

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ AKTIVITU INVERTASY BĚHEM KVAŠENÍ, DOKVAŠOVÁNÍ A V HOTOVÉM PIVU

FACTORS AFFECTING INVERTASE ACTIVITY DURING BEER BREWING, LAGERING AND IN THE FINISHED PRODUCT

JIŘÍ ŠROGL¹, HANA VERNEROVÁ², LENKA MATASOVÁ³, KAREL SIGLER⁴

¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague 2*

² Plzeňský Prazdroj, a.s., Plzeň, U Prazdroje 64/7, 304 97 Plzeň/ *Pilsner Urquell, PLC, U Prazdroje 64/7, 304 97 Pilsen*, e-mail hana.vernerova@pilsner.sabmiller.com

³ Katedra chemie, Pedagogická fakulta, Západočeská universita, Plzeň / *Department of Chemistry, Faculty of Education, University of West Bohemia in Pilsen*

⁴ Mikrobiologický ústav AVČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 / *Institute of Microbiology CAS, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4*, e-mail sigler@biomed.cas.cz

Šrogl, J. – Vernerová, H. – Matasová, L. – Sigler, K.: Faktory ovlivňující aktivitu invertasy během kvašení, dokvašování a v hotovém pivu. *Kvasny Prum.* 53, 2007, č. 5, s. 134–138.

Článek se zabývá vlivem teploty, praní kvasnic a různých varných technologií (klasický proces, technologie CKT) na aktivitu invertasy během kvašení, zrání a v hotovém pivu.

Během dokvašování při klasickém procesu při teplotě 1,0–4,5 °C i v přetlačných tancích se aktivita invertasy (3,4–3,5 µkat/l) výrazně nemění. Zvyšuje se (až na 5,4 µkat/l), jestliže dokvašování probíhá při teplotě 22–24 °C, a současně dochází ke zvyšování hladiny FAN jako indikátoru buněčné lýze. U CKT procesu bylo zjištěno, že prané kvasnice uvolňují do hotového nepasterovaného piva méně invertasy než neprané, a jsou tedy zřejmě v lepším fyziologickém stavu. Pivo vyrobené s použitím čistěných kvasnic bylo senzorycky hodnoceno většinou příznivěji. Množství uvolňované invertasy se také zvyšuje s opakovaným nasazováním kvasnic. Hladina invertasy v pivu po celou dobu dokvašování je konstantní a buňky během tohoto procesu nelyzují. Při použití technologie CKT je hladina invertasy v hotovém pivu podobná jako u klasické technologie, vykazuje však větší variabilitu, zřejmě jako důsledek méně intenzivní homogenizace jednotlivých partií piva.

Šrogl, J. – Vernerová, H. – Matasová, L. – Sigler, K.: Factors affecting invertase activity during beer brewing, lagering and in the finished product. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 5, p. 134–138.

The article concerns the effect of temperature, yeast washing and different brewing technologies (classical process, CCT technology) on invertase activity during main fermentation, secondary fermentation and in finished beer.

During secondary fermentation in the classical process at 1,0–4,5 °C, as well as in the bright beer tanks, invertase activity (3,4–3,5 µkat/l) does not perceptibly change. It increases (up to 5,4 µkat/l) when the secondary fermentation proceeds at 22–24 °C, with a concomitant increase in the level of FAN as an indicator of cell lysis. As found in the CCT process, washed yeast releases into the finished unpasteurized beer less invertase than unwashed one and is thus obviously in a better physiological state. Beer produced with washed yeast was also evaluated as being sensorially superior. The amount of released invertase also increases with repeated yeast pitching. The activity of invertase in beer during secondary fermentation is constant throughout and the cells do not lyse during this process. When using CCT technology, the activity of invertase in filtered beer is similar to that found during the classical brewing process but exhibits a higher variability, obviously as a result of a less intensive blending of individual beer lots.

Šrogl, J. – Vernerová, H. – Matasová, L. – Sigler, K.: Faktoren, die die Invertaseaktivität während der Gärung, der Nachgärung und im fertigen Bier beeinflussen. *Kvasny Prum.* 53, 2007, Nr. 5, S. 134–138.

Der Artikel behandelt den Einfluss von Temperatur, Hefewäsche, wiederholter Hefezugabe sowie verschiedenen Gärungstechnologien (klassische Gärung, zylindrisch-konische Gärtanks, ZKG) auf die Invertaseaktivität während der Gärung, während Nachgärung und im fertigen Bier.

In klassischen Prozessen bei 1,0–4,5 °C, wie auch in Drucktanks ändert sich während der Nachgärung die Invertaseaktivität nicht wesentlich (3,4–3,5 µkat/L). Findet die Nachgärung bei einer Temperatur von 22–24 °C statt, steigt die Aktivität bis auf 5,4 µkat/L bei erhöhter Freisetzung freien Aminostickstoffs als Indikator der Zellyse.

Bei ZKG-Prozessen zeigte sich, daß gewaschene Hefe weniger Invertase ins fertige unpasteurisierte Bier freisetzt als ungewaschene, was offensichtlich auf einen besseren physiologischen Zustand schließen läßt. Das mit gewaschener Hefe hergestellte Bier ist auch sensorisch besser zu bewerten. Die Aktivität der freigesetzten Invertase steigt auch bei wiederholter Hefezugabe. Der Invertasespiegel im Bier ist während der gesamten Nachgärung konstant und es findet während dieses Prozesses keine Zellyse der Hefezellen statt. Bei der ZKG-Technologie liegt der Invertasegehalt im fertigen Bier ähnlich wie beim klassischen Prozess, zeigt jedoch größere Schwankungen auf, die einer weniger intensiven Homogenisierung der einzelnen Bierpartien zugeschrieben werden können.

Шрогл, Й. – Вернерова, Г. – Матасова, Л. – Сиглер, К.: Факторы влияющие на активность инвертасы в процессе брожения, созревания и в готовом пиве. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 5, стр. 134–138.

Статья занимается влиянием температуры, промывки дрожжей и разных процессов варки (классический, технология ЦКТ), на активность инвертасы в процессе брожения, созревания и в готовом пиве.

В ходе дображивания в классической технологии при температуре 1,0–4,5 °C активность инвертасы (3,4–4,5 µkat/L), явно не меняется. Возрастает (до 5,4 µkat/L), если созревание происходит при температуре 22–24 °C, и одновременно поднимается уровень FAN как индикатора автолиза клеток. В технологии ЦКТ было установлено, что промытые дрожжи выделяют в готовое не пастеризованное пиво менее инвертасы чем непромытые дрожжи – значит у них видимо лучше физиологическое состояние. Пиво произведенное с применением промытых дрожжей было при дегустации оценивано большинством более благоприятно.

Количество выделенной инвертасы поднимается тоже с многократным применением дрожжей. Уровень инвертасы в пиве в течении дображивания является постоянной и клетки в течении этого процесса не автолизуют. При применении технологии ЦКТ уровень инвертасы в готовом пиве напоминает уровень при применении классической технологии, но показывает более высокую вариабельность, по-видимому в результате менее интенсивной гомогенизации отдельных партий пива.

Klíčová slova: aktivita invertasy, teplota, prané a neprané kvasnice, opakované nasazování, klasické kvašení, technologie CKT

Key words: invertase activity, temperature, washed and unwashed yeast, repeated pitching, classical fermentation, CCT technology

1 ÚVOD

Činnost kvasnic je rozhodující pro složení i senzorické vlastnosti hotového piva. Vyrobená mladina během fermentace mění své složení, protože její složky jsou kvasnicemi metabolizovány za vzniku charakteristických látek. Aby kvašení proběhlo žádoucím způsobem, je nutno, aby kvasnice byly v dobrém fyziologickém stavu, který je vedle složení mladiny základní podmínkou dosažení standardního výrobku.

Posuzování fyziologického stavu kvasnic se dříve omezovalo na znaky, které bylo možno posuzovat vizuálně (sedimentace, vzhled sbíraných kvasnic, vzhled kvasinek pod mikroskopem apod.). Pokrokem bylo barvení mrtvých buněk methylenovou modří nebo deriváty fluoresceinu [1], které ovšem postižuje pouze zastoupení mrtvých buněk v kultuře (viabilitu). V mnoha případech jsou však buňky kvasnic v důsledku působení stresových faktorů sice živé, ale mají sníženou metabolickou schopnost, tedy sníženou vitalitu. Fermentace zahrnující buňky se sníženou vitalitou [1] může vyústit ve změny produkovaných metabolitů, a tedy i nežádoucí změny hotového výrobku.

Posuzování fyziologického stavu kvasnic se stalo aktuálním zejména v souvislosti se změnami technologie, a byla mu věnována značná pozornost [2–6]. Metody posuzování vitality pivovarských kvasnic zahrnují stanovení hladiny důležitých metabolitů a zásobních látek [2], stanovení intenzity metabolických a bioenergetických pochodů probíhajících na buněčné membráně [3–5] a stanovení aktivity některých důležitých enzymů [6].

Významným enzymem, který je vázán na buněčnou stěnu kvasnic, je invertasa (β -D-fruktofuranosidasa), která štěpí sacharosu ze živného prostředí na oba monosacharidy, tj. glukosu a fruktosu, před jejich transportem do nitra buňky. Tento pochod je velmi rychlý (řádově minuty), neboť jedna forma invertasy je lokalizována v mannan-proteinovém komplexu buněčné stěny a v periplasmatickém prostoru mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou. Během kvasného procesu se invertasa v malém množství uvolňuje do prostředí a její aktivitu je možno vždy stanovit v hotovém nepasterovaném pivu (tj. v nepřítomnosti kvasničných buněk).

V sérii pokusů prováděných v Plzeňském Prazdroji v „klasických“ výrobních podmínkách v roce 1987 jsme stanovili aktivitu invertasy uvolněné z kvasnic do piva a sledovali jsme, jak je tato aktivita ovlivněna teplotou a její možnou souvislost s autolýzou kvasnic [7]. Uvolňování invertasy do roztoku by mohlo být ovlivněno dalšími stresovými faktory, např. hydrostatickým tlakem, složením surovin, provzdušněním mladiny atd., a stupeň uvolňování enzymu z buněk by tak mohl poskytnout užitečnou informaci o tom, zda se kvasničné buňky během kvašení a dokvašování setkávají s nepříznivými metabolickými podmínkami. Pro stanovení, zda a jak hladina invertasy v kvasici kultuře, během dokvašování a v hotovém pivu závisí na použité technologii, jsme sledovali v dalších sériích pokusů v letech 2003–2006 aktivitu invertasy spolu s dalšími indikátory kvality kvasného procesu v hotovém pivu po fermentaci v cylindrokónických tančích (CKT) [8, 9].

2 METODIKA

2.1 První série pokusů – klasická fermentace

Vzorky byly odebírány po dobu 25 dnů ze 14 ležáckých oddělení během dokvašování 12% světlého piva, které probíhalo 45–60 dnů při teplotě 1–4,5 °C. Po odebrání byly vzorky dokvašovány při teplotách 0 °C, 6 °C a při laboratorní teplotě (22–24 °C) a byla stanovena aktivita invertasy. K 10 ml přefiltrovaného piva zbaveného CO₂ bylo přidáno 2,5 ml 5% sacharosu a mícháno za laboratorní teploty 25 min. Pak byla invertasa inaktivována (5 min při 100 °C) a stanovena glukosa diagnostickou enzymatickou soupravou Oxochrom–Glukosa (Lachema Brno) využívající glukosaoxidazu, peroxidazu a chromogen. α -Aminodusík byl stanovován spektrofotometricky při 340 nm kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou.

2.2 Druhá série pokusů – technologie CKT

Horká mladina (12% světlý ležák) byla uvařena na provozní varně, odebrána do plastových barelů před chladičem mladiny při spílání a ihned převezena do minipivovaru. Zde byla ihned chlazena a zakvašena. Zakvašování proběhlo ve třech CKT kvasnicemi nasazovanými poprvé (H1), podruhé (H2) a potřetí (H3), buď nečištěnými, čiš-

1 INTRODUCTION

Yeast metabolic activity is a decisive factor affecting the composition and sensoric properties of finished beer. During beer fermentation, the wort changes its composition because its constituents are metabolized by yeast cells to yield characteristic substances. To ensure a satisfactory course of the fermentation, the yeast has to be in a good condition. Along with suitable wort composition, this is a basic requirement for achieving a standard product.

In the past, evaluation of the physiological state of the yeast was limited to traits that could be assessed visually (sedimentation, appearance of collected yeast, appearance of yeast cells under a microscope, etc.). Progress was achieved by the use of staining of dead cells with methylene blue or fluorescein derivatives [1] which provides information on the proportion of dead cells in the culture, i.e. viability. However, in many cases yeast cells, although living, have a lowered metabolic competence due to the action of various stress factors, i.e. lowered vitality. Fermentations involving cells with lowered vitality [1] can give rise to changes in the produced metabolites and undesirable changes in the finished product.

Assessment of the yeast physiological state has gained importance especially in association with changes in brewing technology, and has become a center of considerable attention [2–6]. The methods used for evaluating yeast vitality include determining the levels of important metabolites and storage substances [2], the intensity of metabolic and bioenergetic processes taking place in and at the cell membrane [3–5], and the activity of some important enzymes [6].

An important enzyme bound to the yeast cell wall is invertase (β -D-fructofuranosidase), which splits sucrose from the nutrient medium into the two monosaccharides, glucose and fructose, prior to their transport into the cell. This process is very fast, taking place within minutes, since one form of invertase is localized in the mannan-protein complex of the cell wall and in the periplasmic space between the cell wall and the plasma membrane. During fermentation, small amount of invertase is released into the external milieu and its activity can always be determined in the finished unpasteurized beer (i.e. in the absence of yeast cells).

In a series of experiments carried out in Pilsner Urquell in 1987 under conditions of the classical brewing process, we determined invertase activity liberated from yeast into the beer at different temperatures and investigated its possible association with yeast cell lysis [7]. The liberation of invertase into the medium could also be affected by other stress factors such as hydrostatic pressure, composition of raw materials used for wort preparation, wort aeration, etc., and the degree of its release from the cells could thus indicate whether the yeast cells have encountered adverse metabolic conditions during fermentation and secondary fermentation. To determine whether and how the invertase level in the fermenting culture, during secondary fermentation and in finished beer depends on the technology used, invertase activity, along with some other indicators of the fermentation quality, was measured in another series of experiments performed in 2003–2006 in finished beer after fermentation in cylindrical-conical tanks (CCT) [8, 9].

2 METHODS

2.1 First series of experiments – classical process

Samples for invertase assay were collected for a period of 25 days from 14 lagering sections during the secondary fermentation of 12 % light beer that proceeded for 45–60 days at 1–4.5 °C. After collection the samples were subjected to secondary fermentation at 0 °C, 6 °C and at room temperature (22–24 °C) and invertase activity was determined as follows: 10 ml filtered beer from which CO₂ was removed was supplied with 2.5 ml 5% sucrose and stirred at room temperature for 25 min. Invertase was then inactivated (5 min at 100 °C) and the level of glucose was determined by the Oxochrom – Glukosa diagnostic enzyme set (Lachema Brno) based on glucose oxidase, peroxidase and a chromogen. α -Amino nitrogen was determined spectrophotometrically at 340 nm with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid.

2.2 Second series of experiments – CCT technology

Hot wort (12 % light lager) was brewed in a plant brew house, col-

Tab. 1 Aktivita invertasy v pivu získaném kvašením v CKT při použití různě čištěných a opakovaně nasazovaných kvasnic. Aktivita invertasy zjištěná u piva zakvašeného nečištěnými poprvé nasazenými kvasnicemi byla definována jako 100,0 %, ostatní hodnoty jsou vztaženy k ní. / *Invertase activity in beer produced by CCT fermentation with differently washed and repeatedly pitched yeast. Invertase activity in beer fermented with unwashed yeast after first pitching was taken as 100 %, other values were referred to it.*

Číslo várky / Brew no.	CKT	Násada kvasnic/ Pitching	Čištění / Washing	Invertasa		OE % hm. / m/m	EtOH % obj. / v/v	FAN mg/l
				μkat/l	%			
1	1	H1	nečištěné / unwashed	5.59	100.0	12.15	4.46	184
2	2	H1	čištěné dekantací / washed by decantation	3.97	71.0	11.88	4.37	167
3	1	H2	nečištěné / unwashed	6.11	109.3	12.32	4.67	166
4	2	H2	čištěné dekantací / washed by decantation	5.36	95.9	12.03	4.53	162
5	3	H2	promyté v minipivovaru / washed in mini-brewery	4.66	83.4	11.84	4.46	162
6	1	H3	nečištěné / unwashed	8.04	143.8	12.34	4.91	172
7	2	H3	čištěné dekantací / washed by decantation	7.66	137.0	12.49	4.78	177
8	3	H3	promyté v minipivovaru / washed in mini-brewery	9.0	161.0	12.31	4.81	179

OE – původní extrakt / original extract, EtOH – koncentrace alkoholu / alcohol concentration, FAN – koncentrace volného α-aminodusíku / free α-amino nitrogen

těnými praním ve vodě a dekantací, nebo promytými v minipivovaru několikanásobným praním a dekantací. V čerstvě zakvašené mladíně, během hlavního kvašení, v pivu před filtrací a v hotovém pivu byly stanoveny následující parametry: původní extrakt, obsah alkoholu a koncentrace α-aminodusíku (FAN). FAN byl stanoven na přístroji SAN PLUS Segmented Flow Analyzer (SKALAR Analytical B.V., Holandsko), extrakt a alkohol na přístroji SCABA (TECATOR, Švédsko). Tab. 1 obsahuje tyto údaje pro filtrované pivo.

V hotovém pivu byla stanovena aktivita invertasy jako v první sérii pokusů za použití soupravy BIO-LA-TEST, Glukosa god 250 (PLIVA – Lachema Brno) podle návodu výrobce.

2.3 Třetí série pokusů – technologie CKT

Tato rozsáhlá série pokusů zahrnovala analýzu mladiny zakvašené v Plzeňském Prazdroji kvasničným kmenem H (VÚPS 7, pivo 1) nebo W (VÚPS 89, pivo 2) během ležení v 11 CKT (pivo 1), 15 CKT (pivo 2), a filtrovaného piva v 42 přetlačných tancích. Údaje byly získávány pro 3 druhy piva (12%, 13% a 10%). Invertasa byla opět stanovena testem BIO-LA-TEST. Tento rozsáhlý soubor dat umožnil podrobné statistické hodnocení výsledků, které bylo provedeno Studentovým t-testem, F-testem a stanovením trendů (tab. 2).

3 VÝSLEDKY

3.1 Vliv teploty na aktivitu invertasy a autolýzu kvasnic během dokvašování při klasickém procesu

Sledování aktivity invertasy během ležení při klasickém procesu ukázalo, že při teplotě dokvašování 1–4,5 °C se během procesu aktivita invertasy výrazně nemění, a je po celou dobu v rozmezí 3,4–3,5 μkat/l. Tato hodnota byla zjištěna i v přetlačných tancích obsahujících promíchané pivo z několika ležáckých tanků. Současné měření volného aminodusíku (FAN), tedy obsahu aminokyselin, při nízkých teplotách ukázalo nevýrazný počáteční pokles, po němž FAN setrval na stabilní hladině.

Podstatné zvýšení aktivity invertasy uvolňované do piva (až na 5,4 μkat/l) bylo pozorováno, jestliže dokvašování probíhalo za zvýšené teploty, tj. 22–24 °C. Při této teplotě došlo k podstatně většímu poklesu FAN až do 13. dne dokvašování. Od 13. dne až do konce sledovaného období se hladina FAN v pivu silně zvyšovala (obr. 1), což ukazovalo na pokračující lýzi pivovarských kvasnic.

3.2 Aktivita invertasy v hotovém pivu při CKT procesu v závislosti na čištění násadních kvasnic a počtu nasazení

Údaje v tab. 1, shrnující výsledky stanovení invertasy v hotovém nepasterovaném pivu, ukazují, že prané kvasnice uvolňují do piva

lected into plastic barrels before wort pumping into cooler and immediately transferred into a mini-brewery. It was then immediately cooled and pitched in three CCT with yeast pitched for the first (H1), second (H2) and third (H3) time, either unwashed, washed by water and decantation, or in the mini-brewery by repeated washing and decantation. The parameters determined in the freshly pitched wort, during main fermentation, in beer before filtration and in finished beer included original extract, alcohol content and concentration of free α-amino nitrogen (FAN). FAN was determined on SAN PLUS Segmented Flow Analyzer (SKALAR Analytical B.V., The Netherlands), extract and alcohol on SCABA instrument (TECATOR, Sweden). Tab. 1 contains the data measured in finished beer.

Invertase activity was measured as in series 1 by using the BIO-LA-TEST, Glucosa god 250 (PLIVA – Lachema Brno) according to the manufacturer's instructions.

2.3 Third series of experiments – CCT technology

This extensive series of experiments involved invertase determination in beer brewed from wort pitched with yeast strain H (RIBM collection no. 7, beer 1) or W (RIBM collection no. 89, beer 2) during secondary fermentation in 11 CCT (beer 1) and 15 CCT (beer 2) and in filtered beer in 42 bright beer tanks. The data were acquired for 3 beer types (12 %, 13 %, 10 %). Invertase was again determined as above by the BIO-LA-TEST. The large body of data enabled us to perform statistical analysis, which was done by the Student's t-test, F-test and trend determination (see Tab. 2).

3 RESULTS

3.1 Effect of temperature on invertase activity and yeast autolysis during lagering in classical process

Determination of invertase activity during secondary fermentation in the classical process showed that during secondary fermentation at 1–4.5 °C invertase activity did not change appreciably and was 3.4–3.5 μkat/l throughout the experimental period. The same level

Tab. 2 Aktivita invertasy během hlavního kvašení a dokvašování ve velkých souborech CKT u 2 procesů a v přetlačných tancích (PT) u 3 druhů piva / *Invertase activity during main fermentation and secondary fermentation in large sets of CCT in 2 processes and in bright beer tanks (BBT) in three beer types*

Typ procesu / Process type	Počet CKT/PT / No. of CCT/BBT	Invertasa (μkat/l)		
		min.	max.	průměr ± SD / mean ± SD
pivo 1 – 12% / beer 1	11	3.48	4.26	3.87 ± 0.28
pivo 2 – 13% / beer 2	15	2.56	4.43	3.53 ± 0.49
pivo 2 – 12% / beer 2	42	2.65	3.38	3.46 ± 0.04
pivo 4 – 10% / beer 3	19	2.65	4.22	3.50 ± 0.37

Tab. 3 Srovnání souborných hodnot aktivity invertasy zjištěné u klasické technologie a u CKT procesu provedené pomocí statistického programu QC-Expert od firmy TRILOBITE / Comparison of overall values of invertase activity found in classical technology and the CCT technology – performed by the statistical software QC-Expert (TRILOBITE)

Parametr / Parameter	Invertasa / Invertase ($\mu\text{kat/l}$)	
	Klasický proces / Classical process	CKT / CCT
průměr / mean	3.48	3.81
spodní mez / lower limit	3.45	3.49
horní mez / upper limit	3.50	4.13
rozptyl / scatter	0.001	0.09
směrodatná odchylka / SD	0.04	0.31
normalita / normality	ano / yes	ano / yes

méně invertasy než neprané. Množství uvolňované invertasy se rovněž zvyšuje s opakovaným nasazováním kvasnic (o zhruba 10 % při druhém nasazení a zhruba 40 % při třetím nasazení). Aktivita invertasy v hotovém pivu souhlasí u stejného druhu kvasnic, lišícího se pouze praním vodou, s dosaženým prokvašením stanoveným v sudovaném pivu. Pivo vyrobené s použitím čistěných kvasnic (s nižší aktivitou uvolňované invertasy) bylo senzorycky hodnoceno většinou příznivěji.

Stejně jako u klasického procesu je hladina invertasy v pivu během dokvašování v CKT po celou dobu dokvašování konstantní, aniž by se zřetelně zvyšovala. V technologickém rozsahu teplot 0–9 °C se nemění a začíná se zvyšovat při vyšších teplotách. Vzhledem k tomu, že se současně zvyšuje i obsah FAN, jde zřejmě o lýzi buněk.

Bylo potvrzeno, že určitá hladina invertasy se nachází v hotovém pivu, tj. v nepřítomnosti kvasinek, a je tedy uvolňována buňkami do prostředí. Enzym není tedy za všech okolností vázán pevně na buněčné struktury.

3.3 Aktivita invertasy během hlavního kvašení, dokvašování a v hotovém pivu v rozsáhlém souboru CKT u 3 technologických celků

Tab. 2 a 3 ukazují, že při použití technologie CKT je hladina invertasy ve filtrovaném pivu podobná jako u klasické technologie, vykazuje však větší variabilitu.

4 DISKUSE

Naše výsledky ukazují, že jak u klasické technologie, tak u technologie CKT je při teplotách kvašení a dokvašování 0–9 °C z periplasmatického prostoru kvasničných buněk do piva uvolňováno určité množství invertasy, aniž by byl tento pochod doprovázen poškozením nebo lýzí buněk. K uvolňování enzymu současně s lýzí dochází až při vyšších teplotách. Kromě optimální teploty má na hladinu invertasy v pivu pozitivní účinek také praní kvasnic. Prané kvasnice uvolňují do piva méně invertasy než neprané, což naznačuje lepší stav buněčných povrchových struktur (buněčné stěny) a zřejmě i lepší celkový fyziologický stav buněk.

Přes značně odlišné rheologické poměry při fermentaci, hydrostatický tlak kvasného prostředí a další faktory je hladina invertasy v pivu

was found in bright beer tanks containing blended beer from several storage tanks. A simultaneous measurement of FAN, i.e. the content of amino acids, at low temperatures showed a mild initial drop after which FAN remained fairly constant.

The level of invertase released into the beer substantially increased (up to 5.4 $\mu\text{kat/l}$) at increased temperature (22–24 °C). Until day 13 of the lagering, the FAN dropped considerably. Beginning on day 13 until the end of the experimental period, the FAN level in the beer markedly increased (Fig. 1), indicating a progressing lysis of the yeast cells.

3.2 Invertase activity in finished beer in the CCT process as dependent on pitching yeast washing and number of pitchings

The data in Tab. 1, which summarize the results of invertase determination in finished unpasteurized beer, show that washed yeast releases into the beer less invertase than unwashed one. The amount of liberated invertase increases with repeated pitching, the increase being about 10 % after 2nd pitching and some 40 % after 3rd pitching. In the same yeast strain differing only in washing, invertase activity in finished beer agrees with the attained wort attenuation determined in cask beer. Beer produced with the use of washed yeast, i.e. with a lower invertase level, has a more suitable sensoric character.

Like in the classical process, the invertase activity during secondary fermentation is constant throughout without any conspicuous rise. It does not change within the technological temperature range of 0–9 °C and increases only at higher temperatures. The simultaneous rise in FAN indicates cell lysis.

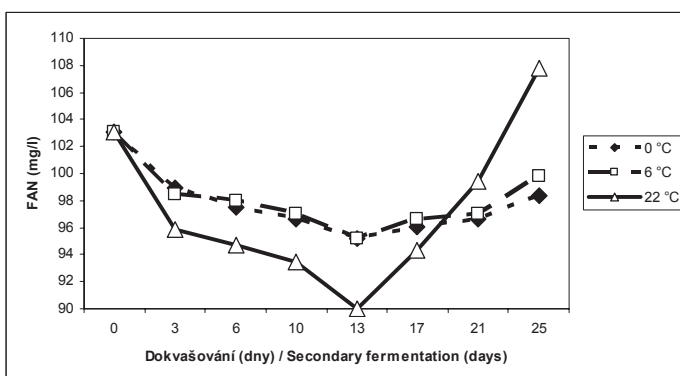
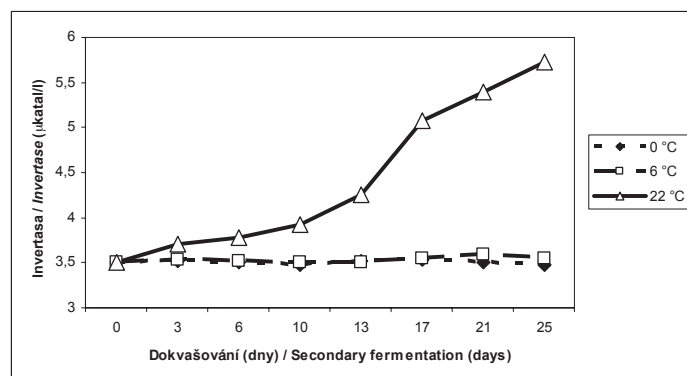
The tests confirmed the presence of invertase in finished beer in the absence of yeast. The enzyme is thus not always firmly bound to cell structures.

3.3 Invertase activity during main fermentation, secondary fermentation and in finished beer in an extensive CCT set in 3 technological modes

Tab. 2 and 3 again show that invertase activity in filtered beer produced by CCT technology is nearly the same as in beer produced by the classical technology but it exhibits higher variability.

4 DISCUSSION

Our results show that, with both the classical brewing process and with the CCT technology, when the beer fermentation and secondary fermentation is carried out at temperatures of 0–9 °C, a certain amount of invertase is released from the periplasmic space of yeast cells while the cells are not concomitantly damaged or lysed. The release of the enzyme from lysed cells takes place only at higher temperatures. In addition to optimum temperature, the invertase level in beer is also positively affected by yeast washing. Washed yeast releases into the beer less invertase than unwashed one, which indicates a better condition of the cell surface structures (cell wall) and apparently also a better overall physiological state of the cells.



Obr. 1 / Fig. 1 Časový průběh invertasové aktivity a volného α -aminodusíku během dokvašování v klasickém procesu / Time course of invertase activity and free α -amino nitrogen during secondary fermentation in a classical process

podobná při použití klasické technologie i technologie CKT; v druhém případě však hladina enzymu vykazuje větší variabilitu. Tu lze připsat tomu, že klasická technologie (kvašení v otevřených kádích o objemu 30–150 hl, dokvašování v dřevěných sudech a ocelových ležáckých tancích o objemu 40–200 hl) zahrnuje rozsáhlé a opakované míchání jednotlivých partií vyrobeného piva, tedy jeho důkladnou homogenizaci, zatímco při kvašení ve zcela uzavřených cylindrokónických tancích o objemu 2000–3300 hl, tedy v podstatně větších partiích piva, je míchání/homogenizace v přetlačných tancích podstatně méně intenzivní.

Pokud použijeme hladinu invertasy v pivu jako indikátor stavu kvasnic během fermentace a dokvašování, lze nicméně konstatovat, že rozdíl mezi klasickou a CKT výrobou nejsou významné, a prostředí v cylindrokónických tancích je pro normální činnost kvasinek v podstatě stejně příznivé, jako při klasické výrobě.

5 ZÁVĚR

Mezi faktory, které významně ovlivňují aktivitu invertasy během dokvašování a v hotovém pivu, patří především teplota. Při teplotách nad 9 °C se hladina enzymu v pivu zvyšuje, patrně vlivem lýze kvasnic. Aktivita invertasy je také vyšší v pivu zakvašeném nepranými kvasnicemi a kvasnicemi po druhém a třetím nasazení. Pivo vyrobené klasickým způsobem a technologií CKT vykazuje obdobnou aktivitu invertasy, přičemž variabilita hladin tohoto enzymu je podstatně vyšší u CKT technologie. To je přičítáno méně intenzivní homogenizaci jednotlivých partií piva. Pokud se hladina invertasy bere jako indikátor stupně buněčné lýze, tedy jako ukazatel fyziologického stavu kvasnic, lze říci, že rozdíly mezi klasickou a CKT výrobou nejsou významné, a prostředí v cylindrokónických tancích je pro normální činnost kvasinek v podstatě stejně příznivé, jako při klasické výrobě.

Práce byla řešena v rámci Výzkumného úkolu VÚ – 8: „Zjišťování vlivu fyziologického stavu kvasnic na tvorbu zákalů v pivu“ a Výzkumného centra 1M0570 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR „Obsahové látky ječmene a chmele“, a byla podporována Výzkumnými záměry AV0Z50200510 a MSM6019369701.

Despite the considerably different rheological relations during the fermentation, hydrostatic pressure of the fermentation broth and other factors, the level of invertase in beer is similar in the classical process and in the CCT technology, although in the latter process the invertase level exhibits higher variability. This higher variability can be ascribed to the fact that in the classical technology (fermentation in open 30–150 hl tubs, secondary fermentation in 40–200 hl wooden casks and steel lagering tanks) involves extensive and repeated blending of individual lots of the produced beer, i.e. its thorough homogenization, while fermentation in the much larger (2000–3300 hl) closed cylindric-conical tanks, i.e. in much larger beer lots, brings about a considerably less intensive blending in bright beer tanks. When using the level of invertase in beer as an indicator of the physiological state of yeast during the main fermentation and the secondary fermentation, it can nevertheless be stated that the differences between the classical and the CCT process are not significant and the milieu in the cylindric-conical tanks is in principle equally suitable for the normal activity of the yeast as that during the classical process.

5 CONCLUSION

Temperature is the major factor that significantly affects the activity of invertase during secondary fermentation and in finished beer. At temperatures above 9 °C the level of the enzyme increases, apparently due to yeast cell lysis. The level of invertase is also higher in beer from fermentations started with unwashed yeast, and with yeast after second or third pitching. Beer produced by the classical technology and the CCT technology exhibits similar invertase activity, the variability of invertase levels being considerably higher in the CCT process. This is attributed to a less intensive homogenization of individual beer lots. If the level of invertase is taken as an indicator of yeast cell lysis, i.e. as a marker of the physiological state of yeast, the differences between the classical and the CCT technology can be seen to be insignificant and the milieu in cylindric-conical tanks is in principle equally suitable for the normal activity of the yeast as that during the classical process.

The work was performed within the frames of the Institutional Research Concepts AV0Z50200510 and MSM6019369701, RIBM Research Task 8: „Determining the effect of physiological state of yeast on the formation of beer haze“ and Research Center 1M0570, CR Ministry of Education, Youth and Sports.

Literatura / Literature

- Hollerová, I., Sigler, K., Kadlecová, J., Šrogl, J.: Vitalita a viabilita násadních kvasnic: metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou resistenci. *Kvasny Prum.* **51**, 2005, 3–7.
- Imai, T.: The assessment of yeast vitality – the past and the future. *Brewer's Guardian*, 1999, 20–27.
- Opekarová, M., Sigler, K.: Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **27**, 1982, 395–403.
- Šusta, J., Hodaň, J., Opekarová, M., Sigler, K.: A simple method for determining the metabolic activity of brewer's yeast during the brewing process. *Food Microbiol.* **1**, 1984, 169–171.
- Sigler, K., Höfer, M.: Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 1991, 375–391.
- Wellhoener, U., Geiger, E.: Definition of the physiological condition of a brewer's yeast by means of enzyme activity measurements during propagation and fermentation. *Proc. 29th Internatl. Congress Eur. Brewery Convention*, Contribution 55, Dublin, Ireland 2003.
- Krejčová, I.: Posouzení stupně autolýzy kvasnic během dokvašování 12% světlého piva Prazdroj. Diplomová práce, VŠCHT Praha, Fakulta potravinářské a biochemické technologie a Prazdroj, Plzeň 1987.
- Korbel, J., Šrogl, J., Vernerová, H.: Posouzení fyziologického stavu kvasnic zjištěním aktivity invertázy. Zpráva o technologické zkoušce č. MP 34, Plzeňský Prazdroj, a. s., Plzeň 2005.
- Matasová, L.: Metody posouzení vitality kvasnic na základě přeměny cukrů

přes buněčnou membránu. Diplomová práce, Pedagogická fakulta Západočeské univerzity, Plzeň 2006.

*Translated by Karel Sigler
Do redakce došlo 30. 11. 2006*

KEG TECHNIK
KOUTEK

PLNICÍ LINKY KEG

e-mail: info@keg.cz

www.keg.cz