

Hodnocení násadních kvasnic moderními metodami

Evaluation of Pitching Yeast by Advanced Methods

MARTIN SLABÝ¹, JOSEF ŠKACH¹, JAROMÍR FIALA²

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

²Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 / *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha*

e-mail: slabý@beerresearch.cz

Slabý, M. – Škach, J. – Fiala, J.: Hodnocení násadních kvasnic moderními metodami. Kvasny Prum. 56, 2010, č. 5, s. 226–233.

Byly studovány změny fyziologického stavu kvasinek při opakovaném nasazení za různých podmínek kvašení. Studovány byly klasické české kmeny uchovávané ve sbírce VÚPS. Řídicími parametry hlavního kvašení byly maximální teplota a tlak, resp. tlakem ovlivňovaná koncentrace oxidu uhličitého. Fyziologický stav kvasnic byl hodnocen jak průtokovou cytometrií na základě obsahu trehalosy a glykogenu v buňce, tak stanovením acidifikační schopnosti kvasinek.

Zjistilo se, že v práci testované kmeny reagují na změnu podmínek diferencovaně. Použité metody stanovení fyziologického stavu poskytují významné informace o fyziologickém stavu kvasnic a tvorbě glykogenu. Nezaznamenala se však souvislost získaných výsledků s průběhem kvašení charakterizovaným rychlostí úbytku extraktu mezi 48. a 96. hodinou kvašení a délkou kvašení potřebnou pro dosažení rozdílu mezi zdánlivým a dosažitelným prokvašením 8–10 %.

Slabý, M. – Škach, J. – Fiala, J.: Evaluation of pitching yeast by advanced methods. Kvasny Prum. 56, 2010, No. 5, p. 226–233.

Changes in the physiological state of yeasts during repeated pitching under different fermentation conditions were studied. Traditional Czech strains kept in the culture collection of the Research Institute of Brewing and Malting (RIBM) were tested.

The control parameters for the primary fermentation were maximum temperature and pressure. The pressure is dependent on the concentration of carbon dioxide. The physiological condition of yeasts was evaluated by means of flow cytometry based on the content of trehalose and glycogen in the cell and by the determination of the acidification power (AP) of the yeasts.

It was found that the yeast strains tested reacted to changing conditions in different ways. The methods used for the study of the physiological conditions also show important information about glycogen production. No significant relationship between the results obtained and the fermentation process was found, when characterizing by the speed of extract reduction between the 48th and the 96th fermentation hour and the time of fermentation needed for an attenuation difference of 8–10 %.

Slabý, M. – Škach, J. – Fiala, J.: Anwendung von modernen Methoden zur Auswertung der Brauhefe. Kvasny Prum. 56, 2010, Nr. 5, S. 226–233.

Die Änderungen des physiologischen Zustands der Hefe, die unter verschiedenen Gärungsbedingungen mehrmals eingesetzt wurde, sind verfolgt worden. Es wurden die in der Sammlung des Forschungsinstitutes für Brauereien und Mälzereien in Prag aufbewahrende klassische Hefestämme studiert. Physiologischer Hefezustand wurde durch Durchflussszytometrie auf Grund des Gehalts an Trehalose und an Glykogen in der Zelle und durch die Azidifikationsfähigkeit der Hefe ausgewertet.

Es wurde festgestellt, dass die getesteten Hefestämme auf die Bedingungenänderungen unterschiedlich reagieren. Angewandte Methode zur Bestimmung des physiologischen Zustands der Hefe bieten bedeutende Informationen über den physiologischen Hefezustand und Glykogenbildung an. Ein Zusammenhang zwischen den erworbenen Ergebnissen mit dem durch Extraktabschmelzgeschwindigkeit im Gärungszeitbereich 48–96 Stunde charakterisierten Gärungsverlauf und die für die Erreichung des Unterschiedes zwischen dem Scheinbaren und dem Wirklichenvergärungsgrad notwendige Gärungszeit 8–10 % wurde jedoch nicht festgestellt.

Klíčová slova: kmen kvasnic, hlavní kvašení, trehalosa, glykogen, acidifikační test, průtoková cytometrie

Keywords: yeast strain, primary fermentation, trehalose, glycogen, acidification power test, flow cytometry

1 ÚVOD

Kvalita násadních kvasnic zásadním způsobem ovlivňuje kvalitativní parametry piva. Fyziologický stav má dopad na tvorbu vicinálních diketonů (VDK), organických kyselin, esterů, vyšších alkoholů, aldehydů, nejen během hlavního kvašení, ale i během dozrávání a v řadě případů i během skladování. Zdravotní stav násadních kvasnic se promítá i do kvality sbíraných kvasnic na konci kvašení, jež jsou nadále nasazovány. Proto je této problematice trvale věnována pozornost výzkumu i praxe.

Pro hodnocení vitality a viability násadních kvasnic bylo vypracováno mnoho metod, jejichž souhrn přehledně uvádí Heggart a kol. [1]. Stanovení acidifikačního testu je podle tohoto přehledu jedním z osmi postupů stanovení vitality, založených na měření metabolické aktivity. Pro měření vitality je zde uváděno celkem 16 metod, pro stanovení viability pak 8 metodik. Kolik se jich ale používá v našich pivovarech? V České republice se používá počítání živých/mrtvých buněk. V několika málo pivovarech se používá acidifikační test, ale jiné metody jsou v našem pivovarnictví nepoužívané.

1 INTRODUCTION

The quality of pitching yeasts has a fundamental impact on qualitative parameters of beer. Their physiological condition influences the production of vicinal diketones (VDK), organic acids, esters, higher alcohols, and aldehydes not only during the fermentation but also during the secondary ripening and in some cases even during the storage. The health of pitching yeasts also influences the quality of the skimmed yeasts at the end of fermentation, as they are used further. Therefore a permanent attention is devoted in both, the research and the practice to this issue.

For the vitality and viability evaluation of pitching yeasts plenty of methods have been described. They are summarized by Heggart et al. [1]. The acidification power test (APT), based on a measurement of metabolic activity, is only one of eight possible approaches for the determination of vitality.

The summary by Heggart introduces a total of 16 methods for the determination of vitality and 8 methods for the determination of viability. However, how many of them are used in Czech breweries? In

2 ROZBOR PROBLEMATIKY

Při kvašení tvoří kvasinky dva zásobní sacharidy, glykogen a trehalosu. Oba se akumulují v kvasinkách až v pozdějších stádiích kvašení [1].

Glykogen je zásobní polysacharid kvasinek a slouží buňce jako zásobárna glukosy, neboli jako zdroj energie i uhlíku pro syntézu metabolických intermediátů. Strukturu má podobnou škrobu, glukosa je v něm vázána α -(1,4)-glykosidickou vazbou s větvením α -(1,6)-glykosidickou vazbou [2]. Jeho obsah přesahuje 40 % sušiny buňky. Obsah glykogenu v kvasinkách je ovlivňován podmínkami při fermentaci, skladování kvasnic a také závisí na vlastním kmenu kvasinek [3]. V průběhu skladování mezi jednotlivými nasazeními kvasinek se spotřebovává až 40 % tohoto zásobního sacharidu [1].

Množství obsaženého glykogenu ve skladovaných kvasinkách 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), zatímco úbytek sacharidů obsažených v mladině je zanedbatelný. Glykogen tedy slouží jako zdroj energie pro syntézu sterolů a nenasycených mastných kyselin [2].

Obsah glykogenu při nasazení ukazuje potenciál kvasinek syntetizovat tyto nezbytné sloučeniny plazmatické membrány, které jsou nepostradatelné při správném dělení a růstu kvasinek. Podmínky pro odbourávání glykogenu v kvasinkách během jejich skladování jsou buď přítomnost kyslíku, nebo nepřítomnost asimilovatelného cukerného zdroje.

Nedostatek zkvasitelných sacharidů v médiu může nastat při pozdním sběru kvasnic na konci kvašení, či při příliš dlouhém teplém skladování kvasnic za přítomnosti kyslíku, kde je glykogen použit jako zdroj energie pro nezbytné biochemické pochody buňky. Nevhodné zacházení s kvasinkami způsobuje disimilaci glykogenu, jež neslouží k syntéze sterolů a nenasycených mastných kyselin [3]. Nízký obsah glykogenu může vedle delší doby fermentace ovlivňovat také vyšší obsah diacetylů a acetaldehydu, nebo oxidu siřičitého [1].

Jiné výzkumy ukazují, že obsah glykogenu nemá na kvašení příliš velký vliv a že hned po zakvašení může být nahrazen glukosou z mladiny. Vztah glykogenu k rychlosti kvašení je vlastností určitých kmenů kvasinek [2].

Mezi hlavní metody stanovení glykogenu v kvasinkách patří enzymatická metoda, barvení jodovým roztokem, infračervená spektrometrie a barvení fluorescenčním barvivem akriřavinou nebo komerčními sety od výrobců přístrojů (Partec Yeast control – glycogen) [4].

Trehalosa je neredukující disacharid složený ze dvou molekul glukosy, které jsou k sobě napojeny svými redukujícími konci, takže je isomerem maltosy. Trehalosa se nenachází pouze v cytoplasmě kvasinky, ale také je částečně lokalizována na buněčné stěně a membráně buňky, kde je navázána. Kvasinka má specifické přenašeče, které transportují trehalosu z cytoplasmy na plasmatickou membránu, a to zejména v podmínkách buněčného stresu.

Původně byla trehalosa považována pouze za zásobní polysacharid, podobně jako glykogen. Ukázalo se však, že trehalosa není vysoce energetická sloučenina jako glykogen, ale že slouží zejména jako stabilizátor plasmatické membrány v podmínkách buněčného stresu [4]. Mezi obsahem trehalosy a resistencí vůči dehydrataci, mrazu, zahřívání a osmotickému stresu lze najít dobrou korelaci. Další stresové podmínky, ve kterých pomáhá k přežití buňce trehalosa, jsou hladovění a tolerance vůči ethanolu.

Zvýšený obsah trehalosy lze pozorovat zejména u vícekrát nasazovaných kvasinek. Také byla nalezena pozitivní korelace mezi obsahem trehalosy a produkcí vyšších alkoholů, zejména isopropanolu a isobutanolu. Je výhodné sledovat obsah trehalosy u kvasinek před dalším nasazením, což může sloužit zejména jako indikace stresových podmínek, kterým mohly být kvasinky vystaveny [1].

Stresové faktory v pivovarském procesu

Většina technologických operací při kvašení mladiny je pro kvasinky nějak stresující. Na stresy, jimž jsou vystaveny, mají kvasnice specifické odezvy projevující se v buněčném složení nebo adaptací jejich metabolismu na vnější podmínky. Základní část mechanismu odpovědi na stres tvoří aktivace genů označovaných jako „heat shock genes“ vedoucí k syntéze specifických proteinů „heat shock proteins“ (HSPs). Později se zjistilo, že HSPs jsou tvořeny i při jiných stresových podmínkách, než je teplotní stres a jsou v buňkách přítomny i za nestresujících podmínek. Primární funkcí HSPs je rychlá a účinná odpověď na prožívaný stres [5,6].

Fyziologický stav kvasnic je nejdůležitějším parametrem pro technologii.

the Czech Republic mainly only a counting of vital/dead cells is used. A few breweries use acidification power tests, but none of the other methods were tried out.

2 ANALYSIS OF THE ISSUE

During the fermentation the yeasts produce two reserve saccharides, glycogen and trehalose. Both of them accumulate in the yeasts only in the later stages of the fermentation [1].

Glycogen is a reserve polysaccharide of the yeasts and serves as a source of glucose or as a source of energy and carbon for the biosynthesis of metabolic intermediates. Glycogen has a very similar structure to that of starch. The glucose is joined by α -(1,4)-glycoside linkage and branched with α -(1,6)-glycoside linkage chains [2]. The cells contain more than 40 % glycogen as a dry matter. The content of glycogen in the yeasts is influenced by the fermentation conditions, the storage of the yeasts, and also depends on the yeast strain [3]. Up to 40 % of glycogen is depleted during the storage between pitchings. [1].

The amount of glycogen in the stored yeasts has an impact on a growth rate after the pitching and on the overall performance by fermentation. After the pitching in the hop wort containing oxygen, the glycogen content in the yeasts decreases rapidly (up to 10 % as dry matter). However, the decrease of saccharides contained in the wort is negligible. It follows that the glycogen serves as a source of energy by the biosynthesis of steroids and unsaturated fatty acids [2].

The content of glycogen at the beginning of pitching determines the potential ability for biosynthesis of these essential components of plasma membranes, which are necessary for the growth and multiplication of the yeasts. Factors that influence the burning of glycogen in yeasts during their storage are either the presence of oxygen or the absence of a source of fermentable saccharides.

The lack of fermentable saccharides can occur from the late skimming of the yeast head at the end of fermentation or by too long a storage at warm temperatures and at oxygen access. In this case the glycogen is used as a source of the energy necessary for biochemical processes in the cells. Inappropriate handling of the pitching yeasts causes a reduction of glycogen, which is later missing for the biosynthesis of steroids and unsaturated fatty acids [3]. The low content of glycogen can also influence the fermentation time and can induce a higher production of diacetyl, acetaldehyde, or sulphur dioxide [1].

According to other studies glycogen hasn't any big impact on the fermentation and it can be replaced by glucose from the wort immediately after the pitching. The relationship between the glycogen content and the speed of fermentation is an attribute of particular yeast strains [2].

The most popular methods for the determination of glycogen in yeasts are the enzymatic method, dyeing with an iodine solution, infrared spectrometry and dyeing with a fluorescent dye acriflavine, or the commercial kit from instrument producer (Partec Yeast control-glycogen) [4].

Trehalose is an isomer of maltose. It is a non-reducing disaccharide composed of two glucose molecules linked by their non-reducing ends. Trehalose could not only be found in the yeast cytoplasm but it is also partially localized in the cell wall and the cell membrane. Originally, trehalose was considered only as a reserve saccharide (similar to glycogen), however, it was shown that yeasts have specific transmitters, which transport trehalose from the cytoplasm to the plasma membrane. Trehalose doesn't supply energy but it stabilizes the plasma membrane especially in the case of cell stress [4].

A positive correlation could be found between the trehalose content and the resistance against dehydration, frost, warming, starvation, and osmotic stress. Trehalose also enhances the yeast tolerance against alcohol.

An increased content of trehalose was especially found in repeatedly used pitching yeasts. A positive correlation was also found between the content of trehalose and the production of higher alcohol such as isopropanol and isobutanol. The determination of trehalose content in yeasts before the next pitching can indicate the possible previous stress conditions [1].

Stress Factors in a Brewing Process

Most of the technological operations during the fermentation of wort cause some sort of stress in the yeasts. The yeasts react specifically according to their cell composition or they adapt their metabolism to external conditions. The basic part of the metabolic answer to stress

Sledování a předpovídání průběhu kvašení je krok, který je nutné provádět klasickými metodami jako je acidifikační test, nebo je v této době stále více doporučována metoda průtokové cytometrie. A to jak pro výzkumná pracoviště, tak i pro pivovary. Cílem této práce je zjistit výpovědní hodnotu obou zmíněných metod pro praktické účely a porovnat jejich výsledky.

3 POUŽITÉ ANALYTICKÉ METODY

Popis vzorků, jejich příprava a uchování

Zkoumané vzorky byly značeny podle klíče $X/Y - ZT$, kde X je číslo kvasničného kmene dle sbírky VÚPS. Y označuje počet nasazení u kvasnic, Z je maximální teplota kvašení, T je označení pro vzorky které byly kvašeny za tlaku 0,3 MPa. Kvašení probíhalo v mladíně o koncentraci 12 %, připravené dvourmutovým způsobem se sypáním 100 % sladu. Vzorky kvasnic byly odebírány na konci hlavního kvašení při rozdílu zdánlivého a dosažitelného extraktu 8–10 %. Kvasnice byly před dalším nasazením uchovávány po promytí vodou při teplotě 0 °C po dobu 24 hodin.

Vzorky byly okamžitě po odebrání třikrát promyty ve studené destilované vodě. Po třetím odstředění byly resuspendovány v ledovém 70% ethanolu a zamrazeny. Takto ošetřené kvasnice je možné skladovat po dobu několika měsíců beze změn.

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je fluorescenčně optická metoda, při níž je prováděna dynamická analýza vzorku unášeného proudem nosné kapaliny. Průtokový cytometr je složen z excitačního zdroje, měřící cely, detektoru dopředného rozptylu (forward scatter), detektoru bočního rozptylu (side scatter), systému zrcadel, optických filtrů a několika fluorescenčních detektorů seřazených podle vlnových délek. Excitačním zdrojem je buď laser dané vlnové délky (nejčastěji argonový s vlnovou délkou 488 nm), nebo rtuťová výbojka. U průtokových cytometrů se k excitaci používá převážně čárového spektra od 365 po 546 nm [7, 8].

Při průtokové cytometrii je nutné mít proměřovaný vzorek bez shluků buněk nebo sraženin případných nečistot. Vzorek je unášen nosnou kapalinou do měřící cely, kde je ozařován laserovým paprskem nebo rtuťovou lampou. V měřící cele z optického plastu dojde k průchodu světla buňkami procházejícími jednotlivě kapilárou. Světlo se pak rozptýlí, odrazí či při určité vlnové délce vyvolá fluorescenci, jež se šíří všemi směry od svého zdroje. Úhel rozptylu světla ve směru toku paprsku detekuje tzv. „forward scatter detektor“, jehož odezva je určujícím parametrem velikosti buněk. Světlo rozptýlené pod úhlem 90° vzhledem ke směru excitačního paprsku je detekováno tzv. „side scatter detektorem“, jehož signál odpovídá granularitě buněk. Granularita odpovídá jak rozptylu laserového paprsku způsobenému povrchovými vlastnostmi buňky, tak rozptylu paprsku způsobenému odrazem od vnitrobuněčných struktur. Povrchové vlastnosti buňky jsou hlavně živý po dělení na buněčné stěně a vnitrobuněčné struktury mající vliv na rozptyl paprsku jsou především vakuoly, ale i jiné organely v buňce. Světlo excitačního zdroje je vždy nižší vlnové délky, než je vlnová délka vyvolané fluorescence, jež je detekována fluorescenčními detektory [9,10].

Metodou průtokové cytometrie se získávají informace o rozložení velikosti a granularity v populaci buněk a o intracelulárních komponentech jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, sacharidy a jiné látky. Též lze sledovat změny v rychlosti růstu, určit počet mrtvých a živých buněk v populaci, sledovat buněčný cyklus, měřit velikost i počet buněk nebo intracelulární pH či dokonce buňky třídít podle zadaných charakteristik. Obrovskou výhodou metody je, že lze získat informace o velkém souboru buněk v krátkém časovém úseku [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Hodnocené parametry

Výsledky jsou vyjadřovány dvou nebo třídímními histogramem nebo bodovým diagramem pro dvě charakteristiky. Každý bod diagramu odpovídá jedné měřené částici, překryv bodů v jednom místě vyjadřuje změna barvy. Mezi nejčastěji používaný bodový diagram v průtokové cytometrii patří tzv. Dot plot diagram, který popisuje závislost dvou korelujících veličin, například velikosti buněk (podle FSC) na intenzitě fluorescence některé obarvené buněčné komponenty. Tento typ vyhodnocování umožňuje sledovat segmentaci populace dle stejných vlastností [12].

Hodnoceny jsou tyto parametry:

- relativní distribuce velikosti částic ve formě histogramu **FSC**
- relativní distribuce granularity částic ve formě histogramu **SSC**

is the activation of genes called heat shock genes. They initiate a synthesis of specific proteins called heat shock proteins (HSPs). Furthermore, it was found that HSPs are also produced under other stress conditions than temperature stress and that they are present in cells even in the absence of stress. The primary function of HSPs is a fast and efficient answer to possible stress conditions [5,6].

The physiological condition of the yeasts is the most important parameter in beer technology. The monitoring and predictions for the fermentation process are necessary steps. It must be carried out either by the common acidification test or by, currently increasingly recommended, flow cytometry. This applies to both, research institutes and breweries. The objective of this study is to evaluate both methods mentioned above.

3 ANALYTICAL METHODS

Samples

The samples studied were marked using a $X/Y - ZT$ coding where X is the number of the yeast strain according to the culture collection of the RIBM, Y is the number of pitching repetitions, Z represents the maximum fermentation temperature and T marks samples fermented at the pressure of 0,3 MPa. The fermentation was carried out in the hop wort with a concentration of 12 %, prepared by a two-mash decoction method and with 100 % malt grist. The samples were taken at the end of the primary fermentation, after the attenuation difference of 8–10 % was reached. Before the next pitching the yeasts were rinsed with water and stored at a temperature of 0 °C for 24 hours.

After the sampling the yeast samples were immediately rinsed 3 times with cold distilled water and centrifuged. Then they were suspended in 70% iced ethanol and frozen. Yeast treated like this can be stored for several months without any changes.

Flow cytometry

The flow cytometry is a fluorescent optical method, which simultaneously measures and then analyzes multiple physical characteristics of single particles as they flow in a fluid stream through a beam light. The flow cytometer consists of the excitation optics, commonly an argon ion laser beam of 488 nm wavelength or a mercury lamp to illuminate the particles in the sample, the flow chamber, forward and side light scattering detectors and the collection optics with optical mirrors and filters and several fluorescence detectors aligned according to the wavelengths. For the excitation a spectral overlap with the wavelength range from 356 to 546 nm is mostly used [7,8].

By using the flow cytometry it is necessary that the sample doesn't contain any suspended particles, clots or impurities. The sample particles carried in the fluid stream are hydro-dynamically focused to the plastic sheath (mess cell) before intercepting an optimally focused light source (laser beam or mercury lamp). As the sample of interest intercepts the light source it scatters light and emits fluorescence. A forward scatter detector detects the scattered light at an angle to the jet flow direction and provides information about the particle's size. Light measured at an angle of approximately 90° to the excitation line is detected by a side scatter detector and provides information about the granular content within a particle. The granularity equates to both, the scattered light due to the surface properties and the scattered light caused by a reflection from the intracellular structures. Properties of the cell surface relate mainly to scars on the cell walls after cell divisions. Structures inside cells, which influence the scattered light, are vacuoles or other cell organelles.

As more energy is consumed in absorption transition than is emitted in fluorescent transition, emitted wavelengths will be longer than those of the excitation source [9,10].

Flow cytometry generates data about the distribution of particle sizes and the granularity in a cell population and about components inside the cells such as proteins, nucleic acids, saccharides and others. It also allows an identification of changes in the growth speed, a counting of live and dead cells in the population, a monitoring of a cell cycle, a measurement of the size and the number of cells, a determination of an intracellular pH, and even a classification of cells according to given characteristics. The potential for obtaining information about a large amount of cells in very short time is one part of the method benefits [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

Evaluated parameters

The results are presented in two- or three-dimensional histograms or as (mainly used) dot plot diagrams for two correlating character-



RUČÍME ZA TO, ŽE VAŠE ZAŘÍZENÍ BUDE V PROVOZU.
Dlouhá životnost, jistota, efektivita: originální náhradní díly od KHS.

Další informace jsou uvedeny na www.khs.com/service.

Competence in Solutions.



- relativní distribuce fluorescence různých vlnových délek **FL1, ... FLn**.

Koncentrace fyziologicky významných látek

Pomocí průtokové cytometrie lze sledovat řadu fyziologicky významných látek kvasinek. V poslední době jsou v literatuře zmíněny aplikace průtokové cytometrie, zejména při sledování koncentrace glykogenu, trehalosy, proteinů, neutrálních lipidů a sterolů. Stanovení těchto látek průtokovou cytometrií má výhodu, že podává informaci o rozložení koncentrace látky v jednotlivých buňkách. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi velikostí buněk a koncentrací glykogenu na konci hlavního kvašení u kmene spodních pivovarských kvasnic.

Průtokový cytometr typ PAS III

K vyhodnocení charakteristik sledovaných spodních pivovarských kvasinek byl použit průtokový cytometr Partec PAS III (Partec GmbH, přední firma v oblasti analytické cytometrie). PAS III je vybaven dvěma světelnými zdroji, modrým argonovým laserem pro excitaci při vlnové délce 488 nm a dále rtuťovou výbojkou 100 W pro excitaci při dalších vlnových délkách. Intenzita argonového laseru je regulovatelná v rozmezí 10–30 mW, přičemž pro všechny analýzy bylo použito nastavení na 10 mW.

Rozmezí rychlosti analýzy částic je u tohoto typu přístroje 0–30 000 částic za sekundu. Během níže popsaných analýz byly použity průtokové rychlosti v rozmezí 100–400 částic za sekundu s poměrem vzorku k mobilní fázi R nastaveným na hodnotu 2. Po každé analýze byl kapilární systém propláchnut roztokem azidu sodného v demineralizované ultrazvukem odplyněné vodě filtrované přes filtr Millipore o velikosti pórů 0,22 μm a dále roztokem fosfátového tlumivého roztoku připraveného stejným způsobem. Poměr R byl během promývání nastaven na hodnotu 10 litrů [15].

Stanovení kvasničného glykogenu na průtokovém cytometru

Ke stanovení odhadu obsahu kvasničného glykogenu bylo použito fluorescenční barvivo Acriflavine, který se nespecificky váže na glykogen, a komerční set firmy Partec GmbH pro stanovení glykogenu v kvasinkách [15, 16].

Stanovení kvasničné trehalosy na průtokovém cytometru

Ke stanovení obsahu kvasničné trehalosy byl použit komerční set od firmy Partec GmbH.

istics, for example cell size and fluorescence intensity from some dyed cell component. Each dot on the diagram corresponds to one measured particle. An accumulation of measured data in one dot is shown by a change in dot colour. The dot plot diagram allows a monitoring of population segmentations according to their identical properties [12].

The following parameters were monitored:

- Relative distribution of particles size in the form of a forward scatter channel (**FSC**) histogram
- Relative distribution of particle granularity from a side scatter channel (**SSC**) histogram
- Relative distribution of fluorescence light with various wavelengths from fluorescence (FL) channels **FL1, FLn**.

Concentration of physiologically important compounds

By means of flow cytometry it is possible to determine a number of physiologically important compounds in the yeasts. In the recent research studies applications of flow cytometry especially for the determination of glycogen, trehalose, proteins, lipids and sterols are described. The determination by flow cytometry is favourable as it shows concentration distributions of these compounds in individual cells. A positive correlation between the cell size and the concentration of glycogen at the end of a primary fermentation by using a strain of brewery bottom yeast was found.

Flow cytometer type PAS III

For the evaluation of brewery bottom yeasts the flow cytometer Partec Pas III (Partec GmbH, Görlitz, D) was used. Partec is a leading company in the field of analytical cytometry. The PAS III consists of two light sources, a blue argon ion laser light for excitation at the wavelength of 488 nm and a 100 W mercury lamp for excitation at other wavelengths. The argon ion laser has an adjustable intensity from 10 to 30 mW. The analysis speed varies from 0–30.000 particles per second. For all the analyses described an intensity of 10 mW, a flow velocity between 100 and 400 particles/second and a ratio of sample to mobile phase (R) set at the value 2 were used. The capillary system was first rinsed with a solution of sodium azide in water, previously deionised, ultrasonically degassed and filtered through a Millipore filter with a pore size of 0,22 μm and then with a phosphate buffer solution prepared in the same way. During the rinsing the ratio R was set at the value 10 [15].

Test acidifikační schopnosti (APT)

Základní postup, na který se odvolávají téměř všechny práce z pivovarské problematiky, publikovali Opekarová a Sigler [17] v roce 1982. Principem tohoto testu je měření změny pH prostředí, vyvolané kvasinkami. Za velmi významný výsledek je považováno stanovení těsné korelace mezi AP a fermentační výkonností u násadních kvasnic pro 4 různé kmeny. Dále je zajímavá lineární korelace mezi AP a specifickou absorpcí kyslíku. Hodnota AP je výrazně ovlivněna do tří dnů skladování. Acidifikační test je výhodný jako předpověď kvasničné vitality a koreluje s chováním kvasinek při kvašení, zvláště při skladování kvasnic v mezních podmínkách. Při testu se deset minut měří změna pH extracelulárního prostředí, poté se k suspenzi přidá glukosa a měří se dalších deset minut. Po přidání cukru pH kvasničné suspenze výrazně klesne.

Pokles pH je způsoben vznikem elektrochemického gradientu protonů přes plasmatickou membránu při absorpci živin. Gradient pH vytváří membránová ATPasa. Kromě ATPasy se na acidifikační schopnosti podílí též vylučování metabolických produktů, převážně slabých kyselin do prostředí [18]. Při nedostatku metabolizovatelného cukru kvasinka pro udržení poměru extracelulárního a intracelulárního pH využívá energii zásobních polysacharidů, glykogenů a trehalosy. Za přítomnosti cukru v prostředí k udržení této homeostázy využívá kvasinka jak endogenní, tak exogenní metabolismus.

Změna pH v prvních deseti minutách po přidání kvasinek do vody, v nepřítomnosti vnějšího zdroje glukosy, se nazývá spontánní acidifikační schopnost. Označuje se jako pH10, vyjadřuje růstovou schopnost kvasinek [1] a souvisí s obsahem zásobních polysacharidů v kvasinkové buňce. Po deseti minutách se měří další pokles pH, označovaný jako pH20. Glukosou indukovaná acidifikační schopnost značí aktivitu kvasinek při kvašení a rychlost glykolýzy [2]. Základem reprodukovatelnosti výsledků je přesné měření pH a velmi dobrá kalibrace pH metru. Při dodržení nastavení pH metru neovlivní výsledky ani kolísání v navážce kvasnic o $\pm 11\%$. Proto není nutné dodatečné stanovení sušiny.

Na tuto metodu navazuje další metoda, která je založená na aktivní tvorbě a udržování protonového gradientu, měření intracelulárního pH fluorescenčními sondami [18,19].

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky zde uvedené jsou aritmetickým průměrem tří naměřených hodnot. Glykogen byl měřen pomocí dvou různých fluorescenčních barviv, acriflavinem a komerčním setem (Yeast control – glycogen od firmy Partec GmbH), tato měření se od sebe lišila do 10 %, což je v mezích tolerance metody. Z důvodu finančních úspor při dalších měřeních je v tabulkách a výsledcích uváděn pouze obsah glykogenů získaný měřením pomocí acriflavinu.

Fyziologický stav kvasnic byl v našich testech zvolenými metodami zkoumán za různých maximálních teplot hlavního kvašení a za různého tlaku při kvašení, který modeloval podmínky zvýšeného hydrostatického tlaku v moderních CKT, jehož důsledkem je zvýšená koncentrace oxidu uhličitého. Ta významně ovlivňuje průběh hlavního kvašení. Byly zvoleny 2 hladiny maximální teploty kvašení: 10 a 12 °C a dvě hladiny tlaku: atmosférický a 0,3 MPa, který v podmínkách našeho pilotního zařízení zajišťoval koncentraci oxidu uhličitého odpovídající koncentraci ve spodních vrstvách běžných velikostí (výšek) provozních CKT. Ta podle našich měření dosahuje cca 7,0 g/l.

Výsledky stanovení obsahu trehalosy v kvasinkách po 1. a 3. nasazení za daných podmínek ukazuje obr. 1.

Je možné pozorovat některé rozdíly mezi jednotlivými kmeny. U kmene č. 3 je zřejmý výrazný nárůst obsahu trehalosy v případě vedení hlavního kvašení za vyšší teploty a zejména pak v kombinaci se zvýšeným tlakem. Po třetím nasazení za těchto podmínek se obsah trehalosy zdvojnásobil. Považujeme-li zvyšování obsahu trehalosy v buňce za indikátor působení stresových faktorů, lze usuzovat, že tento kmen nebude vhodný pro moderní technologie hlavního kvašení, charakterizované vyššími teplotami a používáním vysokých kvasných nádob.

Naproti tomu u kmene č. 6 byl nejvýraznější nárůst obsahu trehalosy zaznamenán při maximální teplotě kvašení 10 °C a zvýšeném tlaku při opakovaném nasazení. To naznačuje, že by kmen mohl být vhodný pro teplejší vedení v CKT.

U kmene č. 9 došlo k výraznému nárůstu obsahu trehalosy ve všech případech s výjimkou 12 °C bez zvýšeného tlaku. To by nasvědčovalo tomu, že kmen je poměrně citlivý na nejrůznější stresové faktory, pravděpodobně i na jiné, než které byly v této studii zkoumány.

Poslední testovaný kmen č. 95 naopak nevykazuje žádný výrazný nárůst. Může to souviset s relativně vysokými hodnotami na počátku

Determination of glycogen in yeasts by flow cytometer

For the determination of glycogen content in yeasts a fluorescent dye acriflavine with an unspecific adherence to glycogen and the commercial kit from Partec GmbH (Yeast control-glycogen) were used [15, 16].

Determination of trehalose in yeasts by flow cytometer

For the determination of trehalose content in yeasts a commercial kit from Partec GmbH was used.

Acidification power test (APT)

The basic approach quoted in almost all studies on brewery topics was already published by Opekarová and Sigler [17] in 1982. The principle of this test is a measurement of pH changes caused by yeasts. In this study a close correlation between AP and fermentation efficiency of pitching yeasts of four different strains was considered as an important result. Another interesting result is linear correlation between AP and specific oxygen absorption. The AP value was influenced considerably during the first three days of the storage. The acidification test is favourable as a prediction of yeast vitality and it correlates with the yeast behaviour during the fermentation, especially with yeasts stored under extreme conditions. The test was performed as follows: pH changes in the yeast suspension were monitored over 10 minutes, glucose solution was added, the pH changes were measured for another 10 minutes.

After glucose addition the pH of the yeast suspension decreases significantly. The pH reduction is caused by the formation of an electrochemical gradient of protons through a plasmatic membrane by nutrient absorption. The ATPase generates the pH gradient. Apart from ATPase the AP is also supported by extraction of metabolic products such as weak acids in the medium [18].

In the absence of metabolizable carbohydrates the yeasts utilize the energy of reserve polysaccharides such as glycogen and trehalose for the retention of the proportion between extracellular and intracellular pH. With the presence of carbohydrates in the medium they use both endogenous and exogenous metabolism for the maintenance of this homeostasis.

The pH change during the first 10 minutes after suspending the yeast cells in pure water without any addition of glucose is called spontaneous (oxygen-induced) acidification. It depends on the content of reserve polysaccharides in the yeast cells and reflects the vitality of the yeasts strains [1]. It is called pH10. After a further 10 minutes the next pH reduction called pH20 is measured.

Glucose indicated acidification represents the yeast metabolic activity during the fermentation and the speed of glycolysis [2]. The basic requirement for good reproducibility of the results is an exact pH measurement and a precise pH meter calibration. Under these conditions the results are not influenced by a weight fluctuation of yeasts within the range of $\pm 11\%$. Therefore, no additional determination of dry weight is necessary.

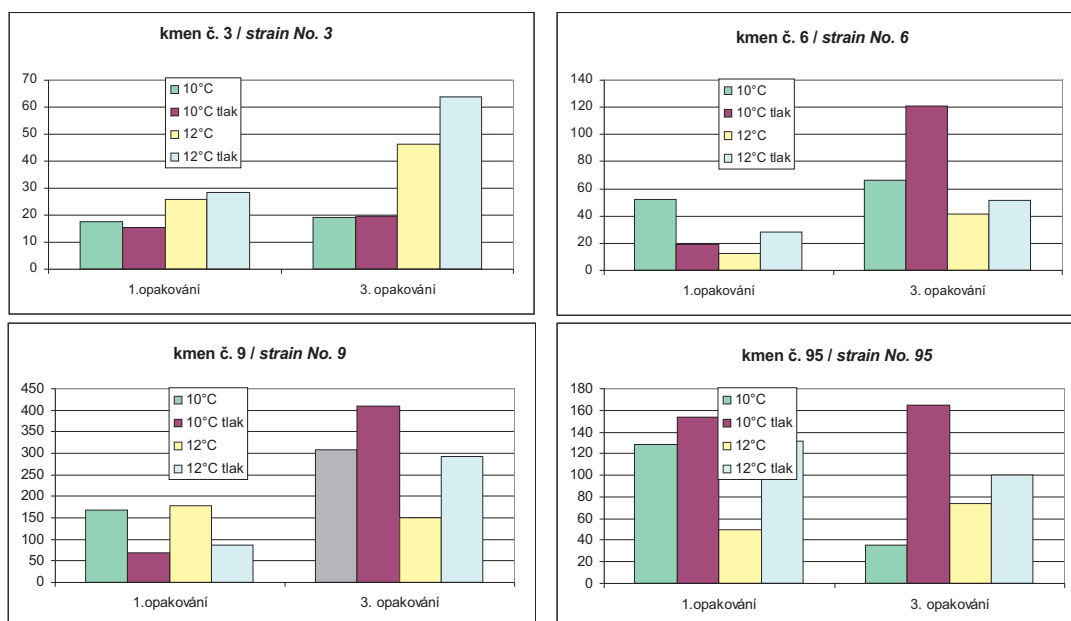
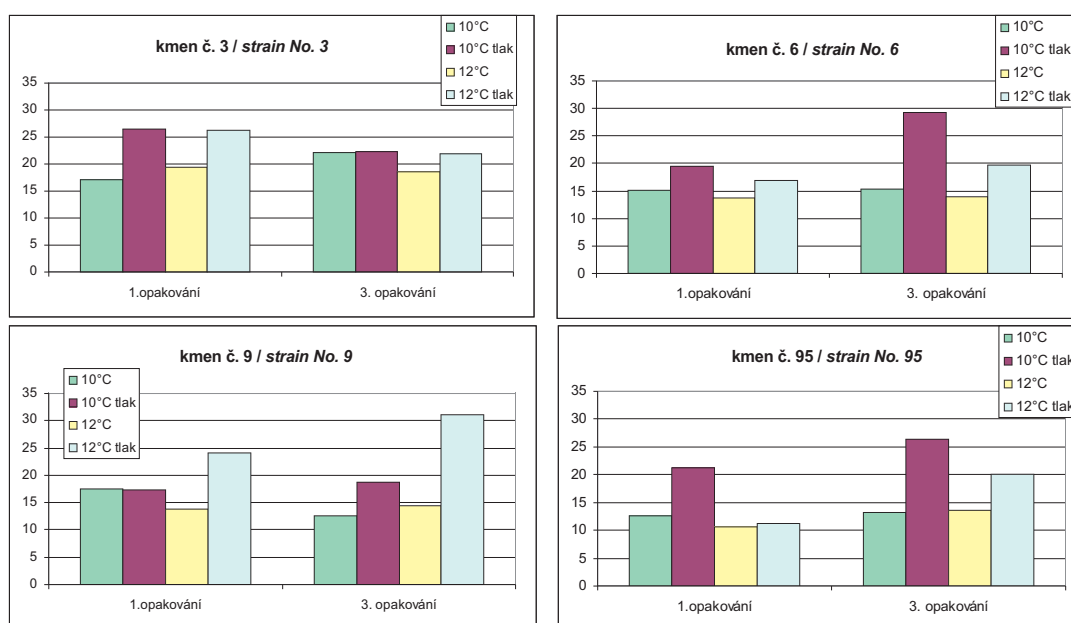
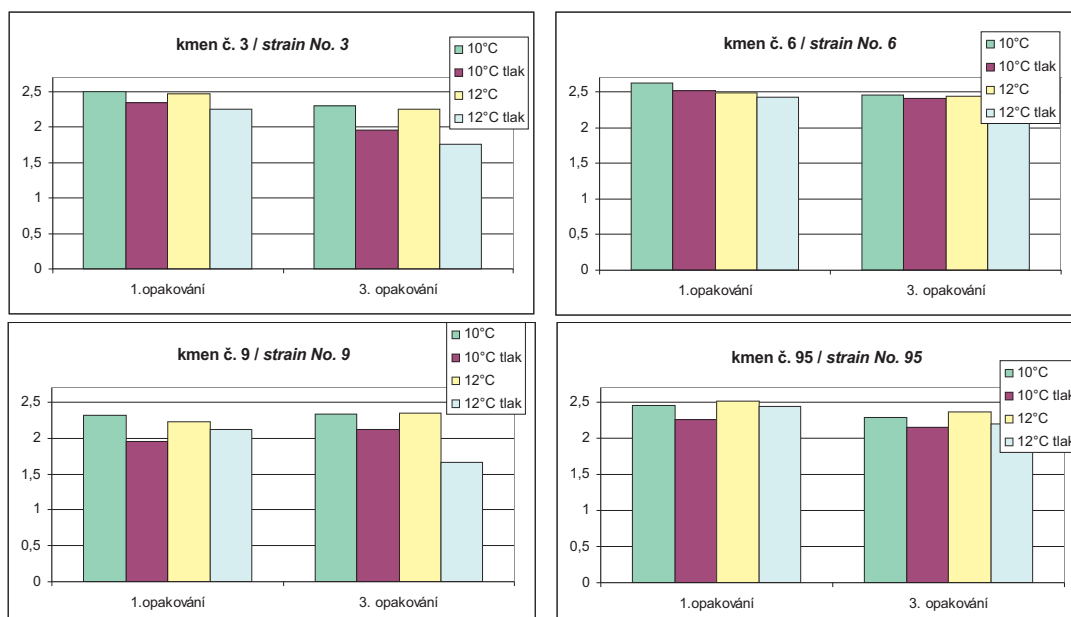
This method follows another method based on active formation and retention of proton gradient and measurement of intracellular pH by fluorescent probes [18,19].

4 RESULTS AND DISCUSSION

The results given represent an average from 3 measured values. Glycogen was determined by two different methods; using a fluorescent dye acriflavine and the commercial set (Yeast control-glycogen from Partec GmbH). The results obtained by these methods differed up to the range of the method tolerance of 10 %. For the financial reasons the following results given in the tables, were obtained only by determination by means of acriflavine.

The physiological condition of the yeasts was examined during the primary fermentation under different maximum temperatures and different pressures. Two maximum fermentation temperatures of 10 °C and 12 °C and two pressures of atmospheric and 3 bars were chosen. These conditions cause enhanced the concentration of carbon dioxide, which significantly influences the process of primary fermentation. In our pilot equipment the pressure of 3 bar ensured a CO₂ concentration of 7.0 g/l, which corresponds to the concentration in the bottom layer of common modern cylindro-conical tanks (CCTs) with their higher hydrostatic pressure. The results for the trehalose determination in the yeasts after first and third pitching under the conditions described above are shown in Fig. 1.

The differences between individual yeast strains are noticeable. Strain No. 3 showed a significantly enhanced content of trehalose

Obr. 1 Obsah trehalosy v kvasnicích po 1. a 3. nasazení / Fig. 1 Content of trehalose in the yeasts after the 1st and the 3rd pitchingObr. 2 Obsah glykogenu v kvasnicích po 1. a 3. nasazení / Fig. 2 Content of glycogen in the yeasts after the 1st and the 3rd pitchingObr. 3 Test acidifikační schopnosti u kvasných kmenů při 1. a 3. nasazení / Fig. 3 Acidification power of the yeast strains during the 1st and the 3rd pitching

testování, ale tendence ke snižování obsahu spíše ukazuje na dobrou adaptabilitu kmene na podmínky kvašení. To naznačuje univerzálnost jeho použití, což je v souladu s praktickými zkušenostmi výrobní praxe.

V případě obsahu glykogenu se jedná o základní zásobní polysacharid, který si kvasničné buňky vytvářejí a který hraje významnou roli především v počátečních fázích hlavního kvašení. Z výsledků na obr. 2 je zřejmé, že rozdíly u jednotlivých kmenů mezi prvním a třetím nasazením nejsou výrazné a také poměry mezi jednotlivými variantami kvašení se u každého kmene do značné míry zachovávají. Za zajímavé je možno považovat to, že kmen č. 3 má zjevně tendenci tvořit více glykogenu, než zbývající tři zkoušené kmeny. Při tom se u tohoto kmene míra tvorby glykogenu výrazně nemění s podmínkami kvašení. U kmenů č. 6 a 95 byla zjištěna nejvyšší tvorba glykogenu za tlaku jak při maximální teplotě kvašení 10 °C, tak při 12 °C. V případě kmene č. 9 byl významný vliv tlaku zaznamenán jen při maximální teplotě kvašení 12 °C. Vliv tlaku se u těchto tří kmenů s vyšším počtem nasazení zvětšuje. Toto zjištění je v protikladu s některými názory, podle nichž vysoká koncentrace oxidu uhličitého vede k potlačení anabolických pochodů při kvašení. Z námi zjištěných rozdílů mezi testovanými kmeny je pravděpodobné, že citlivost kmenů na obsah oxidu uhličitého v kvasicím médiu bude významně diferencovaná.

Na rozdíl od stanovení obsahu konkrétních látek trehalosy a glykogenu v kvasničné buňce je test acidifikační schopnosti komplexní kritérium vztahující se k fyziologickému stavu kvasinek. Velmi dobrý fyziologický stav vysoce aktivních kvasnic se silnou fermentační schopností charakterizují hodnoty $\geq 2,4$. Hodnoty v intervalu 2,0 až 2,4 jsou považovány za přijatelné, interval 1,8 až 2,0 charakterizuje kvasnice se sníženou metabolickou aktivitou a kvasnice pod 1,8 mají nízkou metabolickou aktivitu. Jejich nasazení je spojeno s vysokým rizikem technologických problémů.

V našich kvasných zkouškách jsme zaznamenali hodnoty od 1,66 (kmen č. 9, 12 °C za zvýšeného tlaku, 3. nasazení) do 2,63 (kmen č. 6, 10 °C za normálního tlaku, 1. nasazení). Na obr. 3 jsou znázorněny změny hodnot acidifikačního testu v závislosti na testovaných podmínkách pro jednotlivé kmeny. Je zřejmé, že nejvyšší hodnoty byly stanoveny u kmene č. 6, a to jak při prvním nasazení, tak po třetím nasazení. Kmen 9 má nejvýraznější závislost na podmínkách kvašení při obou opakováních. U kmenů č. 3 a 95 je možno hovořit pouze o tendenci k poklesu hodnot, a tedy zhoršování fyziologického stavu hodnoceného na tomto základě. U všech čtyř kmenů však bylo zaznamenáno podstatné zhoršení acidifikačního testu při 12 °C za zvýšeného tlaku. Působení tlaku, resp. oxidu uhličitého během kvašení při 10 °C, je zřetelně menší. Z tohoto hlediska je překvapující, že kmen č. 95 doporučený pro kvašení v CKT se z tohoto hlediska neliší podstatně od některých klasických kmenů uchovávaných ve sbírce VÚPS. Hodnotou acidifikačního testu po třetím nasazení při 12 °C za tlaku 2,2 je mezi kmenem č. 6 (2,3) a kmenem č. 9 (1,7). Na druhé straně je však zřejmé, že při 10 °C a zvýšeném tlaku jako jediný z testovaných kmenů vykázal horší hodnoty než při 12 °C za zvýšeného tlaku.

Rozdíly ve výsledcích získaných průtokovou cytometrií a acidifikačním testem mezi zkoušenými kmeny kvasinek naznačují, že tyto metody mohou být s výhodou využity při diferenciaci kvasných kmenů. Pro pivovarského technologa ve výrobní praxi je však dominantní otázkou okamžitě objektivní posouzení stavu násadních kvasnic z hlediska průběhu hlavního kvašení a možného dopadu na senzorické vlastnosti piva. Z tohoto důvodu jsme sledovali vztah mezi výsledky provedených testů a průběhem hlavního kvašení. Sledovanými parametry byla rychlost kvašení vyjádřená změnou zdánlivého

during primary fermentation under higher temperature and especially in combination with higher pressure. After the third pitching under these conditions the content of trehalose doubled. If the enhanced trehalose content in the cell is considered as an indicator of the impact of stress factors, evidently this strain isn't suitable for modern primary fermentation technology characterized by higher temperatures and high fermentation vessels.

On the contrary, the content of trehalose in strain No. 6 increased considerably at all trial conditions apart from at 12 °C and atmospheric pressure. This indicates that the strain is sensitive probably not only to the stress factors studied but to others as well.

The strain tested last, No. 95, didn't show any considerable trehalose accumulation. The possible explanation is the relatively high initial trehalose content but more likely the trend to lower this content indicates a good adaptability and versatility of this strain to the fermentation conditions. This agrees with the practical experiences.

Glycogen as a reserve polysaccharide produced in the yeast cell is important mainly in early phase of primary fermentation. The results given in Fig. 2 show that the differences in glycogen content between particular strains, between the first and the third pitching weren't significant and also that the proportions by individual yeast strain hardly changed under the fermentation conditions tested. An interesting result is shown by strain No. 3 which produced more glycogen than the other three strains tested and the amount of glycogen produced remained about the same at all fermentation conditions tested. Strains Nos. 6 and 95 formed the most glycogen with the application of pressure at both temperatures of 10 °C and 12 °C. For the strain No. 9 the influence of the pressure was noticeable only at the maximum fermentation temperature of 12 °C. The pressure impact correlated positively with the number of pitchings for these three strains. This finding contradicts some theories suggesting that a high concentration of CO₂ inhibits anabolic processes during the fermentation. Anyway the differences between the strains tested indicate a significantly distinct sensitivity to the CO₂ content in the fermenting medium.

Contrary to the determination of trehalose and glycogen contents in the yeast cell, the acidification power test is a complex criterion related to the physiological condition of the yeasts. A very good physiological condition with high fermentative power is characterized by a value ≥ 2.4 . Values ranging from 2.0 to 2.4 are considered as acceptable and values ranging from 1.8 to 2.0 indicate reduced metabolic activity of the yeasts. Their use for pitching can bring a high risk of technological problems. The values obtained by the determinations ranged from 1.66 (for strain No. 9, at 12 °C, pressure 0,3 MPa, third pitching) to 2.63 (for strain No. 6, at 10 °C, atmospheric pressure, first pitching). The results given in Fig. 3 represent the changes in AP depending on the test conditions for particular yeast strains. The clearly highest values were determined for strain No. 6 after both, the first and the third pitching. Strain No. 9 depended most significantly on the fermentation conditions for both repitchings. Strains Nos. 3 and 95 indicated only a weak trend to lower values and therefore a worsening of physiological conditions. For all four strains tested a substantial reduction in AP at a temperature of 12 °C and pressure of 0,3 MPa was found. The impact of pressure and therefore CO₂ during the fermentation at 10 °C is significantly lower. From this respect it is surprising, that strain No. 95 recommended for fermentation in CCT doesn't differ much from some traditional strains kept in the culture collection of the RIBM. Its AP of 2.2 after the third pitching at 12 °C and a pressure of 0,3 MPa lay between strain No. 6 (2,3) and strain No. 9 (1,7). On the other hand it's obvious that at 10 °C and

Tab. 1 Shrnutí korelačních koeficientů / Summary of correlation coefficients

| Podmínky / Conditions | trehalosa x rychlost kvašení / trehalose x fermentation speed | glykogen x rychlost kvašení / glycogen x fermentation speed | acidifikační schopnost x rychlost kvašení / acidification power x fermentation speed | trehalosa x délka kvašení / trehalose x fermentation time | glykogen x délka kvašení / glycogen x fermentation time | acidifikační schopnost x délka kvašení / acidification power x fermentation time |
|--------------------------|--|--|--|--|--|--|
| 10 °C | -0.026 | 0.331 | -0.622 | 0.516 | -0.283 | -0.238 |
| 10 °C, 0,3 MPa | -0.542 | 0.351 | -0.688 | 0.400 | 0.297 | -0.247 |
| 12 °C | -0.501 | 0.126 | 0.506 | 0.521 | -0.097 | -0.509 |
| 12 °C, 0,3 MPa | -0.018 | 0.299 | -0.148 | -0.268 | 0.162 | 0.065 |

extraktu mezi 48. a 96. hodinou kvašení a délka kvašení nutná pro dosažení rozdílu mezi zdánlivým a dosažitelným prokvašením 10 %. Vypočtené korelační koeficienty shrnuje *tab. 1*.

Je zřejmé že se za námi použitých podmínek testování nezaznamenala souvislost mezi fyziologickým stavem kvasnic hodnoceným na základě obsahu trehalosy, glykogenu a acidifikační síly s parametry hlavního kvašení – rychlostí úbytku extraktu v exponenciální fázi kvašení a celkovou délkou kvašení. Tento výsledek není příliš překvapující, uvědomíme-li si, že složité pochody v buňce i komplexnost faktorů působících při kvašení jsou jen obtížně postihnutele jedním analytickým kritériem. To samozřejmě neznamená, že hodnocení fyziologického stavu kvasnic různými postupy má malý praktický význam. Zdravé, vysoce aktivní násadní kvasnice jsou nezpochybnitelně základním předpokladem pro bezproblémový průběh hlavního kvašení a požadovanou kvalitu piva. Jejich kontrola v tomto směru je nezastupitelná. Získané výsledky však nejsou dostačující pro jednoznačnou detailní předpověď průběhu hlavního kvašení.

5 ZÁVĚR

Stanovení obsahu trehalosy a glykogenu v kvasné buňce průtokovou cytometrií stejně jako acidifikační test umožňuje diferencovat reakci různých kvasných kmenů na konkrétní technologické podmínky při hlavním kvašení. Tyto postupy tak přispívají k podrobnější charakterizaci kmenů uchovávaných ve sbírkách a mohou být výtěžkem při výběru vhodného kmene pro konkrétní využití.

Nejsou však dostačující informací pro jednoznačnou předpověď průběhu hlavního kvašení za zvolených technologických podmínek. Korelaci mezi obsahem trehalosy, glykogenu a acidifikačním testem s rychlostí úbytku extraktu v exponenciální fázi kvašení a celkovou délkou kvašení se nepodařilo nalézt.

Poděkování

Tato práce je součástí projektu 2A-2TP1-031 Ministerstva průmyslu a obchodu.

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Do redakce došlo / Manuscript received: 10. 12. 2009

Přijato k publikování / Accepted for publication: 26. 3. 2010

LITERATURA / REFERENCES

- Heggart, H. et al: Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **37**, 2000, 409–430.
- Imai, T.: The assesment of yeast vitality – the past and the future, *Brewer s Guardian*, 1999, 20–27.
- O Connor-Cox, E. S. C., et al.: The use of yeast glycogen and trehalose contents as indicators for process optimisation. *Ferment* **9**, 1996, 321–328.
- Cahill, G., Walsh, P. K., Donnelly D.: Determination of yeast glycogen content by individual cell spectroscopy using image analysis, *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 2000, 312–322.
- Novák, J., Basařová, G., Fiala, J.: Rychlost zkvašování sacharidů mladiny a buněčný cyklus pivovarských kvasinek, II. Buněčný cyklus tří kmenů pivovarských kvasinek za podmínek modelového kvašení. *Kvasny Prum.* **50**, 2004, 126–129.
- Piper, P. W.: Differential role of Hsps and trehalose in stress tolerance- *Trends Microbiol.* **43**, 1998, 43–44.
- Shapiro, H. M.: *Practical Flow Cytometry*, Wiley-Liss, Inc., New York, 1995.
- Givan, A. L.: *Flow Cytometry, First Principles*, Wiley-Liss, New York, 1992.
- Boháčová, M.: Vliv technologického postupu kvašení na morfologické a fyziologické vlastnosti kvasinek. Diplomová práce, VŠCHT Praha, 2003.
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F., Scheper, T.: Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 2001, 350–360.
- Katsuragi, T., Tani, Y.: Screening for Microorganisms with Specific Characteristic by Flow Cytometry and Single-Cell Sorting. *J. Biol. Bioeng.* **89**, 2000, 217–222.
- Porro, D., Brambilla, B. M., Ranzi, E., Alberghina, L.: Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid. *Biotechnol. Prog.* **11**, 1995, 294–298.
- Hutter, K. J., Remor, M., Klein, K., Lange, C., Mueller, S.: Control of cell cycle, glycogen content and viability of brewing yeasts du-

a pressure of 0.3 MPa strain No. 95, alone, gave worse values than at 12 °C and a pressure of 0.3 MPa.

The differences between the yeast strains tested, obtained by flow cytometry and APT indicate that both methods can be successfully applied for yeast differentiation. However, a brewery production technologist must be able to judge immediately the physiological condition of the pitching yeast because of its impact on the sensory properties of beer. For this reason we have followed the relationship between the test results and the primary fermentation process. The monitored parameters were fermentation speed expressed as a change of apparent extract between the 48th and the 96th fermentation hour and the fermentation time necessary to achieve an attenuation difference of 10 %. The calculated correlation coefficients are summarized in the *Tab. 1*.

It is obvious that under the test conditions any correlation between the physiological condition of the yeasts as evaluated from trehalosa and glycogen contents and AP with primary fermentation parameters such as the speed of extract reduction in the exponential phase of fermentation and the total time of fermentation wasn't found. This result isn't surprising if the complicated processes in the cells and the complexity of influencing parameters during the fermentation are considered. These can hardly be expressed by only one single analytical criterion. However, it doesn't mean that assessments of the physiological condition of yeasts by different approaches have a negligible practical importance. These assessments are necessary, since healthy and highly active pitching yeasts are doubtless a basic requirement for a smooth process during primary fermentation and a desired beer quality. Nevertheless, the results obtained aren't adequate for a clear-cut and detailed prediction of the primary fermentation process.

5 CONCLUSIONS

The determinations of trehalose and glycogen contents in pitching yeasts by means of both, the flow cytometry and the acidification power test make it possible to distinguish between reactions of different yeast strains to particular technological conditions during primary fermentation. These findings add to the detailed characterization of strains kept in the culture collections and could be helpful for selecting a suitable strain for a specific usage.

Nevertheless, this information isn't adequate for a clear-cut prediction of the primary fermentation process under selected technological conditions. Any correlation between trehalosa and glycogen contents and acidification power and the speed of extract reduction in the exponential phase of fermentation and the total time of fermentation wasn't found.

Acknowledgements

The financial support by the Ministry of Industry and trade of the Czech Republic (project 2A-2TP1-031)

Translated by Eva Paterson

- ring fermentation by flow cytometric analysis, 28th European Brewing Convention, 2001, Budapest, 194–197.
- Boyd R. A., Gunasekera S. T., Attfield P. V., Simic K., Vincent F. S., Veal A.: A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery, *FEMS Yeast Res.* **3**, 2003, 11–22.
 - Partec GmbH, Firemní manuál: FloMax® Software pro průtokovou cytometrii – Operační manuál, Analýza dat.
 - Huter, K. J., Remor, M., Muller, S.: Biomonitoring in practice by optical fluorescence methods – VII. Studies on the flow cytometric determination of the glycogen content of brewery yeast, *Monatsschr. Brauwiss.* **53**, 2000, 68–76.
 - Opekarová, M., Sigler, K.: Acidification power: indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **27**, 1982, 395–403.
 - Kara, B. V., Simpson, W. M., Hammond, R. M.: Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *J. Inst. Brew.* **94**, 1988, 153–160.
 - Hollerová, I., et al.: Vitalita a stabilita násadních kvasnic: metody posuzování a vliv buněčných systémů pro stresovou resistenci. *Kvasny Prum.* **51**, 2005, 3–7.