

MĚŘENÍ AKTIVITY VÁREČNÝCH KVASNIC

Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Budějovický Budvar, n. p., Č. Budějovice

Klíčová slova: várečné kvasnice, kvasničná aktivita, měření

1. ÚVOD

Kromě chemického složení mladin a množství rozpuštěného kyslíku jsou pro průběh hlavního kvašení při určitém teplotním režimu zejména důležité množství a aktivita kvasničných buněk.

Pro stanovení hustoty várečných kvasnic a jejich koncentrace v zakvašené mladině se používají sedimentační i fotometrické metody, popř. přímé počítání buněk v komůrce [1].

Vitalita kvasničných buněk se posuzuje barvením methylenovou modří nebo jinými barvivy [2]. Použití fluorescenčních technik vyžaduje fluorescenční mikroskop [3]. Dokonalejší, ale nákladnější postup je průtoková cytometrie [4]. K nepřímému stanovení kvasničné vitality rovněž slouží stanovení rezervních sacharidů, např. glykogenu nebo trehalosy [2, 5].

Klasickou metodou stanovení vitality kvasinek podle EBC je pozorování růstu mikrokolonií kvasinek v želatině pod mikroskopem [6]. Méně používané metody zahrnují stanovení ATP luminiscenční metodou, radiotechnické metody se značenými substráty, imunotechnické techniky a metody založené na měření impedance kvasničných suspenzí [7, 8].

V poslední době se v pivovarství používají zejména měření spotřeby rozpuštěného kyslíku a acidifikační test [9 — 11]. Podstata testu spočívá ve výměně vodíkových kationtů mezi buňkou a okolím po přídavku glukosy do míchané suspenze kvasnic.

V minulosti byly velmi oblíbené tzv. fermento-

metry, měřící volumetricky množství uvolněného oxidu uhličitého [12]. Klasickou technikou posouzení aktivity buněk je modelové kvašení, které se ovšem z časových důvodů nemůže použít k provozní kontrole nasazovaných kvasnic [13].

Přístroj pro měření aktivity kvasnic navrhli Mück a Narziss [14]. Do nerezového válce se naplní kvasnice, rozmíchané v mladině, při konstantní teplotě se měří lineární závislost tlaku a z její směrnice se určí aktivita kvasnic. Tento přístroj, který vyzkoušeli a modifikovali pracovníci Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS) v Praze, se vyrábí ve spolupráci s firmou CUBE [15].

Naše sdělení se zabývá měřením aktivity várečných kvasnic měřením množství, nebo rychlosti uvolňování oxidu uhličitého.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 KVASNIČNÉ KMENY

Používal se provozní kmen *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum* (carlsbergensis), č. 2 podle sbírky VÚPS.

2.2 MĚŘÍČE PRŮTOKU A TLAKU PLYNU

Laboratorní elektronický průtokoměr plynů s rozsahem 20 a 2000 ml.min⁻¹ a laboratorní elektronický tlakoměr s rozsahem 20 a 200 mbar (SI-Special Instruments, SRN) zapůjčila firma EKOTECHNIKA, Praha.

2.3 VÁHY

Baňky s kvasící mladinou se vážily na technických vahách OWA LABOR (Polsko) s citlivostí 0,01 g.

2.4 SPEKTOFOTOMETR

Jednopaprskový spektrofotometr CADAS 100 (Dr. B. Lange, SRN) se používal s originálními skleněnými válcovitými kvetami.

2.5 VÝVIN OXIDU UHLIČITÉHO

PŘI KVAŠENÍ

Kvasnice se odsály na Büchnerově nálevce, dokonale promísily s mladinou ve zvoleném poměru v 50 ml Erlenmeyrově baňce při 25 °C a po uzavření zátkou se skleněnou trubičkou se oxid uhličitý plastikovou hadičkou odváděl do přístroje pro měření tlaku nebo průtoku plynu.

Při vážkovém měření se měřil pokles hmotnosti 50 ml Erlenmeyrovy baňky se směsí kvasnic a mladin při 25 °C.

2.6 FOTOMETRICKÝ TEST

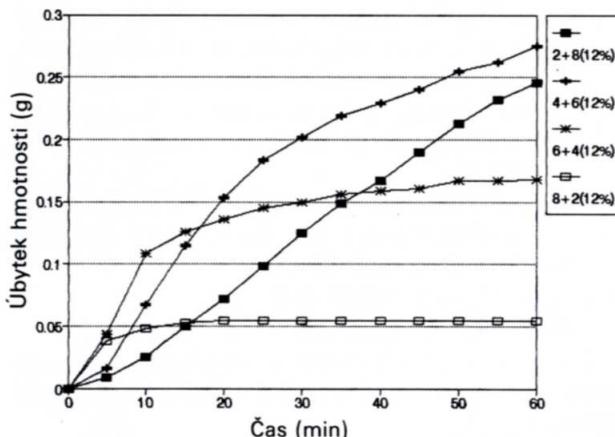
Kvasnice se odstředily (10 minut, frekvence otáček 3000 min⁻¹) v původní válcovité kvetě (Dr. B. Lange), po odlití supernatantu se pětkrát zředitly vodou a zvolené množství suspenze se v další válcovité kvetě doplnilo čirou mladinou na 5 ml. Po 2 minutách dalšího odstředování se kvetu se sedimentovanými kvasnicemi umístila do spektrofotometru a programem t-SC se měřil časový průběh absorbance při 800 nm.

3. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

3.1 VLIV KONCENTRACE KVASIC

NA RYCHLOST KVAŠENÍ

Kvasnice, odsáté v Büchnerově nálevce se v Erlenmeyrově baňce smísily s mladinou v různém poměru a v 5minutových intervalech se měřil úbytek hmotnosti kvasící mladiny. Výsledky měření uvádí obr. 1.

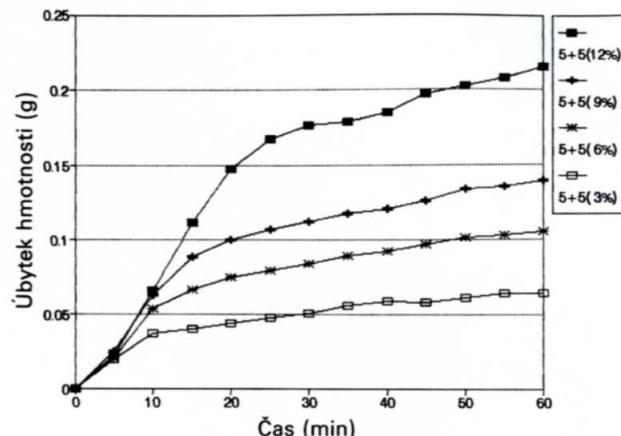


Obr. 1. Úbytek hmotnosti 10 g směsi kvasnic a mladiny, obsahující 2, 4, 6 a 8 g kvasnic s 8, 6, 4 a 2 g 12% mladiny

3.2 VLIV KONCENTRACE MLADINY

NA RYCHLOST KVAŠENÍ

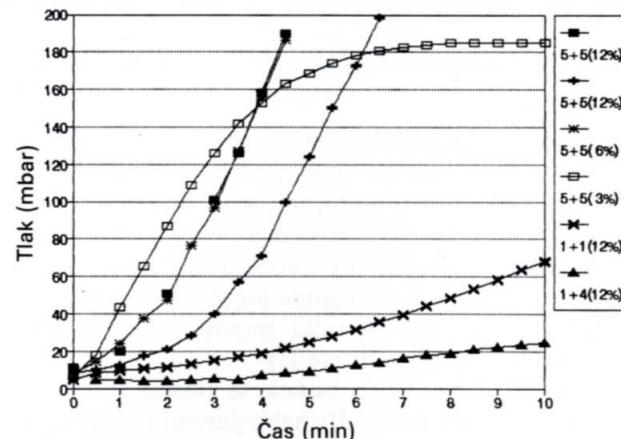
5 g odsátych kvasnic se míšilo s 5 g různě koncentrované mladiny a v 5minutových intervalech se měřil úbytek hmotnosti kvasící mladiny. Výsledky uvádí obr. 2.



Obr. 2. Úbytek hmotnosti směsi 5 g kvasnic s 5 g 12, 9, 6 a 3% mladinou

3.3 MĚŘENÍ TLAKU V UZAVŘENÉM SYSTÉMU KVASICÍ MLADINOU

Elektronickým tlakoměrem se měřil tlak v 50ml baňce se směsí kvasnic a mladiny v 0,5minutových intervalech (obr. 3). První dvě měření zahrnují dva různé odběry ze stejných kvasnic.



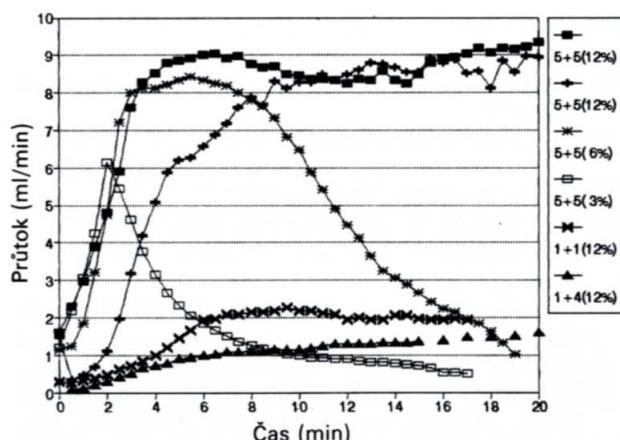
Obr. 3. Změny tlaku uzavřené kvasné nádobky, obsahující 1 a 5 g kvasnic ve směsi s 3, 6 a 12% mladinou. Měření označená —■— a —■— představují dva různé odběry ze stejných kvasnic

3.4 MĚŘENÍ PRŮTOKU OXIDU UHLIČITÉHO PŘI KVAŠENÍ

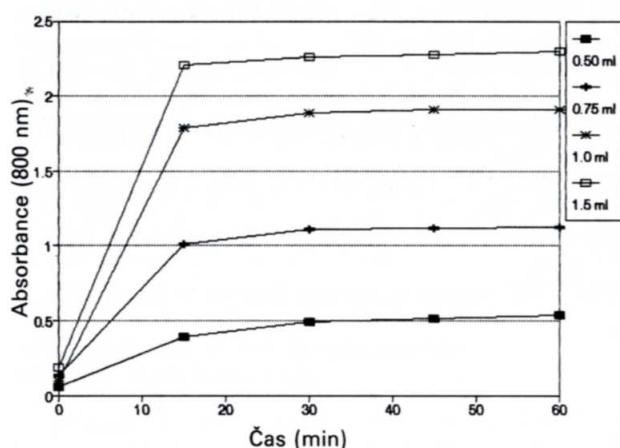
Elektronickým průtokoměrem se měřil průtok oxidu uhličitého uvolňovaného při kvašení směsi kvasnic a mladiny v 0,5minutových intervalech (obr. 4). První dvě měření zahrnují dva různé odběry ze stejných kvasnic.

3.5 FOTOMETRICKÉ STANOVENÍ AKTIVITY KVASIC

Suspenze odstředěných kvasnic ve vodě (20 % sedimentu) se dávkovala v množství 0,5, 0,75, 1 a 1,5 ml a doplnila se do celkového objemu 5 ml čirou 12% mladinou. Po opětovném odstředění (2 min, frekvence otáček 3000 min⁻¹) se sledovaly změny absorbance při 800 nm v čase (obr. 5).



Obr. 4. Změny průtoku oxidu uhličitého z kvasné nádobky, obsahující 1 a 5 g kvasnic ve směsi s 3, 6 a 12% mladinou. Měření označená —■— a —■— zahrnují dva různé odběry ze stejných kvasnic



Obr. 5. Závislost absorbance (800 nm) směsi čiré mladinu a odstředěných kvasnic. Čísla udávají počet ml 20% kvasničné suspenze v 5 ml směsi.

4. DISKUSE

Hodnocení aktivity kvasnic podle měření rychlosti vývinu oxidu uhličitého je oblíbená technika, která se v minulosti často používala k sledování průběhu hlavního kvašení i aktivity kvasnic. K rychlému hodnocení aktivity kvasnic ji použili němečtí autoři [14], kteří množství uvolněného oxidu uhličitého hodnotili podle nárůstu tlaku v uzavřeném systému.

Rychlosť vývinu oxidu uhličitého silně závisí nejen na teplotě, ale také na vzájemném poměru kvasnic a substrátu. V původní práci se doporučuje smísit 200 g kvasnic se 700 g mladinou a po homogenizaci v ultrazvukové lázni měřit rychlosť nárůstu tlaku v uzavřeném reakčním systému [14].

Na podobném principu je založen přístroj podle VÚPS, ale ultrazvukovou lázeň nahrazuje magnetické míchadlo. V obou případech se aktivity kvasnic hodnotí podle rychlosťi lineárního nárůstu tlaku.

Pro posouzení dalších možností těchto metod

jsme měřili úbytek hmotnosti různého množství kvasnic s různou dávkou 12% mladinou při 25 °C. Lineárnímu nárůstu množství uvolněného oxidu uhličitého odpovídá poměr 2 díly kvasnic a 8 dílů mladinou. U ostatních směsí byla lineární jen počáteční část křivky. Postupný pokles rychlosťi tvorby oxidu uhličitého patrně odpovídá vyčerpání zkvasitelných sacharidů mladinou.

Se zvětšujícím se množstvím kvasnic také rostla rychlosť tvorby oxidu uhličitého a současně se zkracovala počáteční stacionární fáze uvolňování oxidu uhličitého. Této skutečnosti lze využít při rychlém měření aktivity kvasnic v krátkém časovém intervalu, ihned po smísení kvasnic s mladinou.

Tyto závěry se potvrdily po smísení kvasnic s různě koncentrovanou mladinou. Z obr. 2 je dobře patrné vyčerpání různého množství sacharidů v mladině.

Při zanedbání počáteční krátké stacionární fáze lze tvorbu oxidu uhličitého přibližně považovat za reakci druhého řádu, s diferenciální rovnici tvaru

$$dm/d\tau = k \cdot c \cdot (S_0 - a \cdot m) \quad (1)$$

kde m je množství uvolněného oxidu uhličitého (pokles hmotnosti), c je hmotnostní koncentrace kvasnic ve směsi, S_0 je hmotnostní koncentrace zkvasitelného původního extraktu ve směsi mladin s kvasnicemi, a je přepočítávací faktor, udávající množství extraktu, potřebné na tvorbu 1 g oxidu uhličitého a τ je čas. Rovnici, která vychází z několika zjednodušujících předpokladů, lze upravit i pro jiné koncentrační jednotky.

Schematický tvar rovnice zanedbává inhibici vývinu oxidu uhličitého vznikajícím ethanolem, vyčerpáním dusíkatých látek, nebo růstových faktorů. Předpokládá se přitom nadbytek dusíkatých látek a růstových faktorů, uvolněných do prostředí kvasnicemi ve vysoké koncentraci a jejich kladný vliv při potlačení inhibičního vlivu ethanolu.

Ze stejného důvodu nelze z metody rychlého stanovení aktivity kvasnic patrně spolehlivě předpovědět chování kvasnic v reálném prostředí, na konci kvasné křivky, kde se uplatňují inhibiční vlivy ethanolu při relativně nízkém obsahu kvasnic a vliv poklesu koncentrace kvasnic sedimentací [13].

Rychlá měření aktivity kvasnic posuzují pouze kvasnou aktivitu kvasnic za optimálních podmínek. Chování kvasnic za reálných podmínek, ve vztahu k složení mladin, lze předpovědět pouze modelovou kvasnou zkouškou, ovšem za cenu prodloužení doby analýzy. Rychlé měření aktivity kvasnic má přesto význam pro rozpoznaní trvale poškozených kvasnic.

Modelové kvašení v provozu zakvašené mladiny v kvašných válcích může poskytovat stejné

kvasné a růstové křivky v počátečních fázích kvašení, ale odlišné v závěrečné fázi kvasné křivky.

Pro sledování kvasné aktivity kvasnic ve směsi s mladinou je důležitý i objem směsi při kvašení. Pro směs kvasnic a mladiny s celkovou hmotností 10 g postačoval reakční prostor 50 ml.

Použití elektronických přístrojů pro měření tlaku a průtoku přináší další možnosti při měření aktivity kvasnic. Elektronický tlakoměr umožňuje přesně měřit relativně nízké hodnoty tlaku, takže pro měření není nutné používat nerezový válec, ale skleněné nádobky. Tak je možné pracovat s tlaky do 20 kPa.

Lepší možnosti poskytuje elektronický průtokoměr, měřící přímo rychlosť vývinu oxidu uhličitého. Z obr. 4 je patrné, že přibližně po 10 minutách je možné měřit ustálený průtok oxidu uhličitého. Jednotlivé vzorky kvasnic se mohou lišit i délkom stacionární fáze. Při vyčerpání zdroje sacharidu klesá velmi rychle průtok plynu.

Měření průtoku plynu umožňuje měřit okamžité hodnoty průtoku u většího počtu vzorků při přepínání průtokoměru mezi jednotlivými baňkami, což není např. možné při měření tlakového nárůstu.

Tlak oxidu uhličitého v uzavřeném systému je přímo úměrný jeho hmotnosti a nepřímo úměrný objemu plynového prostoru, takže rovnici (1) lze modifikovat ve tvaru:

$$\frac{dp}{dt} = (K/V) \cdot c \cdot (S_0 - p \cdot b \cdot V) \quad (2)$$

kde K , b jsou nyní nové, teplotně závislé konstanty a V je objem plynového prostoru. Rychlosť a tvar odezvy rovněž závisí na celkovém objemu prostoru, ve kterém se měří tlak.

V počátečních fázích měření se neprojeví změny koncentrace substrátu a rychlosť tvorby oxidu uhličitého i tlakového nárůstu jsou konstantní. Odezvu přístroje lze nastavit podle parametrů příslušných rovnic. Při zvyšující se koncentraci kvasnic klesá ovšem doba lineárního nárůstu tlaku, neboť je k dispozici méně zkvasitelného substrátu.

Fotometrické stanovení aktivity kvasnic ukazuje další možnosti při hodnocení várečných kvasnic. Jeho podstatou je rozptýlení kvasnic do čiré mladiny s následovným odstředěním. Tím se na dně kyvety utvoří směs mladiny s vysokou koncentrací kvasnic a rychle se uvolňující oxid uhličitý rozptýluje kvasnice do mladiny.

Předpokládáme, že rychlosť rozptýlení kvasnic a jejich rovnovážná koncentrace jsou kromě množství kvasnic závislé rovněž na jejich aktivitě. Zkouška je vlastně modifikací deflokulačního testu.

Tato práce se zabývá možnostmi rychlého posuzování kvasnic v provozu. V dalších pokusech bude nutné standardizovat jednotlivé postupy, důkladně prověřit jejich reprodukovatelnost a posoudit možnosti jejich využití v praxi.

LITERATURA

- [1] ŠAVEL, J.—PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. **40**, 1994 s. 9.
- [2] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy. 1. vyd. ALFA/SNTL, Bratislava, Praha 1982.
- [3] HUTTER, K. J.: Brauwelt **132**, 1992, s. 252.
- [4] DONHAUSER S. et al: Brauwelt **132**, 1992, s. 1301.
- [5] QUAIN, D. E. — TUBB, R. S.: J. Inst. Brew. **89**, 1983, s. 38.
- [6] GILLILAND, R. B.: J. Inst. Brew. **65**, 1959, s. 424.
- [7] PRIEST F. G.—CAMPBELL, I.: Brewing Microbiology. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., England 1987.
- [8] Symposium Instrumentation and Measurement (1992, Copenhagen): Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Nürnberg 1993.
- [9] PEDDIE, F. L. et al.: J. Inst. Brew. **97**, 1991, s. 21.
- [10] OPEKAROVA, M.—SIEGLER, K.: Folia Microbiol., **27**, 1982, s. 395.
- [11] FERNADEZ, S. S.—GONZALES, M. G.—SIERRA, J. A.: MBAA Techn. Quart. **30**, 1993, s. 1.
- [12] HLAVÁČEK, F.: Pivovarské kvasnice 1. vyd., Praha 1958.
- [13] ŠAVEL, J.—PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. **40**, 1994, 198.
- [14] MÜCK, E.—NARZISSL, L.: Brauwelt, **127**, 1987, s. 1280.
- [15] CUBE, firemní materiály. Havlíčkův Brod, 1994

Lektorovala prof. Ing. G. Basařová, DrSc.
Do redakce došlo 7. 8. 1994

Šavel, J.—Prokopová, M.: Měření aktivity várečných kvasnic. Kvas. prům., **40**, 1994, č. 11, s. 325—329.

Článek pojednává o možnostech rychlého stanovení aktivity várečných kvasnic v provozních podmírkách. Aktivita várečných kvasnic se hodnotila podle množství oxidu uhličitého, uvolněného ze směsi 20 až 80 % kvasničného sedimentu v 12% mladině. Úbytek oxidu uhličitého se měřil vážkově, elektronickým průtokoměrem a tlakoměrem. Ve fotometrickém deflokulačním testu se měřily změny čirosti suspenze kvasnic v čiré mladině po jejich odstředění a novém rozptýlení unikajícím oxidem uhličitým.

Šavel, J.—Prokopová, M.: Measuring of the Activity of Brewing Yeast Kvas. prům., **40**, 1994, No. 11, pp. 325—329.

Options for rapid assessment of the brewing yeast activity under operational conditions are discussed. The activity of brewing yeast was evaluated in compliance with carbon dioxide quantity, released from a mixture of 20 to 80% yeast's sediment in 12% hopped wort. Carbon dioxide drop was measured by loss in weight by using of electronic flowmeter and pressure gauge. By

means of photometric deflocculation test were measured changes of the yeast suspension in clear hopped wort, after their centrifugation and following dispersion by escaping carbon dioxide.

Šavel, J.—Prokopová, M.: Messung der Aktivität der Brauereihefe. Kvas. prům., 40, 1994, Nr. 11, S. 325—329.

In dem Artikel werden die Möglichkeiten der schnellen Bestimmung der Aktivität von Brauereihefe in Betriebs-Bedingungen behandelt. Die Aktivität der Brauereihefe wurde nach der Menge des Kohlendioxids bewertet, der aus dem Gemisch von 20 bis 80 % des Hefesediments in 12%-Würze freigesetzt wurde. Die Kohlendioxidabnahme wurde gravimetrisch, mit dem elektronischen Durchflußmesser und mittels Druckmesser gemessen. In dem photometrischen Deflockulationstest wurden die Änderungen der Klarheit der Hefesuspension in klarer Würze gemessen, nach

ihrer Separierung und neuer Dispersion durch das entweichende Kohlendioxid.

Шавел, Я.—Прокопова, М.: Измерение активности варочных дрожжей. Квас. прум., 40, 1994, № 11, стр. 325—329.

Статья обсуждает возможности быстрого определения активности варочных дрожжей в эксплуатационных условиях. Активность варочных дрожжей оценивалась по количеству двуокиси углерода, выделившегося из смеси 20—80 %-ного дрожжевого осадка в 12 %-ном охмеленном сусле. Убыток двуокиси углерода измерялся весовым методом, электроническим расходометром и манометром. При помощи фотометрического дефлокуляционного теста измерялись изменения прозрачности суспензии дрожжей в прозрачном охмеленном сусле, после их центрифугирования и нового рассеяния выделяющейся двуокисью углерода.