\text{CO}_2g} = \frac{P_{\text{CO}_2} \cdot V_g \cdot M_{\text{CO}_2}}{RT} \quad (6)$$

kde  $P_{\text{CO}_2}$  je parciální tlak oxidu uhličitého,  $M_{\text{CO}_2}$  je jeho molekulární hmotnost,  $R$  je plynová konstanta,  $V_g$  je objem hrdlového prostoru včetně vnitřního objemu manometru a  $T$  absolutní teplota.

Koncentrace oxidu uhličitého se obvykle vyjadřuje jeho rozpustností:

$$c_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2} \cdot K(t) \quad (7)$$

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Theory of pressure fermentation

Yeast suspension with a known dry mass and selected volume of the fermentation substrate is assumed. Usually, brewing yeast is centrifuged in a cylinder cuvette with a flat bottom and the ratio of wet sediment was used for estimation of yeast dry matter (Basařová and Šavel, 2010). The washed yeast suspension usually does not contain fermentable sugars.

The weight of dry yeast and the amount of water in it are calculated by:

$$m_{dy} = m_{wy} \cdot w_{dy} \quad (1)$$

$$m_w = m_{wy} - m_{dy} \quad (2)$$

where  $m_{dy}$  is the mass of dry yeast in suspension,  $m_{wy}$  is the mass of wet yeast suspension,  $w_{dy}$  is the mass fraction of the dry matter of yeast and  $m_w$  is the mass of water in the yeast suspension. Mass fraction  $w_{dy}$  of the yeast dry matter in the yeast suspension can be determined by centrifugation. Liquid yeast contains 8-14 %, thick yeast 14-18 % and pressed yeast about 30 % of yeast dry matter ( $w_{dy} = 0.3$ ) (Basařová and Šavel, 2010).

The yeast suspension is added to the fermentation substrate with a known content of the extract:

$$m_{E0} = m_s \cdot w_{E0} \quad (3)$$

where  $m_{E0}$  is the total mass of the extract in the added solution with the mass  $m_s$  and the concentrations given by mass fraction of extract  $w_{E0}$  and the mix is homogenised. Inoculated solution in the fermentation vessel with a headspace  $V_g$  consists of yeast extract solution and suspension.

$$m_0 = m_{wy} + m_s \quad (4)$$

where  $m_0$  is the total mass of pitched solution.

Pitched substrate is filled into fermentation vessel with a headspace in which the pressure growth is measured after sealing the vessel. Vessel headspace usually contains air with atmospheric pressure of 101.3 kPa. After oxygen consumption by yeast the pressure over the substrate drops by one fifth to pressure around 79 kPa.

Zero gauge value at the beginning of fermentation after consumption of oxygen and its replacement by carbon dioxide responds to partial pressure of carbon dioxide ranging from 21 to 101.3 kPa. If nitrogen from air stays in the headspace, the value zero responds to 21 kPa of  $\text{CO}_2$  which grows with further production of  $\text{CO}_2$ .

$$P_{\text{CO}_2} = p - P_i + P_{\text{atm}} \quad (5)$$

where  $p$  is an indication of the gauge,  $P_{\text{CO}_2}$  is the partial pressure of carbon dioxide,  $P_{\text{atm}}$  is the atmospheric pressure 101.325 kPa,  $P_i$  is the partial pressure of gas containing no carbon dioxide in the container headspace. For nitrogen in the headspace is  $P_i = 79$  kPa, for the headspace prefilled with  $\text{CO}_2$   $P_i = 0$ .

Mass of carbon dioxide in the headspace is calculated from the ideal gas law:

$$m_{\text{CO}_2g} = \frac{P_{\text{CO}_2} \cdot V_g \cdot M_{\text{CO}_2}}{RT} \quad (6)$$

where  $m_{\text{CO}_2g}$  is the mass of carbon dioxide in the gaseous phase,  $P_{\text{CO}_2}$  is the partial pressure of carbon dioxide  $M_{\text{CO}_2}$  is its molecular weight,  $R$  is universal gas constant,  $V_g$  is the headspace volume including the internal volume of the pressure gauge and  $T$  is the absolute temperature of gas.

Carbon dioxide concentration in liquid is usually expressed by its solubility:

$$c_{\text{CO}_2} = P_{\text{CO}_2} \cdot K(t) \quad (7)$$

where  $c_{\text{CO}_2}$  is the concentration of dissolved carbon dioxide,  $K(t)$  is the constant of the temperature dependence of the solubility of carbon dioxide,  $P_{\text{CO}_2}$  is the partial pressure of  $\text{CO}_2$  in equilibrium.

The amount of dissolved carbon dioxide in the liquid phase is:

$$m_{\text{CO}_2l} = c_{\text{CO}_2} \cdot (m_s + m_w) \quad (8)$$

where  $m_{\text{CO}_2l}$  is the amount of carbon dioxide in the liquid phase with its concentration  $c_{\text{CO}_2}$ , expression  $m_w + m_s$  is the total mass of the fermenting liquid.

kde  $c_{CO_2}$  je koncentrace rozpuštěného oxidu uhličitého,  $K(t)$  je konstanta teplotní závislosti rozpustnosti oxidu uhličitého,  $P_{CO_2}$  je parciální tlak  $CO_2$ .

Množství rozpuštěného oxidu uhličitého v kapalně fázi je:

$$m_{CO_{2l}} = c_{CO_2} \cdot (m_s + m_w) \quad (8)$$

kde  $m_{CO_{2l}}$  je množství oxidu uhličitého v kapalně fázi,  $c_{CO_2}$  jeho koncentrace, výraz  $m_w + m_s$  je celková hmotnost kvasící kapalně fáze.

Celkové množství oxidu uhličitého vzniklého kvašením vyjadřuje vztah:

$$m_{CO_2} = m_{CO_{2g}} + m_{CO_{2l}} \quad (9)$$

kde  $m_{CO_2}$  je celkové množství oxidu uhličitého kvasící suspenzi.

$$m_{CO_2} = P_{CO_2} \left( \frac{V_g M_{CO_2}}{RT} + (m_s + m_w) \cdot K(t) \right) \quad (10)$$

V pivovarství se tradičně pro výpočet koncentrace oxidu uhličitého v pivu používá tzv. Haffmansův vzorec:

$$c_{CO_2} = \left( \frac{p_{eq} + 101,325}{100} \right) \cdot \exp \left( -10,73797 + \frac{2617,25}{t + 273,15} \right) \quad (11)$$

kde  $c_{CO_2}$  se vyjadřuje v % hm.,  $p_{eq}$  je rovnovážný přetlak oxidu uhličitého v kPa,  $t$  je teplota v °C. Pro použití jednotek, běžných v laboratorní praxi, se musí doplnit hodnoty přepočtových konstant:

$$m_{CO_2} = (p - P_i + 101,325) \cdot \left[ 0,00529 \cdot \frac{V_g}{t + 273,15} + 0,0001 \cdot (m_s + m_w) \cdot \exp \left( -10,74 + \frac{2617,25}{t + 273,15} \right) \right] \quad (12)$$

$$m_{CO_2} = (p - P_i + 101,325) \cdot f \quad (13)$$

kde  $m_{CO_{2g}}$  je hmotnost oxidu uhličitého v plynné fázi v gramech,  $p$  je přetlak, měřený přetlakovým manometrem v kPa,  $V_g$  je objem hrdlového prostoru v ml,  $P_i$  je parciální tlak plynů neobsahujících oxid uhličitý (kPa) v hrdle nádoby,  $t$  je teplota ve °C a  $f$  je hodnota přepočítávacího faktoru v g/kPa.

Podle koeficientů Ballingova vzorce vznikne z 2,0665 g extraktu 0,9565 g oxidu uhličitého, což znamená, že tvorba 1 g  $CO_2$  odpovídá spotřeba 2,1605 g extraktu.

$$\Delta E = \frac{2,0665}{0,9565} \cdot m_{CO_2} = 2,1605 \cdot m_{CO_2} \quad (14)$$

kde  $\Delta E$  je spotřeba substrátu (extraktu) v g při jeho počátečním množství  $m_s$ . Využití substrátu lze vyjádřit jako:

$$\alpha = \frac{2,1605 \cdot m_{CO_2}}{m_{E_0}} \quad (15)$$

kde  $\alpha$  je aktuální stupeň využití substrátu, který po vyjádření v % odpovídá skutečnému prokvašení substrátu.

Spojením vztahů (13) a (15) lze naopak získat hodnotu přetlaku  $p$  pro předem stanovený stupeň využití substrátu  $\alpha$ :

$$p = \alpha \cdot \frac{m_s E_0}{2,1605 f} + P_i - 101,325 \quad (16)$$

S použitím těchto vztahů lze odhadnout i složení zkvašeného substrátu, opět s použitím koeficientů Ballingova vzorce:

$$E_R = 100 \cdot \frac{(m_{E_0} - 2,1605 \cdot m_{CO_2})}{(m_s + m_w)} \quad (17)$$

$$A = 100 \cdot \frac{m_{CO_2}}{0,9565 \cdot (m_s + m_w)} = 104,55 \cdot \frac{m_{CO_2}}{(m_s + m_w)} \quad (18)$$

Obsah oxidu uhličitého v pivu v kvasné nádobce se vypočte podle:

$$CO_{2l} = 100 \cdot \frac{m_{CO_{2l}}}{(m_s + m_w)} \quad (19)$$

The total amount of carbon dioxide generated by fermentation is expressed by the relationship:

$$m_{CO_2} = m_{CO_{2g}} + m_{CO_{2l}} \quad (9)$$

where  $m_{CO_2}$  is the total amount of carbon dioxide produced by the fermentation which provide:

$$m_{CO_2} = P_{CO_2} \left( \frac{V_g M_{CO_2}}{RT} + (m_s + m_w) \cdot K(t) \right) \quad (10)$$

The brewers traditionally use the Haffmans formula for the calculation of the carbon dioxide concentration in beer:

$$c_{CO_2} = \left( \frac{p_{eq} + 101,325}{100} \right) \cdot \exp \left( -10,73797 + \frac{2617,25}{t + 273,15} \right) \quad (11)$$

where  $c_{CO_2}$  is expressed in % wt.,  $p_{eq}$  is the equilibrium pressure of carbon dioxide in kPa,  $t$  is the temperature in °C. To use the units, the conversion constants must be added for common practice in the brewing laboratory:

$$m_{CO_2} = (p - P_i + 101,325) \cdot \left[ 0,00529 \cdot \frac{V_g}{t + 273,15} + 0,0001 \cdot (m_s + m_w) \cdot \exp \left( -10,74 + \frac{2617,25}{t + 273,15} \right) \right] \quad (12)$$

$$m_{CO_2} = (p - P_i + 101,325) \cdot f \quad (13)$$

Where  $m_{CO_2}$  is expressed in grams,  $p$  is the overpressure showed by pressure gauge in kPa,  $V_g$  is the volume of the neck area in ml,  $P_i$  is the partial pressure of no carbon dioxide gas (kPa) in the vessel headspace,  $t$  is the temperature in °C  $f$  is the conversion factor in g/kPa.

According to the Balling formula 0.9565 g of extract carbon dioxide is obtained from 2.0665 g of extract which means that 1 g of  $CO_2$  corresponds to the consumption of 2.1605 g of extract.

$$\Delta E = \frac{2,0665}{0,9565} \cdot m_{CO_2} = 2,1605 \cdot m_{CO_2} \quad (14)$$

where  $\Delta E$  is the consumed substrate (extract) with initial quantity  $m_{E_0}$ . Consumption of the substrate can be expressed as:

$$\alpha = \frac{2,1605 \cdot m_{CO_2}}{m_{E_0}} \quad (15)$$

where  $\alpha$  is the degree of the substrate utilization, which corresponds to the real degree of attenuation usually expressed in %.

Combination of the relations (13) and (15) provides the value of pressure  $p$  for selected degree of the substrate consumption  $\alpha$ :

$$p = \alpha \cdot \frac{m_s E_0}{2,1605 f} + P_i - 101,325 \quad (16)$$

With these relationships we can estimate the composition of the fermented substrate, again using the coefficients of Balling formula:

$$E_R = 100 \cdot \frac{(m_{E_0} - 2,1605 \cdot m_{CO_2})}{(m_s + m_w)} \quad (17)$$

$$A = 100 \cdot \frac{m_{CO_2}}{0,9565 \cdot (m_s + m_w)} = 104,55 \cdot \frac{m_{CO_2}}{(m_s + m_w)} \quad (18)$$

The carbon dioxide content in beer in the fermentation container is calculated by:

$$CO_{2l} = 100 \cdot \frac{m_{CO_{2l}}}{(m_s + m_w)} \quad (19)$$

where  $CO_{2l}$  is calculated carbon dioxide content (wt%  $CO_2$ ) in fermented substrate solution. The value obtained by direct calculation from the pressure using Haffmansova formula is slightly different because it does not use the remaining nitrogen pressure of nitrogen in the headspace and the exchange of  $CO_2$  between the liquid and gas phases.



Tab.1 Výpočet využití substrátu z přetlaku na konci kvašení / Table 1 Calculation of substrate utilization from the pressure at the end of fermentation

| Druh substrátu / Substrate | Hrdlový prostor / Headspace gas | Substrát / Substrate ms (g) | Extrakt / Extract E <sub>0</sub> (%) | Přetlak / Overpressure p (kPa) | Využití substrátu α / Substrate utilization α |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|
| Sacharosa / Sucrose        | vzduch / air                    | 5                           | 1                                    | 30                             | 0.99  |
| Sacharosa / Sucrose        | CO <sub>2</sub>                 | 5                           | 5                                    | 130                            | 0.97  |
| Sacharosa / Sucrose        | CO <sub>2</sub>                 | 5                           | 10                                   | 340                            | 0.92  |
| Mladina / Hopped wort      | CO <sub>2</sub>                 | 5                           | 12                                   | 275                            | 0.66  |

Tab.2 Výpočet složení částečně zkvašeného substrátu z rovnovážného přetlaku v 0,5 l PET láhvi (A – alkohol, % hm.) / Table 2 Calculation of the composition of fermented substrate from the equilibrium pressure in 0.5 l PET bottle (A – alcohol in wt%)

| Extrakt / Extract E <sub>0</sub> (%) | Přetlak / Gauge p (kPa) | Vypočtené / Calculation |       |      |                      | Změřené / Measurement |       |      |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|------|----------------------|-----------------------|-------|------|
|                                      |                         | E <sub>R</sub> (%)      | A (%) | α    | CO <sub>2l</sub> (%) | E <sub>R</sub> (%)    | A (%) | α    |
| 1.1                                  | 190                     | 0.71                    | 0.35  | 0.65 | 0.32                 | 0.67                  | 0.35  | 0.52 |
| 2.1                                  | 350                     | 1.25                    | 0.61  | 0.60 | 0.55                 | 1.37                  | 0.64  | 0.49 |
| 3.1                                  | 420                     | 1.50                    | 0.72  | 0.48 | 0.66                 | 1.65                  | 0.81  | 0.50 |
| 4.1                                  | 600                     | 2.10                    | 1.02  | 0.51 | 0.93                 | 2.49                  | 0.99  | 0.45 |

kde CO<sub>2l</sub> je obsah oxidu uhličitého (hm.% CO<sub>2</sub>) v zkvašeném roztoku substrátu. Přímý výpočet ze změřeného přetlaku podle Haffmansova vzorce se mírně liší, protože nezahrnuje odečet tlaku zbývajících vzdušného dusíku v hrdle láhve a výměnu CO<sub>2</sub> mezi kapalnou a plynnou fází.

### 3.2 Ověření teoretického modelu tlakového kvašení

Pro orientační ověření výpočetních vzorců se měřil tlak v nádobce pro měření kvasničné aktivity i po kvašení roztoku sacharózy v PET láhvi.

Malé kvasné nádoby obsahovaly 5 g substrátu a 5 g kvasnic se sušinou 30 %, objem hrdlového prostoru byl 20 ml, teplota kvašení 23 °C. Obr.1 znázorňuje průběh přetlaku v čase, tab.1 uvádí vypočtené hodnoty využití substrátu α po skončeném kvašení. Pro větší názornost se hmotnostní zlomek extraktu udává v procentech. Přítomnost vzduchu a nízká koncentrace substrátu při nízkém přetlaku CO<sub>2</sub> patrně snížily přesnost výpočtu v prvním řádku tab. 1.

V dalším pokuse se zakvasilo 500 g roztoku sacharózy (1 až 4 %) s přidavkem 1,5 g sladového extraktu a 1 g lisovaných kvasnic v 0,5 l PET láhvi. Po 2 dnech kvašení při 23 °C se změřil rovnovážný tlak CO<sub>2</sub> v uzavřené láhvi a po zbavení roztoku CO<sub>2</sub> se částečně zkvašený roztok analyzoval (tab.2).

## 4 ZÁVĚR

Měření aktivity kvasnic podle objemu nebo množství uvolněného CO<sub>2</sub> se v historii biochemie i pivovarnictví uplatnilo v klasické Warburgově metodě i v klasických fermentometrech. Moderní elektronické měření tlaku prokázalo své přednosti v malém i větším laboratorním měřítku již před 20 lety a později. Přetlak oxidu uhličitého v kvasné nádobce se obvykle pohyboval mezi 20 až 200 kPa. Posledním stupněm vývoje měření přetlaku v kvasné nádobce jsou plně automatizované přístroje s bezdrátovým přenosem dat v reálném čase. Tyto metody využívaly vhodně volené počáteční podmínky stanovení, většinou zahrnující předepsané množství roztoku mladiny nebo sacharózy. Pro urychlení rozborů se volily vysoké dávky kvasnic, což sice neodpovídalo podmínkám provozního kvašení, ale přesto poskytovalo hodnotné informace.

S použitím tlakové odolných nádobek je možné využít i přetlaku v řádu MPa, což má význam při ověřování odolnosti kvasnic při kombinacích vysokého tlaku CO<sub>2</sub> i ethanolu při kvašení. Zajímavá je i příprava zkvašených substrátů s vysokým obsahem oxidu uhličitého, kde se nevyžadují vysoké dávky kvasnic a je možné využít podmínek blízkých provoznímu kvašení. Výhodná je také předpověď tlaku nad zkvašeným substrátem v uzavřené nádobce, což opět umožňuje optimalizovat návrh nových laboratorních metod, zaměřených na měření konečného prokvašení substrátu, účinku dezinfekčních prostředků i vitality kvasnic. Tyto postupy také mohou lépe předpovídat podmínky refermentace piva v láhvi nebo vliv mladiny na měření náchylnosti piva na gushing. Tlakové kvašení v uzavřené nádobce rovněž vylučuje únik vlhkosti, oxidu uhličitého a alkoholu, kterým se jinak při klasickém laboratorním rozboru nelze vyhnout.

### 3.2. Validation of the theoretical model of the pressure fermentation

To verify the calculation formulas the pressure was measured in the container to determine the activity of the yeast and the pressure after fermentation of sucrose solution in a PET bottle.

Small fermentation container contained 5 g of the substrate solution and 5 g of yeast (30% of dry matter), the volume of the headspace was 20 mL, the fermentation temperature was 23 °C. Fig.1 shows the pressure growth depending on time. Table 1 shows calculated values of degree of consumption of substrate α at the end of fermentation, the extract is expressed in percentages as usual in brewing. The presence of air and low substrate concentration at a low pressure CO<sub>2</sub> caused low accuracy of α value in the first row of Table 1.

In other experiment 500 g sucrose solution (1-4 %wt) with 1.5 g of malt extract and 1 g of compressed yeast addition was put in 0.5 l PET bottle. After 2 days of fermentation at 23 °C the equilibrium pressure of CO<sub>2</sub> in a closed bottle was determined and after decarbonation the partially fermented solution was analyzed (Table 2).

## 4 CONCLUSIONS

Measurement of yeast activity based on volume or amount of released CO<sub>2</sub> determination were applied in the history of biochemistry and brewing using conventional Warburg method or classical fermentometers. Modern electronic pressure measurement has shown its advantages in brewing laboratory 20 years ago and later. Overpressure of carbon dioxide in the fermentation container usually varied between 20 and 200 kPa. The latest stage of such procedures is pressure measuring in the fermentation container which is fully automated with wireless data transmission in real time. These methods use properly selected initial conditions comprising mainly a prescribed amount of wort or sucrose solution. To accelerate the analysis high dose of yeast is used, which does not respond to the industrial conditions of fermentation, but still provides valuable information.

Pressure-resistant container can also be used to work with overpressure in a range of MPa, which is important to verify the resistance of the yeast at combination with high pressure CO<sub>2</sub> and ethanol concentration. On the other hand the preparation of saturated substrate with low dosage of yeast is close to the industrial fermentation. The pressure measurement in a closed container allows optimize the design of new laboratory methods for the determination of the final substrate attenuation or to estimate effect of disinfectants on yeast vitality. These procedures can better predict conditions for beer refermentation in a bottle or find wort with tendency to beer gushing. Pressure fermentation in sealed container also eliminates the escape of moisture, carbon dioxide and alcohol, which otherwise influence the result of classical laboratory analysis in fermenting sample.

Z těchto důvodů jsme navrhli orientační výpočet vztahu mezi parametry kvašení a výsledným složením piva. Výpočet se ověřoval jak při stanovení stupně prokvašení roztoků sacharózy i mladiny, tak na výsledné složení nápoje, připraveného ze směsi sacharózy a sladového výtažku. Výsledky měření i přes poměrně velkou chybu umožňují odhad hodnot tlaku v uzavřené nádobě při známém stupni prokvašení substrátu.

#### Seznam symbolů:

|             |   |
|-------------|---|
| $A$         | obsah alkoholu ve zkvašeném substrátu                                   |
| $C_{CO_2l}$ | koncentrace rozpuštěného oxidu uhličitého                               |
| $CO_{2l}$   | vypočtená koncentrace $CO_2$ v modelovém roztoku                        |
| $dy$        | kvasničná sušina  |
| $E$         | extrakt, koncentrace substrátu  |
| $E_0$       | obsah extraktu v přidaném substrátu                                     |
| $E_R$       | obsah zbytkového extraktu ve zkvašeném extraktu                         |
| $f$         | hodnota přepočítávacího faktoru   |
| $K(t)$      | teplotní závislost rozpustnosti oxidu uhličitého                        |
| $m_0$       | celková navážka zakvašeného roztoku                                     |
| $m_{CO_2}$  | celkové množství oxidu uhličitého vzniklého kvašením                    |
| $m_{CO_2g}$ | hmotnost oxidu uhličitého v hrdlovém prostoru nádoby                    |
| $m_{CO_2l}$ | množství oxidu uhličitého v kapalně fázi                                |
| $m_{dy}$    | hmotnost sušiny v kvasničné suspenzi použité pro zakvašení              |
| $m_{E0}$    | množství extraktu v přidaném roztoku kvasného substrátu                 |
| $m_s$       | hmotnost roztoku kvasného substrátu, přidaného ke kvasničné suspenzi    |
| $m_w$       | hmotnost vody v kvasničné suspenzi pro zakvašení                        |
| $m_{wy}$    | hmotnost vlhké kvasničné suspenze pro zakvašení                         |
| $M_{CO_2}$  | molekulární hmotnost $CO_2$   |
| $p$         | přetlak v hrdlovém prostoru   |
| $p_{eq}$    | rovnovážný přetlak oxidu uhličitého v nasyceném roztoku                 |
| $P_{atm}$   | normální atmosférický tlak 101,325 kPa                                  |
| $P_{CO_2}$  | parciální tlak oxidu uhličitého v hrdle nádoby                          |
| $P_i$       | parciální tlak plynů neobsahujících oxid uhličitý v hrdle kvasné nádoby |
| $R$         | plynová konstanta   |
| $S$         | substrát  |
| $t$         | teplota ve °C   |
| $T$         | absolutní teplota   |
| $V_g$       | objem hrdlového prostoru  |
| $w$         | vláha   |
| $w_{E0}$    | hmotnostní zlomek extraktu v přidaném roztoku kvasného substrátu        |
| $w_{dy}$    | hmotnostní zlomek sušiny kvasničné suspenze pro zakvašení               |
| $wy$        | vlhké kvasnice, kvasničná suspenze                                      |
| $\Delta E$  | spotřeba extraktu (substrátu)   |

For these reasons, we proposed an indicative calculation of the relationship between the initial fermentation parameters and the resulting composition of the fermented substrate. The calculation was verified with both wort fermentability determination and the calculation of composition of the beverage, prepared from a mixture of sucrose and malt extract. Although accuracy of the method was relatively low, it could allow assess the value of pressure in a closed container at known attenuation degree of fermentation.

#### List of symbols

|             |   |
|-------------|---|
| $A$         | alcohol content in fermented substrate                                    |
| $C_{CO_2l}$ | concentration of dissolved carbon dioxide                                 |
| $CO_{2l}$   | calculated concentration of $CO_2$ in the model solution                  |
| $dy$        | dry yeast   |
| $E$         | extract, substrate concentration  |
| $E_0$       | extract content of the added substrate                                    |
| $E_R$       | residual extract of fermented substrate                                   |
| $f$         | the value of the conversion factor  |
| $K(t)$      | constant of the temperature dependence of the carbon dioxide solubility   |
| $m_0$       | total mass of pitched solution  |
| $m_{CO_2}$  | total amount of carbon dioxide resulting from fermentation                |
| $m_{CO_2g}$ | mass of carbon dioxide in headspace of the container                      |
| $m_{CO_2l}$ | amount of carbon dioxide in the liquid phase                              |
| $m_{dy}$    | mass of dry yeast in suspension used for pitching                         |
| $m_{E0}$    | amount of extract in solution added to the yeast suspension               |
| $m_s$       | mass of substrate solution added to the yeast suspension                  |
| $m_w$       | the mass of water in the yeast suspension for pitching                    |
| $m_{wy}$    | mass of wet yeast suspension for pitching                                 |
| $M_{CO_2}$  | molecular weight of $CO_2$  |
| $p$         | pressure in the headspace   |
| $p_{eq}$    | equilibrium pressure of carbon dioxide in a saturated solution            |
| $P_{atm}$   | normal atmospheric pressure 101,325 kPa                                   |
| $P_{CO_2}$  | partial pressure of carbon dioxide in the headspace                       |
| $P_i$       | the partial pressure of gas containing no carbon dioxide in the headspace |
| $R$         | gas constant  |
| $S$         | the substrate   |
| $t$         | the temperature in °C   |
| $T$         | the absolute temperature  |
| $V_g$       | headspace volume  |
| $w_{E0}$    | mass fraction of extract added in substrate solution                      |
| $w_{dy}$    | the mass fraction of the dry matter of yeast                              |
| $wy$        | wet yeast, yeast suspension   |
| $\Delta E$  | consumed extract (substrate)  |

#### LITERATURA / REFERENCES

Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T.: Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva. 1.vyd., VŠCHT Praha, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

Daoud, I.S., Searle, B.A., 1990: On-line monitoring of brewery fermentation by measurement of  $CO_2$  evolution rate. J. Inst. Brew., 96(5): 297-302.

Eyben, D., 1989: An automated method for fermentation process control. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am., 26(2): 51-55.

Forrest, I.S., 1996: In-line measurements, the way towards brewing efficiency? Ferment, 9(5), 273-280.

Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R.J., Pilkington, H., Sobczak, J., Russel, I., 2000: Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am., 37(4): 409-430.

Hlaváček, F. et al.: Pivovarské kvasnice. 1. vyd., SNTL, Praha 1958.

Košin, P., Šavel, J., Brož, A., Sigler, K., 2008: Control and prediction of the course of brewery fermentations by gravimetric analysis. Folia Microbiol., 53(5): 451-456.

Kobayashi, M., Hiroshima, T., Nagahisa, K., Shimizu, H., Shioya, S., 2005: On-line estimation and control of apparent extract concentration in low-malt beer fermentation. J. Inst. Brew., 111(2): 128-136.

Mück, E., Narziss, L., 1987a: Das Gäraktivitätsgerät – eine Möglichkeit zur Bestimmung der Hefevitalität. Teil I: Aufbau und Messgenauigkeit. Brauwelt, 127(29): 1280-1284.

Mück, E., Narziss, L., 1987b: Das Gäraktivitätsgerät – eine Möglichkeit zur Bestimmung der Hefevitalität. Teil II: Optimierung der Hefegabe beim Anstellen. Brauwelt, 127(39): 1734-1747.

Mück, E., Narziss, L., 1988: The fermentation activity apparatus - a means for determining yeast vitality. Part 1: Construction and accuracy of measurement. Brauwelt Int., 6: 61-62, 67-68.

Müller, H., 1972: Eine Methode zur Bestimmung der Endvergärung von Würzen. Mschr. Brauerei., 25(10): 278-279.

Müller-Auffermann, K., Hutzler, M., Schneiderbanger, H., Jacob, F., 2011: Scientific evaluation of different methods for the determination of yeast vitality. BrewingScience, 64(11), 107-118.

Müller-Auffermann, K., Silva, W., Hutzler, M., Jacob, F., 2014: Alternative method for the determination of yeast vitality. 11th International trends in brewing. Ghent, Belgium, April 13-17th., P 46, s. 105.

Pandiella, S.S., Garcia, L.A., Diaz, M., Daoud, I.S., 1995: Monitoring the production of carbon dioxide during beer fermentation. Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am., 32(3): 126-131.

Šavel, J., Prokopová, M., 1994a: Sedimentační a turbidimetrické stanovení koncentrace kvasnic. Kvasny Prum., 40(1): 9-12.

Šavel, J., Prokopová, M., 1994b: Měření aktivity várečných kvasnic. Kvasny Prum., 40(11), 325-329.

Šavel, J., Košin, P., Brož, A., Sigler, K., 2009a: Použití refraktometrie pro sledování průběhu kvašení. Kvasny Prum., 55(4): 94-99.

Šavel, J., Košin, P., Brož, A.: Sledování průběhu hlavního kvašení. Pivovarský kalendář 2009b. VÚPS, Praha. 2008. s. 116-132. ISBN 978-80-86576-32-9.