

Z výzkumu a praxe

SEDIMENTAČNÍ A TURBIDIMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE KVASNIC

Ing. Jan ŠAVEL, CSc., Ing. Marie PROKOPOVÁ, B. Budvar, n.p. Č. Budějovice

Klíčová slova: kvasnice, koncentrace, sedimentační a turbidimetrické stanovení, mladina, kvašení

663.4

1. ÚVOD

Stanovení počtu buněk v zakvašené a kvasící mladině umožňuje posoudit standardnost zakvašování a průběh kvašení. Určení koncentrace kvasničných buněk ve várečných kvasnicích je velmi důležité pro stanovení správné zákvasné dávky, zejména při objemovém dávkování kvasnic. Tyto rozborů jsou důležitou částí denní kontroly při výrobě piva v otevřených kvasných kádích i ve velkoobjemových nádobách.

Nejčastěji se kvasničné buňky počítají pod mikroskopem v Bürkerově, nebo Thomově komůrce [1]. Tyto metody také obvykle slouží jako referenční měření při automatickém provozním dávkování kvasnic.

Přímé počítání buněk je časově náročné. Proto se používají fotometrické metody, založené na turbidimetrickém, nebo nefelometrickém principu. Fotometrické stanovení buněk po jejich odstředění a novém rozmíchání v hydroxidu amonném popsal Rainbow [2].

Hustota várečných kvasnic se stanovuje sušením, nebo odstředěním ve zvláštních nádobkách se zúženým koncem. Prvý postup je zdouhavý, druhý vyžaduje zvláštní nádoby, které se obtížně čistí.

Proto jsme ověřovali dvě jednoduché metody stanovení kvasničných buněk v mladině, dokvašovaném pivu i ve várečných kvasnicích.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Várečné kvasnice

Provozní várečné kvasnice (kmen č.2 podle sbírky VÚPS v Praze) se odebíraly ze zásobních van, nebo tanků, po předchozím praní vibračním sítem.

2.2 Skleněné válcovité kyvety

Válcovité kyvety s pryžovou zátkou, nebo šroubovým uzávěrem se dodávají v soupravách činidel pro kolorimetrická stanovení v optických měřicích firmy Dr. B. Lange (SRN). Vnější průměr kyvety je 13,5 mm, výška 85 mm. Kyvety se používaly pro sedimentační i turbidimetrická stanovení.

2.3 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra se měřila v křemenných kyvetách (tloušťka 10 mm) ve spektrofotometru CADAS 100 (Dr. B. Lange) proti destilované vodě. Spektrofotometr se řídil osobním počítačem s použitím původního software PCSCAN.

2.4 Sedimentační stanovení koncentrace várečných kvasnic

Vzorek várečných kvasnic se pipetoval, nebo nasával injekční stříkačkou do skleněné válcovité kyvety. Kyvety se odstředovaly v laboratorní odstředivce Chirana, n.p. (10 min, frekvence otáček 3000 min⁻¹) s vatou na dně kovových pouzder pro kyvety.

Po odstředění se určil podíl výšky sedimentu a celkové výšky náplně, měřeno ode vnitřního dna kyvety. Výsledek se vyjadřoval jako procentický podíl sedimentovaných kvasnic.

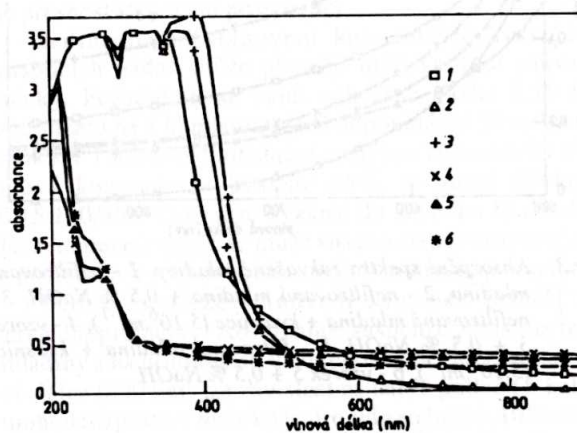
2.5 Turbidimetrické stanovení kvasnic

Do skleněné válcovité kyvety se pipetovaly 4 ml vzorku, obsahujícího kvasnice, přidalo se 0.4 ml 20% NaOH a po uzavření pryžovou zátkou se vzorek protřepal. Absorbance se měřila při 800 nm proti destilované vodě.

3. VÝSLEDKY

3.1 Vliv NaOH na rozpouštění kalů v mladině

Absorpční spektra nefiltrované mladiny se proměřila bez úpravy a s přidávkou 0,05 a 0,5 % NaOH. Podobným způsobem se proměřily vzorky vodné suspenze várečných kvasnic s přibližnou koncentrací 10⁷ buněk.ml⁻¹ (obr.1).



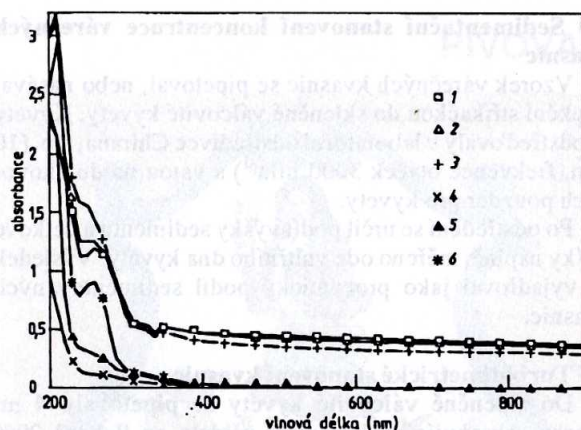
Obr.1 Absorpční spektra mladiny a kvasnic. 1 - nefiltrovaná mladina, 2 - mladina + 0,05 % NaOH, 3 - mladina + 0,5 % NaOH, 4 - kvasnice (10⁷.ml⁻¹), 5 - kvasnice, + 0,05 % NaOH, 6 - kvasnice + 0,5 % NaOH

Vzorky mladiny absorbovaly silně ve viditelné oblasti i v ultrafialové oblasti světla. Nenulová absorbance při

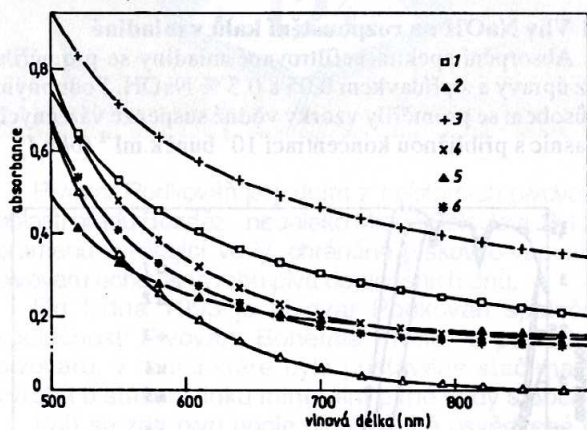
800 nm je způsobena částicemi kalů. Přidáním roztoku NaOH se rozpustily kalící částice, ale změnila se barva mladiny. Také poklesla hodnota zákalu, způsobeného kvasnicemi.

3.2 Vliv NaOH na absorpční spektra kvasnic

Absorpční spektra vodných suspenzí kvasnic ($10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$) se proměřovala bez úpravy vzorku a s přidáním 0,05 a 0,5 % NaOH. Po odstředění (10 min. frekvence otáček $3000 \cdot \text{min}^{-1}$) se opět zaznamenala spektra supernatantů (obr.2). Absorpční spektra v oblasti nad 500 nm pro suspenze kvasnic v různých soustavách uvádí obr.3.



Obr.2 Absorpční spektra kvasnic. 1 - kvasnice ($10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$), 2 - kvasnice + 0,05 % NaOH, 3 - kvasnice + 0,5 % NaOH, 4 - supernatant vzorku 1, 5 - supernatant vzorku 2, 6 - supernatant vzorku 3



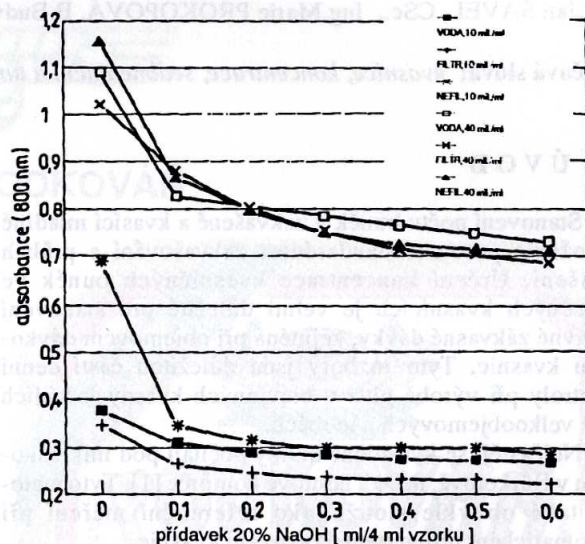
Obr.3 Absorpční spektra zakvašené mladiny. 1 - nefiltrovaná mladina, 2 - nefiltrovaná mladina + 0,5 % NaOH, 3 - nefiltrovaná mladina + kvasnice ($5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), 4 - vzorek 3 + 0,5 % NaOH, 5 - filtrovaná mladina + kvasnice ($5 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), 6 - vzorek 5 + 0,5 % NaOH

3.3 Závislost absorpce kvasničné suspenze na koncentraci NaOH

Ke 4 ml suspenze kvasnic v nefiltrované, filtrované mladiny a vodě se postupně přidával 20% roztok NaOH. Po každém přidání se po protřepání změřila absorpce při 800 nm (obr.4). Absorpce suspenze postupně klesala až do přidání 0,4 ml 20% NaOH.

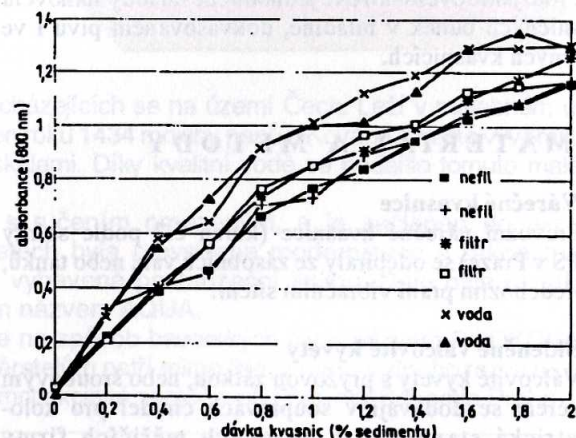
3.4 Závislost absorpce kvasničné suspenze na dávce kvasnic

Provozní kvasnice se odstřeďovaly 10 min při frekvenci otáček $3000 \cdot \text{min}^{-1}$ a k sedimentu se přidalo čtyřnásobné množství filtrované, nefiltrované mladiny, nebo vody. Po rozmíchání v ultrazvukové lázni se připravily různě zředěné suspenze kvasinek v příslušných soustavách.



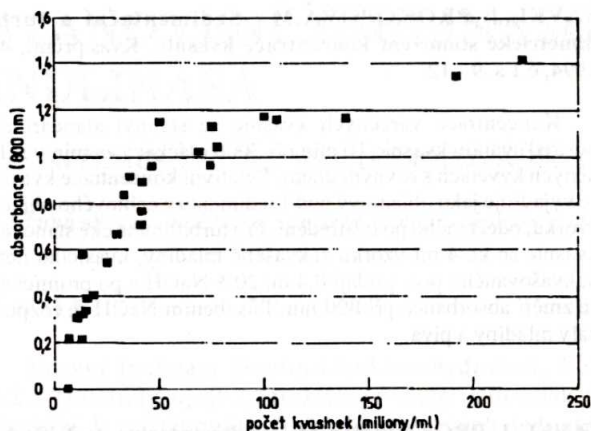
Obr.4 Závislost absorpce kvasničné suspenze (10 a $40 \cdot 10^6$ buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$) na dávce NaOH

Ke 4 ml zředěné suspenze se přidalo 0,4 ml 20% NaOH, po promíchání se změřila absorpce při 800 nm a stanovil počet buněk přímým počítáním pod mikroskopem. Dávka kvasnic se vyjadřovala jako objemový podíl (%) odstředěných kvasnic v naředěné suspenzi (obr.5,6).



Obr.5 Závislost absorpce kvasničné suspenze na dávce kvasnic

Při hodnotách absorpce do 1,0 lze považovat závislost absorpce na koncentraci buněk za lineární s konstantou úměrnosti 0,02 AU (absorbančních jednotek) $\cdot 10^6$ buněk $\cdot \text{ml}$. Při měření v mladiny je při malé koncentraci buněk nutné uvážit, že absorpce mladiny po přidání NaOH se může lišit od nuly a dosahovat hodnot až 0,01 AU.



Obr.6 Závislost absorbance kvasničné suspenze na koncentraci kvasničných buněk

3.5 Obsah kvasinek v provozních substrátech

V různých vzorcích, odebraných v průběhu výroby, se fotometricky stanovily kvasinky podle odstavce 2.5. Výsledky stanovení uvádí tab.1.

3.6 Koncentrace kvasnic v zásobních kvasnicích

Ve vzorcích kvasnic ze zásobních van, nebo tanků se stanovila koncentrace kvasnic sedimentační metodou (tab.2.).

Tab.1 Obsah kvasinek v provozních substrátech

Vzorek	Absorbance		Počet buněk.10 ⁶ ml ⁻¹	
	původní	+NaOH	turbidim.	počítání
nefiltr.mladina	0,270	0,010	0	0
zakvašená mladina	0,266	0,166+	7,8	5,5
kvasící mladina	0,983	0,657	32,9	29,0
kvasící mladina	0,941	0,675	33,8	30,1
sudované pivo	1,144	0,619	31,0	31,0
dokvašované pivo	0,611	0,410	20,5	15,8
dokvašované pivo	0,062	0,040	2,0	1,2
dokvašované pivo	0,015	0,010	0,2	0,5

+ odečtena hodnota 0,01

Tab.2 Koncentrace kvasnic v zásobních kvasnicích

Vzorek	Koncentrace kvasnic [% obj.sedimentu]	
	Vana	Tank
1	63,5	17,5
2	57,1	25,8
3	62,8	30,5
4	65,1	18,9
5	63,6	26,8

4. DISKUSE

Se snahou o standardní průběh výrobních operací narůstají nároky pro jejich kontrolu. Zejména při kvašení ve velkoobjemových nádobách je nutné udržet vysokou standardnost zákvasné dávky. K tomu se musí stanovit

koncentrace nasazovaných kvasnic a následně kontrolovat počet buněk v zakvašené mladině.

Při výrobě piva se používá označení "husté várečné kvasnice", za které se obvykle pokládají kvasnice, přirozeně sedimentované na zásobních vanách, z nichž se před zakvašováním slévá voda. Naproti tomu kvasnice v zásobních tancích velkoobjemových kvasných nádob se často uchovávají spolu s pivem a obvykle se před zakvašením homogenizují.

V provozu se často zakvašuje objemovými dávkovači. Pro určení správné dávky je nutné znát alespoň relativní objemovou koncentraci kvasnic. Jako základ jsme zvolili kvasnice, sedimentované po 10 min odstředování při frekvenci otáček 3000 .min⁻¹, protože podle našich zkušeností se objem sedimentu dalším odstředováním již nezmenšuje.

Koncentrace kvasnic se tak udává množstvím sedimentu v objemové jednotce suspenze, což jsou vlastně objemová procenta. Přesto se také používá v provozu vžitý název hustota, související s dalšími výrazy, např. husté, nebo řídké kvasnice.

Objemová procenta také odpovídají zákvasné dávce, která se obvykle udává v litrech "hustých" várečných kvasnic, přidávaných do 1 hl mladiny.

Stanovení koncentrace kvasnic touto metodou je velmi jednoduché, rychlé a především nezávislé na odměřeném objemu kvasnic. Přesnému odměření (pipetování) kvasnic a stanovení jejich koncentrace jinou nezávislou metodou často brání jejich napěnění. Odstředění přitom dokonale rozdělí kvasnice od tekutiny.

Doporučujeme stanovení sedimentu bez přídavku hydroxidu sodného, neboť v provozu se rovněž odměřují kvasnice v přirozeném stavu a objemový podíl kalů je obvykle zanedbatelný.

Pro pohodlné odečítání sedimentu se osvědčily kyvetty firmy Dr.B.Lange (SRN), které také umožňují další rozmíchávání a ředění kvasničných suspenzí, popř. jejich kolorimetrické proměření. K snazšímu odečítání množství sedimentu kvasnic je výhodné použít válcovitou kyvetu, opatřenou měřítkem. Rozptyl křivek na obr.5 patrně souvisí s nepřesnostmi odečtu sedimentu, ale pro praktické účely je přesnost stanovení postačující.

Sedimentační stanovení koncentrace kvasnic ze zásobních nádob může přesněji určit velikost zákvasné dávky. Požaduje-li se např. zákvasná dávka 0,15 litru sedimentu na 1 hl mladiny (což odpovídá asi 10 milionům buněk v 1 ml) a sedimentační analýzou se stanovila objemová koncentrace kvasnic 35%, je nutné dávkovat 0,15.100/35 = 0,43 litru kvasnic do každého hl mladiny. Koncentrace kvasnic se může snadno stanovovat současně s počítáním mrtvých buněk a jejich mikroskopováním.

Turbidimetrické stanovení kvasinek přináší dva základní problémy. Absorbance suspenze závisí na barvě mladiny a na přítomnosti kalů. Při dostatečně vysoké vlnové délce (800 nm) lze závislost na barvě potlačit a kaly se mohou rozpustit v roztoku hydroxidu sodného. 10% roztok hydroxidu sodného se obvykle používá při mikroskopování várečných kvasnic.

Na obr.1 a 2 je dobře patrný vliv roztoku NaOH při působení na suspenzi kvasnic v mladině a ve vodě. Působením NaOH se sice výrazně přibarvuje mladina, ale také podstatně klesá zákal mladiny i při relativně nízké koncentraci NaOH.

Naproti tomu se přidavkem NaOH mění i optické vlastnosti suspenze várečných kvasnic, jejichž absorbance při 800 nm se působením NaOH snižuje. Současně vzrůstá absorbance rozpustných látek v oblasti okolo 260 nm. Pokles absorbance nelze vysvětlit rozpouštěním absorbovaných kalů na kvasnicích, neboť absorbance klesala i po několikanásobném proprání kvasnic vodou.

Také množství kalů, pozorovaných mikroskopem, neodpovídalo výraznému poklesu absorbance po přidavku NaOH. Pravděpodobně se působením NaOH z kvasnic uvolňují vysokomolekulární látky, které přecházejí do roztoku.

Podle obr.4 se dalším přidavkem NaOH absorbance suspenze dále nemění. Pro další stanovení se používal standardní přírůbek 0,4 ml 20% NaOH na 4 ml vzorku, což odpovídá výsledné koncentraci asi 1,8 % NaOH.

Zpracování závislosti absorbancí kvasničných suspenzí s přidavkem NaOH prokázalo lineární závislost mezi absorbancí (800 nm) a počtem kvasinek se směrnici $0,02 \text{ AU} \cdot 10^{-6} \text{ buněk.ml}$. Při zpracování provozních materiálů je zejména při kontrole zakvašování vhodné do výpočtu zahrnout i obvyklou zbytkovou hodnotu zákalu mladiny po přidavku NaOH, která může dosáhnout až hodnoty 0,01 AU.

Turbidimetrickou metodou se může kontrolovat standardnost zakvašování i při relativně nízkých zákvasných dávkách, neboť 10 milionům buněk odpovídá již dobře měřitelná absorbance 0,2 AU. Další výhodou přidavku NaOH je zastavení růstu kvasinek a eliminace bublinek oxidu uhličitého. Přesto doporučujeme odebraný vzorek protřepat.

Metoda může alespoň orientačně posoudit přítomnost kalů ve vzorcích, neboť pokles absorbance kvasnic působením NaOH činí asi 35 %. Vyšší pokles po přidavku NaOH tedy svědčí o přítomnosti kalů, jak tomu odpovídají údaje v tab.1, podle nichž klesá množství kalů s dobou kvašení, popř. dokvašování piva.

Turbidimetricky se mohou stanovit kvasinky ve spektrofotometru, nebo v levnějším fotometru s příslušným filtrem, např. v jednom z přenosných fotometrů firmy Dr.B.Lange. Tyto fotometry, které současně slouží k základním rozborům piva a vody, rovněž používají válcovité kyvety.

Hlavní výhodou turbidimetrické metody je její rychlost, umožňující kontrolovat velké množství vzorků v krátkém čase a odhadnout tak např. možné obtíže při filtraci, spotřebu křemelinu apod.

LITERATURA

- [1] ŠAVEL,J.: Mikrobiologická kontrola v pivovarech. 1.vyd., Praha 1980.
- [2] RAINBOW,C.: J.Inst.Brew. 74, 1968, s.427
Lektorovala Ing.B.Pardonová
Do redakce došlo 20.10.1993

ŠAVEL,J.-PROKOPOVÁ,M.: Sedimentační a turbidimetrické stanovení koncentrace kvasnic. Kvas.prům., 40, 1994, č.1 s. 9 - 12

Koncentrace várečných kvasnic se stanoví standardním odstředováním kvasnic 10 min při 3000 otáčkách za min v skleněných kyvetách s rovným dnem. Relativní koncentrace kvasnic se vyjadřuje jako objemový podíl sedimentu z celkového objemu vzorku, odečteného po odstředění. Pro turbidimetrické stanovení kvasnic se ke 4 ml vzorku zakvašené mladiny, kvasícího nebo dokvašovaného piva přidají 0,4 ml 20% NaOH a po promíchání se změří absorbance při 800 nm. Působením NaOH se rozpustí kaly mladiny a piva.

ŠAVEL,J.-PROKOPOVÁ,M.: Sedimentative and Turbidimetric Assessment of Yeast Concentration, Kvas.prům., 40, 1994, No 1, pp. 9 - 12

Pitching yeast concentration is assessed by standard centrifugation of yeast for 10 min (3000 r.p.m) in flat-bottomed glass cells. Relative yeast concentration is expressed as a sediment volume fraction on sample total volume, read after centrifugation. For turbidimetric yeast assessment, 0,4 ml of 20% NaOH was added to 4 ml sample containing fermented hopped wort, fermenting or secondary fermented beer; after stirring-up an absorbance value was measured at 800 nm. NaOH activity effects sludge dissolution contained in hopped wort and beer.

ŠAVEL,J.-PROKOPOVÁ,M.: Sedimentative und turbidimetrische Bestimmung der Hefekonzentration. Kvas.prům., 40, 1994, Nr.1, 9 - 12

Die Konzentration der Bierhefe wird durch Standardzentrifugierung der Hefen 10 min bei Drehzahl 3000 min^{-1} in Glasküvetten mit ebenem Boden bestimmt. Die relative Hefekonzentration wird als Volumenanteil des Sediments aus dem Gesamtvolumen der Probe, das nach dem Zentrifugieren abgelesen wurde, ausgedrückt. Für die turbidimetrische Bestimmung der Hefen werden zu den 4 ml der Probe vergärter Würze, gärenden oder nachgerändenes Bieres 0,4 ml 20 % NaOH zugegeben und nach Durchmischung wird die Absorbanz bei 800 nm gemessen. Durch Einwirkung des NaOH wird der Trub der Würze und des Bieres gelöst.

Шавел, Я. - Прокопова, М. : Седиментационное и турбидиметрическое определение концентрации дрожжей. Квас. прум., 40, 1994, №1, стр. 9 - 12

Концентрация варочных дрожжей определяется стандартным центрифугированием дрожжей в течение 10 мин. при 3000 оборотах/мин в стеклянных кюветках с плоским дном. Относительная концентрация дрожжей выражается как объемная доля седимента от суммарного объема пробы отсчитанной после центрифугирования. В целях турбидиметрического определения дрожжей к 4 мл образца заквашенного охмеленного сусла, бродящего или дображиваемого пива добавляется 0,4 мл 20 % -го гидроксида натрия и после перемешивания измеряется абсорбанция при 800 нм. Под действием гидроксида натрия растворяются осадки охмеленного сусла и пива.