

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ VLASTNOSTÍ KVASINEK V PRŮBĚHU KVAŠENÍ PIVA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

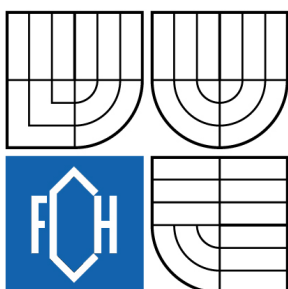
AUTHOR

LENKA KOCIÁNOVÁ

BRNO 2007



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ VLASTNOSTÍ KVASINEK V PRŮBĚHU KVAŠENÍ PIVA

INVESTIGATION OF YEAST PROPERTIES DURING THE BEER FERMENTATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

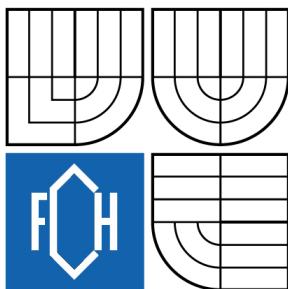
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LENKA KOCIÁNOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2007



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0057/2006

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Kociánová Lenka

Studijní program

Chemie a technologie potravin (M2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)

Vedoucí diplomové práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

Sledování vlastností kvasinek v průběhu kvašení piva

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2007

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Lenka Kociánová
student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byl sledován průběh kvašení ve spilce vybraného pivovaru, závislosti různých faktorů a jejich případný vliv na vitalitu a viabilitu nasazovaných kvasnic, což mělo ukázat opodstatněnou vícenásobnou použitelnost kvasničného kmene v rámci správného technologického procesu kvašení piva. Předmětem sledování byli i další faktory: fyziologický stav kvasnic, pH, teplota, množství jemných a hrubých kalů, množství rozpuštěného kyslíku v mladině, stupeň prokvašení mladiny. Ke stanovení se odebíraly vzorky kvasící mladiny a vypraných násadních kvasnic. Použitý kmen násadních kvasnic byl sledován od jeho prvního nasazení až po poslední (celkově byl nasazen 4x po sobě). U odebraných vzorků mladiny bylo vždy změřeno pH, teplota, zdánlivé prokvašení (průměrně od 4. dne od zakvašení) a počet buněk. Před každým dalším nasazením byly kvasnice vyprány a byla stanovena jejich vitalita. Metodou vitálního barvení se sledoval podíl mrtvých buněk v suspenzi kvasnic určených pro další nasazení. Množství mrtvých buněk bylo vždy pod mezní hodnotou 5%, v jednom případě nebyla nalezena dokonce žádná mrtvá buňka v odebraném vzorku.

Důležitým faktorem, především pro pomnožení kvasnic, je množství rozpuštěného kyslíku v mladině. Byly provedeny zkoušky s nedostatečně provzdušněnou mladinou. Pomocí těchto zkoušek bylo dokázáno, že při nedostatečném provzdušnění mladiny O_2 se prodloužila doba hlavního kvašení v průměru o 3 – 4 dny. Byly provedeny i zkoušky s vyšším obsahem kalů v mladině při nichž bylo dokázáno, že vyšší obsah kalů nemá významný vliv na průběh hlavního kvašení a na vlastnosti kvasnic.

Cílem této práce bylo potvrdit, na základě zpracovaných výsledků sledovaných parametrů, u opětovně nasazovaného (celkově 4x) kmene pivovarských kvasnic, během hlavního kvašení, správnost jednotlivých opakovaných nasazení v průběhu technologického procesu.

KLÍČOVÁ SLOVA

pivovarské kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae*, svrchní kvašení, metabolismus kvasinek, aktivita, vitalita, viabilita, mladina, kultivace buněk, počítání buněk, vitální barvení, pH, stupeň prokvašení, zdánlivý extrakt, kvasné křivky

ABSTRACT

In this diploma thesis, the properties of brewery's yeasts during the operation beer fermentation in the selected brewery and dependences of different agents and their influence on viability and vitality of the yeasts were studied. Other observed properties were physiological state, pH, temperature, a value of soft and coarse sludges, a value of dissolved oxygen in wort, the level of wort's fermentation. It were collected the samples of fermenting wort and washing yeasts for determination. The used yeasts were observed from the first time until their last used (generally 4 times). pH, temperature, apparent fermenting and total number of yeast cells were measured in the collected samples. The used yeasts were washed before every other application and vitality was determined. The number of death cells were observed by this method. The number of death cells never fell below 5 %. The value of dissolved oxygen in wort is also the important agent for the growth of yeasts. The touches with low number of oxygen showed that the time for fermentation had to be longer (by about 3 or 4 days more). The touches with higher number of sludges showed that the sludges haven't any influence on the yeasts and the process of fermentation.

Confirm the accuracy of the repeated used of the yeasts was the object of this thesis

KEYWORDS

brewer's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, top fermentation, yeast metabolism, activity, vitality, viability, wort, cell-culture, cells counting, vital dyeing, pH, apparent extract, fermentation level, fermentative curve

KOCIÁNOVÁ, L. Sledování vlastností kvasinek v průběhu kvašení piva. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 69 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí provozní laboratoře pivovaru Ing. Marii Minářové a vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za velkou podporu, vstřícnost a cenné rady. Dále své rodině za podporu při studiu.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1. Kulturní pivovarské kvasinky	10
2.1.1. Taxonomie.....	10
2.1.2. Historie a vývoj zařazení kvasinek	10
2.1.3. Sbírka pivovarských kvasinek	12
2.1.3.1. Historie sbírky	12
2.1.3.2. Sbírkové kmeny	12
2.1.3.3. Uchování a vedení sbírky.....	13
2.1.3.4. Produkční kmeny	13
2.1.4. Chemické složení	14
2.1.5. Morfologie a cytologie	15
2.1.6. Růst rozmnožování a stárnutí.....	18
2.1.7. Metabolismus.....	19
2.1.7.1. Metabolismus sacharidů.....	20
2.1.7.2. Metabolismus dusíkatých látek.....	22
2.1.7.3. Metabolismus lipidů.....	22
2.1.8. Výživa a utiliza kvasnic.....	24
2.1.8.1. Uhlíkaté zdroje	24
2.1.8.2. Dusíkaté zdroje	24
2.1.8.3. Kyslík	24
2.1.8.4. Anorganické soli	24
2.1.8.5. Vitamíny	25
2.1.9. Stresové faktory	25
2.1.9.1. Teplotní stres.....	25
2.1.9.2. Etanolový stres	25
2.1.9.3. Osmotický stres.....	25
2.1.9.4. Tlakový stres a stres CO ₂	26
2.1.9.5. Hodnota pH jako stresový faktor	26
2.1.9.6. Oxidační stres	26
2.1.9.7. Iontový stres	26
2.1.9.8. Dusitanový stres	26
2.1.9.9. Vliv kalů.....	26
2.1.9.10. Vliv pesticidů	27
2.1.9.11. Vliv kontaminujících mikroorganismů.....	27
2.1.10. Genetické faktory.....	27
2.1.11. Aktivita kvasnic	27
2.1.12. Kontaminace	28
2.1.12.1. Druhy kontaminace	28
2.1.12.2. Výskyt mikroorganismů v různých fázích výroby... ..	30
2.1.12.3. Volné buňky a biofirmy.....	31

2.1.12.4. Růst mikroorganismů v pivu.....	32
2.2. Propagace čisté kultury pivovarských kvasinek	32
2.2.1. Laboratorní propagace.....	32
2.2.2. Provozní propagace	33
2.3. Teorie kvašení	34
2.3.1. Hlavní kvašení.....	34
2.3.1.1. Faktory ovlivňující hlavní kvašení.....	35
2.3.1.2. Změny probíhající v mladině při hlavním kvašení.....	36
2.3.1.3. Technologie kvašení	39
2.3.1.3.1. Zakvašování a provzdušňování	39
2.3.1.3.2. Stádia hlavního kvašení	39
2.3.1.3.3. Sedimentace a sběr kvasnic	40
2.3.1.4. Nepravidelnosti hlavního kvašení.....	40
2.3.2. Dokvašování a zrání piva	41
2.3.2.1. Technologie dokvašování a kvašení..	41
2.3.2.2. Nepravidelnosti dokvašování.....	41
2.4. Přehled metod používaných pro kontrolu vlastností kvasnic..	42
2.4.1. Měření viability kvasnic.....	42
2.4.2. Měření vitality kvasnic	42
2.4.2.1. Mikroskopické metody.....	42
2.4.2.1.1. Barvení buněk s pozorováním v ultrafialové (UV) oblasti.....	42
2.4.2.1.2. Fluorescenční barvení	42
2.4.2.2. Metabolické testy	42
2.4.2.2.1. Stanovení rozpuštěného kyslíku v mladině.....	43
2.4.2.3. Zjišťování složení buněk.....	43
2.4.2.3.1. Měření aktivity kvasničných enzymů.....	43
2.4.2.3.2. Měření obsahu charakteristických sloučenin	43
2.4.2.3.3. Měření hodnot pH vně i uvnitř buněk.....	43
2.4.3. Zjišťování technologických vlastností.	44
2.4.3.1. Stanovení hrubých a jemných kalů.....	44
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST... ..	45
3.1. Mikroorganismy.....	45
3.2. Metody používané pro kontrolu vlastností kvasnic.....	45
3.2.1. Přímá metoda stanovení počtu buněk.....	45
3.2.2. Vitální barvení.....	47
3.2.3. Stanovení rozpuštěného kyslíku v mladině.....	47
3.2.4. Stanovení kalů.....	48
3.2.4.1. Stanovení hrubých kalů.....	48
3.2.4.2. Stanovení jemných kalů.....	49
3.2.5. Měření pH vně buňky.....	50
3.2.6. Měření teploty v průběhu kvašení.....	51
3.2.7. Měření stupně prokvašení.....	51
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	52
4.1. Hodnocení průběhu růstu.....	52

4.2. Vitální barvení.....	54
4.3. Sledování poklesu pH.....	55
4.4. Sledování teploty.....	56
4.5. Sledování stupně prokvašení – kvasné křivky.....	57
4.6. Celkový průběh kvašení.....	58
4.7. Stanovení kalů.....	62
4.8. Stanovení rozpuštěného kyslíku v mladině.....	64
5. ZÁVĚR.....	66
6. LITERATURA.....	68
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	69

1 ÚVOD

Průmyslová i domácí výroba piva, vína i jiných alkoholických nápojů se opírá o cílené využívání kvasinek, převážně druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Výrobní proces předpokládá použití standardních kvasnic s dobře definovanými vlastnostmi, pokud možno neměnnými i při opakovaném nasazení. Podle názoru technologa jsou kvasnice jednou ze surovin kontrolovatelných jednoduchými metodami a zaručující bezproblémovou výrobu kvalitního nápoje. Termín kvasinky se většinou používá v laboratorním měřítku, zatímco výraz kvasnice, nebo varečné kvasnice, označuje vlhkou biomasu většího množství kvasnic, využívaných v provozu. Kvasinky, náležející k houbám, se staly předmětem početných vědeckých studií, které rozšířily znalosti o jejich použitelnosti k výrobě alkoholických nápojů [3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kulturní pivovarské kvasinky

2.1.1 Taxonomie kvasinek

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy řadící se do nadříše *Eukaryota*, říše houby (*Fungi*) [3]. V systému hub patří kvasinky mezi *Eumycota*, do pododdělení *Ascomycotina* (vřeckovýtrusné houby). V rámci systému vřeckovýtrusných hub jsou pivovarské kvasinky zařazovány do třídy *Endomycetes* (tvoří primitivní asky, tvoří plodnice a askogenní hyfy) a čeledi *Saccharomycetaceae* [14].

V pivovarnictví se využívá druh *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*. Buňky jsou oválné nebo kulaté, u diploidních buněk se tvoří pseudomycelium, u triploidních nebo aneuploidních bývá pseudomycelium rudimentární, buňky jsou větší. U pivovarských kmenů se spory zpravidla netvoří nebo jejich počet je nižší a nevitální. [14].

V rámci druhu *Saccharomyces cerevisiae* existuje asi 1000 technologických kmenů s různými vlastnostmi [3].

Za jeden z nejdůležitějších biochemických znaků pivovarských kvasinek se považuje schopnost zkvašovat sacharidy za tvorby ethanolu a oxidu uhličitého. Tato schopnost závisí nejen na přítomnosti příslušného enzymového systému, ale také na systému, umožňujícím vstup sacharidů do buněk [1].

2.1.2 Historie a vývoj zařazení kvasinek

V historii se postupně oddělily a do dnešní doby se používají dvě základní technologie výroby piva a tím pádem i dva kvasničné kmeny – spodní pivovarské kvasnice a svrchní pivovarské kvasnice [1].

Původní název pro rod svrchních pivovarských kvasinek pochází z roku 1837 od Schwanna (Zuckerpils – cukerná houba). Tyto kvasinky v roce 1938 označil berlínský botanik J.F.Meyen názvem *Saccharomyces cerevisiae*, což je latinský ekvivalent původního označení spojený s druhovým názvem, souvisejícím s latinským názvem pro pivo. Specifikaci rodu upřesnil roku 1870 Rees [1].

Ze spodně kvasících kvasnic z pivovaru Spatenbrau a používaných v kodaňském pivovaru Carlsberg izoloval Emil Christian Hansen dva kmeny spodně kvasících kvasinek. Kmen č. 1 získal název *Saccharomyces carlsbergensis*, zatímco kmen č. 2, používaný dále v mnichovských pivovarech, se jmenoval *Saccharomyces monacensis* [1].

Oba názvy později splynuly pod jediné označení *Saccharomyces carlsbergensis*. Z anglických piv Hansen izoloval *Saccharomyces cerevisiae* a popsal ho v roce 1883 [1].

Od těchto dob nebo-li dob Hansena, se k výrobě piva používali pouze čisté kmeny pivovarských kvasnic. První propagační stanice zahájila provoz v Carlsbergu 12. listopadu 1883. Hansen také vydal v roce 1885 taxonomickou studii kvasinek [1].

Později se získaly další druhy kvasinek rodu *Saccharomyces*, které ovšem z pivovarnického hlediska často patřily k cizím (divokým) kvasinkám [1].

Za všeobecně uznávané taxonomické systémy se v pivovarství považují systémy podle Lodderové a Kreger van Rijové z tzv. holandské školy, i když se mezitím objevily i systematiky s rozdílným pojetím. Jejich taxonomická studie z roku 1952 udává již 30 druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* s 3 varietami, pro svrchní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a ostatní druhy se v pivovarství považovaly za cizí nebo divoké kvasinky [1].

V roce 1970 splynuly druhy *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces logos* a *Saccharomyces uvarum* do jednoho druhu *Saccharomyces*, který z pivovarského hlediska zahrnoval typické kulturní a cizí kvasinky. Část pivovarských mikrobiologů používala i nadále starý název, ostatní převzali nové označení, popř. ho doplnili ještě starým názvem [1].

Podobně splynuly druhy *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoideus*, *Saccharomyces willianus* v nový druh *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Po roce 1984 existuje již jen jediný druh pro spodní i svrchní pivovarské kvasinky, označovaný jako *Saccharomyces cerevisiae*. Tento druh opět obsahuje kvasinky, dříve považované v pivovarství za cizí (divoké), včetně pro pivovarskou výrobu nejškodlivější druh *Saccharomyces diastaticus* [1].

Pivovarští mikrobiologové se opět pokoušeli rozlišit svrchní a spodní pivovarské kvasinky. Někteří z nich ovšem považovali původní druhy za variety nového kmene, jiní za poddruhy a další uváděli staré názvy v závorce [1].

Proto se i v současné pivovarské literatuře můžeme setkat s různými obměnami názvů, jako *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*}, *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, ssp. *Carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* (*carlsbergensis*), *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Saccharomyces cerevisiae uvarum* var. *carlsbergensis*, *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis* pro spodní pivovarské kvasinky a podobné obměny existují i pro svrchní kvasinky [1].

Variety (varieta, var.) druhu se liší určitými, spíše podružnými vlastnostmi, zatímco poddruhy (subsp., ssp.) se liší fyziologicky významnějšími nebo biochemickými vlastnostmi [1].

Kvasničné kmeny používané v pivovarství[3], [4]:

- spodní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* ({*carlsbergensis*} popř. *uvarum*)) se používají při výrobě piva typu ležák v teplotním rozmezí 7-15 °C, povrch jejich buněk se vyznačuje hydrofilním charakterem, mají tedy schopnost flokulovat a sedimentují na dně kvasné nádoby. Rafinosa zkvašují úplně (pomocí enzymu melibiosa – na fruktosu a disacharid melibiosu, ta je hydrolyzována na glukosu a galaktosu a pak zkvašována), mají nižší růstovou teplotu a tepelnou odolnost

- svrchní pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) se používají při výrobě piv zejména v Anglii jako jsou např. piva Ale, Stout, Porter, Trapist a u nás a v Německu k výrobě pšeničných piv v teplotním rozmezí 18-22 °C. Kvasinky svrchního kvašení se vyznačují spíše hydrofóbním povrchem a jsou vynášeny při kvašení vznikajícím CO₂ k povrchu kvasné tekutiny, kde dochází k jejich hromadění a tvorbě „kvasničné deky“. Rafinosa zkvašují pouze 1/3 molekuly.

Rozdíly mezi svrchními a spodními kvasinkami zahrnují [1]:

- úplné zkvašování rafinosy spodními kvasinkami oproti částečnému (1/3) zkvašování u svrchních kvasinek. Kvasinky, nezksašující úplně rafinosa obsahují pouze β-fruktofuranosidasu, zatímco ostatní druhy také α-galaktosidasu

- imunochemické difference, rozdílné složení buněčných stěn

- vyšší maximální teplota růstu u svrchních kvasinek

- vyšší tepelná odolnost svrchních kvasinek

- rozdílné složení genetického materiálu

- rozdílné technologicky významné vlastnosti

2.1.3 Sbírka pivovarských kvasinek

Moderní průmyslová výroba si vyžaduje čistou kulturu mikroorganismů, která splňuje svými biologickými a biochemickými i technologickými vlastnostmi požadovanou kvalitu hotového výrobku. Také podle užití technologie kvašení je třeba vybírat k aplikaci kmeny, splňující nároky na kvalitu hotového piva. Všechny tyto požadavky vedly k založení **Sbírky pivovarnických kvasinek** na mikrobiologickém oddělení VÚPS, mezinárodně registrované pod značkou RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) [2].

2.1.3.1 Historie sbírky

V roce 1946 byla založena ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze největší čs. Sbírka kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů (velká zásluha RNDr. Anny Kockové-Kratochvílové). Jako základ sbírky posloužily kmeny shromážděné v letech 1942-1944 v Laboratoři vitamínové a hormonální chemie v Praze, také mnoho produkčních kmenů z Dánska, Holandska a mnoha středoevropských pivovarů. Celá sbírka byla v té době uchovávána na šikmých sladidlových agarrech pod parafinovým olejem a uložena při pokojové teplotě. Prvními kmeny v nové sbírce pivovarských kvasinek se staly kmeny používané v českých pivovarech, vesměs kvasinky spodního kvašení, tehdy označované jako *Saccharomyces carlsbergensis*. V průběhu let byla sbírka neustále rozšiřována a doplňována o další nové kmeny (ze zahraničních pivovarů a sbírek a o nově vyšlechtěné či geneticky zkonstruované kmeny) [2].

Roku 1964 se stala Sbírka pivovarských kvasinek členem Federace československých (nyní českých a slovenských) sbírek mikroorganismů a jako jedna z velmi specificky zaměřených průmyslově využitelných sbírek je od roku 1996 také součástí „Národního programu ochrany genofondu mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu a jejich využití v referenční diagnostice“ [2].

2.1.3.2 Sbírkové kmeny

Sbírka obsahovala v roce 1999 124 kmenů pivovarských kvasinek a byla a stále je průběžně doplňována nově vyšlechtěnými perspektivními produkčními kmeny, které mají speciální vlastnosti vhodné pro nové výrobní postupy. Ve sbírce jsou zastoupeny oba typy produkčních kmenů, ve větší míře kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis* a v menší míře i kvasinky svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *Cerevisiae* [2].

Ve sbírce jsou obsaženy kmeny produkční - pracovní (splňující svými parametry požadavky na výrobu piva) a kmeny vhodné k výzkumu nebo pro výrobu pivních specialit. Kmeny ze sbírky jsou dodávány výzkumným pracovištím a pivovarům jako čisté kultury ve formě šikmých agarů, nebo pomnožené v požadovaném objemu sterilní mladiny [2].

Paralelně k této sbírce ještě existuje sbírka obsahující kvasinky jiných kmenů různé provenience (14 kmenů vinařských a 40 kmenů dalších rodů) a sbírka izolátů piva škodících G+ bakterií (45 kmenů různých laktobacilů a 7 kmenů pediokoků). Obě tyto sbírky jsou určeny pro výzkum nebo jako srovnávací [2].

2.1.3.3 Uchování a vedení sbírky

Sbírka je vedena na šikmých sladidlových agarrech pod zaparafinovanou vatovou zátkou a deponována odděleně v chladícím boxu. Tato metoda uchování umožňuje dodání kmene žadateli rychleji a v aktivním stavu (sladina je přirozeným prostředím pro pivovarské kvasinky, takto vedené kmeny se snadno převádí do výroby, zachovávají si léta své specifické

vlastnosti, pravidelně se 2x ročně přeočkovává). Současně se vede sbírka na šikmých sladidlových agaroch převrstvených parafinovým olejem (přeočkování 1x za dva roky). Paralelní sbírka je vedena pouze na sladidlovém agaru pod parafinovým olejem vždy po dobu dvou let. Jiné způsoby očkování (lyofilizace, kryoprezervace) se už nepoužívají [2].

Aby sbírka správně plnila svůj účel a mohla být využívána, je potřeba, aby o deponovaných kmenech poskytovala dostatečné informace. Proto byly v průběhu minulých let ověřovány a stanovovány základní morfologické a biochemické vlastnosti jednotlivých kmenů [2].

Vybrané pivovarské kvasinky jsou pravidelně testovány laboratorními kvasnými zkouškami, probíhajícími ve skleněných kvasných válcích o kvasném objemu 0,5 l v 10% mladině po dobu 7 dnů. Při nich jsou zjišťovány nejdůležitější laboratorně postižitelné technologické vlastnosti připraveného mladého piva – prokvašení mladiny, sedimentace kvasinek a také se věnuje pozornost tvorbě důležitých metabolitů jako vedlejších produktů při kvašení tzn. produkci vyšších alkoholů, esterů, diacetylu i mastným kyselinám a oxidu siřičitému. Studie sbírek byly rozšířeny o posouzení tendencí produkčních kmenů k autolýze i o citlivosti ke složení mladiny [2].

2.1.3.4 Produkční (pracovní) kmeny

Jedná se o kmeny sbírkových čísel 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 95 a 96. Jejich charakteristiky podle výsledků laboratorních kvasných zkoušek jsou uvedeny v Tab. 1 a provozní charakteristiky v Tab. 2. Více než objem sedimentu se zdá o sedimentační charakteristice jednotlivých kvasničných kmenů vypovídat bod flokulace udávající stupeň prokvašení mladiny v době, kdy je ve vzhledu největší počet buněk. To vyplývá při srovnání odpovídajících hodnot tohoto prokvašení s příslušnou provozně zjištěnou charakteristikou sedimentace. Laboratorně stanovované metabolity v mladém pivu vypovídají o tendenci kvasničného kmene k tvorbě nejdůležitějších prekurzorů organoleptických vlastností hotového výrobku. Provozní charakteristiky naopak napovídají vhodnost kmene pro zavedený či nově zavedený technologický postup při výrobě piva. Někdy si také změna kvality suroviny může následně vyžádat změnu kmene provozních kvasnic při nezměněných senzorických vlastnostech [2].

V pivovaru Litovel se používá produkční kmen č. 7 (v tabulkách žlutě zvýrazněn). Tento kmen je podle provozních zkušeností a laboratorních testů zařazen do II. kvasné skupiny, tj. středně prokvašující. Jedná se o kmen s dobrou prokvašující schopností, vyznačující se nízkou produkcí vedlejších metabolitů během hlavního kvašení a dokvašování, což má příznivý vliv na organoleptické vlastnosti hotových piv [2].

Tab. 1 Laboratorní charakteristiky produkčních (pracovních) kmenů

kmen č.:	2	3	6	7	9	10	12	95	96
měřené veličiny									
zdánlivé prokvašení (% hm.), kvasná skupina	66,5 II-III	66,7 II-III	67,7 II-III	60,2 II	66,9 II	68,5 II-III	68,8 II-III	69,8 III	70,6 III
sediment (ml)	5,5	5,0	5,5	5,0	5,5	6,0	6,0	6,0	6,0
sedimentační skupina	C	B-C	C	B-C	C	C	C	C	C
bod flokulace (% hm.)	33	38	49	34	42	38	-	-	-
diacetyl (mg/ml)	0,28	-	0,73	0,40	0,33	-	0,36	0,22	0,22
vyšší alkoholy (mg/ml)	80	70	58	54	71	67	68	75	65
oxid siřičitý (mg/ml)	26,4	-	17,7	-	17,4	13,2	-	-	10,9

Tab. 2 Provozní charakteristiky produkčních (pracovních) kmenů.

kmen č.:	2	3	6	7	9	10	12	95	96
sledovaná vlastnost									
prokvašování mladiny	hluboko						hluboko		
	-	středně	středně	středně	středně	hluboko	-	hluboko	hluboko
	středně						středně		
sedimentace kvasnic	velmi dobrá								
	-	dobrá	velmi dobrá	dobrá	dobrá	velmi dobrá	dobrá	dobrá	velmi dobrá
	dobrá								

Uchování geneticky nezměněného kmene je velice důležité v zájmu zachování biodiverzity. Také nároky průmyslu na uchování technologicky standardních vlastností jsou pro takto specializovanou sbírku mikroorganismů velkým závazkem. Sběrka pivovarských kvasinek je svým způsobem exkluzivitou nejen v České republice, ale i v rámci celého východního bloku a je zárukou zdroje stabilně kvalitních kvasničných kultur především pro české pivovarnictví [2].

2.1.4 Chemické složení

Jako v každém organismu, tak i v kvasničné buňce převažuje voda, tvoří 65 – 85% buňky. $\frac{3}{4}$ obsahu vody tvoří voda intravaskulární vázaná uvnitř buněk a $\frac{1}{4}$ vody hydratační a volná, vázaná povrchovými silami. Složení sušiny kvasničné buňky je proměnlivé v závislosti na fyziologickém stavu a stádiu kultury a mění se i se změnami složení substrátu. Základní složky sušiny v pivovarských kvasinkách jsou uvedeny v Tab. 3 [5].

Tab. 3 Základní chemické složení sušiny pivovarských kvasinek

Složka	Obsah (%)
Sacharidy	15 – 37
Dusíkaté látky	45 – 60
Lipidy	2 – 12
Minerální látky	6 – 12
Vitaminy, Kofaktory	stopy

Sacharidy

V sušině jsou přítomny jako monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy, deriváty a substituované sacharidy. Velký podíl je obsažen v obalových vrstvách buňky. Ostatní se nacházejí v protoplazmě (převládají glykogen a mannan). Reservní polysacharid glykogen obsahuje převážně 1,4-vazby mezi glukosovými jednotkami, částečně i 1,6-vazby a malý podíl kyseliny fosforečné. Svrchní kmen obsahují zpravidla více glykogenu než spodní kmeny. Mannanový polysacharid s vazbami 1,2- a 1,6- je fyziologicky spjat se schopností kvasinek aglutinovat. Také obsahují kvasinky okolo 1% zkvasitelného disacharidu trehalosu a další nižší sacharidy (glukosu a v nukleových kyselinách ribosu, deoxyribosu) [5].

Dusíkaté látky

Kvasničné buňky obsahují téměř všechny formy dusíkatých látek. Přítomné aminokyseliny jsou k dispozici pro proteosyntézu a metabolismus dalších látek. Z peptidů je významný obsah glutathionu (glutamylcystylglycin) s neobvyklou ϵ -peptidovou vazbou, který prostřednictvím SH-vazby cysteinu hraje důležitou roli v redoxním systému kvasničné buňky [5].

Bílkoviny tvoří hlavní část dusíkatých látek kvasničné sušiny. Z albuminů byl z kvasnic izolován cerevisin s vysokým obsahem bazických aminokyselin a z fosfoproteinů zymokasein. Většina bílkovin je v kvasničné buňce přítomna jako apoenzymy, také jsou v ní přítomny nebo se při projevu životních funkcí indukují enzymy všech šesti hlavních tříd. Z jednotlivých tříd jsou to např. [5]:

Oxidoreduktasy – alkoholdehydrogenasa, glyceraldehydfosfátdehydrogenasa, peroxidasa, katalasa, atd.

Transferasy – hexokinasa, fosfoglukokinasa, pyruvátkinasa, fosfoglycerátkinasa, fosfoglyceromutasa, aj.

Hydrolasy – acetyl-CoA-hydrolasa, α -glukosidasa, β -fruktofuranosidasa, aj.

Lyasy – pyruvátdekarboxylasa, fruktosodifosfátaldolasa, enolasa, aj.

Isomerasy – triosofosfátisomerasa, glukosofosfátisomerasa, fosfoglycerát- fosfomutasa, aj.

Ligasy – acetyl-CoA-synthetasa, glutathionsyntetasa, pyruvátkarboxylasa, aj.

Lipidy

Zdravá kvasinka většinou obsahuje do 5% lipidů, z nichž většinu tvoří složené lipidy, lecitiny, kefaliny, cerebrosidy a steroly. Některé z nich přímo regulují propustnost buněčné stěny a tím ovlivňují transport substrátu do buňky. Tučky obsažené v sušině mají jak nasycené, tak nenasycené mastné kyseliny s převládajícím podílem kyseliny hexadekanové, stearové a olejové. Jsou lokalizovány hlavně v cytoplazmě a menší část je složkou buněčné struktury [5].

Minerální látky

Nejvíce je zastoupen fosfor, přibližně z poloviny vázaný v nukleových kyselinách, bílkovinách, lipidech a vitamínech. Mezi další významné složky popela patří draslík (má význam pro propustnost obalových částí buněk = buněčný transport), hořčík, vápník (má schopnost flokulovat), sodík, síra, křemík a ze stopových prvků železo (významný cytochromový komplex), mangan, měď a zinek (ovlivňuje metabolické děje). Vysoká koncentrace Ca^{2+} a Fe^{2+} způsobuje mutaci kvasinek [5].

Vitaminy a kofaktory

Jako součást enzymů je v pivovarských kvasinkách přítomna řada vitaminů, např.: mesoinositol, cholin, ergosterol, nikotinamid, thiamin, kyselina pantotenová, pyridoxin, kyselina listová a další. Z kofaktorů jsou v kvasničné buňce přítomny především nikotinamidové nukleotidy NADP, NAD a flavinadenindinukleotid, dále kyselina lipoová, ATP, kyselina tetrahydrolistová, koenzym A a další [5].

2.1.5 Morfologie a cytologie

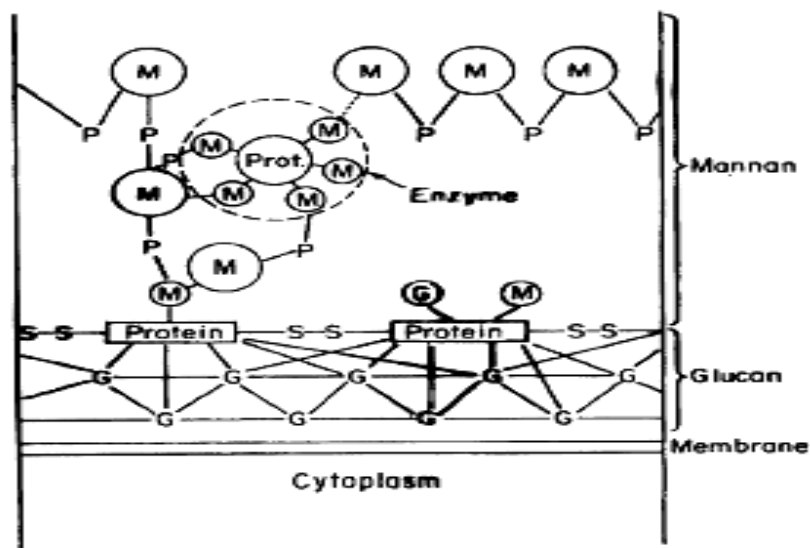
Tvar a velikost kvasničné buňky má přímou souvislost se stavem a podmínkami, v nichž se buňka nachází. Zpravidla je buňka mírně oválného tvaru s délkou 6-10 μm a šířkou 5-8 μm .

Rozměry a tvar buňky určuje velikost plochy povrchu a tím i možnosti transportu a metabolismu kvasničné kultury [5].

Buňky kvasinek se skládají z buněčné stěny, plazmatické membrány, cytoplazmy a jádra. Jádro a cytoplazma jsou nositeli života buňky, buněčná stěna a plazmatická membrána zprostředkovávají transport živin a produktů metabolismu [5].

Buněčná stěna

Určuje tvar buňky a je složena z mannanové, glukanové a proteinové vrstvy (viz. Obr. 1)



Obr. 1 Schéma struktury buněčné stěny kvasinek [5]

Mannanová vrstva obsahuje rozvětvený mannanový polymer a proměnlivé množství fosfátu. Glukanová vrstva obsahuje β-glukanové polymery, proteinová vrstva zase mannoproteiny a glukoproteiny. Pevnost buněčné stěny zajišťuje glukanová vrstva, mannanová je amorfní. V jizvách buněk je navíc přítomen chitin. Ve stěně jsou také přítomny některé exoenzymy jako invertasa a melibiаса [5].

Cytoplazmatická membrána

Obsahuje především bílkoviny a lipidy, v menší míře sacharidy a nukleové kyseliny. Má důležitou roli v kontrole transportu, při syntéze buněčné stěny a vylučování extracelulárních enzymů [5]. Je volně propustná pro malé molekuly bez náboje a neobsahuje dýchací enzymy a systém oxidační fosforylace [9].

Cytoplazma

U mladých buněk se jeví jako průhledná, homogenní hmota. Obsahuje membránový systém, tukové sferozomy, vakuoly s hydrolytickými enzymy, volutinem a lipidy, dále mitochondrie (v nichž probíhají energetické přeměny a syntéza bílkovin) [5,9].

Endoplazmatické retikulum

Tento orgán se nachází v cytoplazmě kvasinek jako systém dvojité membrány s poměrně velkými póry. Na vnějším povrchu obou membrán jsou četná zrníčka polynómů (= agregátů

ribozomů). Endoplazmatické retikulum tvoří v buňce různé nádobky a oddělení, obsahující různé enzymy a rezervní látky [9].

Mitochondrie

Jsou obklopeny dvěma membránami: vnější membrána má bradavičnatý povrch, vnitřní membrána tvoří hluboké vchlípeniny směrem dovnitř mitochondrie. Tyto vchlípeniny se nazývají kristy. Jsou složeny hlavně z bílkovin, lipidů fosfolipidů. Obsahují kyselinu ribonukleovou (RNA a malé množství deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Probíhá v nich syntéza některých mitochondriálních bílkovin [9].

Vakuola

Vakuoly bývají kulovitého tvaru, obklopené jednouchou membránou. Mladé buňky obsahují menší vakuoly ve větším množství. Starší buňky obsahují většinou jednu vakuolu vyplňující celý prostor. Uvnitř vakuoly jsou hydrolytické enzymy jako proteinasy, ribonukleasa a esterasa, takže vakuoly jsou místem, v němž dochází k rozpadu těch struktur buňky, které se neustále v buňce rozkládají a obnovují a které mají krátký poločas rozpadu (mRNA, některé enzymy apod.). Kromě toho obsahují ještě polyfosfáty a velkou zásobu draselných iontů, aminokyselin a purinů, takže jsou rezervoárem látek, jež se právě neúčastní metabolismu [9].

Ribozomy

V buňce se nacházejí buď volné nebo vázané na endoplazmatické retikulum. Probíhá v nich biosyntéza bílkovin [9].

Cytoskelet

Cytoskelet je síť proteinových vláken, která se rozprostírá v cytoplazmě i v jádře a umožňuje vnitrobuněčný pohyb organel z jednoho místa na druhé.

Součástí cytoskeletu jsou mikrotubuly (poměrně málo ohebné trubice složené z bílkoviny *tubulinu*. Každá molekula tubulinu obsahuje guanosintrifosfát, který je zdrojem energie pro její zapojení do mikrotubulu) vycházející z pólového tělíska vřeténka v jadérku. Mikrotubuly hrají důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování [9].

Golgiho aparát

Je dalším membránovým útvarem v cytoplazmě kvasinek. Má tvar jednoho plochého měchýřku nebo několika propojených plochých měchýřků nebo anebo cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Předpokládá se že jeho funkcí je transport prekurzorů (tj. stavebních kamenů) buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu [9].

Jádro

Je složeno z jaderné membrány, jadérka a nukleoplazmy, tvořené převážně z nukleoproteinů. Bývá umístěno uprostřed buňky. U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se nachází v haploidním jádře 16 chromozomů, diploidní jádro má dvojnásobný počet chromozomů. V jádře se vyskytuje také nízkomolekulární kyselina deoxyribonukleová (DNA). Jádro se účastní dělení a pučení buňky [5,9].

Jadérko

Je uloženo v jádře těsně pod jadernou membránou. Je srpkovitého tvaru [9].

2.1.6 Růst, rozmnožování a stárnutí

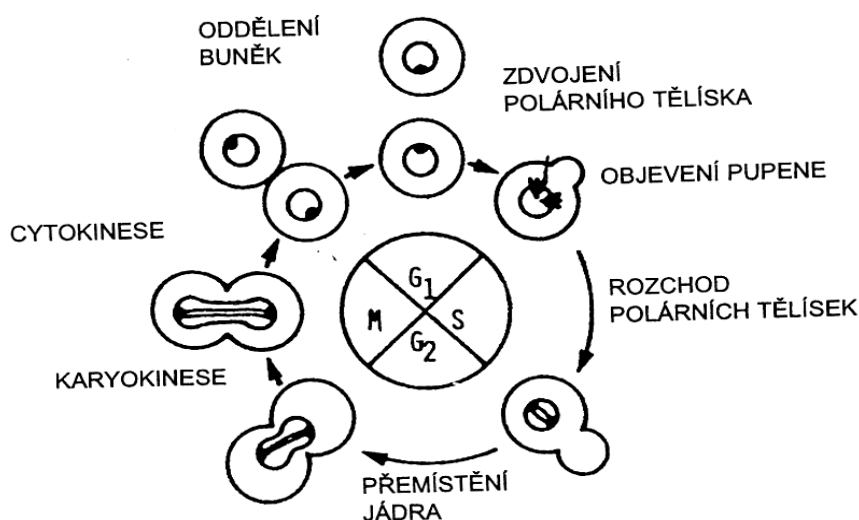
Pivovarské kvasinky, a kvasinky všeobecně, se rozmnožují vegetativním pučením nebo zřídka pohlavním rozmnožováním – sporulací.

Vegetativní rozmnožování

Kvasničný cyklus se obvykle definuje jako údobí mezi dvěma následnými děleními a zahrnuje několik typických fází. Individuální fáze buněčného cyklu se týkají vždy jednotlivé buňky a tím odlišují od známých růstových fází buněčné populace, zahrnující počáteční lag fázi, fázi exponenciálního růstu a posléze opět stacionární fázi růstu [3].

V buněčném cyklu kvasinek se rozeznávají 4 fáze znázorněné na Obr. 2 [3]:

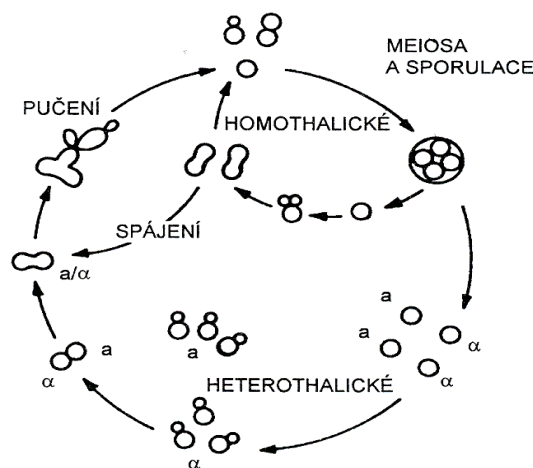
- presyntetická G₁, kdy buňka shromažďuje rezervní látky
- syntetická S, kdy buňka syntetizuje DNA
- postsyntetická G₂, kdy dorůstá pupen
- mitotická M



Obr. 2 Schéma buněčného cyklu kvasničné buňky *Saccharomyces cerevisiae* [14]

Pučení buněk se iniciuje uvolněním energie z rezervních sacharidů, dosáhne-li potřebného fyziologického stavu. Začíná aktivací enzymu štěpícího disulfidové vazby v buněčné stěně. Při pučení se tvoří stěna dceřinné buňky „de novo“ a po ukončení růstu pupenu se dceřinná buňka oddělí. Na dceřinné buňce zůstává dceřinná jizva, na mateřské buňce jedna z mnoha mateřských jizev [5].

Schéma životního cyklu lze vidět na Obr. 3.



Obr. 3 Životní cyklus *Saccharomyces cerevisiae* [14]

Pohlavní rozmnožování sporulací

Kmeny pivovarských kvasinek sporulují obtížně, přesto se umělé vyvolání podmínek pro sporulaci buněk využívá k izolaci nových mutantů. Vlastní sporulaci předchází předsporulační fáze, která se iniciuje růstem ve vhodném prostředí a dostatkem utilizovaných sacharidů, dusíkatých látek a vitaminů. Sporulační fáze je aerobní a probíhá při teplotě okolo 25°C u spodních a 30 – 34°C u svrchních kvasinek, nejčastěji v acetátovém médiu s omezeným zdrojem sacharidů a ostatních živin (obvyklá doba sporulace 5 – 12 hodin) [5].

Kvasinky vytvářejí kulovité spory uzavřené ve vrečku, nejčastěji po čtyřech. Spory po přenesení do média vyklíčí a vzniknou nové buňky. [5]

Jednotlivé kvasničné buňky podléhají stejně jako ostatní organismy individuálnímu stárnutí, určený omezeným počtem dělení buňky (tzv. Hayflickův limit). U kvasinek lze v průběhu stárnutí zaznamenat morfologické i fyziologické změny [3].

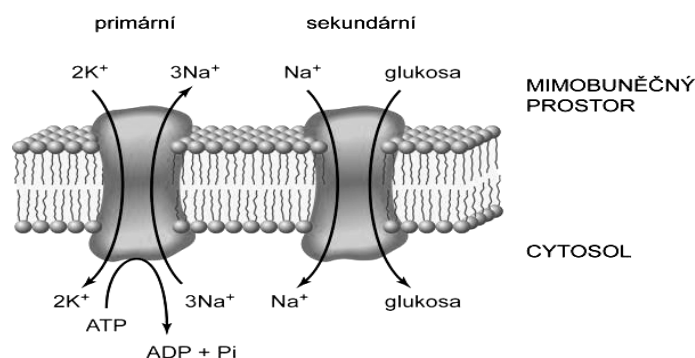
2.1.7 Metabolismus

Zahrnuje katabolické (při odbourávání látek se získává energie) i anabolické procesy (energie se spotřebovává na tvorbu nových, pro život nezbytných látek). Pro kvasinky je typický metabolismus v prostředí mladiny, kde je hlavním biochemickým pochodem glykolýza [5] = přeměna zkvasitelných cukrů na ethanol a oxid uhličitý za účasti řady enzymů a koenzymů [6].

Pro veškerý metabolismus je základní podmínkou transport zejména metabolizovaných, ale i dalších, látek do buňky [5].

Lze rozlišit tři typy transportu uplatňující se v kvasničné buňce [5]:

- prostá difúze – látky rozpuštěné v mladině difundují ve velké koncentraci do buňky v koncentračním spádu. Tento způsob nevyžaduje přísun energie. Prostřednictvím prosté difúze probíhá transport většiny anorganických látek jako K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , NH_4^+ , SO_4^{2-} a dalších.
- usnadněná difúze – zde je nutná přítomnost přenašeče v membráně, opět není třeba přísunu energie
- primární aktivní transport – probíhá proti koncentračnímu spádu, je třeba dodat energii. Probíhá za spoluúčasti membránového nosiče, specifické bílkoviny, a umožňuje transport fosforečnanů. Schéma je znázorněno na Obr. 3.



Obr. 4 Schéma aktivního transportu [6]

Metabolické děje jsou velmi ovlivňovány koncentrací Zn (zpomalení průběhu kvašení a snížení stupně prokvašení piva), a již nízkými koncentracemi Ag, Cd, Hg, Li, Be, Ni, As, B a Cu (inhibitory metabolického děje). NO^{2-} a NO^{3-} jsou velmi toxické [5].

2.1.7.1 *Metabolismus sacharidů*

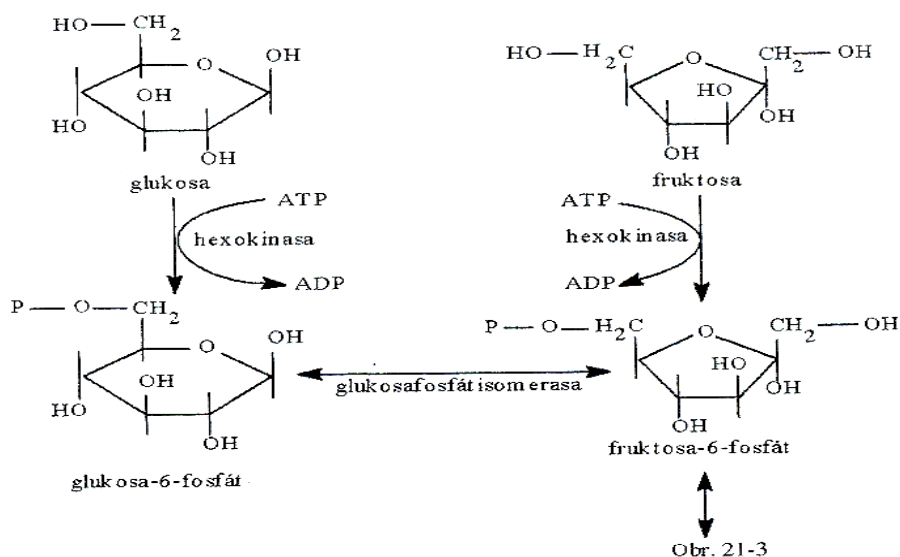
Metabolismus sacharidů pivovarskými spodními kvasinkami zahrnuje, za normálních podmínek, asi z 98 % kvašení, z toho 95 % prostřednictvím glykolýzy a ze 3 % vedlejšími metabolickými dráhami. Přibližně 2 % sacharidů jsou odbourávány aerobně, z toho asi 1,6 % v citrátovém cyklu a 0,6 % v pentózovém cyklu [5].

Pivovarské kvasinky metabolizují pouze část sacharidů v mladině, rod *Saccharomyces* nezkrvašuje pentosy [5].

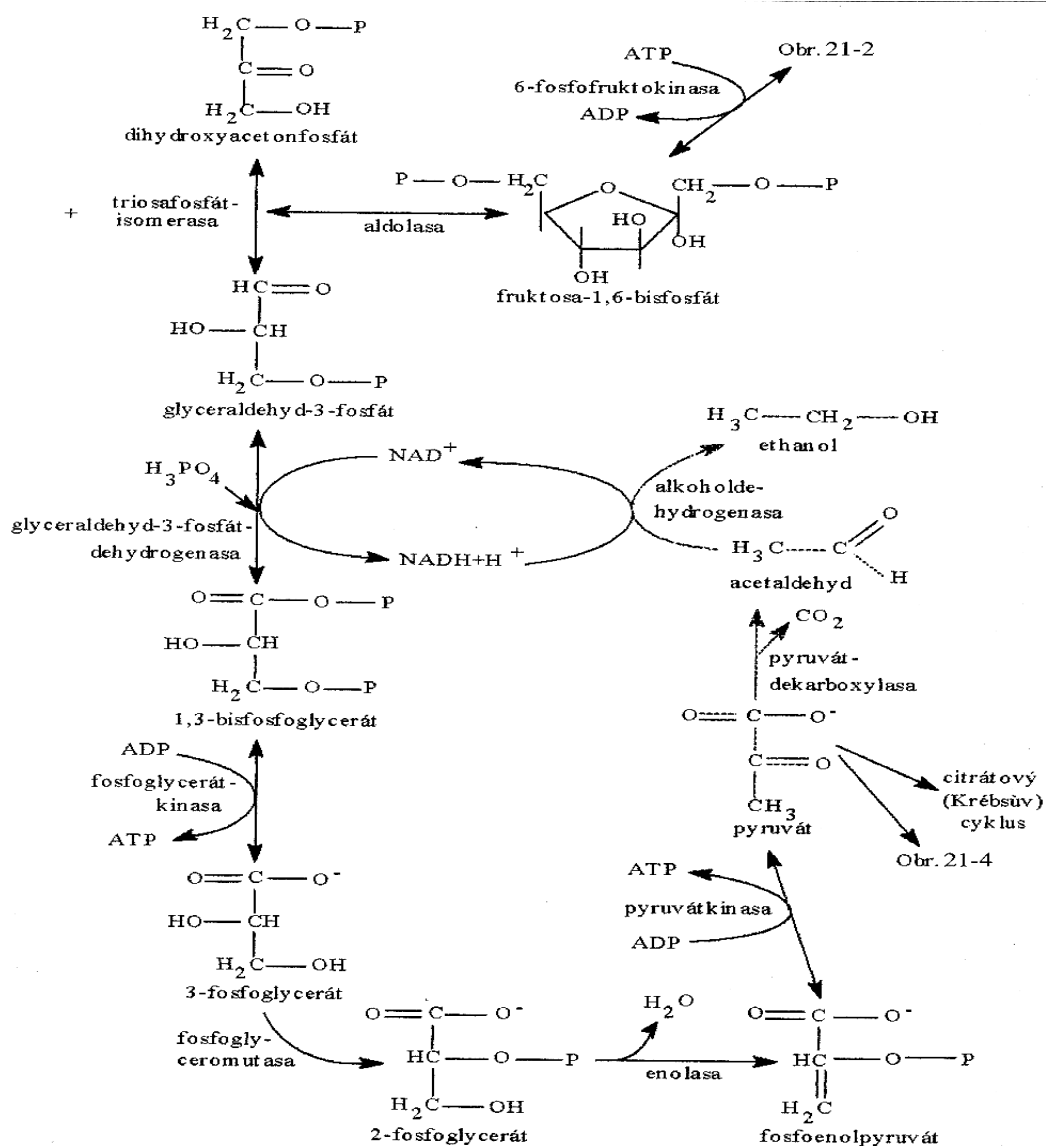
Transport monosacharidů probíhá usnadněnou difúzí. Transportní systém vykazuje určitou specifitu. Glukosa vstupuje do buňky nejrychleji, ostatní monosacharidy pomaleji v pořadí 2-deoxy-D-glukosa, D-fruktosa..... a jako poslední sorbitol [5].

Transport di- a trisacharidů je složitější (v případě maltosy a maltotriosy je zprostředkován specifickými permeasami). Sacharosa je štěpena ještě před vstupem do buňky pomocí invertasy (působí jako melibiáza extracelulárně) [5].

Průběh metabolismu hexos ovlivňují podmínky fermentace: za anaerobních podmínek probíhá kvašení podle Embden-Mayerhof-Parnasova schématu glykolýzy znázorněného na Obr. 5 a 6 (zisk energie je 58,6 kJ), za aerobních podmínek se odbourávají sacharidy v pentózovém cyklu, na který pak navazuje, přes kyselinu pyrohroznovou, citrátový cyklus a dýchací řetězec (při zisku energie až 368,4 kJ z jedné molekuly glukosy) [5].



Obr. 5 Schéma tvorby glukosa-6-fosfátu [6]



Obr. 6 Schéma alkoholového kvašení dle Embden – Meyerhof – Parnase [6]

2.1.7.2 *Metabolismus dusíkatých látek*

Při metabolismu dusíkatých látek, zejména aminokyselin z mladiny, jsou anabolické a katabolické procesy v rovnováze [5].

Podle rychlosti adsorpce a účasti na metabolismu kvasinek se základní aminokyseliny rozdělují do tří a více skupin. Mezi přednostně absorbované patří threonin (THR), serin (SER), glutamin (GLU), lysin (LYS), Leucin (LEU). Tento metabolismus zahrnuje především biosyntézu bílkovin, metabolismus nukleových kyselin, nukleotidů, vyšších alifatických alkoholů, aromatických alkoholů a dalších. Prostřednictvím meziproductů přeměny aminokyselin je napojen na metabolismus sacharidů a dalších látek přítomných v mladině [5].

2.1.7.3 *Metabolismus lipidů*

Má velmi malý význam, jelikož pivovarská mladina obsahuje jen velmi málo lipidických složek u nichž převažuje katabolická β -oxidace mastných kyselin a zároveň probíhá biosyntéza mastných kyselin, tuků, fosfolipidů a sterolů vesměs v napojení na metabolismus sacharidů [5].

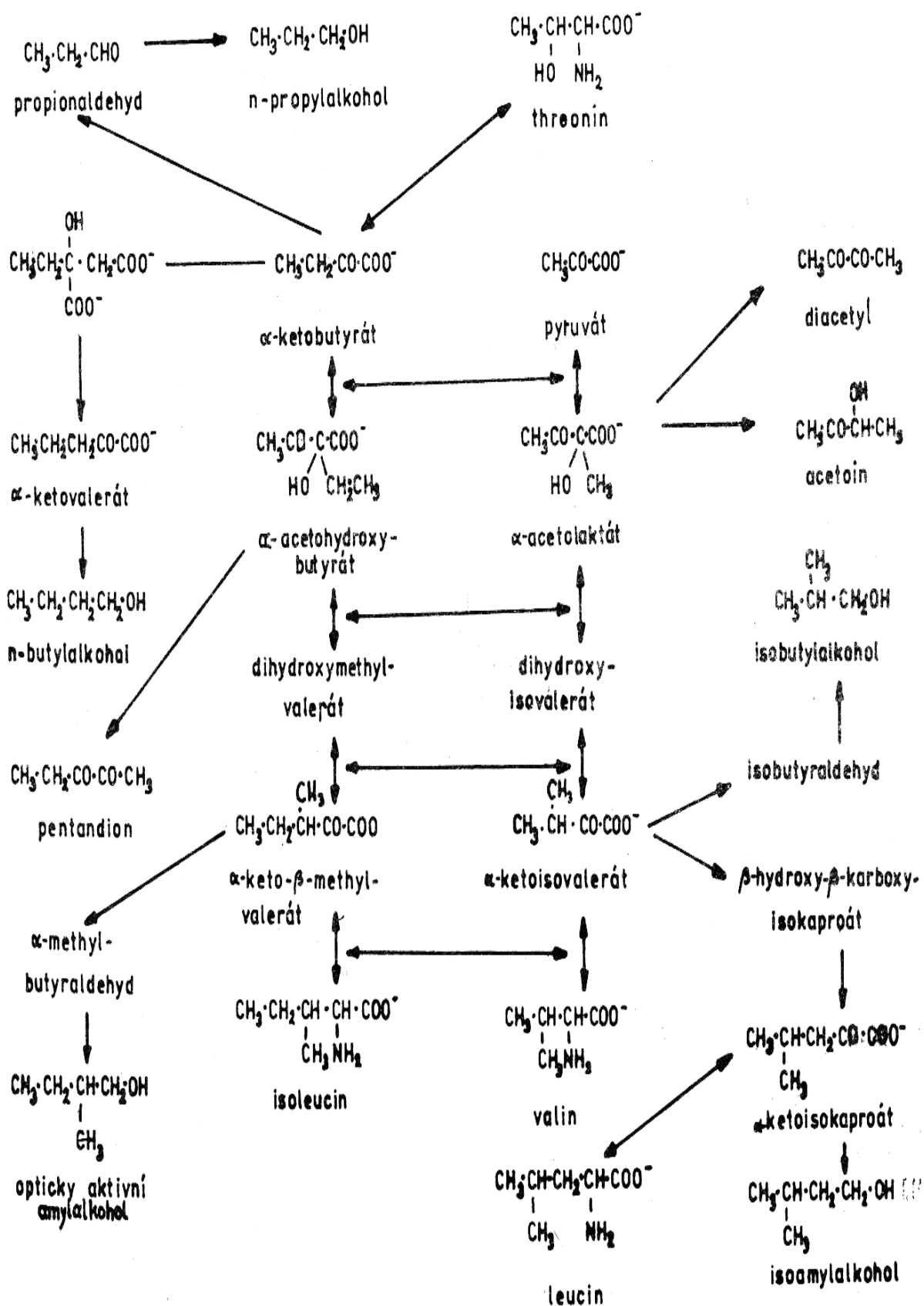
Tvorba vyšších alifatických alkoholů a vicinálních diketonů navazuje na metabolismus sacharidů a aminokyselin. Hlavním meziproductem jsou β -ketokyseliny a z aminokyselin se těchto reakcí zúčastňují hlavně threonin, leucin, isoleucin a valin, jak je patrné ze schématu na Obr. 7 [5].

Tvorba aromatických alkoholů navazuje na biosyntézu aromatických aminokyselin. Hlavním meziproductem je kyselina chorismová [5].

Tvorba esterů se uskutečňuje převážně enzymovou cestou a je napojena na metabolismus lipidů [5].

Tvorba aldehydů a ketonů má vliv na organoleptické vlastnosti piva (nepříznivě působí již při koncentraci 0,5-1 mg.l⁻¹) [5].

Tvorba těkavých sirných sloučenin má velký význam pro chuť piva. Hlavním zdrojem pro jejich tvorbu v mladině jsou sírany [5].



Obr. 7 Schéma tvorby vyšších alifatických alkoholů a vicinálních diketonů [5]

2.1.8 Výživa a utilizace kvasnic

Pivovarské kvasinky žijí a pomnožují se ve velmi na živiny bohatém prostředí jako je mladina. Ve svých buňkách proto shromažďují množství výživných látek: aminokyseliny, bílkoviny, komplexy vitamínů, biogenní prvky vázané v organických sloučeninách a to vše tvoří základ výživové hodnoty pivovarských kvasinek [10].

2.1.8.1 Uhlíkaté zdroje

Pivovarské kvasinky zkvašují glukosu, fruktosu, galaktosu, mannosu, xylulosu, sacharosu a maltosu popř. maltotriosu. Zatímco glukosa, fruktosa a sacharosa mohou vstupovat do buňky přímo (sacharosa po rozštěpení invertasou), ke vstupu maltosy jsou nutné specifické permeasy [3].

Zkvašování cukrů je ovládáno je ovládáno specifickými geny, které také v podstatě určují maximální množství vytvořeného alkoholu a dosažitelný stupeň prokvašení. Rychlost a stupeň využívání sacharidů jsou také závislé na podmínkách kvašení a všeobecně na fyziologickém stavu kvasnic [3].

Během kvašení kvasnice vytvářejí zásobní sacharidy glykogen a trehalosu. Glykogen je zásobní polysacharid, představující zdroj energie při hladovění kvasnic i pro počáteční fázi syntézy lipidů. Disacharid trehalosa je důležitým antistresovým faktorem [3].

2.1.8.2 Dusíkaté zdroje

Hlavním zdrojem využitelného dusíku v mladině jsou aminokyseliny a amonné ionty, přičemž se obvykle uvádí hodnota volného aminodusíku (FAN - Free Amino Nitrogen) v rozmezí 150-250 mg.l⁻¹ podle druhu a koncentrace mladiny. Kvasinky využívají aminokyseliny postupně a podle rychlosti využívání se aminokyseliny dělí do skupin A-D. Nejméně využitelnou aminokyselinou je prolin ze skupiny D. O využívání aminokyselin opět rozhodují selektivní permeasy [3].

2.1.8.3 Kyslík

Také podle požadavku na kyslík se pivovarské kvasnic mohou vzestupně dělit do skupin I-IV. Pro výrobu spodně kvašených piv se většinou využívá téměř nasyceného obsahu vzdušného kyslíku (asi 6 - 8 mg/l O₂) v zakvašené mladině, přičemž rozpustnost kyslíku závisí na teplotě, tlaku a také na koncentraci mladiny. Část kyslíku se spotřebuje jeho reakcí s redukčními látkami mladiny, např. melanoidiny a polyfenoly. Kyslík je především nutný pro syntézu membránových lipidů a sterolů a jejich obsah zpětně ovlivňuje potřebu kyslíku při dalším nasazení kvasnic. Takto se může kvalita kvasnic výrazně zhoršovat při opakovaném nasazení a stejný „paměťový“ efekt se vyskytuje např. i při nedostatečném obsahu kovů, poškození kvasnic dusitany apod. Ačkoliv literatura zmiňuje poškození kvasinek při nadbytečném vzdušnění, není toto nebezpečí při použití vzduchu k vzdušnění příliš velké [3].

2.1.8.4 Anorganické soli

Kovy významné pro kvasinky se dělí na makroelementy (Mg,K,Zn,Fe,Ca,Mn,Cl), mikroelementy (Co,B,Cd,Mo,Cu,Va,Ni,Cr,I) a kovy, působící inhibičně, nebo toxicky (Ag,Hg,Se,Pd,Te,As,Ni,Os,Li). Kovy jsou většinou významné pro správnou funkci enzymů a jejich potřeba narůstá s rostoucí koncentrací mladiny. Nedostatečné množství Zn²⁺ (pod 0,2 mg.l⁻¹) způsobuje závažné zpomalení hlavního kvašení, ale záleží také na vazbě kovu (iontová, komplexní) a na složení mladiny. Dalším významným iontem je Mg²⁺, který

zejména v mladínách s vyšší koncentrací extraktu musí několikanásobně převládat nad Ca^{2+} [3].

Anorganické sirné sloučeniny, zejména sírany tvoří důležitý zdroj pro syntézu methioninu, cysteinu a glutathionu. Metabolismus sirných sloučenin rozhoduje o tvorbě sirovodíku, oxidu siřičitého a dalších sirných sloučenin, majících rozhodující vliv na sensorické vlastnosti pív a jejich stabilitu [3].

Důležitým prvkem je fosfor, který se vyskytuje v nukleových kyselinách, fosfomannanech a fosfolipidech [3].

2.1.8.5 Vitaminy

Pivovarské kvasinky požadují biotin a mnohé z nich také panthotenovou kyselinu, jejíž nedostatek se může projevit ve zvýšené tvorbě sirovodíku a v narušení metabolismu sirných sloučenin, což má výrazný negativní dopad na sensorické vlastnosti piva [3].

2.1.9 Stresové faktory

V současnosti se řada faktorů, nepříznivě ovlivňujících chování kvasnic označuje jako stresové faktory. Jejich působení snižuje viabilitu i vitalitu kvasnic a může vést k poškození kvasničných buněk a jejich úhynu. Proti různým druhům stresů mohou v kvasinkách existovat různé druhy obranných mechanismů [3].

2.1.9.1 Teplotní stres

Teplotní stres zahrnuje jak působení vyšších, tak nižších teplot. Na vyšší teploty reagují kvasničné buňky tvorbou specifických bílkovin (HSPs - Heat-shock Proteins), zvyšujících tepelnou odolnost kvasinek. V praxi významnější je chladový šok. Pro správnou funkci kvasnic je důležitá prostupnost buněčných membrán, což závisí na obsahu sterolů a poměru nasycených a nenasyčených mastných kyselin. Při rychlém ochlazení může membrána získat vlastnosti gelu, což může kvasničnou buňku poškodit [3].

Teplotní stres se uplatňuje zejména při nesprávném režimu chlazení kvasnic v konusech cylindricko kónických tanků, kde špatná prostupnost chladu vrstvou kvasnic poškozuje kvasnice uvnitř vrstvy působením vyšší teploty a naopak nízká teplota stěny způsobuje chladový teplotní šok [3].

2.1.9.2 Ethanolový stres

Ethanol, jako výsledný produkt kvasného procesu negativně působí na kvasničné buňky, přičemž jejich růst inhibuje již 10 % obj., zatímco kvašení až 20 % obj. Ethanol narušuje buněčnou membránu, její prostupnost a inhibuje transport sacharidů a aminokyselin. Ačkoliv odolnost proti ethanolu je určena geneticky, závisí na mnoha dalších faktorech, jako obsahu živin, vlastnostech prostředí a např. i na koncentraci Mg^{2+} , které zvyšují odolnost buňky proti ethanolu [3].

2.1.9.3 Osmotický stres

Osmotický stres závisí na koncentračních rozdílech uvnitř i vně buňky a uplatňuje se zejména při kvašení mladín s vysokou koncentrací extraktu. Účinným faktorem, chránícím buňky proti osmotickému stresu je přítomnost trehalosy uvnitř buňky, a přítomnost glycerolu a aminokyselin v okolním prostředí [3].

2.1.9.4 Tlakový stres a stres oxidu uhličitého

Hydrostatický stres se obvykle zmiňuje v souvislosti s kvašením ve vysokých cylindricko-kónických tancích (CKT), neboť 10 m výšky kapaliny zvyšuje hydrostatický přibližně o 1 bar. Kromě samotného vlivu tlaku se spíše uplatňuje zvýšená rozpustnost oxidu uhličitého, přičemž 2 bary přetlaku již výrazně snižují kvasničnou viabilitu. Na druhé straně může mít zvýšený obsah oxidu uhličitého příznivý vliv, spočívající v nižší tvorbě nežádoucích těkavých látek [3].

2.1.9.5 Hodnota pH jako stresový faktor

Během kvašení se mění pH mladiny nejen vlivem vzrůstající obsahu oxidu uhličitého, ale především produkcí organických kyselin kvasnicemi. Na vitalitu kvasnic má vliv i vnitrobuněčné pH, čehož se často využívá k měření kvasničné aktivity. Od počáteční hodnoty $\text{pH} = 5,5$ mladiny klesá tato hodnota až k $\text{pH} = 4,3 - 4,5$ pro hotové pivo, zatímco vnitrobuněčné pH kvasnic se pohybuje mezi 5,9 - 6,4. Nízké hodnoty pH se uplatňují při kyselém praní kvasnic, většinou s hodnotou roztoku okolo $\text{pH} = 2$ [3].

2.1.9.6 Oxidační stres

Oxidační stres se zmiňuje v souvislosti s reakcemi volných kyslíkových radikálů i reaktivních druhů kyslíku, např. peroxidu vodíku. Tyto vysoce reaktivní látky vznikají při oxidačním metabolismu kvasinek a mohou vážně poškozovat důležité části buňky [3].

2.1.9.7 Iontový stres

Některé kovy vyvolávají stresové reakce u kvasnic a poškozovat jejich struktury. Ionty kovů mohou blokovat funkční skupiny enzymů, vytěsňovat potřebné ionty jiných kovů a inaktivovat enzymy. Jako příklad lze uvést antagonistické působení $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$, $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, $\text{Cd}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ apod. Opět záleží i na přítomnosti ostatních látek, zejména chelatačních sloučenin [3].

2.1.9.8 Dusitanový stres

Dusitany v mladině vznikají nejčastěji vlivem gramnegativních bakterií se schopností redukovat dusičnany, přičemž k reakci postačují i velmi nízké koncentrace dusičnanu (pod $10 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$). Protože aktuální koncentrace dusitanů v mladině je velmi nízká, doporučuje se použít testu s m-fenylendiaminem, který váže vznikající dusitan, aniž by se dusitan rozkládal, nebo reagoval s mladinou. Dusitany v mladině mohou zcela zastavit její kvašení a kromě toho reakcí dusitanu s mladinou vznikají zdraví nebezpečné netěkavé nitrosaminy [3].

2.1.9.9 Vliv kalů

Vliv kalů je často diskutovaným tématem, kde literární údaje zahrnují kladné působení kalů na průběh hlavního kvašení a naopak tzv. zalepování kvasničné buněčné stěny. Přes značnou rozšířenost tohoto názoru, nelze v literatuře nalézt seriózní potvrzení tohoto efektu [3].

Rozeznáváme dva druhy kalů [12]:

- hrubé kaly, jež se vylučují v chmelovaru, obsahují 50-60 % bílkovin, 20-30 % polyfenolů, 16-20 % hořkých látek a kolísavé množství lipidů a minerálních látek. Množství kalů je závislé na technologii ve varně, na intenzitě varu, na způsobu a množství dávkování chmele, na koncentraci připravované mladiny a na

vlastnostech svařovaného sladu. V zájmu dobrého průběhu kvašení je nutné dokonale odstranit hrubé kaly z mladiny

- jemné kaly, které se vylučují v průběhu chlazení mladiny na zákvasnou teplotu, obsahují především bílkoviny (48-57 %) a polyfenoly (11-26 %). Obdobně jako u hrubých kalů je množství jemných kalů závislé na technologii použité ve varně, na způsobu chlazení a na jakosti svařovaných surovin. V případech, že jejich obsah v mladině je vyšší než 200 mg/l, lze očekávat zhoršení chuťových vlastností a současně se při vyšším obsahu absorbují jemné kaly na povrch kvasinek, a tím omezují jejich fyziologickou funkci

2.1.9.10 Vliv pesticidů

Literatura se zmiňuje o možném negativním působení zbytků pesticidů, použitých při pěstování ječmene a chmele na pivovarské kvasnice [3].

2.1.9.11 Vliv kontaminujících mikroorganismů

Většina kontaminujících mikroorganismů v pivovarském provozu působí nepřímo, tj. využíváním rozpuštěného kyslíku, živin a růstových faktorů a změnou vlastností kultivačního prostředí (např. změnou pH). Tzv. killer druhy kvasinek vylučující bílkovinný toxin, účinný k citlivému kmenu pivovarských kvasinek [3].

2.1.10 Genetické faktory

Většina významných vlastností kvasnic je geneticky kódována přes syntézu kvasničných bílkovin a enzymů. Týká se to nejen základních metabolických procesů, ale také technologicky významných znaků jako jsou flokulace, schopnosti prokvašovat mladinu, odolnosti proti ethanolu a v neposlední řadě tvorby těkavých sloučenin, určujících sensorické vlastnosti piva. Důležitá je i schopnost redukovat karbonylové sloučeniny mladiny a mladého piva [3].

Úplnou genová mapu 16 chromosomů *Saccharomyces cerevisiae* lze nalézt na <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>. Metody genového inženýrství slibují připravit kmeny s technologicky významnými vlastnostmi, např. schopností štěpit dextriny, zlepšovat filtrovatelnost piva, urychlit zrání piva apod., ale dosavadní úspěchy nejsou příliš přesvědčivé [3].

Spontánní, nebo i indukované mutace zahrnují tvorbu respiračně deficientních (RD) mutantů s výraznou převahou fermentačního metabolismu a s nežádoucím technologickými vlastnostmi, např. předčasnou sedimentací, nízkým prokvašením a tvorbou diacetylu [3].

2.1.11 Aktivita kvasnic

Pod společným názvem aktivita kvasnic se současně zahrnují dva termíny- viabilita a vitalita kvasnic [3].

Viabilita kvasnic určuje, zda jsou kvasničné buňky živé a schopné reprodukce.

Vitalita kvasnic vyjadřuje fyziologický stav a metabolickou aktivitu kvasnic.

Pro technologa má význam technologická aktivita kvasnic, vyjadřující schopnost kvasnic splňovat technologické požadavky [3].

Aktivita kvasnic hraje důležitou roli v souboru vlivů, které působí na kvasný proces. Při konstantní zákvasné dávce se technolog snaží dodržovat stálé podmínky procesu, jako jsou

zákvasná teplota, množství rozpuštěného kyslíku, minimální kontaminace mladiny a její složení. Průběh kvašení se reguluje chlazením kvasné nádoby, což při nízké aktivitě kvasnic nebo nevhodném složení ovšem poskytuje jen omezené možnosti. Doba hlavního kvašení, stupeň prokvašení a teplota při sudování jsou hlavní souhrnné ukazatele vyrovnanosti kvašení a jejich kolísání vždy svědčí o nezvládnutém průběhu kvašení a zásadních chybách v nastavení hlavních parametrů kvašení. [3].

2.1.12 Kontaminace

2.1.12.1 Druhy kontaminace v pivovarské výrobě

Pivovarská výroba využívá při kvašení a dokvašování piva řízenou činnost pivovarských kulturních kvasinek. Kromě nich se při výrobě uplatňují v různém rozsahu další mikroorganismy, které jsou většinou pokládány za nežádoucí [11].

Mikroorganismy jsou jednobuněčné nebo i více buněčné organismy velmi malých rozměrů, neschopné tvořit funkční diferencované tkáně nebo pletiva. V systému mikroorganismů se rozlišují dvě nadříše zahrnující **Prokaryota** bez diferencovaného jádra a **Eukaryota** s jádrem, odděleným od cytoplazmy jaderným obalem (Tab. 4) [11].

Tab. 4 Dělení živých mikroorganismů

1. nadříše Prokaryota		
1. říše	<i>Monera</i>	bakterie, sinice
2. nadříše Eukaryota		
2. říše	<i>Protista</i>	protozoa, řasy, primitivní houby
3. říše	<i>Fungi</i>	kvasinky, plísně
4. říše	<i>Plantae</i>	rostliny
5. říše	<i>Animalia</i>	živočichové

V pivovarské výrobě se vyskytují hlavně plísně, náležející do říše hub (**Mycota**), mezi pravé houby (**Eumycota**), zahrnující třídy *Zygomycetes* (spájkivé houby), *Endomycetes* (pučící houby), *Ascomycetes* (vřeckaté houby), *Basidiomycetes* (stopkovýtrusné houby) a *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*), u nichž není dosud známé pohlavní rozmnožování [11].

Kvasinky se považují za sekundárně vzniklé jednobuněčné formy hub. Jsou heterotrofní, nepohyblivé, rozmnožují se vegetativně (dělením nebo pučením) i pohlavním způsobem (pohlavními sporami). Mohou tvořit pseudomycelium, vzácně pravé mycelium. Dělí se na anamorfní a telemorfní stadia tříd *Ascomycetes* a *Basidiomycetes* [11].

V pivovarské výrobě je prokázáno mnoho kvasničných rodů, např. *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Kloeckera*, *Dekkera*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, aj. Za nejnebezpečnější se považují druhy nejvíce podobné kulturním kvasinkách, např. *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, schopná růstu i v dobře prokvašeném pivu. V současné době se popisuje asi 100 rodů a více než 600 druhů kvasinek [11].

Kvasinky se morfologicky rozlišují podle tvaru a velikosti kvasničných buněk, způsobu rozmnožování a tvorby spor. Mezi rozdílné biochemické znaky patří zkvašování nebo

asimilace sacharidů, využívání dusíkatých složek, hydrolýza močoviny, štěpení lipidů, tvorba pigmentů apod. Rostou v širokém teplotním rozmezí a jsou také různě teplotně odolné [11].

Za cizí nebo divoké kvasinky se všeobecně považují kvasinky jiných rodů nebo druhů, než ke kterým náleží kulturní kvasinky. Širší termín kvasničné kontaminace označuje veškeré kvasničné buňky, které se negativně projevují v určitém místě výroby, např. i kulturní kvasinky ve filtrovaném pivu. Kromě toho mohou varečné kvasnice obsahovat kmeny kulturních kvasinek s nežádoucími technologickými vlastnostmi, nebo i jejich mutanty. Z nich jsou nejznámější tzv. respiračně deficitní mutanty s převahou fermentačního metabolismu. Tyto mutanty se většinou vyznačují vysokou sedimentační rychlostí a tvorbou diacetylu [11].

Růst cizích kvasinek v pivu silně ovlivňuje množství rozpuštěného kyslíku. Cizí kvasinky se liší poměrným zastoupením fermentačního a oxidačního metabolismu, na čemž se zakládají i některé metody jejich stanovení (Tab. 5) [11].

Tab. 5 Cizí kvasinky v pivovarnictví

Fermentační metabolismus		Oxidační metabolismus
<i>Saccharomyces</i>	<i>Bretanomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Saccharomycodes</i>	<i>Pichia</i>
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Debaryomyces</i>
	Speciální půdy (agar s krystalovou violetí, s CuSO ₄ , s monojodoctovou kyselinou, lysinový agar)	

Plísňe se pomnožují především ve sladařské výrobě, v pivě nemohou růst pro nedostatek kyslíku a vysoký obsah oxidu uhličitého. Kvasinky i bakterie se hojně vyskytují v surovinách, meziproduktech i výrobních zařízeních pivovarské výroby [11].

Bakterie náleží výhradně k prokaryotům. Jsou to jednobuněčné mikroorganismy s nediferencovaným jádrem. V pivovarství se uplatňují tyčinkovité a kokovité bakterie, pohyblivé i nepohyblivé, většinou nesporetné [11].

Z 35 skupin bakterií, vyskytujících se v přírodě, se v pivovarské výrobě nachází 7 skupin, zastoupených různými rody bakterií. Skupiny se charakterizují podle výsledků Gramova barvení, morfologie a nároků na kyslík (Tab. 6). Mezi ně patří octové bakterie (rody *Acetobacter*, *Gluconobacter*), mléčné bakterie (*Lactobacillus* a *Pediococcus*), tzv. mladinové bakterie (většinou z čeledi *Enterobacteriaceae*), dále rody *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinebacter*, *Pseudomonas*, a v zahraničních pivech také *Zymomonas*. Z čeledi *Enterobacteriaceae* se uvádějí rody *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Obesumbacterium* a zvláště druh *Enterobacter agglomerans* [11].

Tab. 6 Hlavní skupiny bakterií v pivovarnictví

Octové bakterie	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i>	G-, aerobní/mikroaerofilní tyčinky a koky
Mladinové bakterie – tyčinky	<i>Lactobacillus</i>	Fakultativně anaerobní G-tyčinky
Mléčné bakterie – koky	<i>Streptococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>	G+ koky
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus cristinae</i>	G+ koky
<i>Obesumbacterium</i>	<i>Obesumbacterium proteus</i>	Fakultativně anaerobní G-tyčinky
<i>Pectinatus</i>	<i>Pectinatus cerevisiphilus</i>	G- anaerobní přímé
<i>Megasphaera</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	Anaerobní G- koky
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus plantarum</i>	G+ tyčinky a koky, endospory
<i>Zymomonas</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	Fakultativně anaerobní G-tyčinky
<i>Acinebacter</i>	<i>Acinebacter</i> sp.	G- anaerobní/mikroaerofilní tyčinky a koky

Bakterie se zařazují podle biochemických, morfologických i fyziologických znaků a v poslední době také podle analýzy genomu. Je používán velmi jednoduchý klíč pro praktické použití v pivovarské laboratoři. Kromě taxonomického dělení se bakterie i kvasinky mohou dělit podle škodlivosti v pivovarské výrobě podle Backa (Tab. 7) [11].

Tab. 7 Hlavní skupiny mikroorganismů podle škodlivosti

mikroorganismus	specifikace	Rod, druh
I. Obligátně škodlivé	růst v pivu	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>
II. potencionálně škodlivé	růst v poškozeném pivu	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Zymomonas</i> , kulturní kvasinky
III. Nepřímo škodlivé	růst v meziproduktech	<i>Enterobacter</i> , <i>Pichia</i> , <i>Obesumbacterium</i>
IV. Indikátorové	růst na zbytcích substrátu	<i>Acetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Debaryomyces</i>
V. Latentní	přežívání ve výrobě	<i>Enterobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Clostridium</i>

2.1.12.2 Výskyt mikroorganismů různých fázích výroby

Při hodnocení významu a škodlivosti mikroorganismů v pivovarském provozu je nutné uvážit, že v průběhu výroby se výrazně mění vlastnosti jednotlivých meziproduktů. Slad přitom obsahuje velké množství plísní, bakterií i kvasinek, varní voda především bakterie, ačkoliv v nádržích na vodu a v potrubí se mohou vyskytovat i kvasinky. Při rmutování se mohou potlačovat nebo podporovat jednotlivé skupiny mikroorganismů v závislosti na jejich růstovém rozmezí teplot a pH, neboť se mění podmínky pro růst jednotlivých skupin mikroorganismů. Na konci rmutování přežívají především termorezistentní druhy mléčných bakterií a rodu *Bacillus*. Někteří zástupci tohoto rodu mohou silně redukovat dusičnany na dusitany a tím způsobovat tvorbu tzv. Netěkavých nitrosaminů. Sladina je tekutý živný substrát s vysokou koncentrací sacharidů, dusíkatých látek a růstových faktorů, takže se

v nich může pomnožovat většina přítomných mikroorganismů díky příznivému pH (okolo 5,0-5,5) i obsahu kyslíku, který se rovněž mění v širokých rozmezích. Podobné vlastnosti má i mladina, ačkoliv hořké látky mohou potlačovat růst mléčných bakterií nebo bakterií rodu *Bacillus*. V mladině se vyskytuje také velké množství kvasinek i mladinových bakterií, převážně z čeledi *Enterobacteriaceae*, které opět mohou redukovat dusičnany na dusitany a ochuzovat mladinu o kyslík a růstové faktory. Vznikající dusitany také mohou účinně inhibovat růst kulturních kvasinek. Kromě *Enterobacteriaceae* jsou zastoupeny rody *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* a samozřejmě také mléčné a octové bakterie [11].

O výskytu a pomnožování mikroorganismů v jednotlivých místech výroby rozhodují výsledné podmínky, postupně měněné činnostmi kulturních kvasinek. Po zakvašení kulturními kvasinkami rychle klesá obsah rozpuštěného kyslíku a hodnota pH, čímž se potlačuje rozvoj mladinových bakterií, ale preferují se mléčné bakterie, protože kvasnice vylučují do mladiny růstové faktory, zejména vitaminy, dusíkaté báze, aminokyseliny apod. Současně se mění spektrum aminokyselin také podle jejich specifického využívání kvasnicemi [11].

Stanovením mikrobiologické čistoty kvasnic se lze velmi dobře informovat o sanitačním stavu pivovaru. Mikrobiologickou čistotu kvasnic lze zvýšit tzv. kyselým praním kvasnic, někdy ovšem za cenu snížení jejich aktivity. V kvasnicích lze nalézt veškerou již dříve zmíněnou kontaminaci mladiny. Současně s poklesem rozpuštěného kyslíku se také mění spektrum cizích kvasnic od aerobních k fakultativně anaerobním druhům. V podstatě stejný trend se také projevuje při dokvašování piva [11].

Po separaci kvasnic filtrací se v pivu mohou rozmnožovat mikroaerofilní mléčné bakterie, cizí kvasinky, a při stáčení piva s velmi nízkým obsahem kyslíku (pod $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) také bakterie velmi obávaných rodů *Pectinatus* a *Megasphaera*. Mezi striktní anaeroby také patří kmeny rodu *Pediococcus* [11].

Na zbytcích nedostatečně odstraněného piva se v době přestávek ve stáčení pomnožuje většina bakterií a kvasinek, za přístupu vzduchu i octové bakterie i plísňe. Pasteraci a tepelné sterilizační zásahy mohou přežívat vysoce tepelně odolné kmeny mléčných bakterií i některých kvasinek [11].

2.1.12.3 Volné buňky a biofilmy

Při hodnocení významu mikroorganismů pivovarském provozu je nutné uvážit rozdíly mezi vlastnostmi volných buněk, vázaných na povrch jednotlivých zařízení. Mikroorganismy totiž často tvoří souvislé nebo přerušované tenké vrstvy mikroorganismů, tzv. biofilmy. Biofilmy se liší plošnou hustotou, metabolickou aktivitou a pevností vazby jednotlivých mikroorganismů. Z biofilmů se jednotlivé buňky uvolňují v míře, která závisí na složení okolního média, jeho fyzikálních vlastnostech, obsahu rozpuštěných plynů a hydrodynamických poměrech. Biofilmy se mohou postupně tvořit i z různých druhů mikroorganismů, kde zapouzdření (enkapsulace) aerobními nebo fakultativně anaerobními mikroorganismy může vytvořit podmínky pro růst striktních anaerobů [11].

Ve srovnání s volnými buňkami obsahují vázané mikroorganismy více rezervních sacharidů, více DNA a mají vyšší metabolickou aktivitu. Obvykle se také vyznačují mnohem vyšší tepelnou odolností i rezistencí vůči dezinfekčním prostředkům. V konečném důsledku mohou tvořit komplexy s vysráženými kaly, tříslóblíkovinými komplexy, hořkými látkami i nerozpustnými solemi [11].

Kromě biofilmů se kontaminující mikroorganismy nacházejí v pórech, mikrotrhlinách i v dutinách větších rozměrů, např. v kanálcích spojujících potrubí nádoby s měřícími čidly. Ve

všech případech se mikroorganismy při průtoku piva postupně strhávají do jeho proudu za současného doplňování jejich zbytků živným substrátem. Tyto celky tak vystupují jako kontinuální i dávkové zdroje kontaminace [11].

V důsledku popsáných mechanismů se ve stočeném pivu mohou mikroorganismy vyskytovat v různé koncentraci, která se pohybuje v rozmezí několika řádů od 10^{-5} až 10^3 mg.ml^{-1} . O jejich pomnožování pak rozhoduje rovnováha mezi sloučeninami podporující jejich růst (sacharidy, dusíkaté látky, růstové faktory), nebo i složkami růst potlačujícími (ethanol, hořké látky, oxid uhličitý). Vyšší pH všeobecně podporuje pomnožování pivovarských mikroorganismů, za kritickou hodnotu se obvykle považuje $\text{pH} = 4,5$ [11].

S klesajícím obsahem oxidu uhličitého vrůstá zejména obsah cizích kvasinek. Růst mléčných bakterií závisí zejména na obsahu hořkých látek a hodnotě pH, protože pouze nedisociované formy hořkých kyselin mají inhibiční účinky. Rezistence mléčných bakterií k těmto látkám je dědičná, rezistentní druhy jsou až o jeden koncentrační řád odolnější. Hořké látky mohou působit mikrobicidně i mikrobistaticky, jejich účinek souvisí s buněčným transportem iontů mezi buňkou a okolím [11].

Obsah rozpuštěného kyslíku má vliv podle druhu přítomných mikroorganismů v pivu. Vyšší obsah kyslíku podporuje růst cizích kvasinek (nad 1 mg.l^{-1}) nebo mikroaerofilních laktobacilů, ale i některých pediokoků ($0,1\text{--}1 \text{ mg.l}^{-1}$). Nízký obsah kyslíku (pod $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$) je nezbytný pro rozvoj striktních anaerobů (*Pectinatus*, *Megasphaera*, některé pediokoky) [11].

2.1.12.4 Růst mikroorganismů v pivu

Růst mikroorganismů v pivu, většinou uvolněných z pevných povrchů a dutin, v exponenciální fázi často sleduje kinetiku prvního řádu, tzn. že trvanlivost lineárně klesá s rostoucí hodnotou logaritmu počátečního počtu mikroorganismů. S každým snížením původní koncentrace mikroorganismů na desetinu vzroste trvanlivost o stálou hodnotu, zpravidla jen o několik dní. S teplotou klesá trvanlivost mnohem výrazněji, tj. exponenciálně [2].

Velmi nepříjemným důsledkem plnění piva do jednotlivých obalů je skutečnost, že i při poklesu koncentrace mikroorganismů pod 1 buňku/obal se nedosáhne technické sterility, ale pouze klesá pravděpodobnost výskytu narušených jednotek (láhev, sud), přičemž spotřebitel narušení pozná a reklamuje celou zásilku. Kromě mikroorganismů schopných růstu ve stočeném pivu je možné v něm prokázat i ostatní druhy, které se v něm nepomnožují a pouze přežívají [2].

2.2 Propagace čisté kultury pivovarských kvasinek

Při propagaci se vychází z čistých kultur, izolovaných a technologicky osvědčených kmenů požadovaných vlastností [2].

Zdrojem kvasinek může být provozní kvasící mladina ve stadiu bílých kroužků ve druhém nebo třetím nasazení nebo banka kvasničných kmenů [2].

2.2.1 Laboratorní propagace

Je první částí přípravy čisté kultury. Práce probíhá v laboratoři a začíná izolací jedné kvasničné buňky a jejím zaočkováním do sladiny nebo na pevnou živnou půdu, kde se vytvoří kolonie, následně přenesená do sladiny (objem sladiny je obvykle 5 ml). Obvykle třetí den, odpovídá stadiu bílých kroužků, se kvasícím médiem zakvašuje desetinásobný objem sladiny.

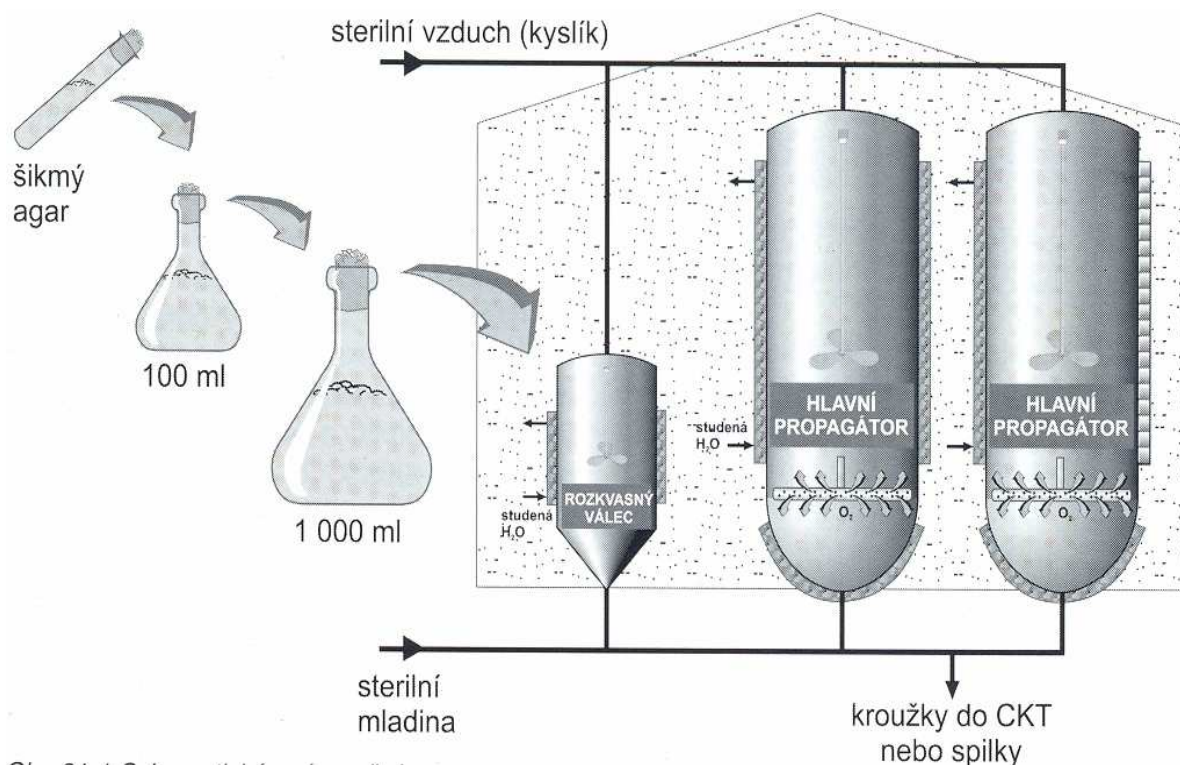
Tento krok se opakuje do té doby, až je získán potřebný objem kroužků pro další krok – provozní propagaci [2].

2.2.1.1 Provozní propagace

Cílem provozní propagace je za aseptických podmínek pomnožit laboratorní kulturu tak, aby získaný objem kroužků postačoval k zakvašení provozní výrobní šarže. Celý proces probíhá v propagátorech. Kvasnice se propagují v provozní mladině, která je nejprve sterilizována (30 minut při 100°C) [2].

Používají se dvě základní metody [2]:

- klasická propagace – využívá běžné postupy jako v provozních podmínkách, sterilizátor je koncipován jako separátní zařízení. Teplota kvašení kolísá mezi 12 – 16 °C, kultura bývá pomnožena v menší nádobě nebo v hlavním propagátoru (pomnožení probíhá v několika krocích), zakvašování poměr je obvykle 1 : 4 až 1 : 10, počet buněk v mladině zakvašené kroužky může být nižší než při zakvašování kvasnicemi
- aerobní propagace – základem je taktované nebo kontinuální vzdušnění s velmi intenzivním nárůstem biomasy. Při vyšších koncentracích kyslíku se mohou projevit jeho inhibiční účinky a zpomalí se nárůst biomasy. K zakvašení provozní mladiny se používají kroužky získané po 36 – 48 hodinách v poměru 1 : 20. Mladinou naplněná nádoba v propagační stanici se steriluje, chladí a zakvašuje laboratorní kulturou. Oddělená sterilace mladiny minimalizuje nebezpečí degenerace kvasnic a umožňuje doplnění v propagátorech zbytky kroužků

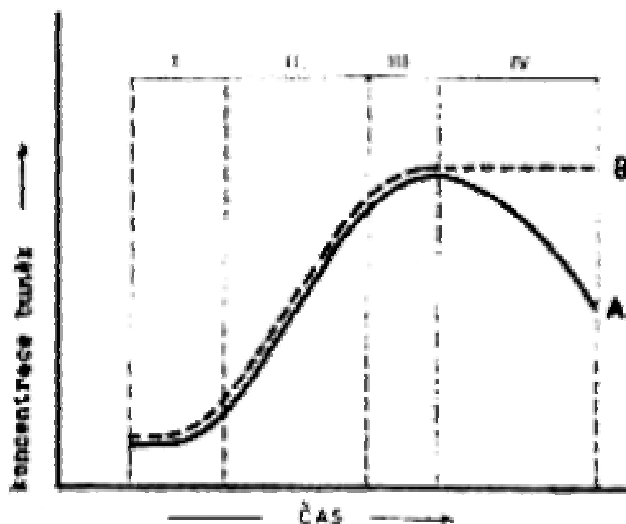


Obr. 8 Schematické znázornění propagace

2.3 Teorie kvašení

Při stacionárním kvašení, které je základem klasického postupu výroby piva ve spilkách, je přírůstek mikroorganismů nerovnoměrný.

Na Obr. 9 lze vidět jednotlivé úseky růstu [5].



Obr. 9 Růstová křivka kvasinek [5]

A – živé buňky, B – celkový počet buněk, I – lag fáze, II – exponenciální fáze, III – stacionární fáze, IV – fáze úhynu růstu

Lag – fáze neboli fáze zdržení růstu, zvyšuje se metabolická aktivita buněk, růst je nulový, velká spotřeba kyslíku, syntéza RNA

Exponenciální fáze – období největšího růstu

Stacionární fáze – snížení růstové rychlosti kvasinek, vyčerpání živin a tvorba metabolitů

Fáze úbytku růstu – zastavení množení s nárůstem počtu mrtvých buněk

Zkvašování cukrů probíhá v 11 stupních za účasti 16 základních enzymů alkoholového kvašení v následujícím pořadí: monosacharidy (transport do buněk), sacharosa (štěpena na glukosu a fruktosu pomocí enzymu invertasy), maltosa (nutnost syntézy přenašeče maltosopermeasy a dodání energie), maltotriosa [5].

Hlavním zdrojem zkvasitelných cukrů v mladině je maltosa, kvasinky mají proměnlivou schopnost ji zkvašovat [5].

2.3.1 Hlavní kvašení

Hlavní kvašení probíhá ve spilce. Budova, v níž je spilka umístěna, je tepelně izolovaná a chlazená a udržuje se v ní čistota [5].

Cílem hlavního kvašení je neúplné zkvašení cukernatých látek za tvorby ethanolu, oxidu uhličitého a v malé míře i vedlejších metabolitů (alifatické alkoholy, aldehydy, diketony, mastné kyseliny, estery) aerobním kvašením:



Všechny tyto látky a jejich vzájemný poměr spolu vytváří chuť a aroma piva. [7].

Během hlavního kvašení se uvolní teplo v hodnotě asi 558 kJ na 1 kg zkvašené glukosy a zvýší se teplota kvasící mladiny. Při 7 denním kvašení je specifická hodnota chladu 739 kJ na hl objemu kapaliny [5].

2.3.1.1 Faktory ovlivňující hlavní kvašení

- **Teplota kvašení** pro spodní kvasinky je optimální v rozmezí 5-9°C. Zvyšování teploty má za následek zvýšenou aktivitu kvasnic, zhoršení trvanlivosti pěny, barvy piva, prudší pokles pH, vyšší ztráty hořkých látek, větší autolýzu buněk a nižší akumulaci glykogenu v kvasničných buňkách. Zhoršení aroma a chuti piva při vyšších teplotách ve spilce není jednoznačné; tvorba α -acetolaktátu, diacetylu a acetaldehydu, které mají negativní dopad na organoleptické vlastnosti piva, se zvyšuje, ale současně probíhá při vyšších teplotách kvašení i intenzivněji jejich redukce [5].
- **Druh a dávka kvasnic** má rozhodující vliv na průběh kvašení i kvalitu piva. Běžně se dává 0,5 l hustých kvasnic na 1 hl mladiny (což v průměru odpovídá 15 milionům buněk v 1 ml) [5].
- **Složení mladiny** ovlivňuje růst kvasinek, průběh kvašení i kvalitu piva. Nemá obsahovat sloučeniny, které kvašení inhibují. Nevhodný je obsah dusitanů, dusičnanů, toxických kovů, kalících a viskózních látek. Průměrné složení mladiny je uvedeno v Tab. 8 [5].

Tab. 8 Průměrné složení mladiny

Maltosa	6,5 – 7,5 %
Dextriny	1,4 – 1,7 %
Rozpuštěný dusík	600 – 1000 mg.l ⁻¹
Polyfenoly	100 – 200 mg.l ⁻¹
Hořké látky	60 – 100 mg.l ⁻¹
Aminodusík	130 – 180 mg.l ⁻¹ (10% mladina)
	220 – 250 mg.l ⁻¹ (12% mladina)
Rozpuštěný kyslík	6 – 8 mg.l ⁻¹
Viskozita	1,6 – 1,9 mPa.s
pH	5,2 – 5,7

- **Minerální látky** mají různorodý význam. K, Mg, Zn jsou nutné pro funkci řady kvasničných enzymů (především kde je koenzym NAD a ATP). Zn je nepostradatelný pro pomnožení buněk i kvasný proces. Jeho nedostatek v mladině má za následek zpomalení a nedokonalé prokvašení. Mladina má většinou dostatek stopových prvků, deficit je sledován pouze u zinku (kolísající koncentrace ve sladech) [5].
- Inositol, biotin a kyselina pantotenová jsou důležité **vitaminy** pro růst kvasinek. Jejich obsah se snižuje v infikovaných mladinách [5].
- **Kaly** – jejich vyšší obsah (nad 12 mg sušiny ve 100 ml mladiny) způsobuje zpomalování kvašení, nižší prokvašení, popř. i předčasnou sedimentaci a zhoršenou výtěžnost kvasnic [5].
- **Nasycení zkvašované mladiny kyslíkem** je důležité především pro pomnožení kvasnic. Vyšší nasycení mladiny kyslíkem působí rychlý růst kvasinek, zrychlení

kvašení, vyšší tvorbu acetaldehydu, esterů, alkoholů, diacetylu, naopak jeho nedostatek zpomaluje kvašení, snižuje výtěžnost kvasnic a omezuje jejich normální činnost, působí tvorbu sirovodíku, dimethylsulfidu, volných mastných kyselin, oxidu siřičitého a nižší pH mladiny. Obsah kyslíku v mladině při zakvašení se pohybuje od 6 do 8 mg.l⁻¹. Po ukončení hlavního kvašení je zvýšený obsah kyslíku v pivu nežádoucí [5], [12].

Obsah sirných sloučenin, dextrinů, hořkých, polyfenolových a vysokomolekulárních dusíkatých látek v mladině má vliv na výsledné organoleptické vlastnosti piva [5].

2.3.1.2 Změny probíhající v mladině při hlavním kvašení

Dochází k poklesu původního pH, z 5,2-5,7 na 4,3-4,7. pH kvasničných buněk zůstává původní 6,0. Největší pokles pH souvisí v počátku kvašení s pomnožením buněk, kdy se uvolňují anorganické fosfáty a je absorbován amoniak a aminokyseliny. Práškovité kvasinky, a všeobecně vyšší dávka zákvasu, míchání a vyšší tlak působí rychlejší a hlubší pokles pH při kvašení [5].

Také dochází k poklesu **oxidoredukčního potenciálu** na hodnotu 8- 12 a v závěru kvašení stoupá na 17. Nízký oxidoredukční potenciál mladého piva se zajistí dostatečným nasycením mladiny kyslíkem, vysokou koncentrací zkvasitelných cukrů a aminokyselin v mladině, nasazením hlubokoprokvašujících kvasinek, zvýšeným podílem reduktorů v mladině [5].

Nízkomolekulární dusíkaté látky, jejich štěpy, jsou během kvašení absorbovány a využívány kvasinkami ke stavbě nových tkání, permeas a enzymů. Určitý podíl je jimi naopak vylučován. Absorpce aminokyselin mladiny kvasinkami není přímá. Z aminokyselin, jednoduchých cukrů a oxokyselin si kvasinky transaminačními reakcemi vytvářejí nové aminokyseliny, které v daném okamžiku potřebují k syntéze buněčného proteinu. Nedostatek určitých aminokyselin v mladině způsobuje zvýšenou tvorbu vyšších alkoholů a naopak jejich přebytek znamená zvýšenou tvorbu metabolitů [5].

Vysokomolekulární dusíkaté látky se během kvašení vylučují z roztoku vlivem snižování pH, adsorpcí na kvasinky a bublinky vznikajícího CO₂. jsou vynášeny k povrchu kvasící mladiny nebo strhávány sedimentujícími kvasnicemi [5].

Tvorba **vedlejších produktů** hlavního kvašení (tj. vyšších alkoholů, esterů, aldehydů, acetonu, diacetylu (Obr. 10) a sirných sloučenin) je ovlivněna složením mladiny, technologickými podmínkami (teplota, obsah rozpuštěného kyslíku v mladině), pohybem, dávkou a druhem kvasnic [5].

Vyšší alkoholy se tvoří především v počátcích kvašení, jejich vznik podporují vyšší teploty kvašení a nedostatek aminodusíku v mladině. **Estery** mají stejný vývoj tvorby jako vyšší alkoholy. Jejich množství stoupá při kvašení kalných mladin, s vysokým obsahem volných nenasycených mastných kyselin. Množství **aldehydů**, vznikajících zejména v počátcích kvašení, je tím větší, čím vyšší je dávka kvasnic, menší provzdušnění mladiny, vyšší zákvasná teplota a teplejší vedení. Vzniklý acetaldehyd v průběhu kvašení částečně vytěká, částečně je vymýván unikajícím CO₂, ale hlavně se redukuje na ethanol. **Vicinální diketony** – 2,3-pentadion a 2,3-butandion (diacetyl) mají nepříznivý vliv na chuť piva už při koncentracích 0,12- 0,15 mg.l⁻¹. Extracelulární tvorba diacetylu z 2-acetolaktátu je omezena při vyšší koncentraci valinu v mladině. Oxidační dekarboxylace 2-acetolaktátu na diacetyl už nezávisí na kmenu kvasnic, ale na teplotě a pH prostředí. Diacetyl je zpětně redukován enzymovou cestou na 2,3-butandiol v závislosti na kmenu a množství kvasnic a na teplotě. Klíčový význam má obsah 2-acetolaktátu, který během kvašení dosáhne maxima a v mladém pivu jeho obsah poklesne. Zvýšenou tvorbu diacetylu působí kontaminace pediokoky

(sarcina), nedostatek aminodusíku, pozdní provzdušnění po zakvašení a špatný fyziologický stav kvasnic. **Volné mastné kyseliny** (kyselina hexanová, oktanová, dekanová) se tvoří hlavně během prvních 4 dnů kvašení. Jejich vyšší tvorba způsobuje špatný fyziologický stav kvasnic, kalné mladiny a teplé dokvašování. Zvýšené množství kyselin způsobuje „kvasničnou příchuť“ a zhoršenou pěnivost piva. Ze **sírných sloučenin** vzniká během kvašení sirovodík, oxid siřičitý (jeho množství v pivu závisí na stupni provzdušnění mladiny, kmenu a dávce kvasnic), dimethylsulfid a methional (během kvašení klesá jejich koncentrace). Zvýšené hladiny sírných sloučenin jsou příčinou „letinkové chuti“ piva. **Organické těkavé kyseliny** (mravenčí, octová) vznikají odbouráváním glukosy, v pivu se vyskytují v závislosti na kmenu kvasnic a dávce, teplotě kvašení a stupni provzdušnění. Vznik **netěkavých kyselin** (pyruvátu, malátu, citrátu a laktátu) je dán deaminací aminokyselin a mají význam v tvorbě esterů. **Glycerol** se během kvašení tvoří ve velkém množství (1300-2000 mg.l⁻¹) v závislosti na obsahu zkvasitelných cukrů a míře jejich zkvašení. [5]

2.3.1.3 Technologie kvašení

2.3.1.3.1 Zakvašování a provzdušňování

Cílem je distribuce kvasinek do celého objemu zchlazené mladiny. Současně se zakvašováním se provádí i provzdušňování jehož cílem je zvýšení obsahu rozpuštěného kyslíku v mladině tak, aby byl optimálně nastartován metabolismus kvasinek [7].

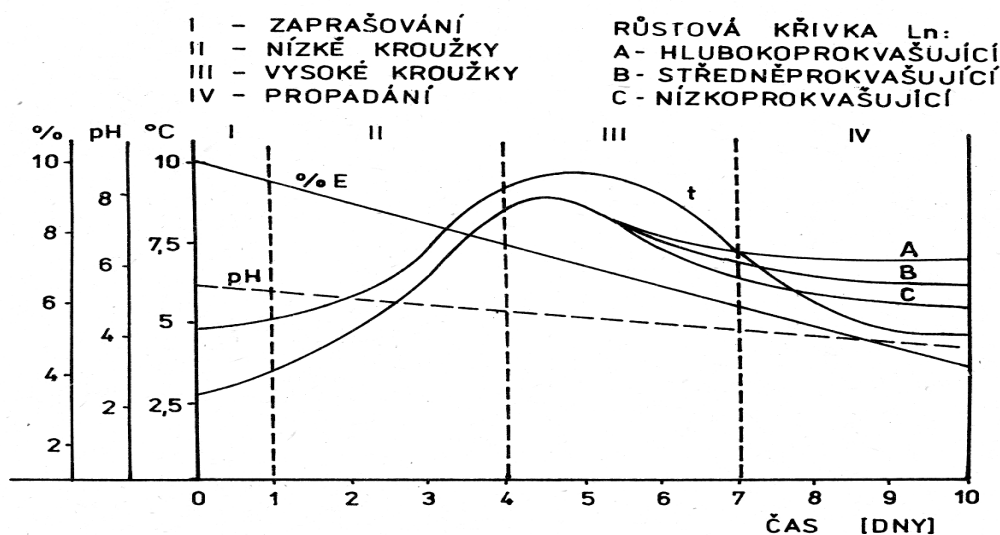
Mladina je zchlazena na průtokových chladičích na teplotu 6-9°C a transportována do kvasných kádí. Během transportu je provzdušňována. Zakvašuje se „na ujetu“. Malým množstvím (250 kg) násadních kvasnic se zakvasí malý objem mladiny. Po 12-24 hodinách, ve stadiu vysokých kroužků, je rozkvašená mladina smíchána v poměru cca 1:5 s provzdušněnou mladinou o stejné teplotě. [5], [6].

2.3.1.3.2 Stadia hlavního kvašení

- zaprašování a odrážení – na povrchu se tvoří pěna (díky unikajícímu), která je prouděním kvasící mladiny unášena od stěn kádě, mírně klesá hodnota pH, a extraktu, mírně stoupá teplota
- nízké bílé kroužky – začíná 24 až 36 hodin (doba maximálního vyvinu CO_2) po naplnění kádě, na povrchu kvasící mladiny se tvoří typické bílé růžice pěny, pH klesá z hodnoty 5,6 na 4,7 – 4,9, teplota stoupá o 0,5 – 0,8°C za 24 hodin.
- vysoké hnědé kroužky – tvoří se během 3 – 4 dne, barva kroužků postupně přechází dohněda, intenzita kvašení je maximální, do pěny jsou vnášeny mrtvé buňky kvasinek a kaly, intenzivní vývoj tepla = dosažení maximální teploty kvašení (8 -12°C), nutnost zchlazování (během hlavního kvašení se uvolní teplo v hodnotě asi 558 kJ na 1 kg zkvašené glukosy a zvýší se teplota kvasící mladiny. Při 7 denním kvašení je specifická hodnota chladu 739 kJ na hl objemu kapaliny)
- propadání deky – snižuje se intenzita kvašení, období maximální aglutinace a sedimentace kvasnic = snižuje se výška pěny na povrchu kádě, na konci tohoto stadia zůstává na povrchu mladiny nízka (2 – 3 cm) a tmavá vrstva pěny (= deka), obsahující vyloučené látky, kvasnice a kontaminanty, musí se včas sebrat

„Mladé“ pivo je připraveno k sudování. [5], [6]

Jednotlivá stadia hlavního kvašení jsou znázorněna na Obr. 11:

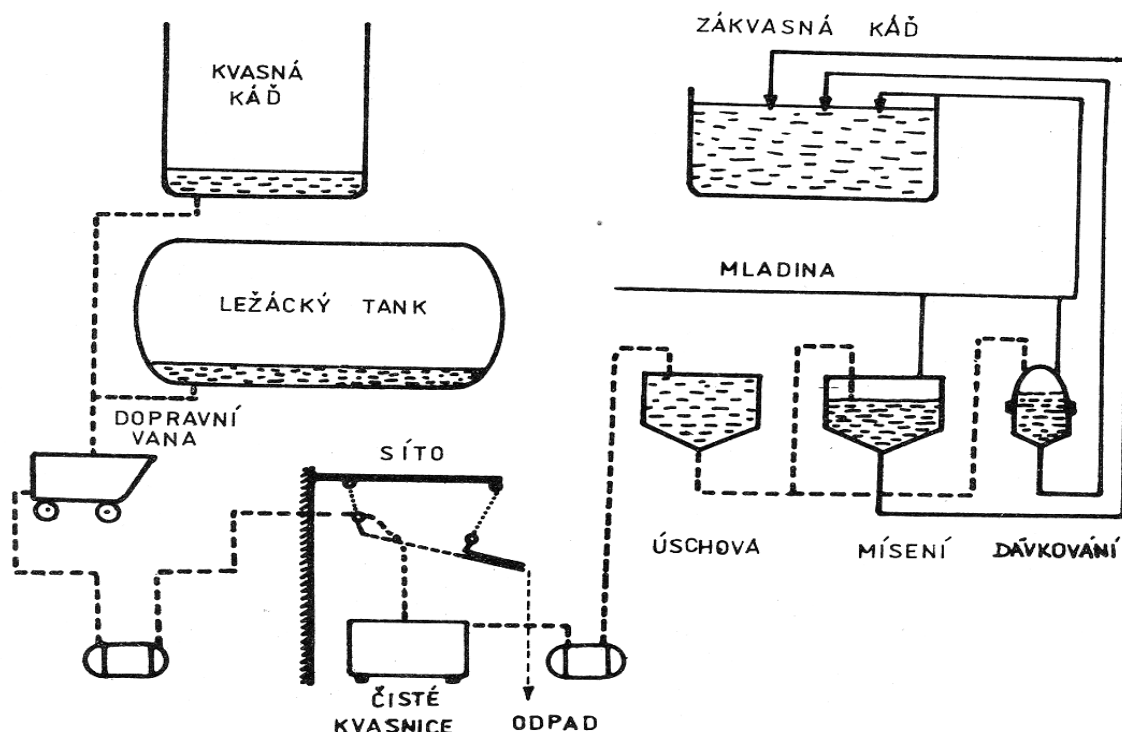


Obr. 11 Diagram hlavního kvašení [5]

2.3.1.3.3 Sedimentace a sběr kvasnic

Aglutinace a sedimentace kvasinek – shlukování a jejich usazování na dně kádě. Po vyprázdnění kádí zůstává na dně jejich sediment, který se skládá ze tří vrstev – špínka (spodní a horní vrstva, tmavší, obsahuje větší podíly nečistot a mrtvých kvasnic), jádro (prostřední a největší část, sbírá se a je použito k dalšímu zakvašení). Počet opětovného nasazení kvasnic se obvykle opakuje 5x. Větší počet nasazení zvyšuje riziko kontaminace a degenerace kvasnic [6].

Získané násadní kvasnice se sítují na vibračním sítu, properou se ledovou vodou a provede se mikrobiologická kontrola zaměřená na počet mrtvých buněk. V případě nutnosti snížení kontaminace se provede ještě kyselé praní kvasnic. Přebytečné odpadní kvasnice se většinou prodávají jako krmivo pro hospodářská zvířata. Schéma sbírání, čištění, ošetřování a nasazování kvasnic je zobrazeno na obr. 12 [6].



Obr. 12 Schéma sbírání, čištění, ošetřování a nasazování kvasnic [12]

2.3.1.4 Nepravidelnosti hlavního kvašení

Jedná se abnormální průběh kvašení způsobený špatnou kvalitou surovin, kvasnic nebo technologickými nedostatky. Může se projevovat atypickým vzhledem pěny, zápachem, pozdním startem kvašení nebo jeho zastavením. Příčiny jsou hlavně ve složení mladiny, kontaminaci, přítomnosti cizorodých látek, kolísání teploty, obsahu kyslíku, špatném objemu nebo stavu kvasnic a vysoké teplotě kvašení [5], [6]

Těmito nepravidelnostem je nutné předcházet důslednou kontrolou, výběrem surovin a dobře nastaveným technologickým postupem [6].

Pokud se nějaká závada objeví, lze ji odstranit zcukřením partie pomocí enzymů nebo novým zakvašením [6].

Mezi nepravidelnosti kvašení související s kvasinkami patří [5], [6]:

- poruchy sedimentace kvasinek, které souvisejí s jejich špatným fyziologickým stavem a se složením mladiny. Ke špatné sedimentaci dochází při nízkém obsahu α -aminodusíku, zinku, vápníku a iontů PO_4^{3-} nebo při vysokém obsahu kalů iontů železa a vápníku v mladině. Zároveň se zhoršuje jejich fyziologický stav a to hlavně při teplém skladování kvasnic a při dlouhém a intenzivním praní
- mutace kvasinek, při nichž můžeme pozorovat změny v chování kvasnic – sedimentace, předčasně ukončené kvašení nebo změny senzorických vlastností piva. Četnost mutací je podporována vysokou koncentrací mladiny, skladováním kvasnic při vyšších teplotách, vysokou koncentrací iontů železa a vápníku a přítomností kontaminace. V pivovarské praxi jsou známy tři typy mutací: ztráta flokulačních schopností (nebezpečné z hlediska odstředivky, protože zmutované buňky se neoddělí při sedimentaci), ztráta schopnosti zkvašovat maltotriosu a s tím spojená rychlejší sedimentace a ztráta schopnosti respirace (= dýchání, vedoucí ke zpomalení kvašení a vyšší produkci diacetylu a vyšších alkoholů)

2.3.2 Dokvašování a zrání piva

Cílem dokvašení a zrání piva je pomalé zkvašování sacharidů při nízkých teplotách s docílením nasycení a fixace oxidu uhličitého pivu, se současným zajištěním vyčeření a organoleptické zralosti piva. Probíhá v ležáckých tancích v ležáckých sklepech s dobrým větráním a stálou teplotou -2 až +3°C [6].

2.3.2.1.1 Technologie dokvašování a zrání

Z chemického hlediska je zrání piva odbouráváním chuti mladého piva.

Pozvolné zkvašování zbylého extraktu je v prvních třech dnech dokvašování rychlejší díky mírnému provzdušnění a zvednutí kvasnic během sudování (koncentrace zbylého extraktu se sníží na polovinu) [5], [6].

Velmi důležité při dokvašování je čiření, které ovlivňuje průběh filtrace, pěnivost a chuť piva a koloidní stabilitu. Kvasnice během čiření sedimentují a strhávají s sebou určitý podíl vysokomolekulárních polyfenolových a dusíkatých látek. Během dokvašování jejich počet klesá z počátečního obsahu $10 - 12 \cdot 10^6$ kvasničných buněk v 1 ml na $0,2 - 2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ [5,6].

Zrání chuti a vůně piva zajišťují mechanické a chemické změny. Mechanicky se absorbují vysokomolekulární bílkoviny na sedimentující kvasnice a, odstraňují se hořké látky. Dochází k poklesu obsahu SO_2 , merkaptanů, acetaldehydu, mastných kyselin, ke změnám složení a růstu obsahu senzoricky aktivních esterů. Další důležitou skupinou reakcí jsou interakce polyfenolů a bílkovin (odstraňuje se bílkovinná drsná hořkost piva) za vzniku nerozpustných komplexů. Nejprve je to chladový zákal (lze jej ještě rozpustit při zvýšení teploty na 20°C), který se postupným stárnutím přeměňuje na stabilnější formu trvalého zákalu [5,6].

Množství kvasnic má také vliv na dobu ležení piva. [5], [6].

2.3.2.1.2 Nepravidelnosti dokvašování

Během dokvašování by nemělo docházet ke kolísání teploty a nedostatečnému vzestupu hradíčního tlaku (výsledkem jsou piva příliš prokvašená ve spilce, s malým podílem zbytkového extraktu a s nízkým obsahem kvasničných buněk). V opačném případě se může uvolňovat rozpuštěný CO_2 , a tím se zvedá kal ze dna nádob a čiření je narušeno (při rychlém vzestupu tlaku) [5], [6].

Po vyprázdnění zůstanou na dně ležáckých nádob stažky a stažkové kvasnice. Stažky se lisují a stažkové pivo se míchá po filtraci se stáčeným pivem. Vysoký obsah nečistot a špatný fyziologický stav zařazuje stažkové kvasnice do kategorie odpadů [5], [6].

2.4 Přehled metod používaných pro kontrolu vlastností kvasnic

Metody kontrolující vlastnosti kvasnic jsou zaměřeny do tří oblastí:

2.4.1 Měření viability kvasnic

Zjišťuje se reprodukční schopnost kvasnic. Existují dvě modifikace této metody, klasická plotnová metoda a mikroskopická metoda s pozorováním tvorby mikrokolonií. Pro příliš dlouhou dobu stanovení se v kontrolní praxi tyto metody používají jen zřídka [5], [6].

2.4.2 Měření vitality kvasnic

Kontroluje se fyziologický stav kvasnic. K jeho kontrole se využívají následující postupy:

2.4.2.1 Mikroskopické metody

Kontrolují počet mrtvých buněk, tvar a velikost vakuol [3], [6].

2.4.2.1.1 Barvení buněk s pozorováním ve viditelné oblasti

Přes častou kritiku klasické barvicí metody s methylenovou modří patří tato metoda mezi všeobecně používané oblíbené postupy. Existují četné varianty metody slibující lepší reprodukovatelnost, přesnější výsledky, nebo dokonalejší rozlišení aktivních i inaktivních buněk, čehož se zpravidla dosahuje přidáním dalších látek, barviv, nebo podmínek barvení. Novou variantu představuje náhrada methylenové modří methylenovou violetí. Z ostatních metod se uvádí barvení s Ponceau červení, barvení methylenovou modří se safraninem O, nebo s basickým fuchsinem [3], [6].

2.4.2.1.2 Fluorescenční barvení

Fluorescenční barvení využívá enzymové aktivity kvasnic k rozštěpení barviva, čímž se uvolní složka, fluoreskující ve světle s vhodnou vlnovou délkou (většinou v UV oblasti), nebo vazby fluorescenčního barviva na buněčné struktury, o čemž opět často rozhoduje prostupnost buněčné stěny. Do první skupiny patří barviva jako diacetát fluoresceinu a karboxyfluoresceinu, druhou skupinu zastupují barviva jako anilinová modř, akridinová oranž, bromkresolový purpur, nebo zeleň, calcofluor, Fungolight, oxonol, primulin, propidium jodid, isothiokyanát fluoresceinu hořečnatá sůl kyseliny 1-anilin-8-naftalensulfonové, rhodamin B, rhodamin 123, erthrosin B, eosin Y a viablue [3], [6].

Tyto techniky vyžadují drahý fluorescenční mikroskop. Ještě dražší je automatický průtokový cytometr, umožňující měřit rozdělení buněk podle zbarvení jejich jednotlivých částí a rozptylu světla v různých úhlech [3], [6].

2.4.2.2 Metabolické testy

Metabolické testy se používají k měření fyziologických procesů kvasnic. Mezi nejčastěji používané metody patří měření spotřeby rozpuštěného kyslíku v nejrůznějších modifikacích, měření vývinu oxidu uhličitého za konstantního tlaku nebo objemu, podle změn hmotnosti, nebo hodnot derivace těchto veličin. Rychlý start kvašení lze stanovit deflokulačním testem. Nejpresnější, ale také nejzdlouhavější metody se zakládají na modelování hlavního kvašení a

sledování průběhu kvasné, růstové a sedimentační křivky kvasnic v otevřených, nebo uzavřených kvasných válcích. Dále sem patří acidifikační test, což je reakce po rozmíchání v glukosovém roztoku [3], [6].

2.4.2.2.1 Stanovení rozpuštěného kyslíku v mladině

Kyslík má rozdílný význam v jednotlivých fázích výroby piva (oddíly 2.1.8.3, 2.3.1.1). V průběhu výroby mladiny podporuje vylučování hrubých kalů, tj. vysrážení komplexů polypeptidů a polyfenolů, což přispívá k jejímu vyčištění a tím ke zvýšení přirozené koloidní stability mladiny a piva. Ve spílané mladině se požaduje 6-8 mg/l rozpuštěného kyslíku k zajištění růstu kvasinek [12].

Ke stanovení rozpuštěného kyslíku se používají metody kolorimetrická, polarografická, elektrochemická a stanovení plynovou chromatografií [12].

2.4.2.3 Zjišťování složení buněk

2.4.2.3.1 Měření aktivity kvasničných enzymů

Kromě aktivity esterasy v mikroskopickém (odst.8.4) i makroskopickém provedení se měří aktivity proteas, jejichž vysoké hodnoty svědčí o počínající autolýze kvasnic. Důležité je měření redukční aktivity kvasnic na základě měření schopnosti redukovat diacetyl, furfural, nebo tetrazoliové soli. S aktivitou kvasničných enzymů také souvisí vylučování hořčnatých iontů z buňky [3], [6].

2.4.2.3.2 Měření obsahu charakteristických sloučenin

V kvasnicích se obvykle stanovuje obsah glykogenu nebo trehalosy, přičemž se používají enzymové testy, infračervená spektroskopie, nebo selektivní barvení s číslicovým zpracováním obrazu. Dále se různými analytickými metodami hodnotí obsah lipidů, sterolů a nenasycených mastných kyselin. Relativně snadné měření obsahu ATP bioluminiscenčními metodami umožňuje usuzovat na aktivitu kvasnic, podobně jako při fluorimetrickém měření obsahu NADH, popř. poměru NAD/NADH [3], [6].

2.4.2.3.3 Měření hodnot pH vně i uvnitř buněk

Měření změn pH vnějšího prostředí po přidavku kvasnic do roztoku zkvasitelných cukrů jako míru aktivity kvasnic navrhli původně čeští autoři Opekarová a Sigler. Prosté měření pH v husté suspensi sebraných kvasnic vypovídá o vhodnosti kvasnic pro opětovné nasazení. Intracelulární pH (ICP) je měřením aktivity vylučování vodíkových iontů z buňky (tzv. H^+ pumpa). Test využívá fluorescenčního barviva esterifikovaného 5 nebo 6 karboxyfluoresceinu a vztahu mezi vnitřní hodnotou pH a fluorescencí barviva. Cytoplasmatické pH se také může měřit podle obsahu ^{31}P metodou NMR. [3], [6].

Hranice mezi oběma skupinami metod (mezi metodami pro kontrolu viability a vitality) není ostrá, protože např. barvicí metody, používané pro hodnocení vitality se spojují často i s aktivitou kvasničných enzymů a naopak buňky, neschopné reprodukce mohou vykazovat kvasnou aktivitu. [3].

2.4.3 Zjišťování technologických vlastností

Při určování technologických vlastností se využívají [6]:

- modelové kvasné zkoušky kontrolující rychlost kvašení, sedimentaci, pomnožování a senzorický profil piva
- statická kontrola výrobního procesu.

2.4.3.1 Stanovení hrubých a jemných kalů

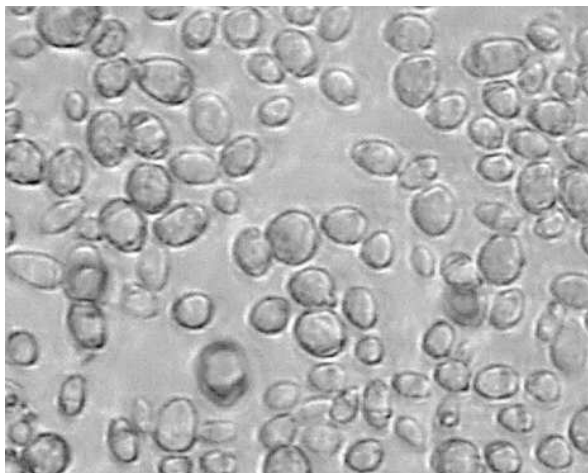
Odstranění a následná kontrola hrubých a jemných kalů (oddíl 2.1.9.9) je důležité v zájmu zajištění dobrého průběhu kvašení [12].

Vhodný výběr metod pro kontrolu vlastností kvasnic je nutné doplnit kontrolou kvality mladiny a sledováním kontaminace (oddíl 2.1.12.) [6].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Mikroorganismy

Spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum*, produkční kmen č. 7 (více viz. oddíl 2.1.3.4). Vzorky kvasinek se odebírají z mladiny kvasící ve spilce, ze dvou kvasných kádí, L5 a L6. Odebírají se v průběhu kvašení, po dokončení kvašení a tento proces nasazení se opakuje 4x.



Obr. 13 *Saccharomyces cerevisiae*

3.2 Metody používané pro kontrolu vlastností kvasnic

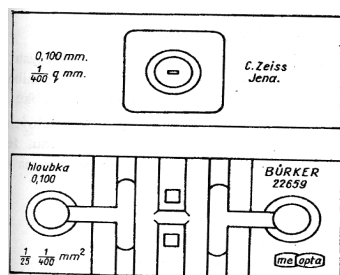
Kvasné zkoušky se provádí pomocí běžných metod pivovarsko-sladařské analytiky a mikrobiologie [13].

3.2.1 Přímá metoda stanovení počtu buněk

Princip:

Stanovuje se celkový počet buněk v jednotce objemu (nejčastěji 1 ml). Metoda je založena na počítání jednotlivých buněk v Bürknerově komůrce pomocí mikroskopu.

Bürknerova komůrka je masivní podložní sklíčko rozdělené dvěma rýhami na tři části. Ve střední části, jež je nižší o 1/10 mm než obě postranní, jsou vyryté dvě mřížky, které po přikrytí krycím sklíčkem tvoří komůrku o přesné hloubce. Celá mřížka je rozdělena na 25 menších čtverečků, které jsou dále děleny na 16 čtverečků. Rozměry jednotlivých čtverečků jsou $1/25 \text{ mm}^2$, $1/100 \text{ mm}^2$, $1/400 \text{ mm}^2$. Při hloubce komůrky 0,1 mm je objem nad každým čtverečkem $1/250 \text{ mm}^3$, $1/1000 \text{ mm}^3$, $1/4000 \text{ mm}^3$. Po obou stranách vybroušených políček jsou kanálky, kam odtéká přebytečná kapalina [8].



Obr. 14 Bürknerova komůrka [8]

Přístroje a pomůcky:

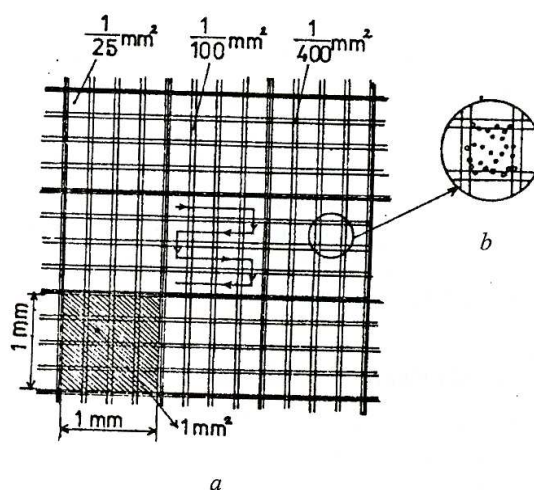
Bürknerova komůrka (Obr. 14), sterilní pipety , mikroskop PZO Warszawa (mains supply ZM50), kádinky

Chemikálie a roztoky:

Destilovaná voda

Pracovní postup:

Nabere se vzorek kvasící mladiny a vzorek pro počítání buněk se naředí v poměru 1 ml extraktu : 9 ml vody. Do středu Bürknerovy komůrky se pipetou nanese kapka této suspenze a překryje se krycím sklíčkem, tak aby nevznikly vzduchové bubliny. Buňky se počítají po několika minutách, až jsou tzv. usazené. Počítací komůrka se suspenzí kvasinek se dá na stolek mikroskopu a při vhodném zvětšení se počítají buňky. Postup počítání buněk je znázorněn na obr. 15 [8].



Obr. 15 Detail Bürknerovy komůrky:

a) Počítací síť komůrky, šipky označují směr počítání. b) Vzorový přepočet buněk – detail [8]

Při počítání buněk v jednotlivých komůrkách je nutné dodržovat následující pravidla: buňky dotýkající se nebo ležící na hraničních čarách čtverců (obdélníků) se počítají tehdy, pokud jde o horní nebo pravou stranu čtverců (obdélníků), zatímco buňky, které leží nebo se dotýkají dolní nebo levé strany se nepočítají. Buňka se však nepočítá, pokud leží na horní straně nebo současně se dotýká levé hraniční čáry. Stejně tak se nepočítá buňka, která leží na pravé hraniční čáře, ale současně se dotýká levé strany [8].

Výpočet a vyhodnocení:

Celkový počet buněk X v 1 ml buněčné suspenze počítaných v P nejmenších čtverečích Bürknerovi komůrky s objemem $1/2500 \text{ mm}^3$ se pak určí podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot z \cdot 2500 \cdot 1000}{P} \quad (2)$$

kde c je celkový počet buněk v počítaných políčkách, z je faktor ředění a P je počet políček [8].

Touto metodou lze zjistit růstovou křivku kvasinek a vykreslit celkový průběh kvašení [8].

3.2.2 Vitální barvení

Princip:

Vitálním barvením rozumíme barvení živých buněk za účelem zjištění jejich fyziologického stavu. Tímto testem lze dokázat přítomnost glykogenu, bílkovin, tuku a volutinu [8].

Vitální test se užívá k určení počtu buněk schopných rozmnožování. Používá se Bürknerova komůrka. Tímto testem se stanoví počet mrtvých buněk přímo [8].

Vitální test je založen na tom, že v živých buňkách prostřednictvím redukujících enzymů (reduktáz) se methylenová modř promění na nebarevnou leukoformu. Mrtvým buňkách chybí reduktázová aktivita a proto se zbarví do modra. Používá se 0,01% roztok methylenové modři [8].

Vitální test se provádí u kvasnic po dokončení kvašení a to: před jejich vypráním, po vyprání a také u odpadních kvasnic.

Přístroje a pomůcky:

Podložní a krycí sklíčko, pinzeta, mikroskop PZO Warszawa (mains supply ZM50), Pasteurova pipeta, filtrační papír

Chemikálie a roztoky:

0,01% roztok methylenové modři, destilovaná voda

Pracovní postup:

Odeberou se jednotlivé vzorky kvasničné suspenze před vypráním, po vyprání a odpadních kvasnic a vhodně se naředí vodou (tak aby v jednotlivých čtverečcích Bürknerovy komůrky nebylo moc buněk 8 – 12). Jednotlivé suspenze kvasničných buněk se obarví 0,01% roztokem methylenové modři a nakape se na Bürknerovu komůrku, překryje se krycím sklíčkem, tak aby nevznikly vzduchové bubliny. Buňky se počítají po několika minutách, až jsou tzv. usazené. Počítací komůrka se suspenzí kvasinek se dá na stolek mikroskopu a při vhodném zvětšení se počítají buňky [8].

Výpočet a vyhodnocení:

Počítají se mrtvé (modře zbarvené) i živé (bezbarvé) buňky v jednotlivých políčkách Bürknerovy komůrky a vypočítá se procentuální obsah mrtvých buněk, který by neměl překročit 5% [8].

3.2.3 Stanovení rozpuštěného kyslíku v mladině

Ke stanovení rozpuštěného kyslíku se osvědčila elektrochemická metoda.

Princip:

Tato metoda je založena na redukci molekul kyslíku, které přecházejí difúzí z měřeného média na katodicky polarizovanou elektrodu. Na elektrodě za stálého polarizačního napětí reagují s vodou nebo s vodíkovými ionty podle sumárních rovnic [12]:



Vznikající proud je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku. Je-li známa maximální rozpustnost kyslíku v měřené kapalině při dané teplotě, lze přímo určit koncentraci kyslíku. K měření se používají pevné elektrody, jež mají většinou stříbrnou a zlatou katodu. Elektroda s elektrolytem, který je necitlivý k oxidu uhličitému, je oddělena od měřeného prostředí tenkou membránou. Krycí membrána je propustná pouze pro plyny. Protože elektroda a elektrolyt jsou odděleny od měřeného roztoku, není soustava citlivá na změny jeho složení (nemohou se vylučovat na katodě inaktivující povlaky) a lze tedy s ní dlouhodobě měřit [12].

Přístroje a zařízení:

Orbisphere laboratoriem model 26073

Pracovní postup:

Přístroj je umístěn přímo na potrubí kterým je ochlazená mladina transportována do kvasných kádí. Přístroj se kalibruje teplotě blízké spílací teplotě. Z displeje přístroje se odečítají naměřené hodnoty.

Výpočet a vyhodnocení:

Výsledky se uvádějí v mg/l [12].

Běžné hodnoty:

Provozdušněná mladiny před zakvašením má obsahovat 6-8 mg O₂/l [12].

3.2.4 Stanovení kalů

3.2.4.1 Stanovení hrubých kalů

Princip:

Vzorek mladiny odebraný přesně v době ukončení chmelovaru se přelije přes síto, aby se odstranilo chmelové mláto. Potom se rozdělí na dvě části, jedna se okamžitě přefiltruje přes filtrační papír a filtrát se použije k analýze, druhá nefiltrovaná část se uzavře v Erlenmeyerově baňce a po ochlazení se použije k analýze. Podstatou analýzy je filtrace vzorku přes filtrační kelímek, ve kterém je vrstva křemeliny. Po vymytí zbytků extraktu z vrstvy křemeliny destilovanou vodou se kelímek vysuší do konstantní hmotnosti a množství kalů se vyjádří jako sušina [12].

Přístroje a pomůcky:

Sušárna, filtrační kelímky, vývěva, Büchnerova nálevka, filtrační papír

Chemikálie a roztoky:

- hrubá křemelina, která se před použitím propere ve zředěné kyselině chlorovodíkové, přefiltruje se přes Büchnerovu nálevku a promyje se destilovanou vodou až do zmizení reakce na Cl⁻. Potom se křemelina usuší při teplotě 105°C. Takto upravená křemelina se používá ke stanovení hrubých i jemných kalů [12].

- zředěná kyselina chlorovodíková o koncentraci 2 mol/l

Pracovní postup:

Asi 400 ml odebrané mladiny v době ukončení v chmelovaru se přelije přes síto (odstranění chmelového mláta) a rozdělí se na dvě části. Jedna se ihned za horka zfiltruje

(teplota nesmí klesnout pod 85°C) a filtrát se uschová. Druhá nefiltrovaná část se uzavře v baňce. Oba vzorky se temperují na teplotu 20°C a do Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml se nepipetuje po důkladném promíchání 20 ml nefiltrované mladiny a 25 ml filtrátu. Před vlastní analýzou se do filtračních kelímků přidá lžička upravené křemeliny a kelímky se vloží do sušárny (105°C) na 3 hodiny. Po této době se nechají vychladnout v exsikátoru a potom se zváží na analytických vahách. Zvážený kelímek se nasadí na odsávačku, vrstva křemeliny se opatrně přelije menším množstvím destilované vody a potom se zapne sací čerpadlo. Odměřený vzorek v baňce se kvantitativně přefiltruje přes vrstvu křemeliny v kelímku, vrstva křemeliny se potom promyje třikrát 10 ml destilované vody a kelímek se po vysušení při teplotě 105°C (3 hodiny) a zchlazení v exsikátoru zváží na analytických vahách. Každý vzorek se analyzuje dvojmo [12].

Výpočet a vyhodnocení:

Obsah hrubých kalů se vypočte podle vztahu [12] :

$$K_h = [(m_1 - m_2) \cdot 50 \cdot 10^3] - [(w_1 - w_2) \cdot 40 \cdot 10^3] \quad (5)$$

kde K_h je množství sušiny hrubých kalů (mg/l)

m_1 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou a sušinou, získanou z nefiltrované mladiny (g)

m_2 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou, použitého pro nefiltrovanou mladinu (g)

w_1 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou a sušinou, získanou z filtrátu mladiny (g)

w_2 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou, použitého pro filtrovanou mladinu (g)

Běžné hodnoty:

Obsah hrubých kalů kolísá v rozmezí 400 – 1000 mg sušiny v litru sladiny. Toto množství odpovídá 200 – 500 g mokrých kalů v hektolitru mladiny [12].

3.2.4.2 Stanovení jemných kalů

Princip:

Mladina odebraná v době ukončení chmelovaru se za horka přefiltruje a ve filtrátu po zchlazení na teplotu 2°C se zjistí množství kalů filtrací přes vrstvu křemeliny. Po vymytí extraktu se kelímek vysuší do konstantní hmotnosti a zváží se [12].

Přístroje a pomůcky:

viz. oddíl 4.2.4.1.

Chemikálie a roztoky:

viz. oddíl 4.2.4.1.

Pracovní postup:

Vzorek odebraný v době ukončení chmelovaru (asi 200 ml) se ihned přefiltruje přes papírový filtr a filtrát se vytemperuje na teplotu 20°C. Potom se do Erlenmeyerovy baňky o objemu 50 ml odpipetuje 25 ml dobře promíchaného vzorku, baňka se uzavře hliníkovou fólií a uloží se přes noc do chladničky při teplotě 2°C. Současně se v chladničce temperuje destilovaná voda k promývání a zvážený filtrační kelímek s křemelinou. Po této době se kelímek nasadí na odsávačku, vrstva křemeliny se opatrně přelije malým množstvím ledové destilované vody, zapne se sací čerpadlo a vzorek se rychle kvantitativně přefiltruje přes

kelímek. Zbytky extraktu se vymyjí ledovou destilovanou vodou a kelímek se potom vloží do sušárny na 3 hodiny při teplotě 105°C. Kelímek vysušený do konstantní hmotnosti se nechá zchladnout v exsikátoru a zváží se na analytických vahách. Každý vzorek se analyzuje dvakrát [12].

Z provozního hlediska je důležité znát obsah kalů, které přecházejí při spílání do spilky. Mladina se proto odebírá až za deskovým chladičem [12].

Výpočet a vyhodnocení:

Obsah jemných kalů se vypočte podle vztahu [12]:

$$K_j = (u_1 - u_2) \cdot 40 \cdot 10^3 \quad (6)$$

kde K_j je množství jemných kalů (mg/l)

u_1 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou a sušinou jemných kalů (g)

u_2 – hmotnost filtračního kelímku s křemelinou (g)

Běžné hodnoty:

Obsah jemných kalů je závislý na teplotě spílání mladiny. Při dobrém odstranění hrubých kalů bývá v litru mladiny 60-180 mg sušiny jemných kalů. Vyžaduje se co nejnížší obsah jemných kalů v mladině, proto se obvykle filtruje celá várka, nebo pouze určitá část [12].

3.2.5 Měření hodnot pH vně buňky

Hodnota pH má vliv při rmutování na enzymové procesy, především na štěpení vysokomolekulárních látek, dále na rozpustnost dusíkatých látek a hořkých látek chmelovaru a na intenzitu přibarvení vysrážené mladiny. Mezi hodnotou pH mladiny a příslušného piva jsou určité závislosti. U mladin s vyššími hodnotami pH obtížněji koagulují při varu vysokomolekulární dusíkaté látky a piva jsou náchylná k tvorbě koloidních zákalů. [12].

Princip:

Měření pH skleněnou elektrodou využívá vlastností skleněné membrány, na které se vytváří potenciál, jehož velikost závisí na koncentraci vodíkových iontů v roztoku. Potenciál skleněné elektrody se měří proti referenční kalomelové elektrodě. [13].

Přístroje a pomůcky:

pH metr ION LAB 750 series Merci

Pracovní postup:

Před použitím se elektroda i přístroj kalibrují. Elektroda se před měřením opláchne zkoušenou mladinou a ponoří se do promíchaného vzorku mladiny. Hodnota pH se odečítá po jejím ustálení. pH se měří ihned po odebrání vzorku [13].

Výpočet a vyhodnocení:

Výsledky se udávají s přesností na 0,1 – 0,05 pH (dle typu přístroje) [13].

3.2.6 Měření teploty v průběhu kvašení

Princip:

Teplota se měří běžným laboratorním rtuťovým teploměrem [13].

Přístroje a pomůcky:

Teploměr dělený po 0,2 °C, s rozsahem stupnice 0 –100°C .

Pracovní postup:

Teplota se měří současně při odběru vzorku kvasící mladiny. Teploměr se přímo ponoří pod hladinu kvasící mladiny (do kvasné kádě). Teplota se zaznamená po ustálení rtuťového sloupce teploměru. Měření se provádí 2x denně [13].

Výpočet a vyhodnocení:

Výsledky se vyjadřují ve °C [12].

3.2.7 Měření stupně prokvašení

Stupeň prokvašení vyjadřuje v procentech úbytek původního zkvasitelného extraktu mladiny. Jeho hodnota je závislá na obsahu zkvasitelných sacharidů a na podmínkách při kvašení a dokvašování. Rozlišuje se proto zdánlivé prokvašení a zdánlivé dosažitelné prokvašení. V praxi stupeň prokvašení mladého nebo stočeného piva téměř nikdy nedosahuje hodnoty dosažitelného stupně prokvašení [13].

Princip:

Mladina se zakvasí pivovarskými kvasinkami a nechá se prokvasit . V procentech se vyjádří rozdíl mezi extraktem mladiny a extraktem po prokvašení [13].

Přístroje a pomůcky:

AlkolyzerPlus DMA4500 Anton PAAR, třepačka GFL 3018, 1l sběrná plastová láhev, filtrační nálevka, filtrační papír

Chemikálie a roztoky:

Křemelina

Pracovní postup:

Odebraný vzorek prokvašeného extraktu se dá na třepačku, nechá se po dobu 30 minut vytřepat, aby se zbavil oxidu uhličitého. Takto vytřepaný extrakt se zfiltruje přes křemelinový filtr a filtrát se nechá se analyzovat pomocí přístroje Alkolyzer [13].

Výpočet a vyhodnocení:

Stupeň prokvašení daného vzorku se pak odečte z výsledků vyhodnocených pomocí použitého přístroje. Výsledky se udávají v % [13].

Běžné hodnoty:

V průběhu kvasného procesu se rozdíl mezi oběma hodnotami zmenšuje a při výstupu piva by neměl být větší než 5 % [13].

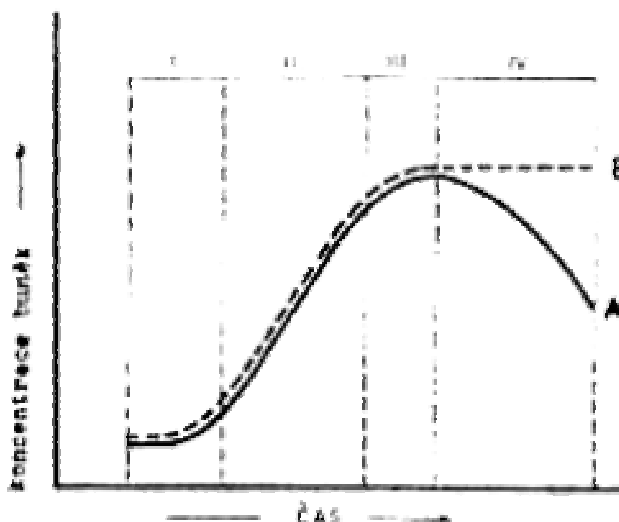
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem studia bylo ověřit některé vlastnosti pivovarských kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* patřících k produkčnímu kmenu č. 7 při opakovaném nasazování. Tento kmen je podle provozních zkušeností a laboratorních testů zařazen do II. kvasné skupiny, tj. středně prokvašující (více viz. oddíl 2.1.3.4.) [2]. Tento kmen je v litovelském pivovaru léty prověřený a osvědčený pro výrobu zdejšího piva.

V práci jsme se zaměřili na hodnocení růstu kvasinek a posouzení jejich fyziologického stavu, dále jsme sledovali pokles pH a stupně prokvašení mladiny, kontrolovali jsme teplotu a zkoumali i vliv kalů a rozpuštěného kyslíku na průběh hlavního kvašení.

4.1 Hodnocení průběhu růstu

Růst kvasničné kultury je přírůstkem velikosti jednotlivých buněk a přírůstkem počtu buněk vzniklých rozmnožováním (přímá metoda stanovení počtu buněk viz. oddíl 4.2.1.). Objem buněk se zvětšuje tak, že rychleji narůstají do délky než do šířky. Po dosažení určitých rozměrů začínají pučet. Když doroste pupen na takový rozměr jako má mateřská buňka, oddělí se od ní. Cyklus se potom opakuje. Pokud budeme vycházet z představy, že z jedné buňky kvasinek vzniknou dvě, ze dvou čtyři, atd., vzniká model geometrického, popř. exponenciálního průběhu růstu populace. (viz Obr. 16)

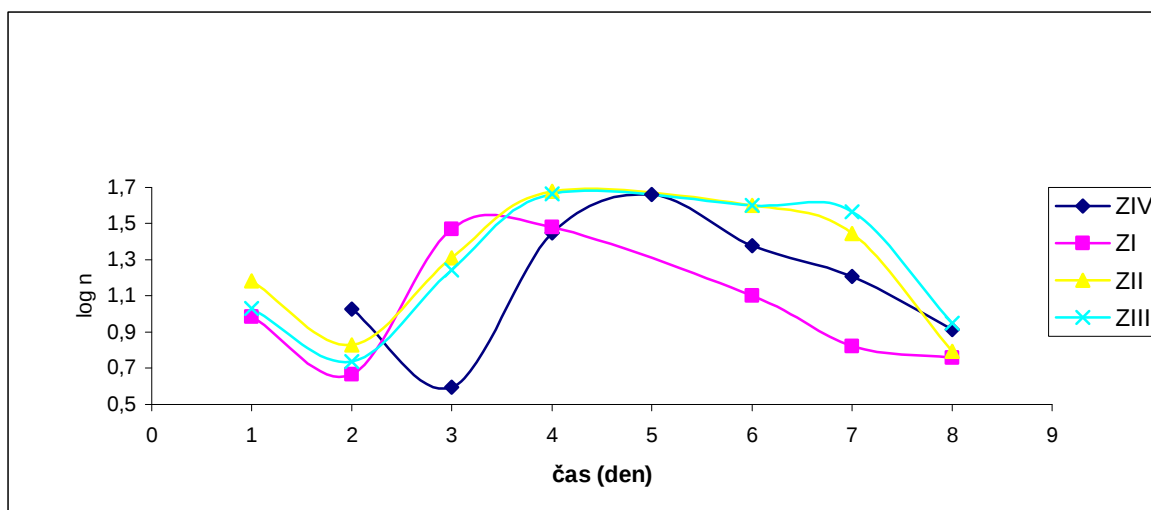


Obr. 16 Růstová křivka kvasinek [5]

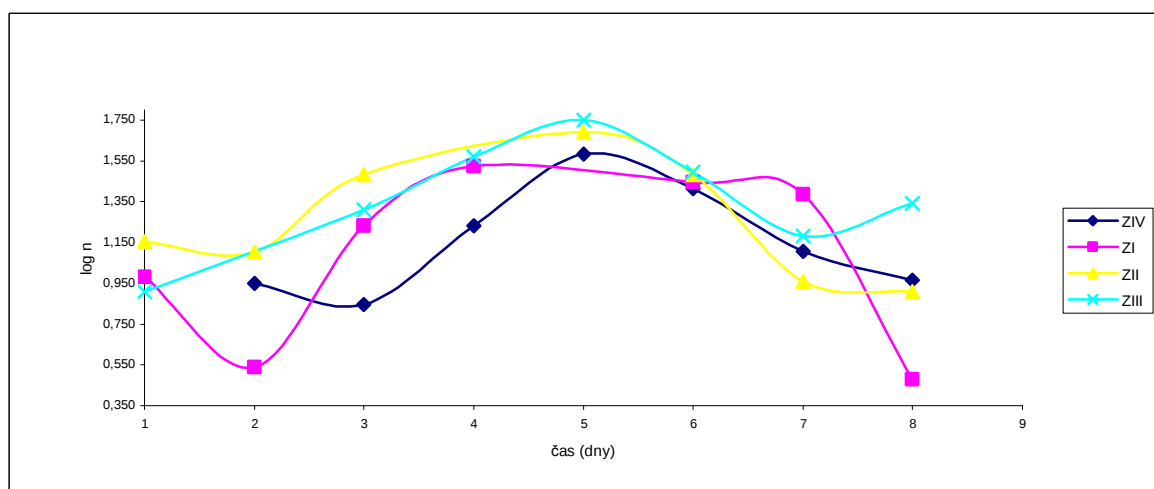
A – živé buňky, B – celkový počet buněk, I – lag fáze, II – exponenciální fáze, III – stacionární fáze, IV – fáze úhynu růstu

Ve skutečnosti však nepučí všechny buňky naráz ani stejně rychle. Některé buňky nemusí pučet vůbec, a ty u nichž dojde k pučení nezačínají ve stejném čase. Kultura je asynchronní. Díky asynchronnosti kultury dochází k odchylkám při odběru a následném počítání buněk (v jednom místě je mnoho buněk, na jiném místě jich může být i o řád méně).

Během hlavního kvašení byl sledován nárůst počtu buněk v závislosti na čase. Byly sledovány dvě zákvasné kádě L5 a L6 ve spilce litovelského pivovaru po dobu 1 měsíce, přičemž mladina byla čtyřikrát zakvašena stejnými kvasnicemi, tzn. nová kvasničná kultura byla opětovně po vyprání nasazena a to celkem třikrát (ZI, ZII, ZIII, ZIV)



Graf č. 1 Průběh růstu buněk pro kád' L5 při prvním (ZI), druhém (ZII), třetím (ZIII) a čtvrtém (ZIV) opětovném nasazení



Graf č. 2 Průběh růstu buněk pro kád' L6 při prvním (ZI), druhém (ZII), třetím (ZIII) a čtvrtém (ZIV) opětovném nasazení

Výsledky hodnocení růstu kvasnic získané během procesu hlavního kvašení jsou uvedeny v grafu č. 1 pro mladinu kvasící v kádi L5 a v grafu č. 2 pro mladinu kvasící v kádi L6.

Na osu x byl vynesena čas [den] a na osu y logaritmus počtu buněk (log n). Tím se získala růstová křivka, která má v ideálním případě, tvar písmene S. Pro každé nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV) i pro každou jednu kvasnou kád' (L5,L6) je vidět, že jednotlivé průběhy růstu buněk se lišily.

Pro nádobu L5 (graf č. 1) je z křivek ZI, ZII, ZIII a ZIV patrné, že přibližně 2. den (křivky ZI, ZII, ZIII) a 3. den (křivka ZIV) po nasazení došlo ke snížení počtu buněk přibližně 5x. K maximálnímu nárůstu počtu buněk došlo ve stadiu vysokých kroužků (přibližně 4. den po zakvašení). Z grafu lze vyplývá, že ideálního průběhu růstu nebylo dosaženo ani v jednom případě. K největšímu nárůstu buněk došlo při třetím nasazení kvasnic (křivka ZIII), kdy bylo napočítáno $41,3 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml.

V případě nádoby L6 (graf č.2) je průběh nárůstu buněk podobný. K maximálnímu nárůstu došlo také při 3. nasazení (křivka ZIII), kdy počet buněk v 1 ml byl $56,2 \cdot 10^6$. Poněkud

zvláštní průběh růstu byl zaznamenán při prvním nasazení (křivka ZI) kde jsou vidět dvě maxima růstu, což mohlo být způsobeno špatných vyhodnocením při počítání v Bürknerově komůrce, špatným zředěním kvasnic mladiny, nešetrným odebráním vzorku, nesprávným nanesením do Bürknerovy komůrky, ale hlavně asynchronností kultury. Při druhém (křivka ZII) a třetím (křivka ZIII) nasazení se průběh růstu opět blížil ideálnímu modelu jako v případě kádí L5 (graf č. 1). Ani při čtvrtém nasazení (křivka ZIV) se průběh růstu moc neliší od ideálního, což ukazuje stále dobrou schopnost reprodukce kvasnic, tedy jejich viabilitu.

V obou případech (graf č. 1 i 2) byl pozorován u všech opětovných nasazeních pokles počtu buněk 2. či 3. den po zakvašení mladiny. Tento pokles je způsoben sedimentací kvasnic před nastartováním samotného kvašení.

Během prvního nasazení se kvasnice adaptují na dané podmínky během kvašení, jejich nárůst není tedy tak vysoký a průběh není ideální. Během druhého a třetího nasazení jsou již kvasničné buňky adaptovány a průběh jejich růstu se blíží ideálnímu, mají ideální reprodukční schopnosti. Při čtvrtém nasazení se průběh růstu stále moc neliší od ideálního, ale další nasazení se již nedoporučuje [5].

4.2 Vitální barvení

Vitálním barvením se rozumí barvení živých buněk za účelem kontroly jejich fyziologického stavu a ke zjištění počtu mrtvých buněk [8]. Byl tedy používán k přímému stanovení počtu buněk mrtvých buněk, neschopných reprodukce. Byl proveden vždy u kvasnic po dokončení hlavního kvašení po každém jednom nasazení u obou kvasných kádí (L5 i L6) a to před jejich vypráním, po vyprání a také u odpadních kvasnic, určených k vyhození.

V tab. č. 9 je uveden počet mrtvých buněk v jednotlivých kádích (L5, L6) po prvním (ZI), druhém (ZII), třetím (ZIII) a čtvrtém (ZIV) nasazení.

Tab. č. 9 Podíl mrtvých buněk v kádí L5 a L6 po každém nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV) a vyprání

počet mrtvých buněk (%)						
	kád' L5			kád' L6		
datum	před vypráním	po vyprání	odpadní	před vypráním	po vyprání	odpadní
ZI	4,76	1,40	22,90	0,70	1,80	5,50
ZII	5,41	0	27,27	10,84	3,62	11,11
ZIII	5,21	1,30	25,67	5,30	4,80	40,58
ZIV	4,19	2,77	21,21	0,87	1,63	16,66

Z tabulky vyplývá, že kvasnice po vyprání neobsahovaly ani v jednom případě více než 5 % mrtvých buněk, což znamená, že vyhovovaly podmínkám pro další nasazení.

V jednom případě byly kvasnice tak dokonale proprány, že neobsahovaly žádnou mrtvou buňku (kád' L5, 2. nasazení ZII).

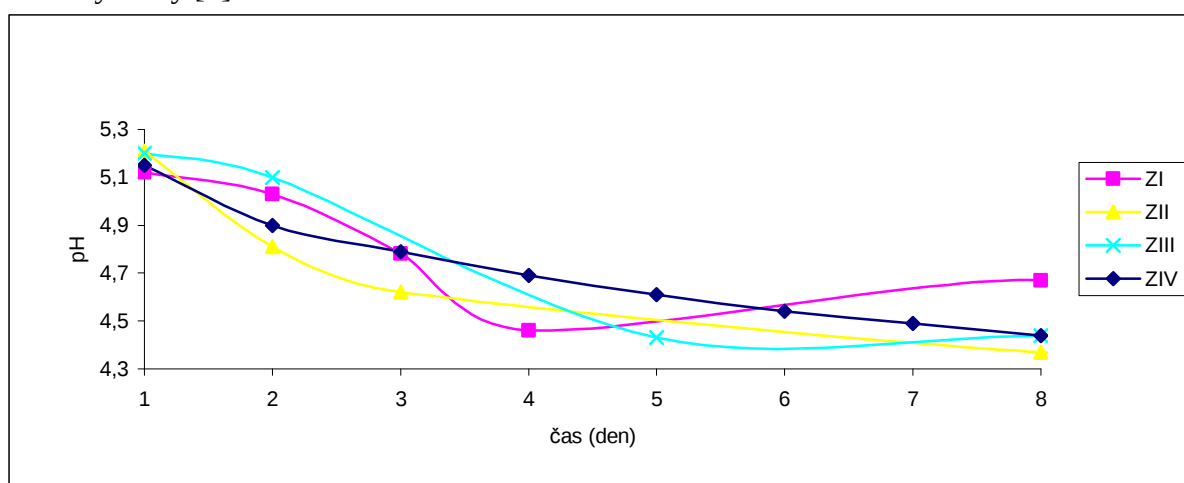
Z vitálního testu byl posouzen fyziologický stav kvasnic – vitalita. Vitalita těchto opětovně nasazovaných kvasnic byla při každém jednom nasazení vyhovující.

Při mnohačetném nasazování kvasnic dochází k jejich degeneraci, čemuž se dá předejít nižším počtem nasazení (4 – 5x), jejich vhodným provzdušněním a malými násadními dávkami (běžně se používá dávka 0,5 l kvasnic na 1 hl mladiny) [5].

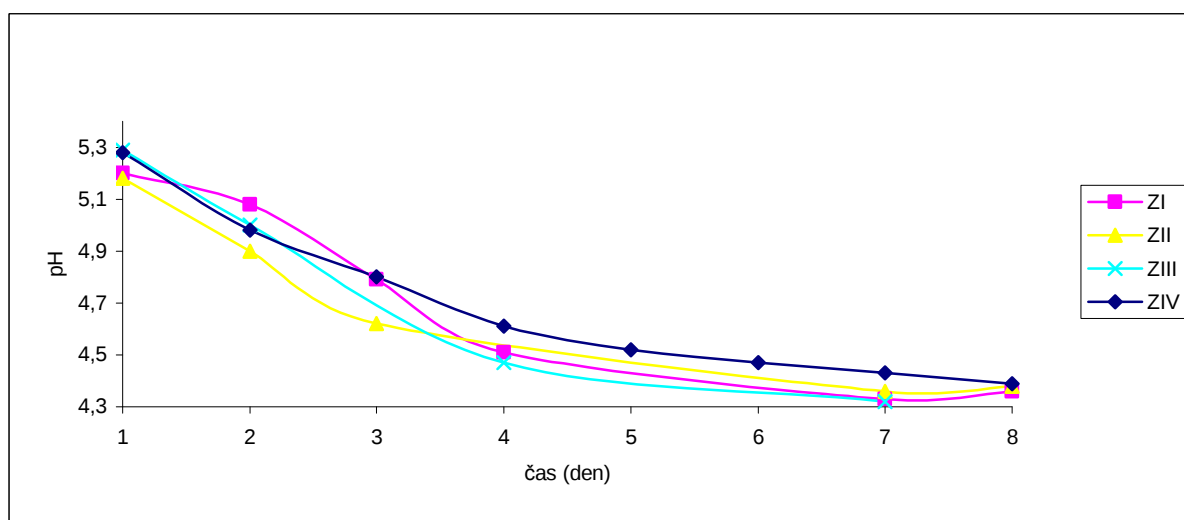
Významný vliv na vitalitu má i samotný proces jejich praní. Při dlouhém a intenzivním praní se fyziologický stav kvasnic oslabuje, což se projeví pomalým zakvašením. Velkým nebezpečím při praní je i riziko kontaminace např. bakteriemi či jinými pivo škodícími mikroorganismy.

4.3 Sledování poklesu pH

Jedním z důležitých parametrů ovlivňujících průběh hlavního kvašení je také pH. V průběhu hlavního kvašení dochází k poklesu pH. Původní pH mladiny 5,2 až 5,7 poklesne během hlavního kvašení na 4,3 až 4,7. Tento pokles je způsoben posunutím ústojné schopnosti do kyselejší oblasti tvorbou těkavých a rozpustných organických kyselin. pH kvasničných buněk zůstává původní (asi 6,0). Největší pokles pH souvisí v počátku kvašení s pomnožením buněk, kdy se uvolňují anorganické fosfáty a je absorbován amoniak a aminokyseliny [5].



Graf č. 3 Pokles pH v průběhu kvašení pro nádobu L5 při prvním (ZI), druhém (ZII), třetím (ZIII) a čtvrtém (ZIV) opětovném nasazení



Graf č. 4 Pokles pH v průběhu kvašení pro nádobu L6 při prvním (ZI), druhém (ZII), třetím (ZIII) a čtvrtém (ZIV) opětovném nasazení

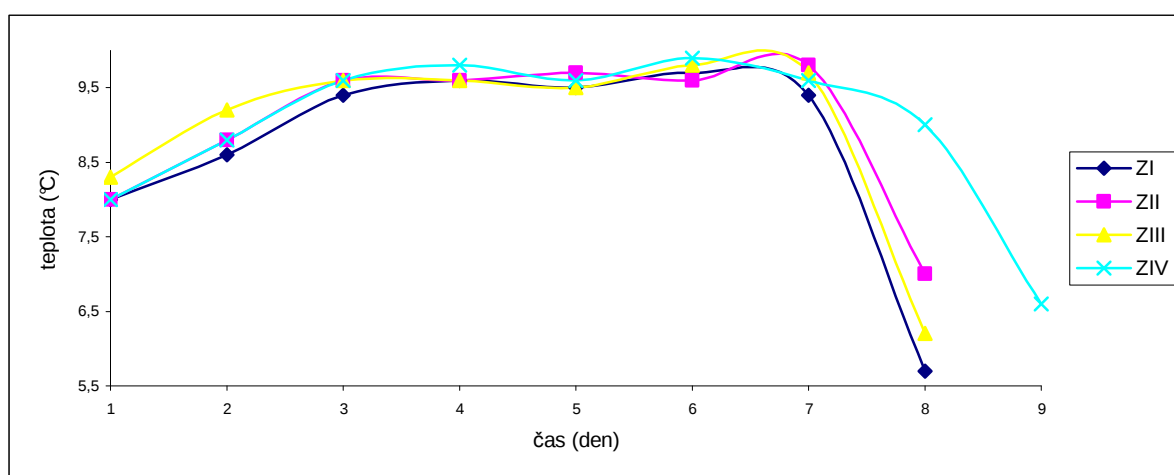
Na základě zpracování výsledků prvního (ZI) nasazení kvasničných buněk v kádi L5 (graf č. 3) lze konstatovat, že 4. den po nasazení došlo k výraznějšímu poklesu pH, což lze vysvětlit nárůstem biomasy [5]. Avšak další den došlo opět ke zvýšení pH.

Při druhém (křivka ZII) a čtvrtém (křivka ZIV) nasazení byly křivky ZII a ZIV podobné modelovému případu poklesu pH během kvašení. K nejvýraznějšímu poklesu pH došlo v této kádi při 2. nasazení (křivka ZII).

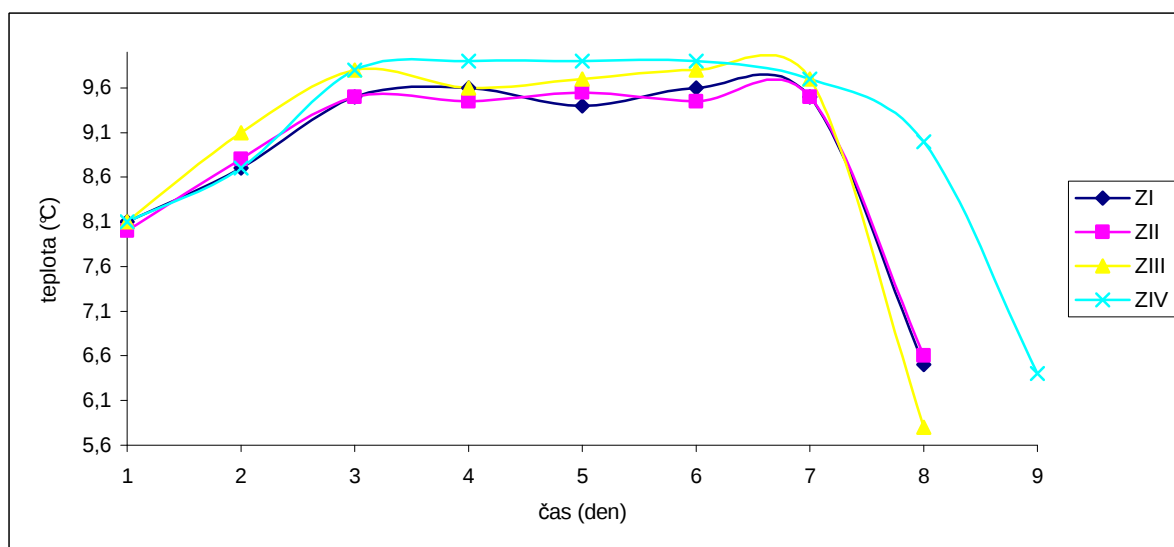
U kádi L6 (graf č. 4) se průběh křivky ZII poklesu pH významně nelišil od modelového případu. Pouze křivky ZI (první nasazení) a ZII (druhé nasazení) vykazovaly určité nepravidelnosti.

4.4 Sledování teploty

Teplota kvašení je důležitý regulační prvek pro výsledné senzorické vlastnosti piva. Proto i tento faktor byl sledován.



Graf č. 5 Průběh teplot v kvasné kádi L5 během hlavního kvašení pro všechna čtyři opětovná nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV)



Graf č. 6 Průběh teplot v kvasné kádi L6 během hlavního kvašení pro všechna čtyři opětovná nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV)

V případě kádi L5 (graf č. 5) i L6 (graf č. 6) se zákvasná teplota pohybovala okolo 8°C. V průběhu hlavního kvašení probíhá takřka výhradně odbourávání cukru na alkohol a oxid uhličitý, přičemž se vyvíjí teplo: [5], [6]



2,82 MJ 2 x 1,34 MJ

Proto se teplota v kvasné kádi s vývojem kvašení zvyšovala (viz grafy 5, 6). V místech s největší hodnotou teploty pro jednotlivé kádě (L5, L6) bylo kvašení nejintenzivnější.

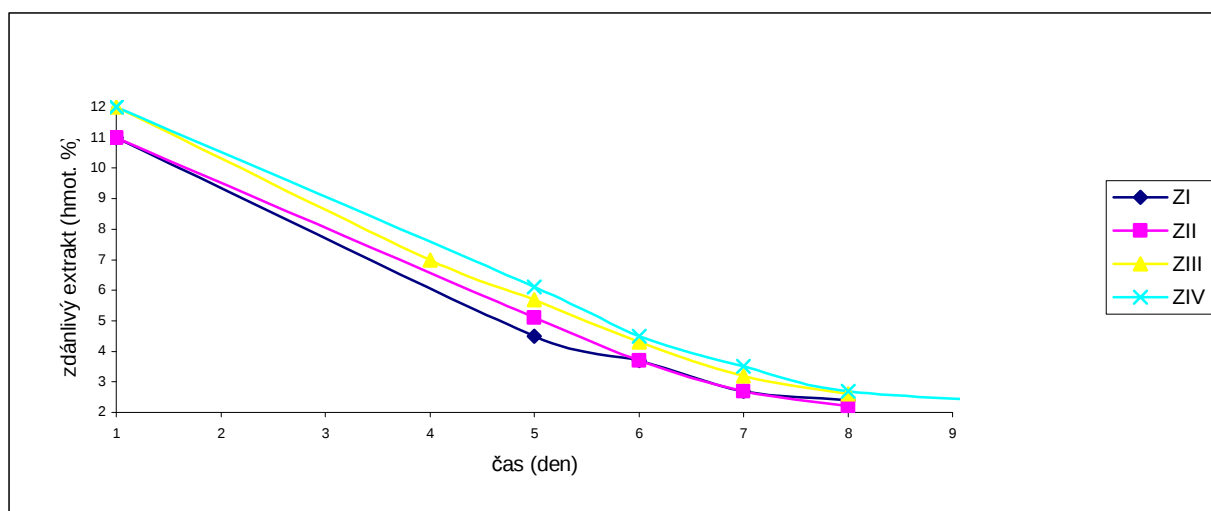
Při vyšších teplotách je i rychlost kvašení vyšší a doba kvašení se tedy zkrátí. Teploty vyšší jak 10°C (10,5°C) nejsou doporučovány, protože hotové pivo kvasící při vyšších teplotách získává kvasničnou chuť a vůni, což není žádoucí (zejména ze strany spotřebitelů) [5].

4.5 Sledování stupně prokvašení – kvasné křivky

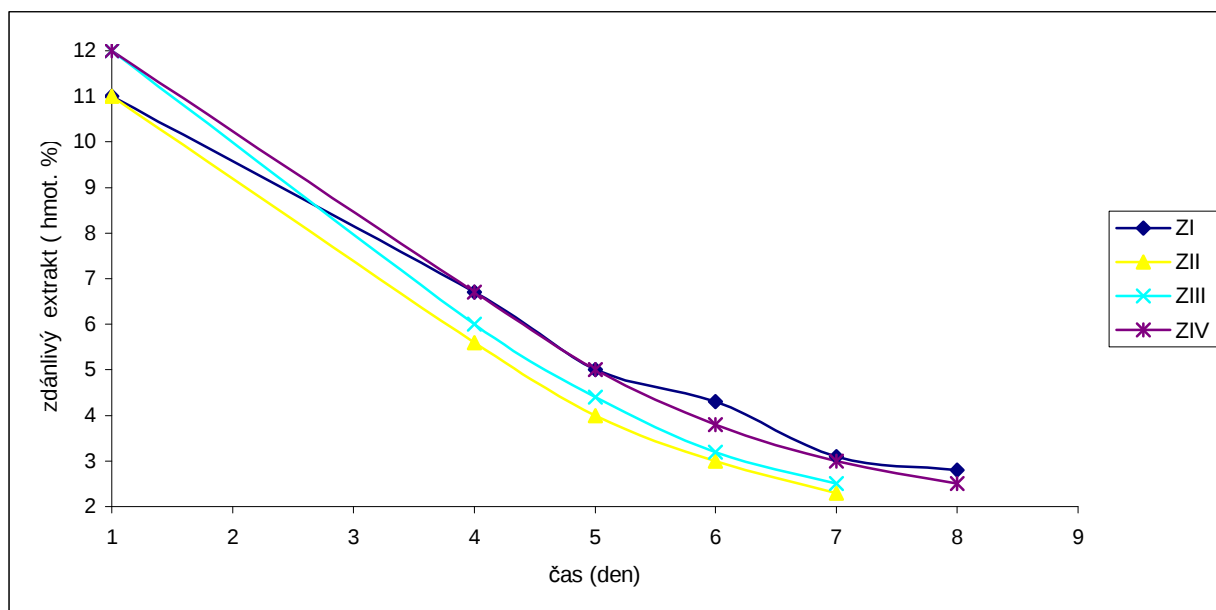
Dalším významným parametrem mezioperační kontroly je výpočet stupně prokvašení. Sledováním úbytku zdánlivého extraktu v mladině lze vypočítat zdánlivý stupeň prokvašení, který je jedním z kontrolních parametrů ukončení hlavního kvašení.

Běžné hodnoty (u vystavovaných piv) pro zdánlivé prokvašení se pohybují u 10% a 11% mezi 75-80 %, u 12% piv jsou hodnoty vyšší 78-82 %. Vyšší hodnoty zdánlivého prokvašení u dvanácti stupňových piv jsou způsobeny delší dobou ležení v ležáckém sklepě.

V obou kádích (L5 i L6) byla počáteční koncentrace extraktu v mladině (P) pro první (křivka ZI) a druhé (křivka ZII) nasazení rovna hodnotě P = 11 %. U křivek ZIII (při třetím nasazení) a ZIV (při čtvrtém nasazení) byla počáteční koncentrace extraktu v mladině P = 12%. Tyto počáteční hodnoty je možné vidět na grafech č. 7 a 8.



Graf č. 7 Sledování úbytku extraktu v kvasné kádi L5 během hlavního kvašení pro všechna čtyři opětovná nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV)



Graf č. 8 Sledování úbytku extraktu v kvasné kádě L6 během hlavního kvašení pro všechna čtyři opětovná nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV)

Pomocí kvasných křivek se kontroloval průběh kvašení. Všechny kvasné křivky (graf č. 7,8) se od ideálních kvasných křivek téměř neliší.

Z kvasných křivek, jenž popisují úbytek extraktu, lze tedy vypočítat zdánlivé prokvašení podle vzorce:

$$P_z = \frac{(P - E_z)}{P} \cdot 100 \quad (7)$$

kde P_z je zdánlivé prokvašení

P – extrakt původní mladiny (%)

E_z – zdánlivý extrakt piva zbaveného CO_2 po dokvašení

Získané hodnoty pro jednotlivé kvasné kádě (L5, L6) jsou uvedeny v Tab. 10

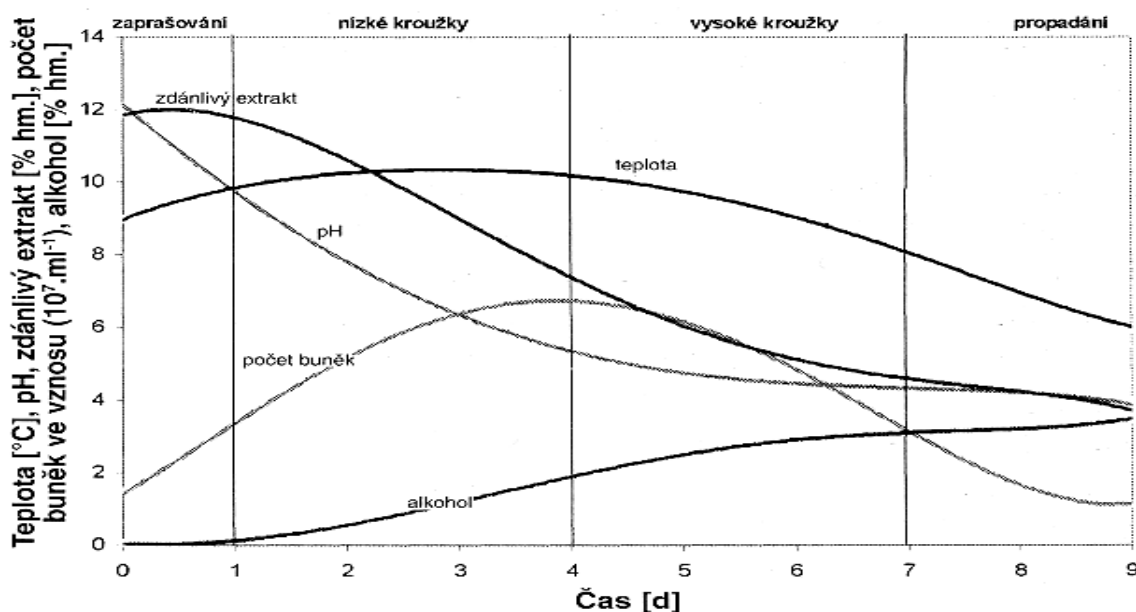
Tab. 10 Zdánlivé prokvašení jednotlivých kádí

Kád' L5	Zdánlivé prokvašení (%)	Kád' L6	Zdánlivé prokvašení (%)
ZI	78,18	ZI	74,55
ZII	80,00	ZII	79,10
ZIII	78,33	ZIII	79,17
ZIV	80,83	ZIV	79,17

4.6 Celkový průběh kvašení

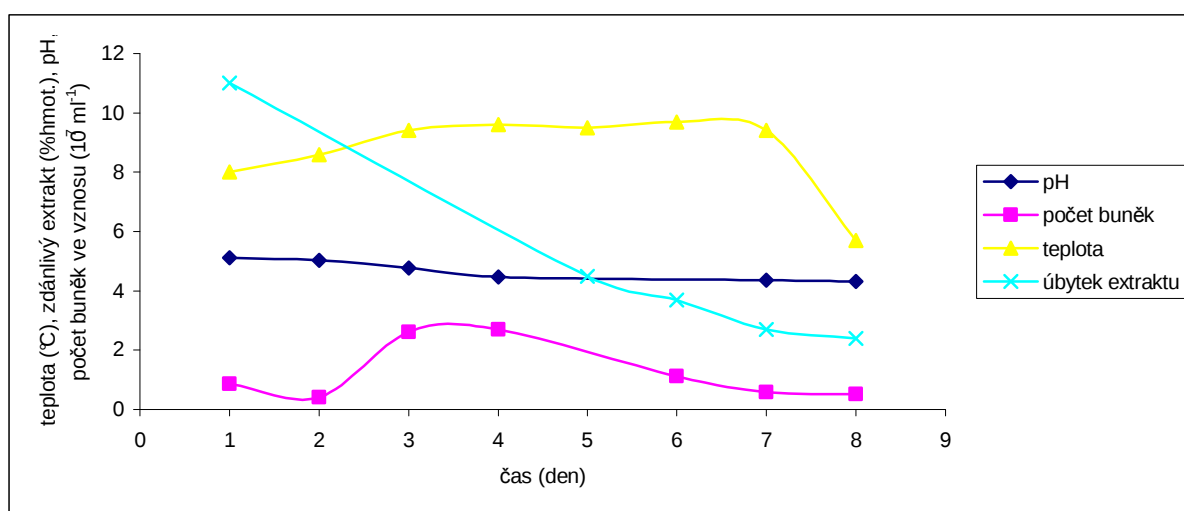
Celkový průběh kvašení lze popsat pomocí měření pH, stanovení počtu buněk, sledováním změn teploty a měřením úbytku zdánlivého extraktu.

Modelová ukázka klasického průběhu kvašení je uvedena na Obr. 16.



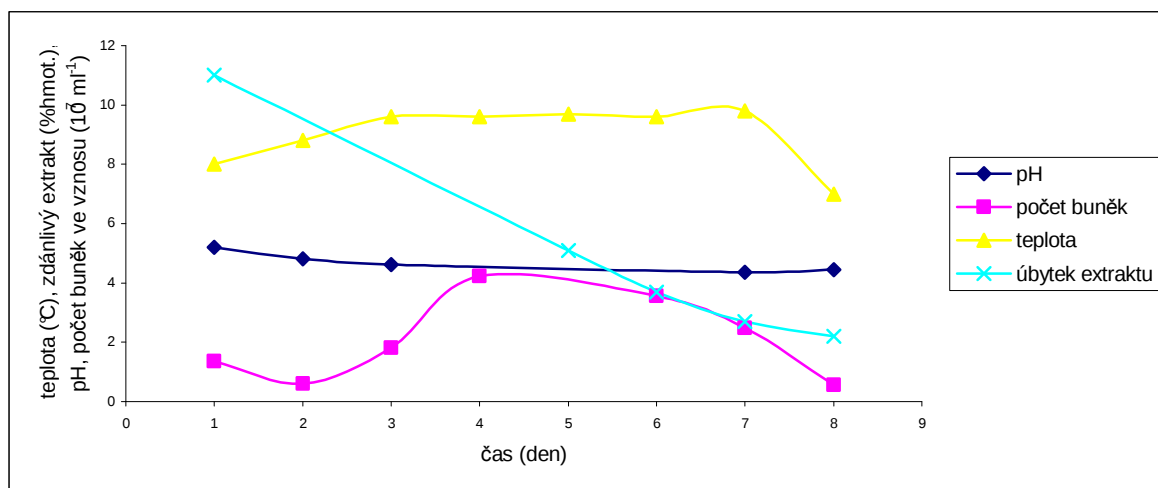
Obr. 16 Průběh kvašení (hodnoty pH neodpovídají ose x - přepočet ($\text{pH} - 4$)). 10 [6]

Na základě modelové ukázky průběhu kvašení byly vyhodnoceny všechny fermentační procesy v kádích L5 a L6 pro každé opětovné nasazení (ZI, ZII, ZIII, ZIV) kvasnic.

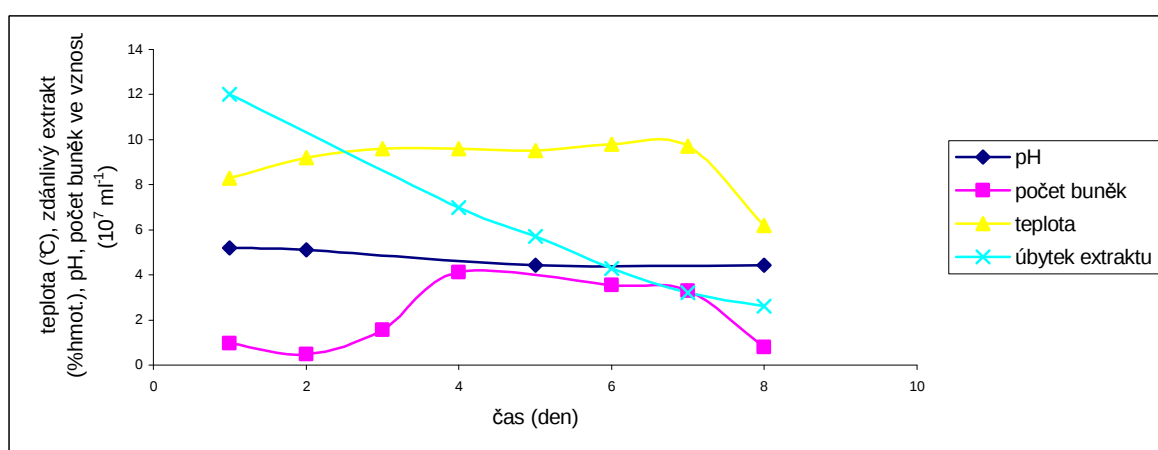


Graf č. 9 Průběh hlavního kvašení v kádi L5 při prvním nasazení ZI kvasnic

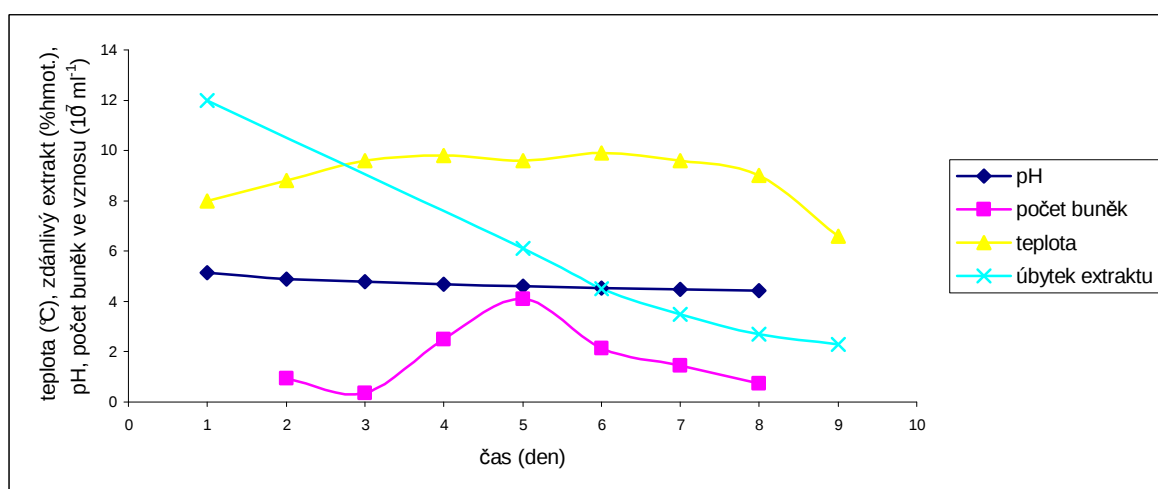
Z grafu č. 9, kvasnice byly nasazený poprvé, je vidět, že se aklimatizovaly na nové podmínky prostředí. Jejich nárůst byl pomalejší. Nízký počet buněk kvasinek neměl však vliv na konečný výsledek hlavního kvašení. Ostatní sledované parametry byly v normě a neměly žádný vliv na množení buněk.



Graf č. 10 Průběh hlavního kvašení v kádi L5 při druhém nasazení ZII kvasnic



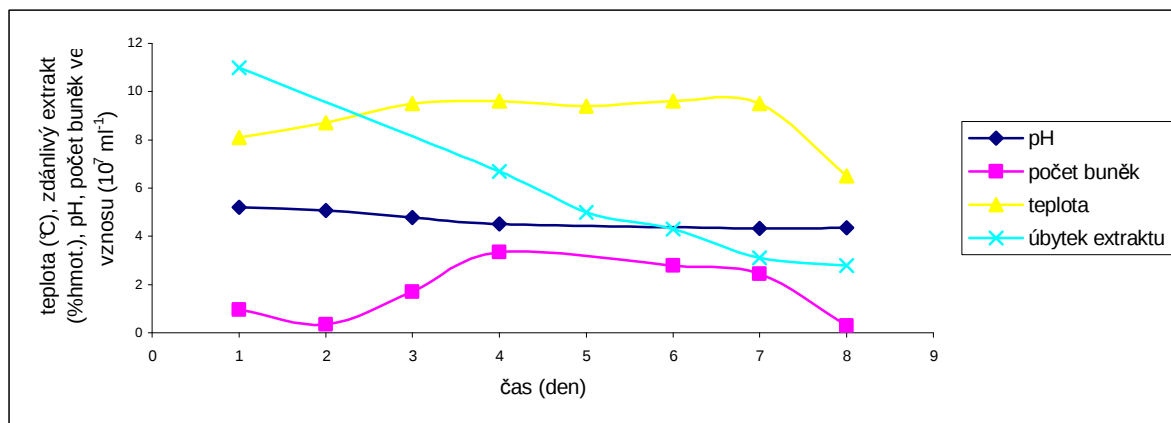
Graf č. 11 Průběh hlavního kvašení v kádi L5 při třetím nasazení ZIII kvasnic



Graf č. 12 Průběh hlavního kvašení v kádi L5 při čtvrtém nasazení ZIV kvasnic

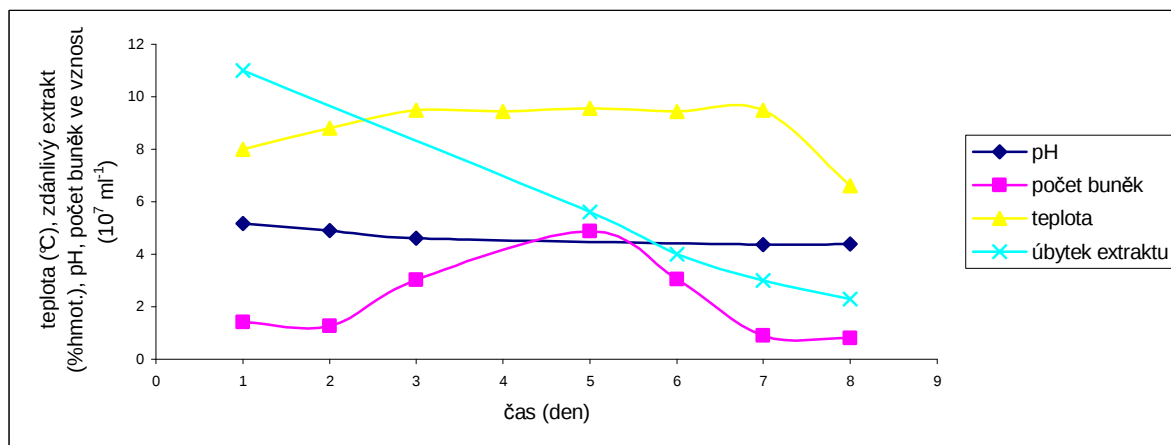
Na grafech č. 10, 11 a 12 je vidět plynulejší začátek růstu kvasnic. Je to důsledek adaptace kvasnic na složení mladiny. Průběh sledovaných parametrů během kvašení zobrazený na těchto grafech se blíží modelovému průběhu kvašení (obr. 16).

Z grafu č. 12 vyplývá, že došlo k poklesu buněk ještě před začátkem chlazení prokvašené mladiny. Tato anomálie mohla být způsobena místem odběru vzorku (asynchronnost kultury).



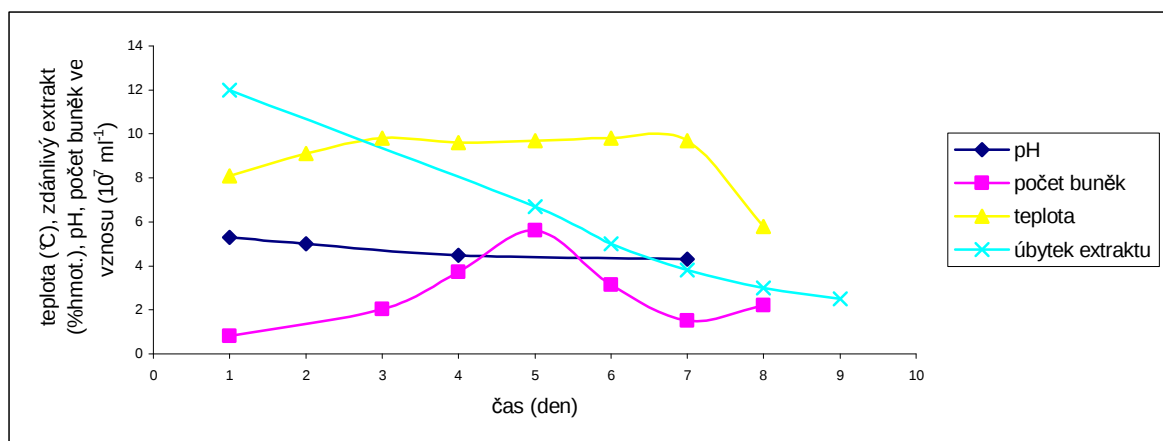
Graf č. 13 Průběh hlavního kvašení v kádi L6 pro první nasazení ZI kvasnic

Průběh hlavního kvašení v kádi L6 při prvním nasazení (ZI), vyhodnocený v grafu č. 13, je totožný s průběhem hlavního kvašení v kádi L5 s prvně nasazenými kvasnicemi (ZI) (graf č. 9).



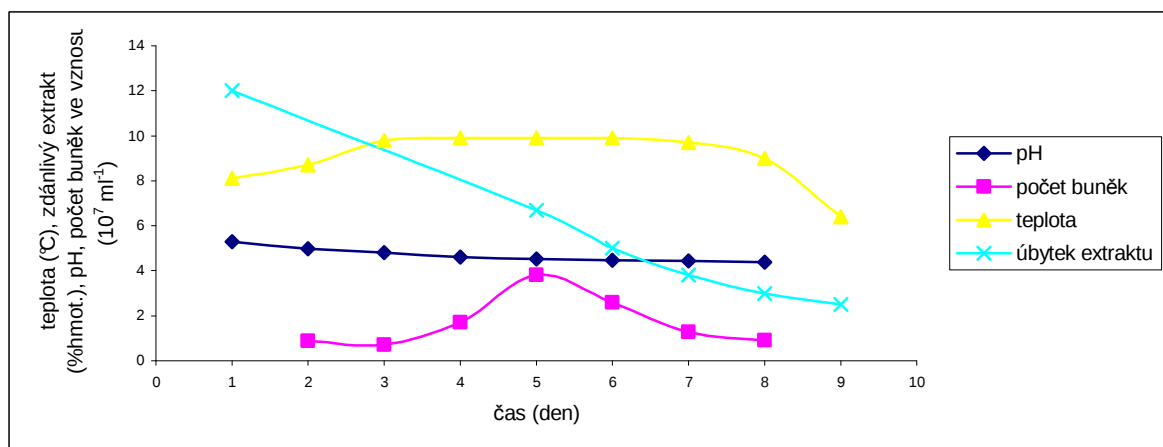
Graf č. 14 Průběh hlavního kvašení v kádi L6 při druhém nasazení ZII kvasnic

Z grafu č. 14 je zřejmé, že kvasnice podruhé nasazené dobře sedimentovaly (pokles počtu buněk 5. den po nasazení) a přitom byly stále aktivní (zdánlivý extrakt v mladině stále klesá – kvasnice stále prokvašují mladinu).



Graf č. 15 Průběh hlavního kvašení v kádi L6 při třetím nasazení ZIII kvasnic

Průběh kvašení v kádi L6 při třetím nasazení kvasnic (ZIII) nevykazuje žádné anomálie. Vysoký nárůst počtu buněk 5. den, mohl být způsoben místem odběru.



Graf č. 16 Průběh hlavního kvašení v kádi L6 při čtvrtém nasazení ZIV kvasnic

Také průběh kvašení v této kádi L6 při čtvrtém nasazení (ZIV) kvasnic nevykazoval žádné anomálie.

Ze všech grafů modelujících průběh hlavního kvašení vyplývá, že množství nasazovaných kvasnic stačilo na zdárný průběh hlavního kvašení a jejich dávkování se nemuselo upravovat. Výsledkem každého hlavního kvašení bylo optimálně prokvašené mladé pivo, které se sudovalo a nechalo dokvasit v ležáckém sklepě.

4.7 Stanovení kalů

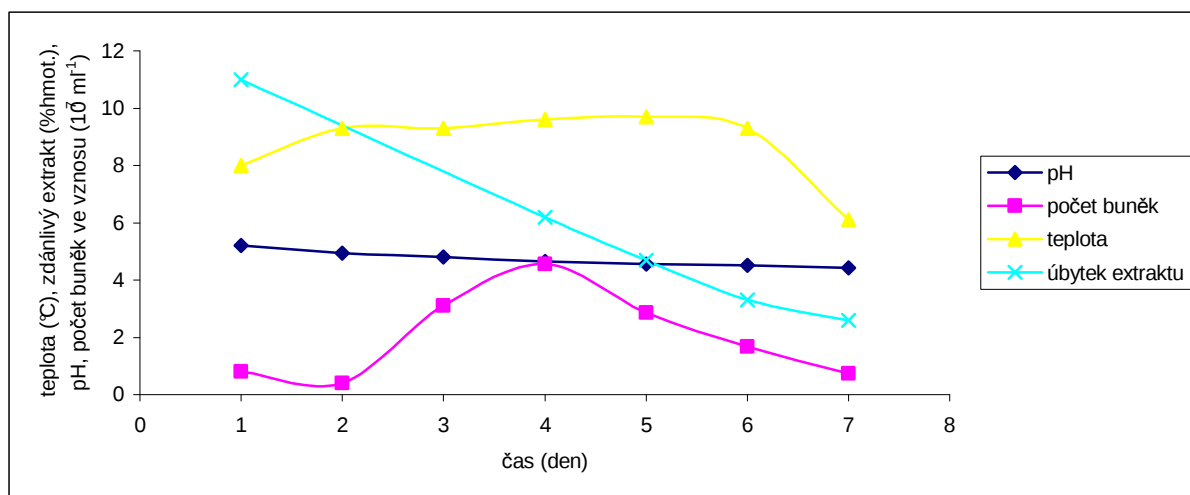
Odstranění a následná kontrola hrubých a jemných kalů (oddíl 2.1.9.9) je důležité v zájmu zajištění dobrého průběhu kvašení [12].

V případě vyššího obsahu kalů, ať už jemných či hrubých, lze očekávat zhoršení chuťových vlastností a současně se při jejich vyšším obsahu absorbují jemné kaly na povrch kvasinek, a tím omezují jejich fyziologickou funkci [12].

Byly provedeny dva modelové průběhy hlavního kvašení při nichž nebyly odstraněny veškeré hrubé či jemné kaly z mladiny.

V prvním případě (graf č. 17) mladina obsahovala 800 mg/l hrubých kalů. Toto množství bylo větší než je běžné.

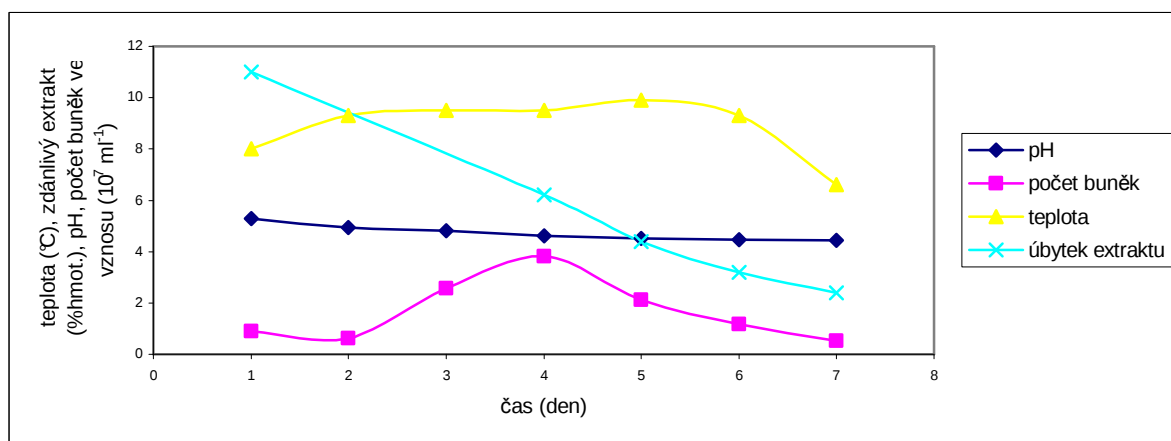
Obsah hrubých kalů kolísá v rozmezí 400-1000 mg sušiny v litru sladiny. Toto množství odpovídá 200-500 g mokrých kalů v hektolitru mladiny. Obsah jemných kalů je závislý na teplotě spílání mladiny. Při dobrém odstranění hrubých kalů bývá v litru mladiny 60-180 mg sušiny jemných kalů. Vyžaduje se co nejnížší obsah jemných kalů v mladině [12].



Graf č. 17 Průběh hlavního kvašení mladiny s obsahem 800 mg/l hrubých kalů a 85 mg/l jemných kalů

Z grafu č. 17 je zřejmé, že při vyšším obsahu hrubých kalů, na základě křivky úbytku extraktu a růstové křivky nedocházelo k významnějšímu ovlivnění hlavního kvašení. Průběh těchto dvou křivek koreluje s modelových grafem (Obr. 16).

Obsah jemných kalů, po odstranění hrubých kalů, byl 85 mg sušiny jemných kalů v litru mladiny (běžná hodnota je 60 – 180 mg sušiny jemných kalů v 1 litru mladiny). Při teplotě spílání 8°C, nebyly pozorovány žádné vlivy jemných kalů na průběh kvašení, vitalitu a viabilitu kvasnic, což lze konstatovat na základě grafu č. 17, kde průběh růstové křivky a křivky znázorňující úbytek extraktu koreluje s modelovým grafem (Obr. 16).



Graf č. 18 Průběh hlavního kvašení mladiny s obsahem 600 mg/l hrubých kalů a 140 mg/l jemných kalů

V druhém případě (graf č. 18) mladina obsahovala 600 mg/l hrubých kalů. Toto množství je na hranici přípustného množství hrubých kalů ve filtrované mladině.

Z grafu č. 18 je zřejmé, že i při množství 600 mg/l hrubých kalů v mladině, na základě křivky úbytku extraktu a růstové křivky nedocházelo k významnějšímu ovlivnění hlavního kvašení. Průběh těchto dvou křivek koreluje s modelových grafem (Obr. 16).

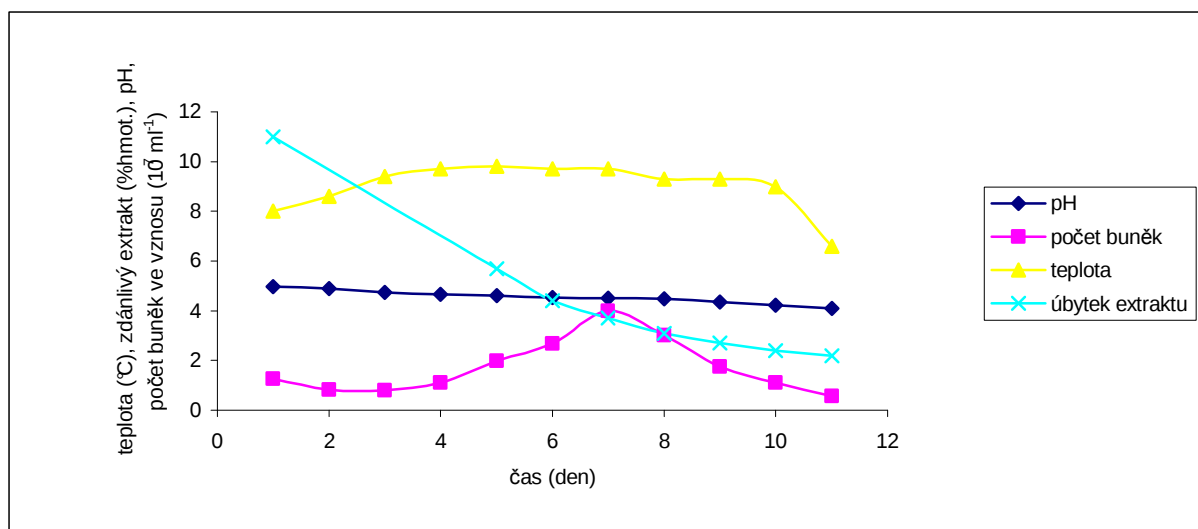
Obsah jemných kalů, po odstranění hrubých kalů, byl 140 mg sušiny jemných kalů v litru mladiny (běžná hodnota je 60-180 mg sušiny jemných kalů v 1 litru mladiny). Při stejné teplotě spílání 8°C jako u grafu č. 17, nebyly pozorovány žádné vlivy jemných kalů na průběh kvašení, vitalitu a viabilitu kvasnic, což lze konstatovat na základě grafu č. 18, kde průběh růstové křivky a křivky znázorňující úbytek extraktu koreluje s modelovým grafem (obr. 16).

4.8 Stanovení spotřeby rozpuštěného kyslíku

Důležitým faktorem, především pro pomnožení kvasnic, je množství rozpuštěného kyslíku v mladině. Rozpouštění kyslíku v mladině závisí na teplotě a velikosti dávkovaných bublinek vzduchu [5].

Vyšší nasycení mladiny kyslíkem působí rychlý růst kvasinek, zrychlení kvašení, vyšší tvorbu acetaldehydu, esterů, alkoholů, diacetylu. Nižší nasycení kyslíkem způsobuje tvorbu sirovodíku, dimethylsulfidu, volných mastných kyselin, oxidu siřičitého a nižší pH mladiny [5].

Bylo provedeno modelování průběhu hlavního kvašení s mladinou, která se nasýtila nižší koncentrací kyslíku, 5 mg/l, než se běžně používá.



Graf č. 19 Průběh hlavního kvašení mladiny při zakvašení kyslíkem v množství 5 mg/l nižším obsahem O₂

Na základě vyhodnocení výsledků, graf č. 19, lze konstatovat, že výsledkem zakvašování nižším množstvím kyslíku, byla delší doba potřebná k dosažení stejného stupně prokvašení jako u mladiny nasycené standardním množstvím kyslíku, které kolísá v rozmezí 6 – 8 mg/l mladiny [5].

Při standardním nasycení mladiny kyslíkem byla doba potřebná k jejímu prokvašení, dle druhu piva, 7 – 10 dní. Při 5 mg kyslíku v 1 l mladiny došlo k jejímu prodloužení v průměru o 3 – 4 dny. Tento nárůst byl způsoben pomalejším úbytkem extraktu.

Nižší koncentrace rozpuštěného O_2 zapříčinila pomalejší nárůst kvasničných buněk (začátek nebyl tak bouřlivý jako jindy). Jeho trvalý nedostatek v mladině měl za následek změnu fyziologických a technologických vlastností kvasničného kmene v dalších nasazeních, jako prodloužení lag-fáze a zhoršení výtěžnosti.

5 ZÁVĚR

V práci byl sledován průběh kvašení ve spilce vybraného pivovaru, závislosti různých faktorů a jejich případný vliv na vitalitu a viabilitu nasazovaných kvasnic, což mělo ukázat opodstatnění vícenásobnou použitelnost kvasničného kmene v rámci správného technologického procesu kvašení piva. Předmětem sledování byli i další faktory: fyziologický stav kvasnic, pH, teplota, množství jemných a hrubých kalů, stupeň prokvašení mladiny.

U studovaného kmene kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae* produkční kmen č. 7 (H7)) dodávaných z partnerského pivovaru, byly zjištěny velmi dobré kvasné vlastnosti, jejich výborná adaptabilita na podmínky prostředí mladiny při prvním zakvašování, dobrá viabilita a odpovídající chování v průběhu hlavního kvašení. Každá nová zákvasná várka kvasnic se celkově nasadila čtyřikrát. Kvasničné buňky byly po celou dobu vzhledově bez závad. Podíl mrtvých buněk po vyprání byl v předepsaných hodnotách. Množství mrtvých buněk bylo vždy pod mezní hodnotou 5%, v jednom případě nebyla nalezena dokonce žádná mrtvá buňka v odebraném vzorku.

Špatná vitalita i viabilita buněk má významný vliv na průběh kvašení. Špatný fyziologický stav kvasnic způsobuje pomalé rozkvašování a v jeho důsledku může dojít až k zastavení kvašení.

Druh a dávka kvasnic při zakvašování má také rozhodující vliv na kvašení. Vyšší zákvasnou dávkou lze regulovat rychlejší a hlubší prokvašení a částečně potlačit tvorbu aromatických metabolitů. Absolutní přírůstek kvasnic během kvašení a jejich výtěžnost už nejsou závislé na zákvasné dávce.

V průběhu stárnutí a opakovaného nasazování pivovarských kvasnic lze zaznamenat morfologické i fyziologické změny jako zvětšování buněk, vrásnění buněčné stěny, rostoucí počet jizev po nově zrozených buňkách, zvýšení generační doby. Stárnutím kvasničné buňky ztrácejí kvasivou schopnost.

Další sledovaný faktor, množství kalů, neměl významný vliv na vitalitu či viabilitu kvasnic.

Důležitým faktorem, především pro pomnožení kvasnic, bylo množství rozpuštěného kyslíku v mladině. Byly provedeny zkoušky s nedostatečně provzdušněnou mladinou.

Výsledkem byla delší doba potřebná k dosažení stejného stupně prokvašení jako u mladiny nasycené standardním množstvím kyslíku, které kolísá v rozmezí 6 – 8 mg/l mladiny.

Při standardním nasycení mladiny kyslíkem byla doba potřebná k jejímu prokvašení, dle druhu piva, 7 – 10 dní. Při 5 mg kyslíku v 1 l mladiny došlo k jejímu prodloužení v průměru o 3 – 4 dny. Tento nárůst byl způsoben pomalejším úbytkem extraktu.

Nižší koncentrace rozpuštěného O₂ zapříčinila pomalejší nárůst kvasničných buněk (začátek nebyl tak bouřlivý jako jindy). Jeho trvalý nedostatek v mladině má za následek změnu fyziologických a technologických vlastností kvasničného kmene v dalších nasazeních, a to prodloužení lag fáze, zhoršení výtěžnosti.

Hodnoty pH mladiny během hlavního kvašení klesaly, hodnoty pH uvnitř buněk zůstávaly stejné (pH = 6). Největší pokles pH byl pozorován v počátku kvašení, a byl způsoben pomnožením buněk a následným uvolněním anorganických fosfátů a absorpcí amoniaku a aminokyselin. Nízká hodnota pH, která se používá při praní kvasnic, a jejich necitlivé praní mají zásadní vliv na technologickou aktivitu. Kvasničné buňky poškozené necitlivým, praním jsou pro další nasazení nepoužitelné.

Při rychlém ochlazení, tzv. chladový šok, prokvašené mladiny membrána buněk získává vlastnosti gelu, což kvasničnou buňku poškodí. Naopak při vyšších teplotách se zvyšuje

aktivita kvasnic, klesají hodnoty pH, a současně je kvašení intenzivnější. Vyšší teploty, díky zvýšené tvorbě i dalších sloučenin negativně ovlivňujících organoleptické vlastnosti, mají za následek kvasničnou chuť výsledného piva.

V průběhu všech sledovaných hlavních kvašení nebyly pozorovány významné abnormality a vždy bylo dosaženo požadovaného stupně prokvašení.

Na základě zpracovaných výsledků sledovaných parametrů u opětovně nasazovaného (celkově 4x) kmene pivovarských kvasnic během hlavního kvašení, lze potvrdit správnost jednotlivých opakovaných nasazení v průběhu technologického procesu.

Je tedy velmi důležité dbát na správný a léty prověřený technologický postup, výběr vhodného kmene kvasnic, dodržování aseptických podmínek a dostatečnou kontrolu průběhu kvašení. Nejen tyto parametry jsou důležitými kritérii pro konečné organoleptické vlastnosti a kvalitu piva.

6 LITERATURA

- [1] Šavel, J.: *Pivovarský kalendář 1998* kap. *Jak nazývat pivovarské kvasinky*. 1. vyd. Praha: VÚPS a.s., 1998
- [2] Hollerová, I., Kohoutová, P.: *Pivovarský kalendář 1999* kap. *Sbírka pivovarských kvasinek*. 1. vyd. Praha: VÚPS a.s., 1999
- [3] Šavel, J.: *Pivovarský kalendář 2002*, kap. *Varečné kvasnice a jejich vlastnosti*. 1. vyd. Praha: VÚPS a.s., 2002
- [4] Šavel, J.: *Mikrobiologická kontrola v pivovarech*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980
- [5] Basařová, G., Čepička, J.: *Sladařství a pivovarství*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1986
- [6] Kosař, K., Procházka, S. a kolektiv autorů: *Technologie výroby sladu a piva*. 1.vyd. Praha: VÚPS a.s., 2000, ISBN 80-902658-6-3
- [7] http://smetana.fch.vutbr.cz/r_studenti/4.rocnik/UCHPBT/Biotechnologie%20I
Rychtera, M.: *Fermentační technologie*
- [8] Veselá, M.: *Praktikum z Obecné mikrobiologie*. Brno: VUT Fakulta chemická, 2004
- [9] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Victoria Publishing, 1995
- [10] Kocková-Kratochvílová, A., Tomášek, K., Ondříšková, M.: *Biologická kontrola výroby piva a nealkoholických nápojů*. 2.vyd. Bratislava: ALFA, 1980
- [11] Šavel, J.: *Pivovarský kalendář 2000* kap. *Kontaminace pivovarské výroby*. 1.vyd. Praha: VÚPS a.s., 2000
- [12] Basařová, G. a kolektiv autorů: *Pivovarsko – sladařská analytika 2*. 2. vyd. Praha: Merkanta s. r. o., 1993
- [13] Basařová, G. a kolektiv autorů: *Pivovarsko – sladařská analytika 1*. 2. vyd. Praha: Merkanta s. r. o., 1993
- [14] Janderová, B., Bendová, O.: *Úvod do biologie kvasinek*. 1.vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 1999

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Acetyl-CoA	acetyl koenzym A
ATP	adenosintrifosfát
NADH	redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH	redukována forma nikotinamiduadenindinukleotidfosfátu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadenindinukleotidu
THR	threonin
SER	serin
LEU	leucin
GLU	glutamin
CYS	cystein
FAN	free amino nitrogen
HSPs	heat-shock proteins
CKT	cylickokónický tank
NMR	nukleová magnetická rezonance
ICP	indukčně vázané plazma
[X]	koncentrace kvasničných buněk
K _h	množství sušiny hrubých kalů
K _j	množství sušiny jemných kalů
z	faktor ředění
P	počet políček