Některé poznámky k testování kvasničných kmenů

Ing. JAN ŠAVEL, Jihočeské pivovary, n. p., podnikové ředitelství, České Budějovice

Ačkoli existuje mnoho analytických metod k určování vlastností pivovarských surovin a produktů, zůstává posuzování pivovarských kvasnic dosud nedořešeným problémem. Přitom bylo na tomto poli vykonáno mnoho práce. Existují obsáhlé sbírky čistých kmenů pivovarských kvasnic s různými vlastnostmi. Byla vypracována řada metod, umožňujících rozlišení jednotlivých kmenů a jejich vlastností. Přesto zavádění vybraných kmenů do provozu naráží na četné obtíže. Chování kvasnic za provozních podmínek bývá odlišné od chování zjištěného v laboratoři.

Aby se tento rozpor odstranil, byly vyvinuty nové metody ke stanovení použitelnosti kvasnic k provozním účelům. Podstatou těchto metod je co nejlepší napodobení provozních podmínek v laboratoři. Kvasnice se zpravidla kultivují v kvasných válcích při nízké teplotě (7 až 10 °C), přičemž se průběžně sledují technologicky důležité vlastnosti, jako rychlost kvašení, sedimentace, lom a růst kvasnic, chemické složení piva aj.

Průkopnickou práci v tomto oboru vykonal *Weinfurtner* [1—8], který pracoval s kvasnými válci obsahu asi 800 ml mladiny nebo syntetické půdy, při stálé teplotě 7 °C. Kvasných válců obdobné konstrukce používají i jiní autoři. *Lietz* [9] sledoval chování kvasnic v skleněném válci s mladinou, ponořeném přímo v kvasné kádi ve spilce. Skupina pro výzkum kvasnic při EBC doporučuje používat 1,5 m dlouhých skleněných válců. Rovněž se objevuje stále více prací, používajících metody kvasných válců k řešení nejrůznějších otázek, týkajících se hlavního kvašení. *Dixon* [10] sledoval změny hořkých látek v průběhu kvašení ve skleněném, válcovitém fermentoru. *Průcha* [11] pracoval s aparaturou podle Weinfurtnera, v níž zjišťoval stav bakteriální kontaminace na průběh kvašení. Charakteristiky kvasnic, získané testováním ve válcích, se používá také při typizaci kvasnic. *Walkey* [12] použil výsledků modelových kvašení k rozdělení 153 druhů kvasnic z britských pivovarů do několika skupin. V ČSSR se typizací pivovarských kvasnic zabývala *Bendová* et al. [13, 14]. Vypracovala podrobnou charakteristiku 55 kmenů sbírky VÚPS v Praze. Kromě obvykle sledovaných znaků, jako je délka a šířka buněk, kvocient povrch/objem, sporulační schopnost, asimilace a zkvašování cukrů, doplněných i méně známými testy (tvorba obřích kolonií, test s kyselinou fosfomolybdenovou), obsahuje jejich charakteristika rovněž výsledky kvasných zkoušek podle Weinfurtnera. Tím vznikla důležitá základna pro výběr technologicky vhodných kmenů pro jednotlivé pivovary.

Přes úspěchy dosažené kvasnými zkouškami, objevují se i kritické hlasy k jejich používání. *Emeis* [15, 16] doporučuje raději testovat kvasnice přímo v pivovaru ve větších objemech (1—2 hl) mladiny. Kvašení v tak velkém objemu umožňuje totiž sledovat i vlastnosti kvasnic během dokvašování. Také *Masschelein* [17] uvádí, že laboratorními testy nelze předpovědět organoleptické vlastnosti hotového piva.

Na chování kvasnic při hlavním kvašení má vliv řada činitelů. Jsou to především velikost zákvasu, provzdušnění mladiny, teplota kvašení a zákvasná teplota, složení mladiny, obsah kalů v mladině, kyslík difundující do mladiny při kvašení, druh kvasničného kmene, adaptace kvasnic.

Abychom co nejvíce přiblížili laboratorní zkoušky provozním poměrům, sledovali jsme chování kvasnic v provozní mladině v kvasné aparatuře podle Weinfurtnera, přičemž jsme měnili některé podmínky kvašení, zatímco ostatní zůstávaly konstantní. Porovnáním takto získaných výsledků s výsledky normálního provozního kvašení jsme se pokusili určit nejvhodnější způsob testování kvasnic.

Materiál a metody

Kvasničné kmeny. Použilo se dvou flokulujících kmenů (č. 3, 5) a dvou neflokulujících (č. 1, 2) hlubokoprokvašujících kmenů ze sbírky VÚPS v Praze. Pro porovnání sloužil provozní kmen (č. 4) pivovaru, v jehož mladině se konaly laboratorní i provozní zkoušky.

Mladina. Provozní mladina 12 % hmot. se odebrala ze stoků před spíláním a zahřívala se 1 hodinu v proudící páře. Pro kvasné zkoušky se mladina před zakvašením ředila vodou na 11,50 % hmot.

Kultivace násadních kvasnic. Studovaný kmen se převedl ze šikmého mladinového agaru do sterilní mladiny ve zkumavce a kultivoval 48 h při 28 °C. Další kultivace následovala v těchto stupních:

30 ml mladiny ve Freundenreichově baňce (3 dny, 20 °C), 50 ml mladiny v Erlenmeyrově baňce (4 dny, 20 °C), 250 ml mladiny v Chamberlainově baňce (5 dní, 14 °C), 500 ml mladiny (12 dní, 8 °C). Přeočkovalo se opatrným slitím prokvašené mladiny a rozmícháním sedimentu v mladině dalšího stupně. Ve všech případech se použilo 12 % hmot. sterilní mladiny.

Zakvašení mladiny. Kvasinky z posledního kultivačního stupně se po slití větší části mladého piva převedly do sterilní kyvety a odstřeďovaly 5 min při 3000 ot/min. 2 g sedimentu se zakvasilo 750 ml sterilní mladiny stupňovitosti 11,50 ± 0,02 % hmot. Počet buněk v mladině se pohyboval v rozmezí 6,2—6,6 . 10^6 buněk/ml.

Odběr vzorků. Každý den se vzorky kvasící mladiny vytlačovaly z kvasných válců kysličníkem uhličitým, odebraným z ležáckých tanků za použití gumového balónku. Po vytřepání 15 ml vzorků na třepačce (10 min) se mladé pivo filtrovalo s přídavkem křemeliny přes skládaný filtr.

Analytické hodnocení. Ve filtrátu se stanovil zdánlivý extrakt měřením refrakce [18]. Počet kvasinek se určil Thomovou komůrkou [19], sušina kvasnic filtrací fritou S 4 [20]. Sedimentace kvasnic se zjišťovala měřením objemu kvasnic v zúžené části kvasného válce. Rozpuštěný kyslík se měřil polarograficky [21].

Kvasné zařízení. Kvasné válce podle Weinfurtnera byly doplněny trubicí, umožňující odběr vzorků během kvašení (viz nákres). Izotermní průběh kvašení zajišťovala termostatovaná vodní lázeň (výrobek Vývojového a pokusného střediska Jihočeských pivovarů), v níž byly válce ponořeny. Průměr kvasných válců byl 45 mm, výška bez zábrusové hlavy 650 mm, délka trubic k měření sedimentace kvasnic 145 mm, obsah mladiny 550 ml.

Výsledky měření

Při všech kvasných zkouškách byly zachovány tyto konstantní hodnoty: stupňovitost původní mladiny 11,50 % hmot., teplota kvašení 8 °C, velikost zákvasu 6,2—6,6 . 10^6 buněk/ml, dokonalé nasycení mladiny vzduchem před zakvašením (kontrolováno polarografickou metodou). Studovali jsme faktory ovlivňující kvašení:

1. *Vliv difúzního vzduchu*

Je všeobecně známo, že k dobrému průběhu kvašení je nezbytné dobré provzdušnění mladiny. Nedostatek kyslíku před zakvašením může mít značný vliv na tvar kvasných i růstových křivek. Při našich pokusech jsme zjistili, že průběh kvašení v kvasných válcích může výrazně ovlivnit i vzduch, který difunduje do kvasící mladiny kvasnou dekou. Abychom to potvrdili, provedli jsme pokus s kvašením za přísně anaerobních podmínek (bez přístupu vzduchu, ale s mladinou nasycenou před zakvašením vzduchem) a za přístupu vzduchu (*obr. 1, 2, tab. 1*).

Tabulka 1. Množství narostlých kvasnic při kultivaci za aerobních (A) a za anaerobních podmínek (B)

kmen č.	počáteční sušina kvasnic (m_1) mg/100 ml mladiny		konečná sušina kvasnic (m_2) mg/100 ml mladiny		množství kvasnic na jednotku zákvasu m_2/m_1	
	A	B	A	B	A	B
1	40,8	46,2	314,9	328,0	7,7	7,1
2	46,0	48,5	332,0	318,5	7,2	6,6
3	45,6	46,3	308,2	302,2	6,8	6,5
4	40,8	44,2	304,8	292,1	7,5	6,6
5	44,0	45,3	307,4	294,8	7,0	6,5

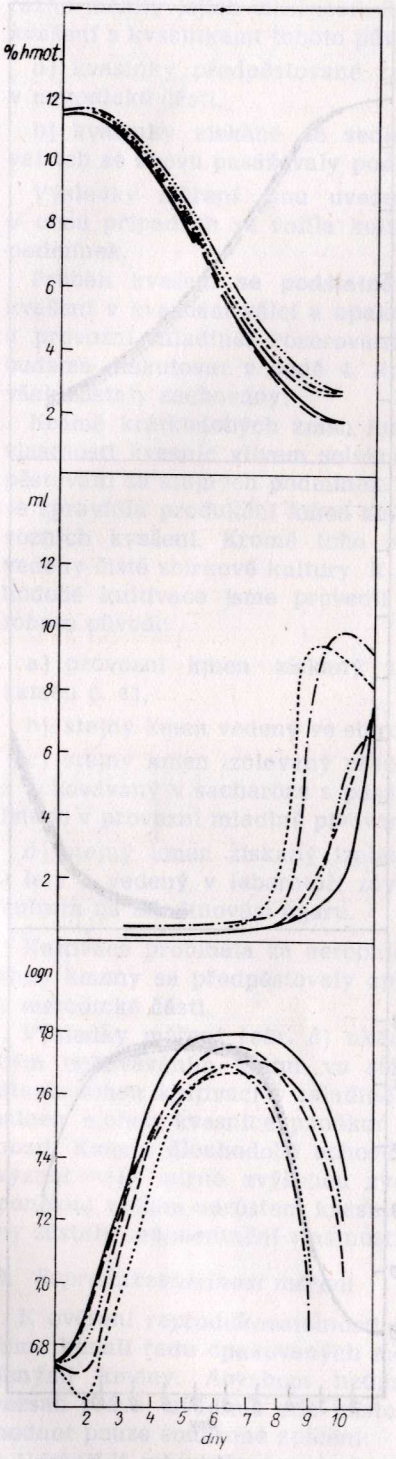
Tabulka 2. Množství narostlých kvasnic při kultivaci po dodatečné změně anaerobního kvašení v aerobní

čas od počátku kvašení, na kterém začal působit vzdušní kyslík (dny)	počáteční sušina kvasnic (m_1) mg/100 ml mladiny			konečná sušina kvasnic (m_2) mg/100 ml mladiny			množství kvasnic na jednotku zákvasu m_2/m_1		
	kmen č.			kmen č.			kmen č.		
	2.	3.	5.	2.	3.	5.	2.	3.	5.
4.	48,6	47,0	50,0	333,2	320,9	346,8	6,9	6,8	6,9
5.	48,6	47,0	50,0	311,0	288,4	289,5	6,4	6,1	5,8
6.	48,6	47,0	50,0	315,4	285,4	285,2	6,5	6,1	5,7
8.	48,6	47,0	50,0	307,6	290,0	293,0	6,3	6,2	5,9

Získané výsledky ukazují, že difúzní vzduch může mít výrazný vliv na průběh kvašení, růstové křivky i sedimentaci. Kvašení je nejen hlubší a rychlejší a sedimentace lepší, ale mohou se změnit i rozdíly mezi kmeny. Také množství narostlých kvasnic je za přístupu vzduchu větší.

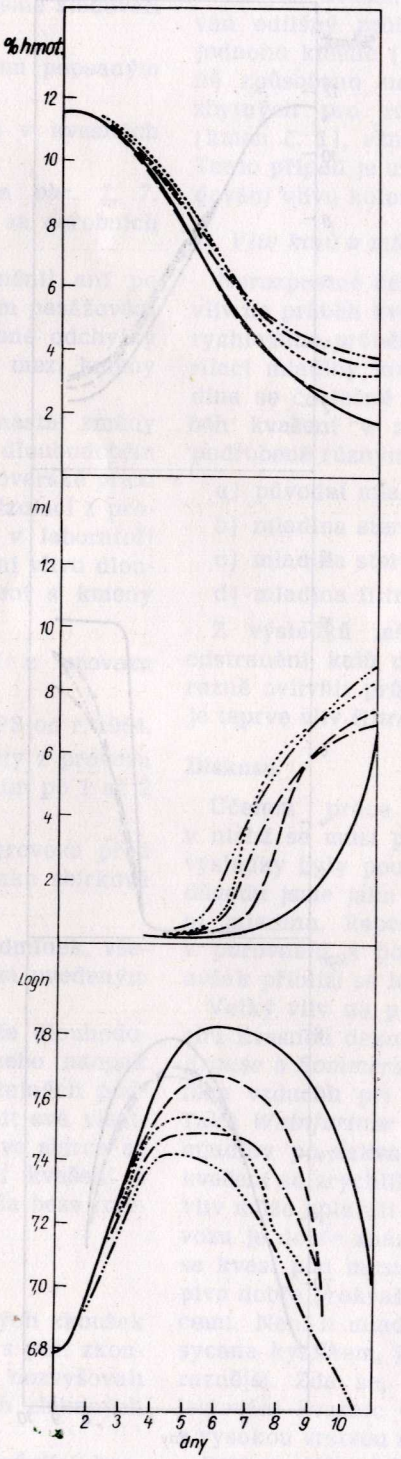
Abychom si dále ověřili vliv difúzního vzduchu na průběh kvašení, sledovali jsme jeho účinek v různých fázích kvašení. Z kvasných válců, v nichž probíhalo kvašení za anaerobních podmínek, se po určité době (několik dní) odstranila hlavice kvas-

Obr. 1



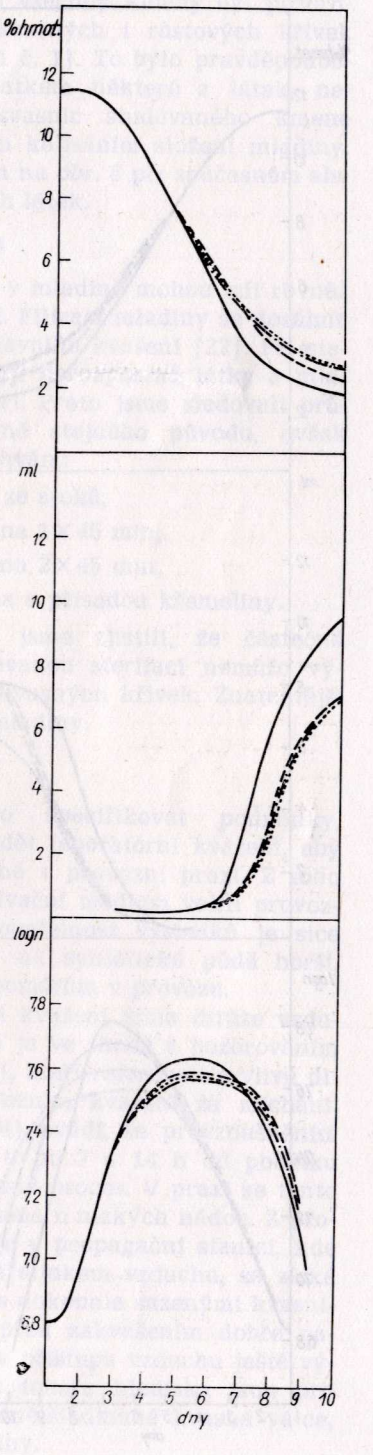
kvasná, sedimentační a růstová křivka pěti kmenů při kultivaci za aerobních podmínek
——— kmen č. 1 ------ kmen č. 4
– – – – kmen č. 2 —·—·— kmen č. 5
—·—·— kmen č. 3

Obr. 2



kvasná, sedimentační a růstová křivka pěti kmenů při kultivaci za anaerobních podmínek
——— kmen č. 1 ------ kmen č. 4
– – – – kmen č. 2 —·—·— kmen č. 5
—·—·— kmen č. 3

Obr. 3

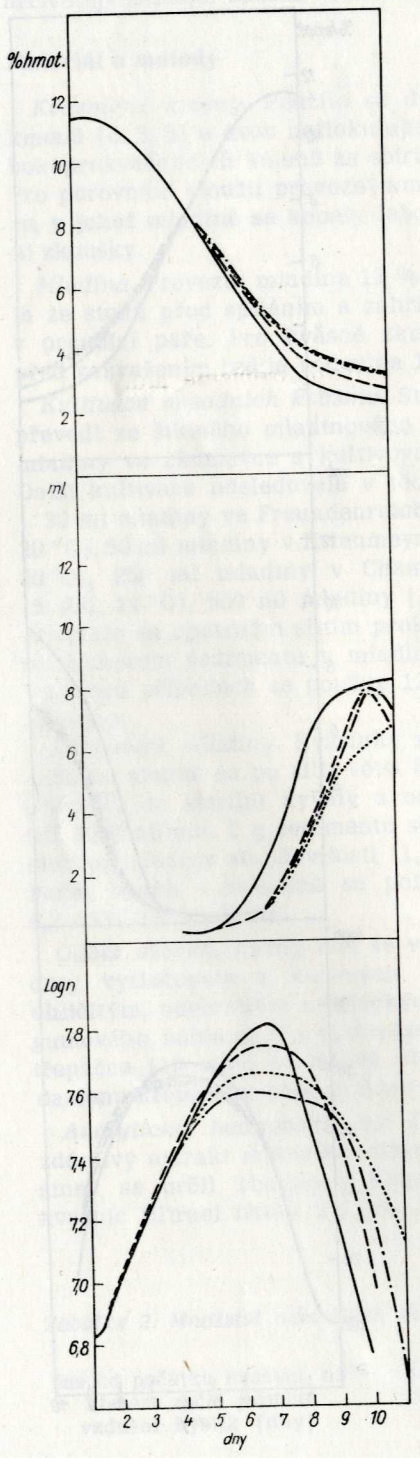


kvasná, sedimentační a růstová křivka kmene č. 2, po dodatečné změně anaerobního v aerobní kvašení
kvasný uzávěr odstraněn po
——— 4 —·—·— 6
– – – 5 ------- 8 dnu kvašení

ného válce, takže vzduch měl za pokračujícího kvašení volný přístup k mladině (*obr. 3, 4, 5, tab. 2*).

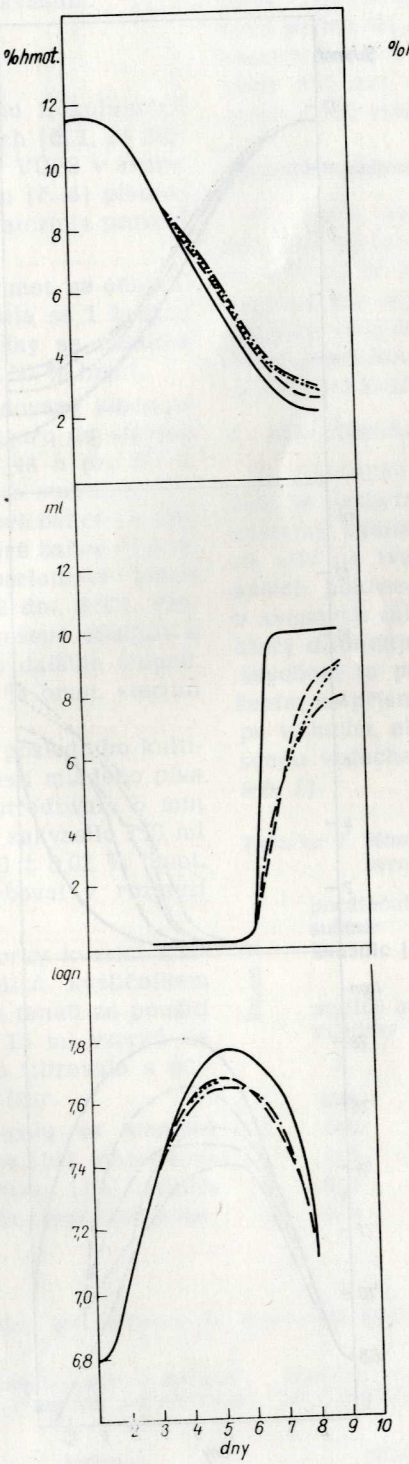
Z výsledků vyplývá, že difúzní vzduch může ovlivnit průběh kvašení nejvýrazněji v době růstu kvasnic, tj. asi do 5. dne od počátku kvašení. V pozdější době se jeho vliv zeslabuje. Změna kvasných, růstových i sedimentačních křivek byla ve shodě s pozorováním učiněným v předešlém případě a projevila se více u flokulujících druhů kvasnic. Obdobné výsledky jsme získali i u zbývajících dvou kmenů.

Obr. 4



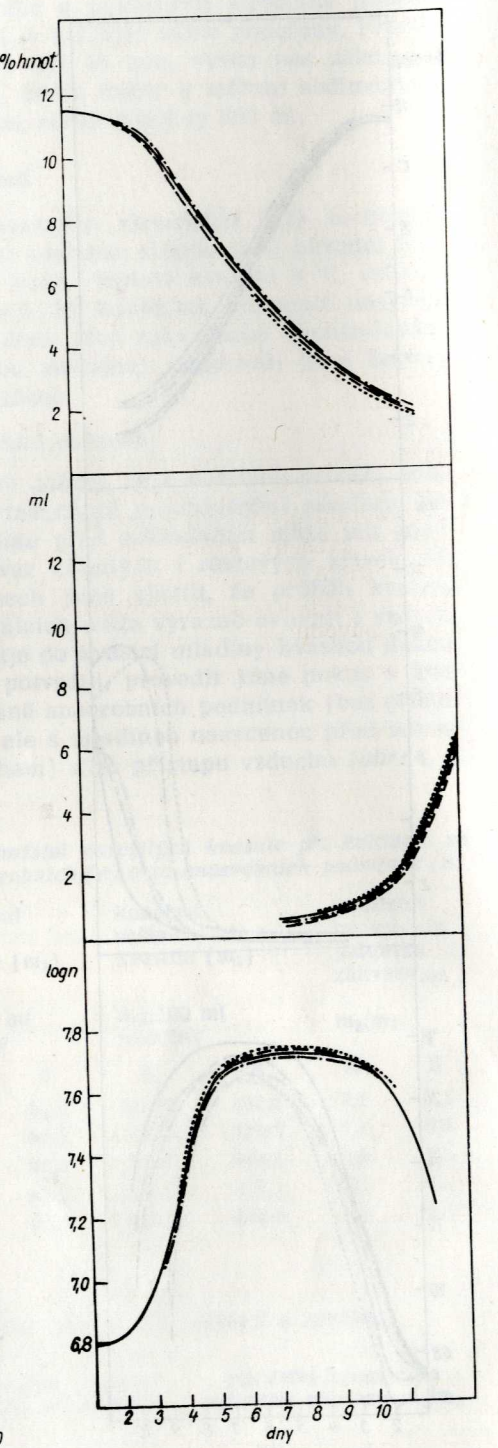
kvasná, sedimentační a růstová křivka kmene č.3 po dodatečné změně anaerobního v aerobní kvašení
kvasný uzávěr odstraněn po:
4 6
5 8 dnu kvašení

Obr. 5



kvasná, sedimentační a růstová křivka kmene č.5 po dodatečné změně anaerobního v aerobní kvašení
kvasný uzávěr odstraněn po:
4 6
5 8 dnu kvašení

Obr. 6



kvasná, sedimentační a růstová křivka kmene č.1 v různě upravené mladině
mladina:
nesterilovaná
sterilovaná 1× 45 min
sterilovaná 2×45 min
filtrovaná mladina

2. *Vliv selekce a adaptace kvasnic*

Je známo, že kvasnice mohou při opakovaném vedení v provoze měnit své vlastnosti. Tato změna zahrnuje jak přizpůsobení kvasnic určitým podmínkám při kvašení, tak selekční vlivy. Při testování je nutno zodpovědět otázku, zda se kvasnice dostatečně přizpůsobily daným podmínkám, aniž by se dále výrazně měnily jejich vlastnosti. Proto jsme sledovali kvašení s kvasinkami tohoto původu:

a) kvasinky předpěstované způsobem popsaným v metodické části,

b) kvasinky získané ze sedimentu v kvasných válcích se znovu pasážovaly podle a).

Výsledky měření jsou uvedeny na *obr. 1, 7.* V obou případech se volila kultivace za aerobních podmínek.

Průběh kvašení se podstatně nezměnil ani po kvašení v kvasném válci a opakovaném pasážování v provozní mladině. Pozorované drobné odchylky budeme diskutovat v bodě 4. Rozdíly mezi kmeny však zůstaly zachovány.

Kromě krátkodobých změn mohou nastat změny vlastností kvasnic vlivem selekce při dlouhodobém pěstování za stejných podmínek. V pivovarské praxi se zpravidla produkční kmen získává izolací z provozních kvašení. Kromě toho bývají v laboratoři vedeny čisté sbírkové kultury. K zjištění vlivu dlouhodobé kultivace jsme provedli kvašení s kmeny tohoto původu:

a) provozní kmen získaný izolací z provozu (kmen č. 4),

b) stejný kmen vedený ve sbírce VÚPS od r. 1964,

c) stejný kmen izolovaný před 10 lety z provozu a uchovávaný v sacharóze s pasážováním po 1 až 2 letech v provozní mladině pivovaru,

d) stejný kmen získaný izolací z provozu před 2 lety a vedený v laboratoři závodu jako sbírková kultura na mladinovém agaru.

Kultivace probíhala za aerobních podmínek, všechny kmeny se předpěstovaly způsobem uvedeným v metodické části.

Výsledky měření (*obr. 8*) ukázaly, že dlouhodobým uchováváním kultur ve sbírce nebo naopak dlouhodobou kultivací v mladině za stejných podmínek mohou kvasnice poněkud změnit své vlastnosti. Kmeny dlouhodobě uchovávané ve sbírce se vyznačovaly mírně zvýšenou rychlostí kvašení a poněkud vyšším nárůstem kvasnic. Zcela beze změny zůstaly sedimentační vlastnosti.

3. *Reprodukovatelnost měření*

K ověření reprodukovatelnosti kvasných zkoušek jsme konali řadu opakovaných měření s pěti zkoušenými kmeny. Abychom neúměrně nezvyšovali rozsah práce, uvádíme zde místo všech získaných hodnot pouze souhrnné zjištění:

Udržují-li se uvedené proměnné ovlivňující kvašení na předem zvolených stálých hodnotách, lze dosáhnout uspokojivé reprodukovatelnosti výsledků. Podstatné je, že zůstávají zachovány rozdíly mezi jednotlivými kmeny, i když některé znaky také za těchto stálých podmínek kolísají při opakovaných pokusech. Dobré reprodukovatelnosti se dosáhne u kvasných křivek, o něco horší u sedimentačních křivek, nejhorší u růstových křivek. Kolísání tvarů křivek je projevem měnícího se chemického složení mladiny, dokonalosti, s jakou lze udržovat veličiny ovlivňující kvašení a přesnosti jednotlivých stanovení. Pouze v jednom z osmi opakovaných kvašení pro všechny kmeny byl pozorován odlišný průběh kvasných i růstových křivek jednoho kmene (kmen č. 1). To bylo pravděpodobně způsobeno nedostatkem některé z látek, nezbytných pro růst kvasnic studovaného kmene (kmen č. 1), vzniklým kolísáním složení mladiny. Tento případ je uveden na *obr. 6* při současném sledování vlivu koloidních látek.

4. *Vliv kalů v mladině*

Nerozpustné částice v mladině mohou mít rovněž vliv na průběh kvašení. Filtrací mladiny se dosáhne rychlejšího průběhu hlavního kvašení [22]. Při sterilaci mladiny koagulují nerozpustné látky a mladina se částečně vyčeří. Proto jsme sledovali průběh kvašení v mladině stejného původu, avšak podrobené různým úpravám:

a) původní mladina ze stoků,

b) mladina sterilována 1 × 45 min,

c) mladina sterilována 2 × 45 min,

d) mladina filtrována s přísadou křemeliny.

Z výsledků měření jsme zjistili, že částečné odstranění kalů opakovanou sterilací nemůže výrazně ovlivnit průběh kvasných křivek. Znatelnější je teprve vliv filtrace mladiny.

Diskuse

Účelem práce bylo specifikovat podmínky, v nichž se musí provádět laboratorní kvašení, aby výsledky byly použitelné v provozní praxi. Z toho důvodu jsme jako kultivační médium volili provozní mladinu. Reprodukovatelnost výsledků je sice v porovnání s pokusy na syntetické půdě horší, avšak přiblíží se lépe poměrům v provozu.

Velký vliv na průběh kvašení měla difúze vzduchu kvasnou dekou. To je ve shodě s pozorováním *Krause* a *Sommera* [23], kteří referovali o vlivu difúze vzduchu při provozním kvašení za míchání. Také *Weinfurtner* [5, 6] uvádí, že provzdušněním mladiny po zakvašení a po 7 a 14 h od počátku kvašení se zrychlil kvasný proces. V praxi se tento vliv může uplatnit zejména u nízkých nádob. Z provozu je dobře známo, že v propagační stanici, kde se kvasí pod mírným přetlakem vzduchu, se získá pivo dobře prokvašené s dokonale sazenými kvasnicemi. Není-li mladina před zakvašením dobře nasycena kyslíkem, je vliv přístupu vzduchu ještě výraznější. Zdá se, že z tohoto hlediska jsou pro testování kvasnic výhodnější dlouhé kvasné válce, s vysokou vrstvou mladiny.

Pokusy dále ukázaly, že způsob zvoleného předpěstování je plně dostačující k adaptaci kvasinek na provozní mladinu. Průběh křivek se výrazně nezměnil ani po pěstování kvasničných kmenů ve spilce a jejich opětovném nasazení v kvasných válcích. To je ve shodě se znalostí z praxe, že vlast-

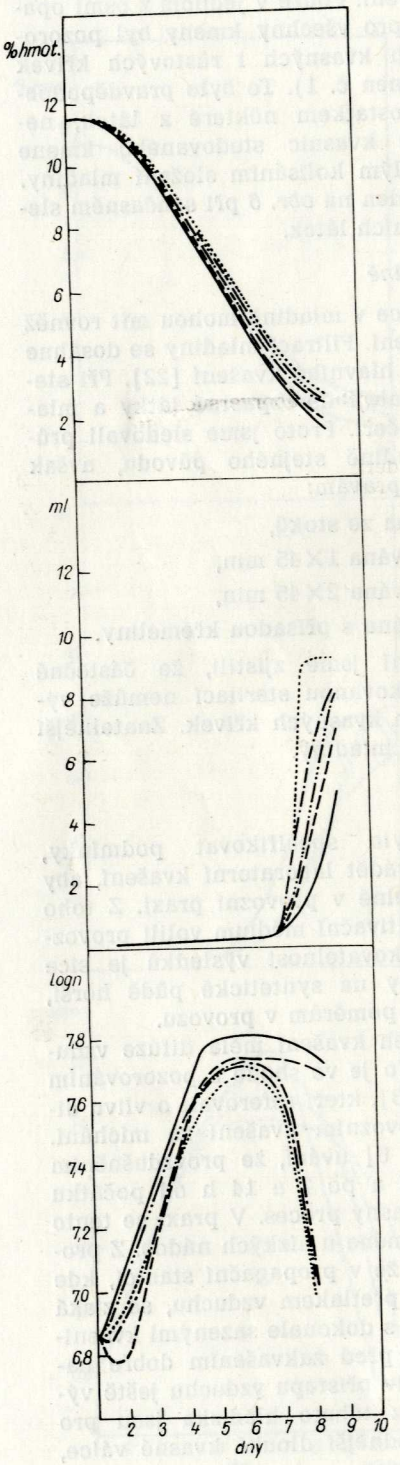
nosti kvasnic se opakovaným nasazováním ve spilce příliš nemění, pokud se nekontaminují.

Zajímavým zjištěním jsou rovněž změny některých vlastností vlivem uchovávání kultur ve sbírce.

Pozorované změny byly však příliš malé, než aby měly větší technologický význam. Sedimentační charakter kvasnic nebyl při tom vůbec pozměněn. Přesto výsledky potvrzují nezbytnost občasného pasážování sbírkových kmenů v provozní mladině. Ani sterilace mladiny a kolísající složení mladiny neměly podstatný vliv na reprodukovatelnost výsledků. Pouze v jedné z několika opakovaných zkoušek jsme u kmene č. 1 pozorovali podstatné zpomalení průběhu kvašení, které mohlo být způsobeno nedostatkem některého růstového faktoru v mladině.

Provedené zkoušky potvrdily, že pokusná kvašení se mohou dobře uplatnit při řešení nejrůznějších úkolů, týkajících se hlavního kvašení a posuzování kvasnic. Velmi užitečné je provádět několik kvašení ve stejné mladině najednou, přičemž jako porovnávací kmen slouží v pivovaru běžně používaný provozní kmen. Získané výsledky laboratorních pokusů mohou dobře předpovědět chování kvasnic v provozu. Výsledky provozních zkoušek s pěti zde používanými kmeny uveřejníme později v samostatném sdělení.

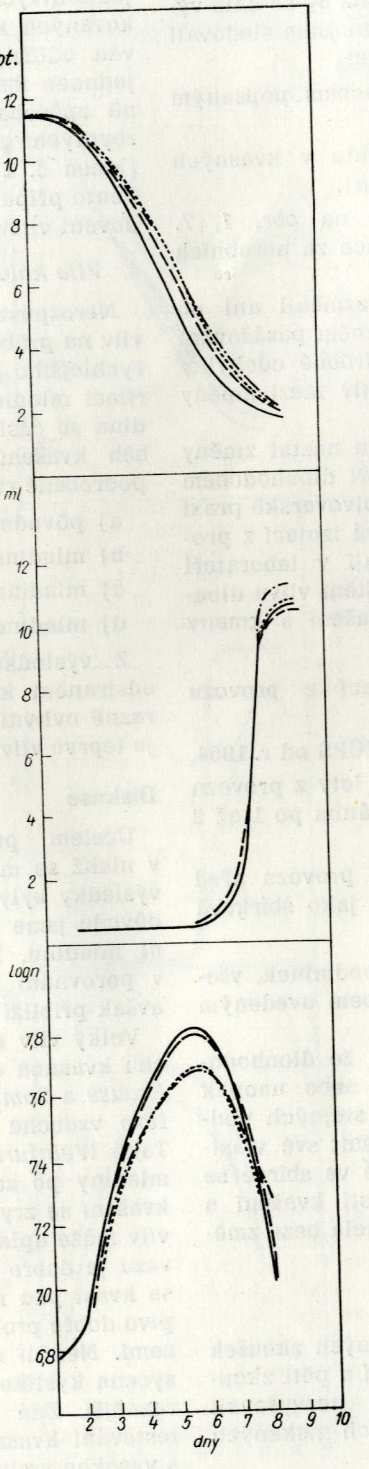
Obr. 7



kvasná, sedimentační a růstová křivka pěti kmenů získaných ze sedimentu kvasných válců

kmen č. 1
kmen č. 2
kmen č. 3
kmen č. 4
kmen č. 5

Obr. 8

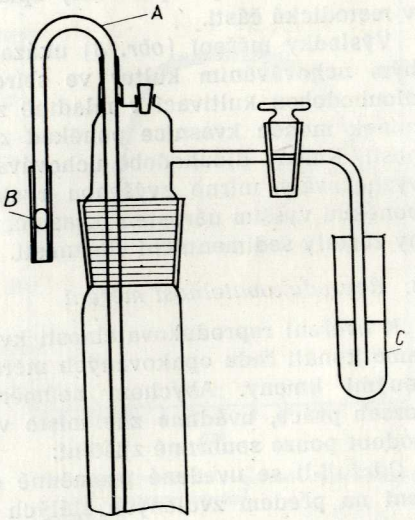


kvasná, sedimentační a růstová křivka kmene č. 4 různého původu:

provozní kmen izolovaný z provozu
kmen vedený ve sbírce VÚPS od r. 1964
kmen izolovaný před 10 lety
kmen izolovaný před dvěma lety

Souhrn

Laboratorními pokusy byly stanoveny faktory s vlivem na výsledky testování kvasnic v kvasných válcích podle Weinfurtnera. Průběh kvasných, růstových i sedimentačních křivek pěti flokulu-



Obr. 9. A — trubice pro odběr vzorku, B — kuličkový uzávěr, C — kvasný uzávěr

jících i neflokulujících kmenů byl ovlivněn difúzí vzduchu kvasnou dekou, složením mladiny a v malé míře obsahem mladinových kalů. Sledoval se také vliv selekce, adaptace kvasnic a změny vlastností kvasničného kmene, který byl uchováván laboratoří po několik let a současně používán v provozním kvašení. V závěru je diskutována reprodukovatelnost testování kvasnic.

Literatura

[1] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **14,** 1961; 109.
[2] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **14,** 1961: 281.
[3] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **15,** 1962: 53.
[4] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **15,** 1962: 379.
[5] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **16,** 1963: 254.
[6] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **16,** 1963: 473.
[7] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **17,** 1964: 201.
[8] WEINFURTNER, F. - WULLINGER, F. - PIENDL, A.: Brauwiss. **18,** 1965: 187.
[9] LIETZ, P.: Monatschr. f. Br. **14,** 1961: 189.
[10] DIXON, J. I.: Inst. Brew. **73,** 1967: 488.
[11] PRŮCHA, J. - SCHREIBLE, E.: Der Brauereitechniker **22,** 1970: 75.
[12] WALKEY, R. J. - KIRSOP, B. H.: J. Inst. Brew. **75,** 1969: 393.
[13] BENDOVÁ, O. - KURZOVÁ, V. - PARDONOVÁ, B.: Kvas. prům. **16,** 1970: 161.
[14] BENDOVÁ, O. - KURZOVÁ, V. - PARDONOVÁ, B.: Kvas. prům. **16,** 1970: 185.
[15] KRAUS, G. - EMEIS, C. C. - SOMMER, G.: Monatschr. f. Br. **21,** 1968: 177.
[16] EMEIS, C. C.: The Brewers Digest. 1970: 66.
[17] MASSCHELEIN, C. A.: Brass. Malt. Europe **18,** 1968: 221.
[18] ŠAVEL, J.: Kvas. prům. **17,** 1971: 53.
[19] HAMPL, B. - ŠILHÁNKOVÁ, L. GROSPIČOVÁ, A.: Návody k cvičením z mikrobiologie. Skripta VŠCHT, SNTL, Praha 1963.
[20] MOŠTEK, J.: Analytické metody k cvičení z kvasné chemie a technologie. Skripta VŠCHT, SNTL, Praha 1966.
[21] BŘEZINA, M. - ZUMAN, P.: Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii. Praha 1952.
[22] MANTSCHEV, DSKATOV, G.: Brauwiss. **23,** 1970: 56.
[23] KRAUS, G. - SOMMER, G.: Monatschr. f. Br.: **20,** 1967: 49.