

## VÁŽÍME SI DOSTATEČNĚ KVASINEK?

### DO WE APPRECIATE YEAST ENOUGH?

JOSEF ŠKACH, MARTIN SLABÝ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Lípová 15, 120 44 Praha / *Research Institute of Brewing and Malting, Lípová 15, CZ – 120 44 Praha*; e-mail: skach@beerresearch.cz

**Škach, J. – Slabý, M.: Vážíme si dostatečně kvasinek?** *Kvasny Prum.* 55, 2009, č. 1, s. 2–8.

Výběr kmene kvasnic pro výrobu piva je jedním z rozhodujících faktorů ovlivňujících technologii výroby a výsledný charakter hotového výrobku. Ve sbírkách kmenů pivovarských kvasinek je uchováváno velké množství kmenů, často pocházejících z dnes již neexistujících pivovarů. I přes tuto širokou paletu je v současné praxi využíváno jen několik málo kvasných kmenů, což může ve značné míře přispívat k postupné unifikaci sensorických vlastností piva. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský realizoval linku na propagaci a přípravu lisovaných kvasnic, které mají velmi dobrou trvanlivost. Na základě hodnocení průtokovou cytometrií je možno na tyto kvasnice poskytovat záruku až 3 týdny při teplotách skladování blízkých 0 °C. To umožňuje jejich distribuci i na velmi dlouhé vzdálenosti. Vhodný kmen kvasnic pro konkrétní podmínky pivovaru je možno vybrat ze sbírky uchovávané ve VÚPS, obsahující 130 kmenů s různými technologickými vlastnostmi.

**Škach, J. – Slabý, M.: Do we appreciate yeast enough?** *Kvasny Prum.* 55, No. 1, p. 2–8.

The selection of a yeast strain for beer production is one of the key factors influencing the production technology and the final character of the finished product. In the libraries of brewing yeasts, a great number of yeast strains is kept, frequently originating from breweries no more existing. Despite this number of the strains, only a small number of yeast strains is used in practice, which can contribute to a large extent to a gradual unification of sensory properties of beer. The Research Institute of Brewing and Malting built a line for propagation and preparation of compressed yeast having a very good stability. Based on the evaluation by means of flow cytometry, a shelf-life time of up to 3 weeks can be granted for the yeast at storage temperatures around 0 °C. This allows their distribution even for very long distances. A suitable yeast strain can be selected from the collection held by the Research Institute of Brewing and Malting, which contains 130 strains with various technological properties.

**Škach, J. – Slabý, M.: Halten wir die Hefe genügend wert?** *Kvasny Prum.* 55, 2009, Nr. 1, S. 2–8.

Die Hefestammauswahl für die Bierproduktion stellt einen der entscheidenden Faktoren dar, die die Herstellungstechnologie und den Charakter des Endproduktes beeinflussen. In den Bierhefestammsammlungen wird eine Menge von Bierhefestämmen aus den heute nicht mehr existierenden Brauereien aufbewahrt. Trotz der breiten Auswahl werden in der zeitgenössischen Praxis nur einige Hefestämme angewandt, was in beträchtlichem Maße zur einen schrittweisen Unifikation von sensorischen Eigenschaften des Bieres führen kann. Das Forschungsinstitut für Brauereien und Mälzereien [VUPS] hat eine Linie zur Propagation und Herstellung von gepressten Hefe mit einer langen Lebensdauer realisiert. Auf Grund einer Auswertung durch die Durchflussszytometrie ist es möglich, während der Aufbewahrung bei der Temperatur von etwa 0 °C eine Lebensdauerfrist von 3 Wochen zu leisten, was eine Distribution zu den sehr weit entfernten Brauereien ermöglicht. Aus der Hefesammlung des VUPS, die 130 Stämme mit verschiedenen technologischen Eigenschaften enthält, ist es möglich, einen geeigneten Bierhefestamm auszuwählen.

**Шах, Й. – Слабы, М.: Уважаем дрожжи достаточно?** *Kvasny Prum.* 55, 2009, No. 1, стр. 2–8.

Выбор штамма дрожжей для производства чешского пива является одним из решающих факторов влияющих на технологию производства и характер конечного продукта. В коллекциях штаммов пивоваренных дрожжей сохраняется большое количество штаммов, которые часто происходят из сегодня уже не существующих пивзаводов. Несмотря на этот широкий спектр в настоящей практике используется только несколько штаммов, что может в значительной степени содействовать последовательной унификации сенсорических свойств пива. Научно-исследовательский институт для пива и солода (НИИПС) проводил линию для воспроизводства и приготовления прессованных дрожжей с очень хорошей стойкостью. На основании обсуждения проточной цитометрией можно гарантировать стойкость до 3 недель при температуре хранения близ 0 °C. Это позволяет их дистрибуцию даже очень далеко. Подходящий штамм дрожжей для конкретных условий пивзавода можно избрать из коллекции НИИПС, которая насчитывает 130 штаммов с разными технологическими свойствами.

**Klíčová slova:** *kmen kvasnic, lisované kvasnice, skladování kvasnic, sensorický charakter, pivo*

#### 1 ÚVOD

Informuje-li výrobce piva zákazníka o svém výrobku, logicky se soustřeďuje na povinné údaje na etiketě o použitých základních surovinách, zejména sladu, chmelu, aditivech atd. V reklamních spotech tyto informace většinou doplňuje ještě obecnými prohlášeními o kvalitě vody, která je v povědomí zákazníka důležitým faktorem kvality výrobku. Zmínka o použitém kmenu kvasinek se buď neobjevuje vůbec, nebo jen výjimečně. Zákon údaje nevyžaduje, specifikace kmene může být složitá a povědomí zákazníka o významu kmene kvasnic pro sensorické vlastnosti piva je minimální. V převážně prvoplánově zaměřené marketingové strategii tak využití informací o kvasinkách není zajímavé.

#### 2 ROZBOR PROBLEMATIKY

Moderní analytické metody umožnily identifikovat přes 1000 látek ovlivňujících sensorický profil piva. Sloučeniny s největším dopadem na aroma a chuť piva jsou produkovány kvasinkami při hlavním kvašení. Sensoricky aktivní substance produkováné při hlavním kvašení mohou být rozděleny do pěti hlavních skupin: látky obsahující síru, organické kyseliny, vyšší alkoholy, karbonylové látky a těkavé estery. Různé kmeny kvasinek při tom produkují odlišná množství klíčových chuťových látek v závislosti na svém genetickém profilu [1].

**Key words:** *yeast strain, compressed yeast, storage of yeast, sensory character, beer*

#### 1 INTRODUCTION

When informing customers, beer producers logically concentrate on the data that have to be stated on the label, such as basic raw materials used, especially barley and hops, additives, etc. In commercial spots, general declarations on water quality are added to this information. In customer's mind, water is an important factor of product quality. The yeast strain used is not mentioned at all or very rarely. By the law, this information is not required, yeast strain specification can be difficult and the customer awareness of the significance of the yeast strain for sensory properties of beer is marginal. Thus the use of the information on yeast is not interesting in a predominantly purpose-oriented marketing strategy.

#### 2 PROBLEM ANALYSIS

Modern analytical methods allowed identifying more than 1000 substances influencing the sensory profile of beer. Compounds with greatest influence on beer aroma and taste are produced by yeast during primary fermentation. Sensorially active substances produced during primary fermentation can be divided into five main groups: sulphur-containing substances, organic acids, higher alcohols, carbonyl compounds and volatile esters. Various yeast strains produce various amounts of key flavours depending on the genetic profile [1].

Bezesporu jedním z hlavních témat je produkce těkavých esterů kvasinkami. Tyto látky hrají klíčovou roli v senzoričské kvalitě piva [2, 3, 4.]. Kromě obecně známých nejdůležitějších esterů jako ethylacetát, isoamylacetát a fenyl-ethylacetát se nověji věnuje pozornost tvorbě ethylesterů středněmolekulárních mastných kyselin, tzv. MCFA [Medium-Chain Fatty Acids] [5, 6, 7.]. I v tomto případě je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím jak celkový obsah esterů MCFA, tak vzájemný poměr jednotlivých zástupců v této skupině látek kmen kvasnic [8].

Pozornost je také věnována výběru kvasničného kmene z hlediska chuťové stability piva [9, 10], Kvasničný kmen může např. ovlivnit oxidativní degradaci hořkých látek při stárnutí piva [9]. Významnou úlohu hraje i metabolismus sloučenin obsahujících síru ve vztahu k oxidačně-redukčním vlastnostem piva atd. [10].

Vedle tvorby aromatických látek mají vlastnosti kvasničného kmene významnou roli i pro technologii výroby piva. Z výrobní praxe jsou obecně známé souvislosti s flokulací, stupněm a rychlostí prokvašení či citlivostí na změny teploty.

V moderních podmínkách výroby piva využívajících HGB se doporučuje výběr vhodného kmene kvasnic pro dosažení čisté chuti s přiměřeným obsahem esterů [11]. Výběr kmene je důležitý i pro volbu způsobu propagace kvasnic [12, 13]. Při kvašení v CKT se významně projevuje vysoká koncentrace rozpuštěného oxidu uhličitého v kvasicím médiu, která vede především k silné inhibici anabolických pochodů v kvasinkách. Méně významné jsou ovlivněny i katabolické pochody [14, 15]. Parciální tlak CO<sub>2</sub> ovlivňuje v první řadě koncentraci glykogenu ve sbíraných kvasnicích [16]. V tomto případě vztah k vlastnostem kvasničného kmene čeká na objasnění, podobně jako různá citlivost kmenů k širokému spektru stresových faktorů, jejichž výčet je předmětem řady sdělení, a které jsou rozhodující pro fyziologický stav následných kvasnic [14, 17].

Výběr vhodného kvasničného kmene a péče o jeho dokonalý fyziologický stav patří k nejdůležitějším faktorům pro řízení charakteru a chuti piva. To si velmi dobře uvědomovali naši předchůdci, kteří velmi pečlivě volili kmen kvasnic pro výrobu piva ve svém pivovaru.

Z té doby je v různých sbírkách uchovávan velký počet kulturních kmenů pivovarských kvasinek. Např. ve sbírce kvasnic, vedené v TU München-Weihenstephan, je k dispozici téměř 200 kmenů spodního kvašení a 10 kmenů pro svrchní kvašení. Přes tuto širokou paletu možností 80 % objednávek spodních kvasnic představuje v současnosti kmen č. 34, a pro výrobu svrchně kvašeného pšeničného piva je prakticky výlučně použit kmen č. 68 [18]. Obdobně sbírka VLB uchovává cca 100 kmenů [19] a sbírka Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského 131 různých kmenů. Také v České republice je pro výrobu piva využíván jen velmi omezený počet kvasničných kmenů. Kmen č. 7 dle sbírky RIBM v Plzeňském Prazdroji [komerčně nedostupný], kmen č. 2 v Budějovickém Budvaru a dominantní je v českých pivovarech kmen č. 95. Tato skutečnost může být jedním z důvodů postupné unifikace senzoričského profilu piv na trhu. Zejména malé pivovary bez vlastní propagační stanice jsou odkázány na nákup kvasnic z větších pivovarů bez možnosti volby kmene kvasnic podle svých představ. Ztrácí tak rozhodující faktor pro volbu charakteru piva.

Proto Výzkumný ústav pivovarský a sladařský zpracoval projekt zaměřený na realizaci linky na propagaci a lisování kvasnic, která umožní rozšířit nabídku násadních kvasnic zejména menším pivovarům díky dlouhé trvanlivosti a snadné transportovatelnosti lisovaných násadních kvasnic. Součástí projektu je testování klasických českých kmenů kvasnic z hlediska možnosti jejich uplatnění v moderních technologických podmínkách. Náplní tohoto sdělení jsou některé výsledky dosažené při řešení projektu.

### 3 POUŽITÉ ANALYTICKÉ METODY

Základní analytické rozborby byly prováděny podle Pivovarsko-sladařské analytiky a Analytiky EBC [20, 21].

Těkavé látky byly stanovovány plynovou chromatografií [22] s modifikacemi vypracovanými ve VÚPS pro větší efektivnost [dosud nepublikováno].

#### 3.1 Stanovení fyziologického stavu kvasnic průtokovou cytometrií

Stanovení glykogenu, DNA, granulometrie a velikosti buněk bylo prováděno na cytometru PARTEC typ PAS III, výrobce Partec G.m.b.H, SRN [23, 24].

Principem vyhodnocení je bodový, tzv. Dot plot diagram, který popisuje závislost dvou korelujících veličin, například velikosti buněk [podle FSC] na intenzitě fluorescence některé obarvené buněčné

Indisputably, the production of volatile esters by yeast is one of the topics. These substances play a key role in the sensory quality of beer [2, 3, 4.]. Besides generally known most important esters, such as ethyl acetate, isoamyl acetate and phenylethyl acetate, research is focused on the production of ethyl esters of medium-chain fatty acids (MCFA) [5, 6, 7.]. Also in this case, the yeast strain is the most important factor influencing both the overall content of MCFA esters and the relationship of individual representatives in this group of substances [8].

Attention is also paid to the selection of a yeast strain from the viewpoint of the sensory stability of beer [9, 10]. A selected yeast strain can influence for example the oxidative degradation of bitter substances during beer ageing [9]. An important role also plays the metabolism of sulphur-containing substances in relation to oxidation-reduction properties of beer, etc. [10].

In addition to the production of aromatic substances, the properties of the used yeast strain play an important role also for the technology of beer production. From production practice, connections with flocculation, degree and speed of fermentation or sensitivity to temperature changes are known.

Under modern conditions of beer production employing HGB, the selection of a suitable yeast strain is recommended to reach a pure taste of beer with an adequate ester content [11]. The strain selection is important also for the selection of yeast propagation [12, 13]. During fermentation in cylindro-conical fermenters, the high concentration of dissolved carbon dioxide in the fermenting medium takes effect, which leads primarily to a strong inhibition of anabolic processes in the yeasts. Catabolic processes are also influenced, but less significantly than the anabolic ones [14, 15]. The partial pressure of carbon dioxide primarily influences the concentration of glycogen in collected yeast [16]. In this case, the relation to the properties of the yeast strain needs to be clarified, similarly as the different sensitivity of the strains to the spectrum of the stress factors, listing of which is a subject of many communications, and which are decisive for the physiological condition of pitching yeast [14, 17].

The selection of a suitable yeast strain and the care of its perfect physiological condition is one of the most important factors for beer character and taste control. Our predecessors were well aware of this fact, who very carefully selected the yeast strain for beer production in their breweries.

From that time, a great number of brewing yeast cultures has been kept in various yeast libraries. For example, the yeast collection at TU München-Weihenstephan, nearly 200 strains for bottom fermentation and 10 strains for top fermentation are available. Despite the wide range of strains, 80 % of all orders for bottom fermentation strains are for strain No. 34 and for the production of top-fermented wheat beer strain No. 68 is used nearly exclusively [18]. Similarly, the VLB collection involves more than 100 strains [19] and the collection of the Research Institute of Brewing and Malting keeps 131 different strains. Also in the Czech Republic, only a limited number of yeast strains is used for beer production. Strain No. 7 according to the RIBM collection at Pilsner Urquell [commercially not available], strain No. 2 at Budweiser Budvar, and strain No. 95 dominating in Czech breweries. This fact can be one of the reasons of a gradual unification of beer profile on the market. Especially small breweries without their own yeast propagator are dependent on the purchase of yeast from bigger breweries without any possibility of yeast strain selection according to their expectations. In this way, they lose the decisive factor for the selection of beer character.

Therefore, the Research Institute of Brewing and Malting made a project aimed at the realization of a line for yeast propagation and compression, which would allow to expand the offer of pitching yeasts especially for smaller breweries thanks to long shelf life and easy transportability of compressed pitching yeasts. Part of the project is the testing of typical Czech yeast strains from the viewpoint of their application under modern technological conditions. Some results achieved with the project are the content of this communication.

### 3 ANALYTICAL METHODS USED

Basic analyses were carried out according to Brewing and malting analytics and EBC analytics [20, 21].

Volatile substances were determined by gas chromatography [22] with modifications developed by the Research Institute of Brewing and Malting for higher efficiency [not published yet].

#### 3.1 Determination of physiological condition of yeast by means of flow cytometry

Determination of glycogen, DNA, granulometry and cell size was

komponenty. Tento typ vyhodnocování umožňuje sledovat segmentaci populace dle stejných vlastností.

Hodnoceny jsou tyto parametry:

relativní distribuce velikosti částic ve formě histogramu **FSC**

relativní distribuce granularity částic ve formě histogramu **SSC**

relativní distribuce fluorescence různých vlnových délek **FL 1, ... FLn**.

### 3.2 Laboratorní testování kvasničných kmenů

Příprava kvasničného kmene: kmeny kvasnic uchovávané ve sbírce VÚPS na šikmých agarích byly propagovány v laboratoři běžným způsobem. Pro zakvašení bylo použito 3,0–3,1 g/l kvasnic, odstředěných 10 minut při frekvenci otáček 3 500 min<sup>-1</sup>.

Mladina: 12% světlá mladina pro testování byla odebírána z polo-provozní varny do sterilní nádoby za horka. Po zchlazení a sedimentaci kalů po dobu 12 hodin byla provzdušněna na koncentraci kyslíku 8 mg/l a zakvašena příslušným kmenem. U mladiny byla stanovena koncentrace extraktu, barva, pH, alfa-aminodusík, obsah kalů, dosažitelné prokvašení a provedena mikrobiologická kontrola.

Kvasné zkoušky byly prováděny v kvasných válcích o objemu 1 l, vybavených kalibrováním pro měření sedimentu. Po zakvašení byly kvasné válce umístěny do chladničky s teplotou prostředí 9 ± 0,5 °C. V průběhu kvašení byla 1x denně sledována teplota, zdánlivý extrakt, počet buněk ve vznohu, pH a objem sedimentovaných kvasnic. Kvašení bylo ukončeno, když úbytek zdánlivého extraktu za 24 hodin poklesl pod 0,3 %. Vzorky byly odebírány sterilní pipetou 10 cm pod hladinou v objemu 50 ml. Extrakt byl stanovován na zařízení PAAR.

Pro potvrzení výsledků byly pokusy opakovány.

### 3.3 Provozní kvašení

Pro jednorázové orientační porovnání kvasničných kmenů v provozních podmínkách byly připraveny 2 po sobě jdoucí várky z jedné šarže sladu. Objem kvasných kádí byl 230 hl. Mladina byla zakvašena 0,5 l husté suspenze kvasnic na 1 hl. Zákvasná teplota byla 10 °C, maximální 11,5 °C, délka kvašení 9 dnů. Sudování mladého piva probíhalo při 4 °C. Zrání piva trvalo 70 dnů při teplotě 2 °C. Hotové pivo nebylo kromě křemelinové filtrace nijak upravováno.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Významným problémem menších pivovarů, potýkajících se s nerovnoměrným harmonogramem várek, je doba skladování kvasnic. Ta je s ohledem na provzdušnění při sběru a praní kvasnic, nedostatku živin v suspenzi kvasnic někdy i při vyšších teplotách velmi omezená. I za optimálních podmínek sběru a uchovávání kvasnic se za přijatelnou dobu pro zachování dobrého fyziologického stavu považuje 24 hodin, s určitými výhradami 48 hodin. Pro delší periody vyvolané přerušením navařování může být řešením využití lisovaných kvasnic z nově realizované linky na propagaci a lisování kvasnic, kterou VÚPS instaloval ve spolupráci s Žateckým pivovarem, s. r. o. Produktem této linky jsou různé kmeny lisovaných kvasnic s obsahem sušiny 28 %. Pro hodnocení skladovatelnosti kvasnic jsou rozhodující změny fyziologického stavu během uchovávání. Pro tento účel byla použita průtoková cytometrie. V tomto směru jsme vycházeli z postupů využitých pro hodnocení fyziologického stavu kvasnic během

provedených prostřednictvím PARTEC cytometru, typu PAS III, vyrobeného firmou Partec G.m.b.H, Německo [23, 24].

Principem vyhodnocení je bodový diagram popisující závislost dvou korelujících veličin, například velikosti buňky [podle FSC] na intenzitě fluorescence zbarvené složky buňky. Tento typ vyhodnocení umožňuje sledovat segmentaci populace podle shodných vlastností.

Následující parametry jsou sledovány:

Relativní distribuce velikosti částic ve formě histogramu **FSC**

Relativní distribuce granularity částic ve formě histogramu **SSC**

Relativní distribuce fluorescence různých vlnových délek **FL 1, ... FLn**

### 3.2 Laboratory testing of yeast strains

Yeast strain preparation: Yeast strains kept at the RIBM yeast collection on slant agar were ordinarily propagated in the laboratory. After pitching, 3.0 to 3.1 g/l of yeast were used, which were centrifuged at 3,500 revolutions per a minute.

Hopped wort: 12% pale hopped wort for testing was hot-sampled from the pilot brewhouse into a sterile container. After cooling and sludge sedimentation (12 hours), the hopped wort was aerated to achieve the oxygen concentration of 8 mg/l and pitched with the selected yeast strain. The hopped wort was analysed for extract concentration, colour, pH, alpha-amino-nitrogen, sludge content, maximum degree of fermentation and microbiological control was performed.

Fermentation trials were carried out in 1 litre fermentation cylinder with calibrated space for sediment measurement. After pitching, the fermentation cylinders were placed into a refrigerator with a temperature of 9 ± 0,5 °C. During fermentation, temperature, apparent extract, cell count in the float, pH and the volume of sedimented yeast were monitored once a day. Fermentation was finished after the decrease in apparent extract was less than 0.3 % within 24 hours. Samples of 50 ml were taken by a sterile 10 cm pipette under the surface. The extract was analysed on the PAAR apparatus.

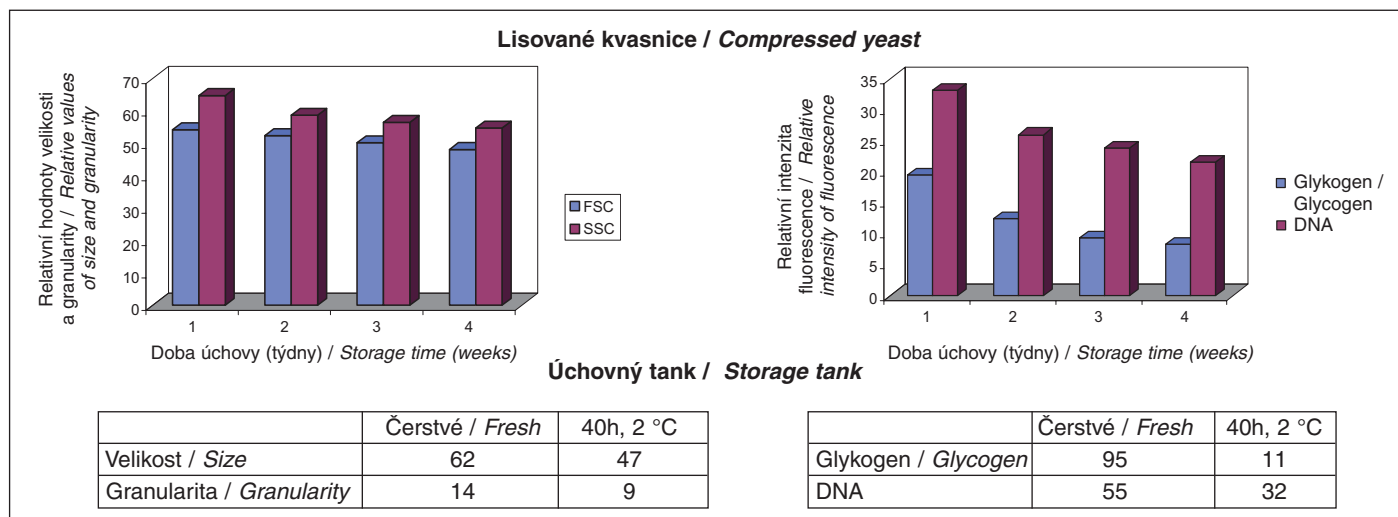
The tests were repeated to confirm the results.

### 3.3 Full-scale fermentation

For one-time approximate comparison of yeast strains under plant conditions, 2 consecutive brews from one barley batch were prepared. The volume of the fermenting tub was 230 hl. The hopped wort was pitched by 0.5 l of dense yeast suspension for 1 hl. The pitching temperature was 10 °C; the maximum temperature was 11.5 °C, with the time of fermentation of 9 days. The green beer was hosed at 4 °C. Beer maturation took 70 days at 2 °C. With the exception of kieselguhr filtration, the finished beer was not treated in any other way.

## 4 RESULTS AND DISCUSSION

One of the significant problems of smaller breweries facing irregular brewing schedules is the storage time of yeast. This time is very limited due to aeration during yeast collection and washing, lack of nutrient in the yeast suspension, sometimes also at higher temperatures. Also under optimum conditions of yeast collection and storage, 24 hours are considered as the acceptable time for the maintenance of good physiological conditions, 48 hours are accepted with rese-



Obr. 1 / Fig. 1 Změny fyziologického stavu kvasnic při skladování / Changes of physiological condition of yeast during storage

Tab. 1 Spektrum vlastností kvasných kmenů uchovávaných ve sbírce RIBM / *Spectrum of properties of yeast strains kept at RIBM collection*

	pH	Prokvašení / Degree of attenuation (%)	Sediment (ml)	SO <sub>2</sub> (mg/ml)	Diacetyl (μg/l)	DMS (μg/l)
Maximum	5,56	86,6	15,3	10,1	867	198
Minimum	4,08	3,9	1,0	3,4	12	11
Kmen č. 95 / Strain No. 95	4,49	82,4	9,0	7,4	263	23

Tab. 3 Parametry hotových piv z provozního testování / *Parameters of finished beers from full scale testing*

Kmen číslo / Strain No.	Pěnivost NIBEM / Foaming power NIBEM	pH	Hořkost / Bitterness	Čiřost / Clarity	E <sub>zd</sub>	Alkohol / Alcohol	P <sub>zd</sub>	CO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>
	s		j.h	j.EBC	%	% obj.	%	%	mg/l
6	308	4,52	22,5	0,95	3,1	4,25	72,14	0,36	6,5
95	267	4,48	23,95	0,51	2,75	4,44	75,28	0,4	8

E<sub>zd</sub> – extrakt zdánlivý / *Apparent extract*  
P<sub>zd</sub> – prokvašení zdánlivé / *Apparent attenuation*

Tab. 2 Vlastnosti vybraných kvasných kmenů ze sbírky RIBM / *Properties of selected yeast strains from the RIBM collection*

Kmen číslo / Strain No.	E <sub>dos</sub> -E <sub>zd</sub> (%)	MPB (mil/ml)	Využití amino-N / Amino-N utilization (%)	Diacetyl (μg/l)	Δ pH	Rychlost kvašení / Fermenta- tion speed (%/h)
3	0,54	140	59	102	1,34	0,0625
6	0,56	119	66	99	1,28	0,0710
8	0,83	130	54	450	1,24	0,0700
9	0,73	69	55	72	1,21	0,0679
11	1,65	124	59	150	1,19	0,0590
12	1,58	71	53	174	1,19	0,0596
26	1,48	126	58	194	1,2	0,0652
32	0,38	84	54	120	1,18	0,0654
98	1,12	114	55	265	1,11	0,0694

E<sub>dos</sub>-E<sub>zd</sub> – rozdíl dosažitelného a zdánlivého extraktu / *Difference between maximum and apparent extract*  
MPB – maximální počet buněk v kvasící mladině / *Maximum number of cells in fermenting hopped wort*  
Rychlost kvašení je vypočtena z úbytku extraktu mezi 48. a 96. hodinou kvašení / *The fermentation speed is calculated from the decrease in extract between 48th and 96th hour of fermentation*

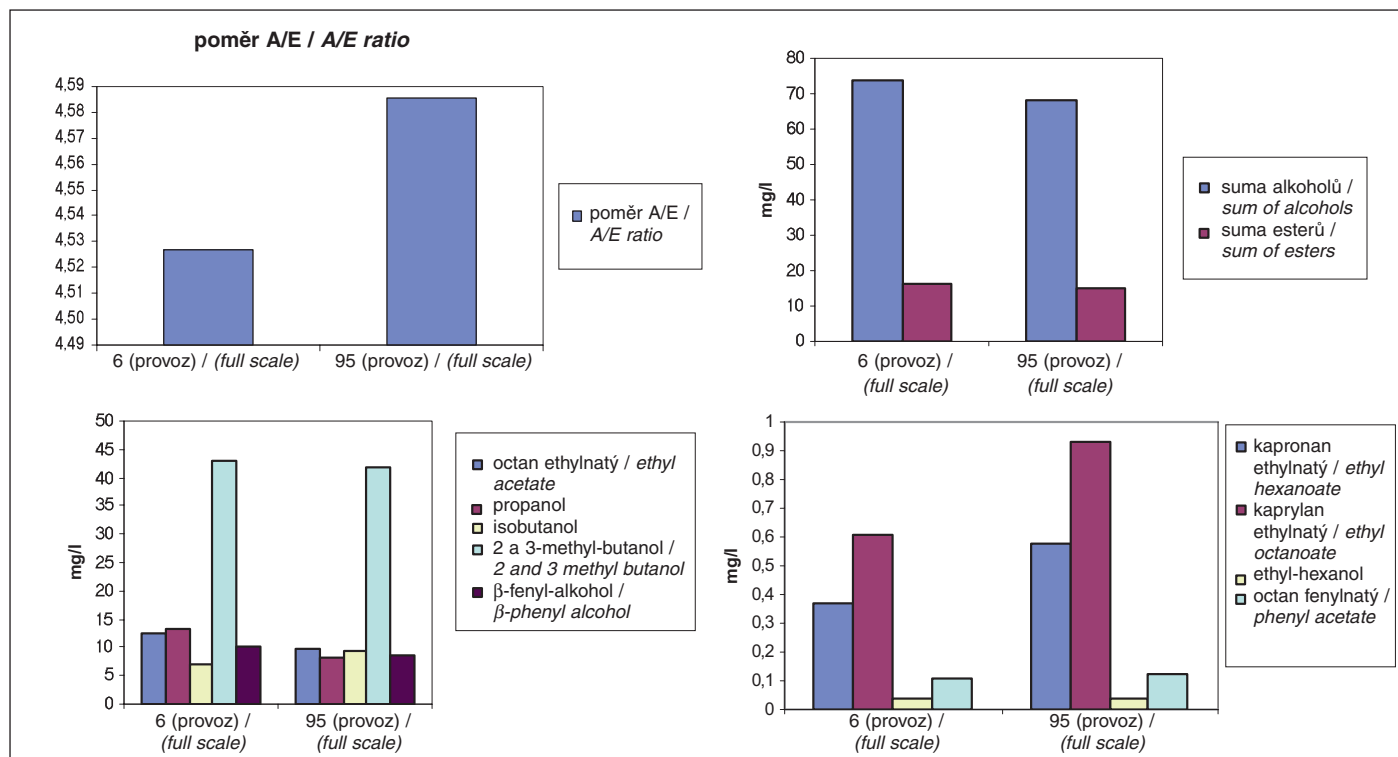
kvašení mladiny s různou koncentrací, kterou popisuje Chlup, H. P. a kol. [25]. Užší spektrum námi využitých parametrů vychází z našich současných možností.

Velikost buněk je známý a dobře představitelný parametr, granularita odpovídá jak rozptylu laserového paprsku způsobenému povrchovými vlastnostmi buňky, tak rozptylu paprsku způsobenému odrazem od vnitrobuněčných struktur. Pivovarské kvasinky podléhají během procesu kvašení změnám velikosti, které jsou typické pro každý kmen. Variabilita velikosti během kvašení je u kvasinek spodního kvašení od 2,5 μm do 22,0 μm. Na počátku kvašení je pozorován pokles plochy aktivního povrchu buněk, který souvisí s velkým počtem pučících kvasinek v tomto období. Pro optimální průběh kultivace je důležitá také velikost nově vzniklých dceřiných buněk. Mateřské buňky s velkými dceřinými buňkami, vznikající v exponenciální fázi růstu populace, jsou žádoucí, neboť velké buňky jsou schopné zahajovat buněčný cyklus téměř okamžitě, a to následně zkracuje dobu kultivace.

Základním parametrem, charakterizujícím výživu buněk, je obsah

rvations, too. For longer periods caused by the interruption of brewing, the use of compressed yeast from the newly built line for yeast propagation and compression, which was installed by the Research Institute of Brewing and Malting in co-operation with the Žatec brewery, Ltd. The products of this line are various strains of compressed yeasts with a dry matter content of 28 %. The changes of the physiological condition of the yeast during storage are decisive for the evaluation of the storage stability. Flow cytometry was used for the purpose of evaluation. Here, we proceed from the methods used for the evaluation of the physiological condition of yeast during the fermentation of hopped worts with different concentrations, as it is described by Chlup, H. P. et al. [25]. A narrow spectrum of parameters we used is based on our possibilities at this time.

The size of cells is a known and well imaginable parameter; granularity corresponds with both the scattering of the laser beam caused by the surface properties of the cell and the scattering of the beam caused by the reflection from intracellular structures. During the fermentation process, brewing yeast changes its size, which is



Obr. 2 / Fig. 2 Obsah alkoholů a esterů v provozně připravených pivech s kmeny č. 6 a 95 / *Content of alcohols and esters in full-scale brewed beers with strains No. 6 and 95*

glykogenu. Je to zásobní polysacharid kvasinek a slouží buňce jako zdroj energie i uhlíku pro syntézu metabolických intermediátů. Jeho obsah přesahuje 40 % sušiny buňky. Obsah glykogenu v kvasinkách je ovlivňován podmínkami při fermentaci, skladování kvasnic a také závisí na vlastním kmenu kvasinek. V průběhu skladování mezi jednotlivými nasazeními kvasinek se spotřebovává až 40 % tohoto zásobního sacharidu.

Množství obsaženého glykogenu v kvasinkách při nasazení ovlivňuje rychlost růstu kvasinek po nasazení a celkový výkon kvašení. Obsah glykogenu v kvasinkách rychle klesá po nasazení do mladiny s kyslíkem (až na 10 % sušiny buňky), kdežto úbytek sacharidů obsažených v mladině je zanedbatelný. Glykogen tedy slouží jako zdroj energie pro syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin [12].

Obsah glykogenu při nasazení ukazuje potenciál kvasinek syntetizovat tyto nezbytné sloučeniny plazmatické membrány, které jsou nepostradatelné při správném dělení a růstu kvasinek.

Metody průtokové cytometrie pro stanovení jednotlivých fází buněčného cyklu vycházejí z poznatku, že DNA v buňkách lze po enzymatickém odstranění RNA barvit kvantitativně fluorescenčními barvivy. Intenzita fluorescence poté odpovídá obsahu DNA v buňce. Pro stanovení koncentrace DNA se nejčastěji používají fluorescenční značky. Za předpokladu, že mezi intenzitou emitované fluorescence a obsahem DNA v buňkách platí přímá úměra, se buňky s dvojnásobnou intenzitou emitované fluorescence vyhodnocují jako buňky v G2 a M-fázi buněčného cyklu. Bylo například zjištěno, že při nasazování pivovarských kvasnic k hlavnímu kvašení je výhodné zakvašovat kulturou, ve které je podíl buněk v G2 a M-fázi maximální. Po nasazení takových kvasnic do provzdušněné mladiny se buňky rychle rozmnoží a přejdou do produkční fáze (G1-fáze), kdy má populace nízkou aktivitu množení, ale vysokou metabolickou aktivitu projevující se rychlým úbytkem extraktu a tvorbou ethanolu. Výsledný efekt se projeví kratší dobou kvašení.

Získané výsledky ilustruje obr. 1. Je zřejmé, že výsledky zejména u glykogenu a DNA zjištěné u lisovaných kvasnic po 3 až 4 týdnech odpovídají hodnotám zaznamenaným v suspenzi kvasnic po 40 hodinách. Velikost buněk a jejich granularita se u lisovaných kvasnic prakticky nemění, což znamená, že je v tomto případě zachováván počáteční stav v době sběru a zpracování kvasnic. Naproti tomu v suspenzi se projevuje v obou případech výrazný pokles: u velikosti buněk o 24 % a u granularity o 36 %. Z toho lze usuzovat, že metabolické pochody v buňkách dále pokračují bez přístupu k živinám. Tyto výsledky i zkušenosti s praktickým používáním lisovaných kvasnic nás opravňují k poskytování záruky kvality tři týdny pro skladování při

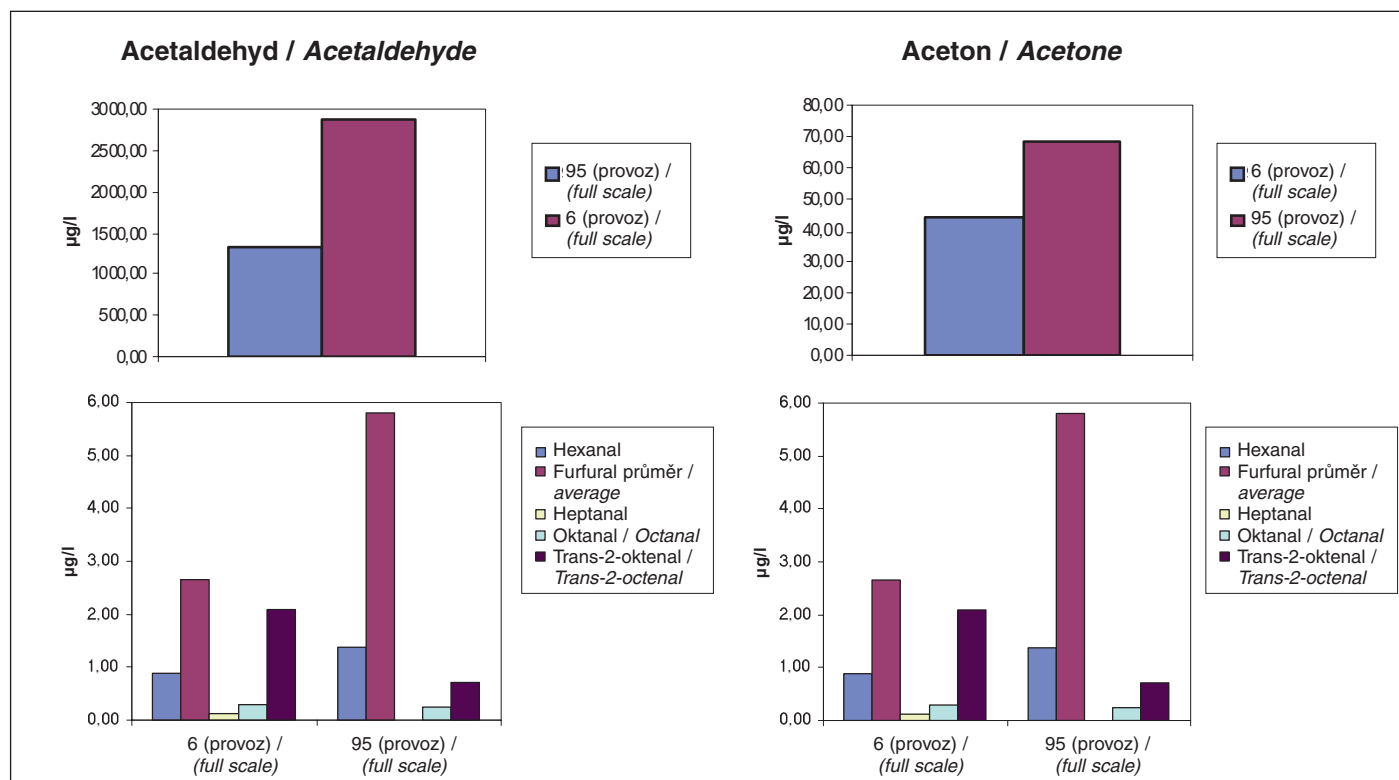
specifické pro každý kmen. The variability of size during fermentation employing bottom fermentation yeasts ranges from 2.5  $\mu\text{m}$  to 22.0  $\mu\text{m}$ . At the beginning of fermentation, decrease in the area of the active cell surface can be observed, which can be related to a high number of budding yeast cells at this stage. The size of newly created daughter cells is important also for the optimum course of cultivation. Mother cells with big daughter cells created at the exponential stage of population growth are desirable, since the big cells are capable of starting the cell cycle almost immediately, which makes the cultivation time shorter.

The basic parameter characterising cell nutrition is the content of glycogen. This is a reserve polysaccharide of yeasts and is used as a source of energy and carbon for the synthesis of metabolic intermediates. Its content exceeds 40 % of the cell dry matter. The glycogen content in yeast is influenced by the conditions during fermentation, storage and also depends on the yeast strain itself. During storage between individual pitching cycles, up to 40 % of the reserve polysaccharide are used up.

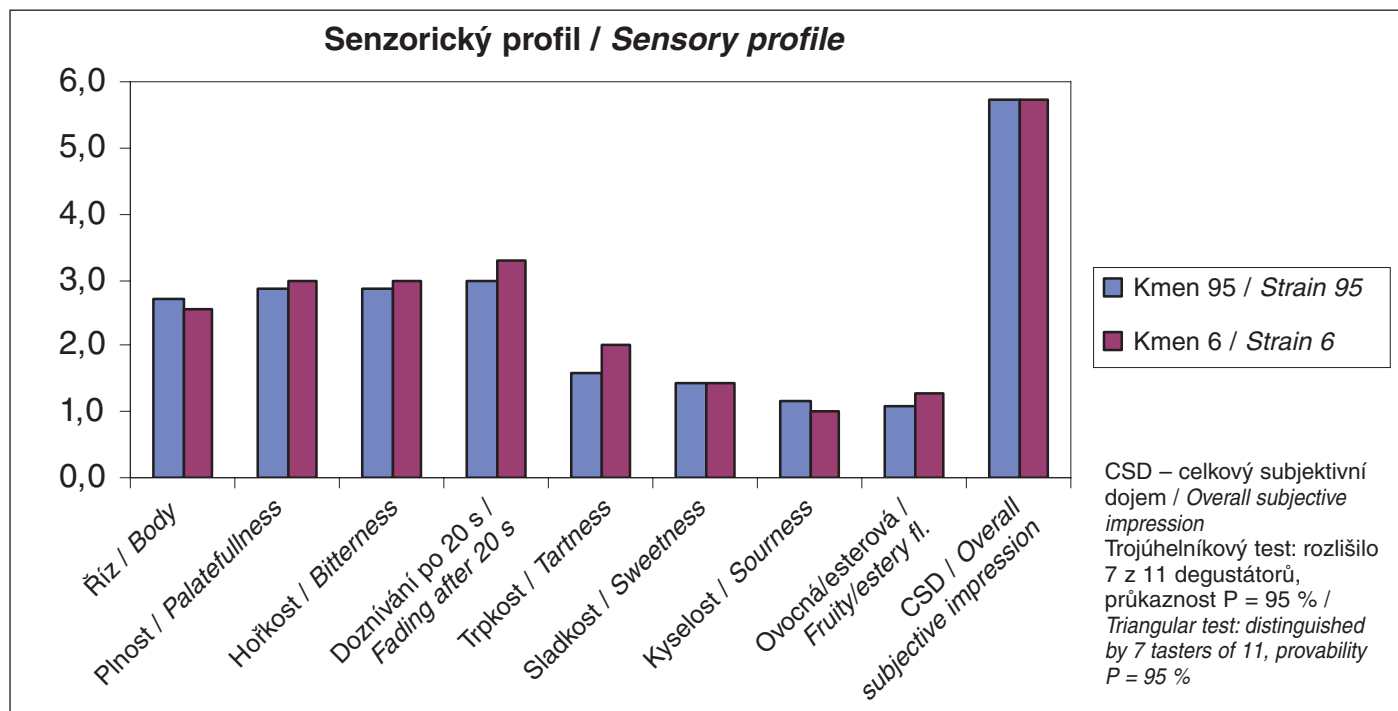
The amount of glycogen contained in the yeasts at the pitching stage influences the speed of their growth after pitching and the overall performance of fermentation. The glycogen content decreases rapidly after pitching into the hopped wort with oxygen (up to 10 % of cell dry matter), while the decrease of saccharides in the hopped wort is insignificant. Thus glycogen serves as a source of energy for the synthesis of sterols and unsaturated fatty acids [12].

The glycogen content at pitching shows the yeast potential to synthesise these indispensable compounds of the plasma membrane, which are necessary for the correct division and growth of yeast cells.

The methods of flow cytometry for the determination of the individual phases of the cell cycle are based on the findings that the DNA present in the cells can be dyed quantitatively by fluorescent dyes after enzymatic removal of RNA. The intensity of fluorescence equals to the content of DNA in the cell. Fluorescent markers are most frequently used for the determination of DNA concentration. Provided that there is a direct proportion between the intensity of emitted fluorescence and DNA content, the cells with a doubled intensity of emitted fluorescence are evaluated as the cell at G2 and M-phase of the cell cycle. It was found, for example, that it is advantageous to pitch with a yeast culture with the maximum proportion of the cells in the G-1 and M-phases, when applying brewing yeast for primary fermentation. After application of such yeast into aerated hopped wort, the cells propagate fast and go over to the production phase (G1-phase), where the population activity is low, but on other hand, the metabolic activity is high, which shows a fast decrease of extract and



Obr. 3 / Fig. 3 Obsah vybraných karbonylových látek v provozních pivech připravených s kmeny č. 6 a 95 / Content of selected carbonyl compounds in full-scale brewed beers prepared with strains No. 6 and 95



Obr. 4 / Fig. 4 Senzorické hodnocení provozních piv / Sensory evaluation of full-scale brewed beers

teplotě do 2 °C. Pro rychlý start hlavního kvašení je vhodné lisované kvasnice suspendovat v malém množství předku vychlazeného na 10–12 °C. Aktivace kvasnic je velice rychlá a je možno je s výhodou použít k zakvašení mladiny po dokončení várky.

Díky velmi dobré skladovatelnosti a pevné konzistenci lisovaných kvasnic je poměrně jednoduchý transport i do vzdálených teritorií. Máme zkušenosti s dodávkami např. na Island, do Vietnamu, Albánie, Tunisu atd. Kvalitu a dobré zkušenosti s těmito kvasnicemi nám potvrzují opakované objednávky od našich odběratelů. Lisované kvasnice se osvědčily i při testech v rámci řešení výzkumných úkolů. Umožňují zajištění standardního průběhu kvašení i v dlouhých sériích zkoušek.

Jak již bylo uvedeno, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský uchovává ve své mezinárodně registrované sbírce cca 130 různých kmenů kvasinek. Široké spektrum jejich vlastností ukazuje tab. 1, která uvádí maximum a minimum sledovaných parametrů v porovnání s kmenem č. 95, nejrozšířenějším v českých pivovarech. Velmi široké rozpětí hodnot vybraných ukazatelů pivovarského technologa určitě upoutá a navodí pocit možnosti jednoduchého řešení jeho problémů. Výběr vhodného kmene pro zvolený účel ale není jednoduchý. To ilustruje tab. 2, porovnávající výsledky pro 9 různých kmenů, získané z laboratorního kvašení v kvasných válcích o efektivním objemu 1 l. U kmenů č. 8, 12, 26 a 98 byla zjištěna vysoká tvorba diacetylů. U kmenů č. 11, 12, 26 a 98 velký rozdíl mezi dosažitelným a zdánlivým prokvašením a u kmenů 11 a 12 nejpomalejší kvašení hodnocené na základě úbytku extraktu mezi 48. a 96. hodinou kvašení. Příznivé výsledky z pohledu možnosti uplatnění v běžných technologických podmínkách tak vykazují kmeny 3, 6, 9 a 32.

Příklad porovnání kmene č. 6 v provozním měřítku s nejrozšířenějším kmenem č. 95 na mladině ze stejné partie sladu uvádí tab. 3. S ohledem na skutečnost, že kmen č. 6 je klasickým českým kmenem, nepřekvapuje nižší stupeň prokvašení. Naproti tomu zřetelně lepší pěnivost i při nižším obsahu oxidu uhličitého u vzorku piva připraveného s kmenem č. 6 je překvapující, a bude vyžadovat potvrzení v další práci. Totéž platí o rozdílu v čirosti hotového piva.

Zjištěné difference v obsahu těkavých látek ukazují obr. 2 a 3. Je sice možné vysledovat odchylky v poměru alkoholů k esterům, ve složení jednotlivých esterů i karbonylových látek, rozdíly však jsou z hlediska prahových koncentrací vnímání jen málo významné. To platí i pro vyrovnaný senzorický profil obou piv (obr. 4). Zásadní rozdíl se však projevil při hodnocení trojúhelníkovým testem. Ten prokázal rozdílnost testovaných vzorků piv na hladině pravděpodobnosti 95 %. To samozřejmě není nijak překvapující. Je velmi dobře známo, že vzájemné působení senzoricky významných látek i pod prahovou koncentrací se může výrazně projevit v konečném charakteru piva [26].

with ethanol production. A result of this is a shorter time of fermentation.

The results are shown on Fig. 1. It is obvious that the results especially for glycogen and DNA found for compressed yeast after 3 to 4 weeks comply with the values recorded for the yeast suspension after 40 hours. For compressed yeast, the size of the cells and their granularity practically does not change, which means in this case that the initial condition at the time of yeast collection and processing is maintained. On the other hand, a significant decrease in the suspension can be observed for both cases, by 24 % for cell size and 36 % for granularity. It can be concluded from this fact that the metabolic processes in cells go further without any access to nutrients. These results and experiences with practical use of compressed yeast entitle us to grant quality assurance of three weeks, when the yeast is stored at a temperature to 2 °C. For a fast start of primary fermentation, it is advantageous to suspend compressed yeast in a small amount of first wort cooled down to 10 to 12 °C. The yeast activation is very fast and it can be used for the pitching of the hopped wort after the brew is finished.

Owing to a good storage stability and solid consistency of compressed yeast, transportation is relatively easy also for long distances. We have rich experience with supplies for example to Island, Vietnam, Albania, Tunis, etc. The quality and good experience with the yeast are confirmed by repeating orders from our customers. Compressed yeast has did well also in the tests within the frame of solving research projects. The yeast allows to ensure a standard course of fermentation also for a long series of trials.

As it has been already mentioned, the Research Institute of Brewing and Malting keeps in its internationally registered yeast strain collection about 130 various strains. A wide spectrum of their properties is given in Tab. 1, stating the maximum and minimum of monitored parameters as compared to strain No. 95, the most frequently used strain in Czech breweries. A wide range of values of selected parameters certainly attracts the attention of technical brewers and creates a feeling of a possibility to simply resolve their problems. But the selection of a suitable yeast strain for the selected purpose is not easy. This is shown in Tab. 2 comparing the results for 9 various strains gained from laboratory fermentation in fermentation cylinders with an effective volume of 1 litre. A high level of diacetyl formation was determined for strains No. 8, 12, 26 and 98. With strains No. 11, 12, 26 and 98, a high difference between the maximum degree of fermentation and apparent attenuation was found. Strains No. 11 and 12 showed the slowest rate of fermentation as evaluated on the basis of the decrease of extract between the hours of 48 and 96 of fermentation. From the viewpoint of the application under common technological conditions, favourable results show strains 3, 6, 9 and 32.

An example of the comparison of strain No. 6 under full-scale con-

## 5 ZÁVĚR

Kmen kvasnic je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících jak senzorický charakter piva, tak technologii jeho výroby. Volba optimálního kmene pro konkrétní podmínky a cíle je vždy velmi důležitým strategickým rozhodnutím, které může ovlivnit nejen uplatnění výrobku na trhu, ale i ekonomiku jeho výroby.

Odměnou za toto složité rozhodování je možnost zvýraznit charakter piva v dnešní postupující unifikaci, což je na trhu jednoznačnou výhodou.

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., má v současnosti technické možnosti i informace pro spolupráci při řešení tohoto složitěho problému.

## Poděkování

Práce byla umožněna těmito granty:

Výzkumný záměr MSM6019369701 „Výzkum sladařských a pivovarských surovin a technologií“ a

Projekt MPO č. 2A-2TP1/031 „Výzkum technologií a příprava unikátní linky pro rozkvašování historických kmenů pivovarských kvasnic pro průmyslové využití“.

*Lektoroval (Reviewed by) Ing. Petr Košin, Budějovický Budvar, n. p.  
Do redakce došlo 4. 12. 2008*

## Acknowledgement

Presented results were acquired with support of these grants:

Research Plan, code MSM6019369701 “Research of malting and brewing raw materials and technologies”

Project MPO No. 2A-2TP1/031 “Research of technologies and preparation of a unique line for fermentation of historical strains of brewing yeasts for industrial purposes”.

## Literatura / References

1. Van Laere, Stijn D. M., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M., Vandino, P., Delvaux, F. R.: Formation of higher alcohols and their acetate esters. *Cerevisia* **33**, 2008, 65–81.
2. Debourg, A.: Yeast flavor metabolites. *Eur. Brew. Conv. Monograph* **28**, 2000, 60–73.
3. Kruger, L.: Yeast metabolism and its effect on flavor: part I. *Brew. Guardian* **127**, 1998, 24–26.
4. Kruger, L.: Yeast metabolism and its effect on flavor: part II. *Brew. Guardian* **127**, 1998, 27–30.
5. Dufour, J.-P., Malcorps, P., Silcock, P.: Control of esters synthesis during brewery fermentation. 2003, 213–313. In Smart, K. (ed) *Brewing Yeast Fermentation Performance*, vol.2, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
6. Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R.: Parameters affecting ethyl ester productions by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2008, 454–461.
7. Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M.: The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acids ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Biol. Chem.* **281**, 2006, 4446–4456.
8. Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R.: Ethyl ester production during brewery fermentation: a review. *Cerevisia* **33**, 2008, 82–90.
9. Guido, L. F., Rodrigues, P. G., Rodrigues, J. A., Goncalves, C. R., Barros, A. A.: The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavor stability: an industrial approach. *Food Chemistry* **87**, 2004, 187–193.
10. Van Opstaele, F., De Rouck, G., De Ridder, M., Albrecht, Ch., De Cooman, L., Aerts, G.: Potential impact of yeast strain selection on the flavor stability of beer. *Cerevisia* **31**, 2006, 70–77.
11. Meilgaard, M.: Effects on flavor of innovations in brewery equipment and processing. *Ferment*, 2000(4/5), 10–17.
12. Novak, J., Basarova, G., Teixeira, J. A., Vicente, A. A.: Monitoring of brewing yeast propagation under aerobic and anaerobic conditions employing flow cytometry. *J. Inst. Brew.* **113**, 2007, 249–255.
13. Lawrence, S. J., Smart, K. A.: Impact of CO<sub>2</sub>-induced anaerobio-

ditions with the most frequently used strain No. 95 with the hopped wort brewed from the same barley batch is given in *Tab. 3*. With respect to the fact that strain No. 6 is a typical Czech strain, a lower degree of attenuation is not surprising. Contrary to this, a significantly better foaming power also with a lower content of carbon dioxide in the beer sample prepared with strain No. 6 is surprising, which will have to be confirmed by further research. The same applies to the difference in the clarity of finished beer.

The differences found in the content of volatile substances are shown on *Fig. 2* and *3*. It is possible to find out the deviations in the alcohol/ester proportion, in the composition of individual esters as well as carbonyl compounds, but these differences are considered to be insignificant from the viewpoint of threshold concentrations of perception. The same is valid for the balanced sensory profile of both beers (*Fig. 4*). But a fundamental difference was found during the evaluation by means of the triangular test. The test proved the difference of tested beer samples with the probability level of 95 %. Naturally, this is not that surprising. It is known very well that the interaction of sensorially important substances being present even under the threshold concentration can significantly influence the final character of beer [26].

## 5 CONCLUSION

The yeast strain used is one of the most important factors influencing both the sensory character of beer as well as the technology of its production. The selection of the optimum yeast strain for concrete conditions and objectives always represents an important strategic decision, which can influence not only the realization of the product on the market, but also the economy of its production.

A reward for this complicated decision-making is the possibility to accentuate the character of beer in today's advancing unification, which is an unequivocal advantage on the market.

The Research Institute of Brewing and Malting, Plc. has at present time a technical background and possibilities as well as information for the co-operation and solution search for this complex problem.

*Translated by Ladislav Kábrt*

- sis on the assessment of brewing yeast flocculation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **65**, 2007, 208–213.
14. Mönch, D., Krüger, E., Stahl, U.: Wirkung von Stress auf Brauerieihafen. *Monatschr. Brauwiss.* **48**, 1995, 288–299.
15. Kruger, L., Pickerell, W., Axcell, B.: The sensitivity of different brewing yeast strains to carbon dioxide inhibition: fermentation and production of flavor-active volatile compounds. *J. Inst. Brew.* **98**, 1992, 133–138.
16. Zufall, C., Kunerth, S., Tietje, N.: Beeinflussung der Hefevitalität durch physikalischen Druck. *Monatschr. Brauwiss.* **53**, 2000, 44–49.
17. Gibbon, B. R., Lawrence, S. J., Leclair, J. P. R., Powell, Ch. D., Smart, K. A.: Yeast response to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 2007, 535–569.
18. Englmann, J.: Hefestämmen und Biergeschmack. *Brauindustrie* **84**(2), 1999, 75–78.
19. Hinrichs, J.: Pure yeast cultures for different types of beer. *Brauerei Forum-VLB International*, 2007, 10–11.
20. EBC Analysis Committee: *Analytica-EBC*, Verlag Hans Carl Göttinger-Fachverlag, Nürnberg, 1998.
21. Basařová, G. et al.: *Pivovarsko-sladařská analytika*, I. vydání, Merkant, Praha, 1992.
22. Brautechnische Analysenmethoden, Band III, 2. Auflage, MEBAK, Freising-Weihenstephan, 1996.
23. Huter, K. J., Remor, M., Miller, S.: Biomonitoring in Praxis mit Fluoreszenzoptischen Verfahren. VII. Mitteilung.: Untersuchungen zur flusszytometrischen Bestimmung des Glykogengehaltes der Betriebshefe. *Monatschr. Brauwiss.* **53**, 2000, 68–76.
24. Huter, K. J.: Anwendungsmöglichkeiten der Durchflusszytometrie für brauereibiologische Fragenstellungen. Teil IV: Ploidiegradbestimmung und simultane Messung des DNS- und Proteingehaltes. *Brauwissenschaft* **32**, 1979, 43–47.
25. Chlup, P. H., Wang, T., Lee, E. G., Stewart, G. G.: Assessment of the Physiological Status of Yeast during High- and Low-Gravity Wort Fermentations Determined by Flow Cytometry. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **44**, 2007, 286–295.
26. Meilgaard, M. C.: Flavor Chemistry of Beer. Flavor interaction between principal volatiles. *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. Am.* **12**, 1975, 107–117.