

DOI: 10.18832/kp201825

# Measurement of yeast concentration in rectangular and cylindrical cuvette Měření koncentrace kvasinek v pravouhlé a válcovité kyvetě

Jan ŠAVEL, Petr KOŠIN, Adam BROŽ

Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, CZ-370 21 České Budějovice  
Budweiser Budvar, N.C., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice

e-mail: jan.savel@volny.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

**Šavel, J., Košin, P., Brož, A.: Measurement of yeast concentration in rectangular and cylindrical cuvette. Kvasny Prum. 64(5): 217–223**

Knowledge of yeast concentration is necessary for the pitching rate estimation. Centrifugation and turbidimetric method present rapid and easy methods for the determination of yeast concentration. There are many variants of such techniques to monitor laboratory fermentations even in test tube sizes. Procedures with and without sodium hydroxide solution were compared and evaluated. A simple calculation procedure is based on two parameters, which have to be determined for the local condition of each brewery. They cover yeast dry matter content of yeast sample and the yeast count related to 1 g completely dry yeast. It enables to calculate the probable cell count in pitched substrate, which can be used for the photometric calibration curve construction. Linear and logarithmic relation was used to express relation between yeast concentration and absorbance at 800 nm. The method based on yeast deflocculation enabled to estimate starting yeast activity.

**Šavel, J., Košin, P., Brož, A.: Měření koncentrace kvasinek v pravouhlé a válcovité kyvetě. Kvasny Prum. 64(5): 217–223**

Znalost koncentrace násadních kvasnic je nutná pro stanovení zákvasného poměru. Odstředování a turbidimetrie představují rychlé a snadné metody pro stanovení koncentrace kvasinek. Existuje mnoho variant těchto technik pro sledování laboratorního kvašení dokonce ve zkumavkách. Postupy s přidavkem roztoku hydroxidu sodného a bez něj byly zkoumány a srovnávány. Jednoduchý výpočetní postup se zakládá na dvou parametrech, které se musí stanovit pro místní podmínky každého pivovaru. Parametry zahrnují sušinu kvasnic a počet kvasinek v 1 g kvasnic. Postup umožňuje vypočítat počet kvasinek v zakvašeném substrátu, což lze využít pro konstrukci kalibrační křivky. Lineární a logaritmický vztah se použil pro vyjádření vztahu mezi koncentrací kvasinek a absorbcí při 800 nm. Hodnotila se také metoda umožňující stanovení kvasničné aktivity založená na kvasničné deflokulaci.

**Keywords:** centrifugation, deflocculation test, photometry, pressed yeast, yeast activity, yeast concentration, yeast pitching, yeast trub**Klíčová slova:** deflokulační test, fotometrie, kvasničná aktivita, kvasničné kaly, koncentrace kvasinek, lisované kvasnice, odstředování, zakvašování

## 1 INTRODUCTION

Yeast consistency is associated with its cell concentration. Yeast slurry also contains trub, which can be removed by sieving, washing with water or chemical treatment.

Yeast pitching rate can be expressed as cell count or dry matter amount in pitched substrate. Traditionally the amount of 0.5 liter of thick bottom yeast per 1 hl of wort is recommended which responds to 15 millions of cell in one ml of wort (Kunze, 2004; Narziss, 1986). 1 lb pressed yeast per UK beer barrel is usually recommended in English spoken countries (0.277 kg/hl wort,  $10 \cdot 10^6$  cel/ml).

Analytica EBC (Yeast analysis) provides the following methods for pitching rate determination:

- haemocytometry
- electronic counter
- photometric determination
- centrifugation
- dry weight determination

Haemocytometry uses various types of counting chambers. The depth of chambers is usually 0.1 mm, area of the large central square is 1 mm<sup>2</sup>, which limits the volume up to 0.1 μl. The large square is divided by the cuts into small ones.

Electronic counters are based on various principles such as conductivity or capacitance measurement, radiometry, luminometry, cytometry or acoustic photometry measurement (Basařová et al., 2017).

Photometric determination uses turbidimetry or nephelometry based on relation between yeast concentration and absorbance or haze measurement. Longer wavelength  $\lambda = 1000$  nm (Upperton, 1969) or 800 nm (Šavel and Prokopova, 1994) were used to eliminate sample color. The wavelength 800 nm was used for so called deflocculation test. The pitched wort was shortly centrifuged and spontaneous growth of absorbance was observed thanks to yeast deflocculation (Basařová et al., 2017). Yeast suspensions are usually centrifuged in test tubes or centrifugation cuvettes with flat or conical bottom.

For dry matter determination the well washed yeast are drying at 105 °C for one to several hours. The pitching yeast contains varying

## 1 ÚVOD

Konzistence násadních kvasnic souvisí s koncentrací kvasničných buněk. Neprané kvasnice také obsahují kaly, které se mohou odstranit praním na sítích, promýváním vodou, nebo působením chemikálií.

Zákvasný poměr se může uvádět jako počet buněk nebo množství sušiny v zakvašeném substrátu. Tradičně se doporučuje množství 0,5 l hustých spodních kvasnic na 1 hl mladiny, což odpovídá 15 milionům buněk v 1 ml mladiny (Kunze, 2004; Narziss, 1986). V anglicky mluvících zemích se doporučuje 1 libra lisovaných kvasnic na anglický pivní barel (0.277 kg/hl wort,  $10 \times 10^6$  buněk/ml).

Analytica EBC (Analýza kvasnic) doporučuje následující metody pro stanovení zákvasné dávky:

- přímé počítání buněk v komůrce
- elektronické měření koncentrace
- fotometrické stanovení
- centrifugace (odstředování)
- gravimetrické stanovení sušiny

Přímé počítání buněk používá různé druhy počítacích komůrek. Jejich hloubka je obvykle 0,1 mm a plocha středového čtverce je 1 mm<sup>2</sup>, což vymezuje objem 0,1 μl. Velký čtverec je rozdělen zářezy na malé čtverečky.

Elektronické počítače kvasinek se zakládají na různých principech, jako jsou měření vodivosti nebo kapacitance, radiometrie, luminometrie, cytometrie nebo akustická fotometrie (Basařová et al., 2017).

Fotometrické stanovení používá turbidimetrii nebo nefelometrii, založené na vztahu mezi koncentrací kvasinek a absorbcí nebo zákalem. Pro eliminaci barvy se použily delší vlnové délky  $\lambda = 1000$  nm (Upperton, 1969) nebo 800 nm (Šavel a Prokopová, 1994). Vlnová délka 800 nm se použila v tzv. deflokulačním testu. Zakvašená mladina se krátce odstředila a pozoroval se samovolný nárůst absorbance jako projev deflokulace (Basařová et al., 2017). Kvasničná suspence se obvykle odstřeďuje ve zkumavkách nebo centrifugačních kyvetách s plochým nebo kuželovitým dnem.

Pro stanovení sušiny se dobře proprané kvasnice suší po 1 až několik hodin při 105 °C. Násadní kvasnice obsahují různá množství

amount of nucleic bases, protein, polyphenol, gummy materials including bitter resins and their oxidation products. It can be dissolved by alkali solutions. 0.1 ml ammonia hydroxide (5 mol/l) or 0.5 ml sodium or potassium hydroxide (20 to 40 % w/w) to 10 ml yeast suspension is added to clean yeast cell (Analytica EBC, method 3.1.2.2). Alkali and non alkali dry matter determination can be used.

The centrifugation method is based on forced sedimentation of yeast slurry. Well washed yeasts are usually centrifuged at 3000 rpm (2000g) for 10 or 15 min and volume of sediment is measured. If the cell count is too low (under  $5 \cdot 10^6$  /ml) yeast can be concentrate by another centrifugation followed by re-suspension of yeast pellet in smaller volume of water (Rainbow, 1968).

Non alkali dry matter of pressed pitching yeast is about 30%, which is approximate limit for its mechanical dewatering (Šruma, 1999). There is the relation between yeast treatment and dry matter: 1 lb dried yeast (100%) = 2.9 lb vacuum pressed (34.5%) = 3.6 lb centrifuged yeast (27.8%) (Palmer, 1969).

Four methods of measuring yeast concentration were examined. Brewing yeast was washed in distilled water, drained at vacuum pump and diluted to 20 g/l. The average dry weight (3.3 mg/l) after ammonia hydroxide addition and cell count ( $66 \cdot 10^6$ /ml) were determined in five laboratories (Rainbow, 1968).

For yeast harvested from 12 breweries the pitching rate 0.5 lb/bbl (about 0.139 l/hl) responded to  $6.5 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^6$  cells/ml. The yeast varied from 10 to 37% and the trub content decreased to 0 to 27% after alkali treatment (Palmer, 1969). The precision of the centrifugation was increased by alkali washing. On the other hand the natural parts e.g. nucleic basis of yeast can be washed out by this procedure.

The same strategy was used for pitched wort to control yeast concentration in it (Analytica EBC, method 3.1.2.2). The relation between yeast cell concentration and its absorbance must be set up. The form of the relation curve depends on many factors including size and form of yeast cell, tendency to flocks formation, composition of cultivation media, presence of cold breaks and others.

Malsters and brewers often need to evaluate malt quality according to fermentation behavior. For this purposes many small fermentation test had been developed enabling testing various malt cultivars in large series. The influence of vessel shape, yeast pitching number and other parameters were studied in several papers (McIntosh and Addler, 2012; Speers and Stokes, 2009).

Some still not fully clarified fermentation activities such as premature yeast flocculation (PYF) can also be studied in small fermentation tubes (Lake and Speers, 2008). This paper deals with comparison between rectangular and cylindrical cuvette used for photometric and centrifugation method for yeast cell concentration measurement.

## 2. MATERIALS A METHODS

### 2.1 Yeast

Bottom yeast (*S. pastorianus*) was taken from production yeast tanks containing washed and sieved yeast harvested after main fermentation. The samples were pressed and washed by brewing water in laboratory pressure filter. The pressed yeast cake (1 to 20 g/l, about 30% dry matter) was homogenized in distilled water or filtered wort to obtain yeast concentration ranging from  $6 \cdot 10^6$  cell/g to  $2 \cdot 10^8$  cell/g. Yeast dry matter and cell concentration using Thoma counting chamber were determined.

### 2.2 Yeast centrifugation

The yeast suspension was placed inside a tube with a flat bottom and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. Original cuvettes LCW 906 (1.1 cm inner diameter) were purchased from Hach Lange, CZ. Volume 1 ml is equal to 1 cm height in this cuvette. The ratio of the sediment height to the height of the tube content after centrifugation is named volume ratio of centrifuged yeast. Centrifuge with swinging bucket rotor was used to obtain horizontal level of yeast sediment.

### 2.3 Yeast turbidimetry

Cell concentration and absorbance of the yeast suspension in distilled water or wort were measured with and without sodium hydroxide addition (20% m/m, 1.0 ml to 10 ml). The rectangular (1x1 cm) or cylindrical cuvette with sample was inverted several times and absorbance measured in the spectrophotometer CADAS 5000 (Hach Lange, CZ).

bází nukleových kyselin, bílkovin, polyfenolů, gumovitých materiálů včetně jejich oxidačních produktů. Tyto látky se mohou rozpustit alkalickými roztoky. Přidává se 0,1 ml hydroxidu amonného (5 mol/l) nebo 0,5 ml hydroxidu sodného (20 až 40 % w/w) k 10 ml kvasničné suspenze, aby se omyl povrch kvasničných buněk (Analytica EBC, metoda 3.1.2.2). Sušina kvasnic se může stanovit s použitím alkalických prostředků, nebo bez nich.

Centrifugační metoda využívá nucené sedimentace kvasnic. Dobře promyté kvasnice se odstředují se při 3000 ot/min (2000g) po dobu 10 nebo 15 minut a měří se objem sedimentu. Pokud je počet buněk příliš nízký (pod  $5 \times 10^6$  /ml), mohou se kvasinky koncentrovat dalším odstředěním, po kterém se kvasnicová peleta resuspenduje v menším objemu vody (Rainbow, 1968).

Sušina lisovaných kvasnic je asi 30%, což je přibližná mezní hodnota jejich mechanického odvodnění (Šruma, 1999). Udává se vztah mezi způsobem odvodnění kvasnic a jejich sušinou: 1 lb sušených (100%) = 2,9 lb vakuově odsátých (34,5%) = 3,6 lb odstředěných kvasnic (27,8%) (Palmer, 1969).

Ověřovaly se čtyři metody měření koncentrace kvasinek. Várečné kvasnice byly promyty destilovanou vodou, odvodněny vývěvou a zředěny na koncentraci 20 g/l. V pěti laboratořích se stanovila průměrná sušina (3,3 mg/l) kvasnic po přidání hydroxidu amonného a počet buněk ( $66 \times 10^6$  /ml) (Rainbow, 1968).

Při zákvasné dávce 0,5 lb/bbl (asi 0,139 l/hl) kolísal počet buněk u 12 pivovarů v rozmezí  $6,5 \cdot 10^6 \pm 1,1 \cdot 10^6$  buněk / ml. Obsah kalů kolísal od 10 do 37% a klesl na 0 až 27% po alkalickém praní (Palmer, 1969). Alkalickým praním se zvýšila přesnost centrifugační metody. Na druhé straně se tímto postupem mohou z kvasnic vymýt např. části nukleových kyselin, popř. jejich štěpy.

Stejný postup se používá při kontrole koncentrace kvasnic v mladině (Analytica EBC, metoda 3.1.2.2). Předem se musí nastavit vztah mezi koncentrací kvasinek a absorbancí mladiny. Tvar relační křivky závisí na mnoha faktorech, jako jsou rozměry a tvar buněk, jejich flokulace, složení kultivačního média, přítomnost studených kalů a další.

Sladaři a pivovarníci často potřebují posoudit kvalitu sladu podle průběhu kvašení. Za tímto účelem byly vyvinuty malé zkoušky, testující kultivary sladu ve velkých sériích. Vliv tvaru kvasné nádoby, počtu buněk při zakvašení a jiných parametrů se studovalo v několika sděleních (McIntosh a Adler, 2012; Speers a Stokes, 2009).

Některé dosud ne zcela objasněné závady kvašení jako předčasná flokulace kvasnic (PYF) se mohou také studovat v malých kvasných válcích (Lake a Speers, 2008).

Tento článek se zabývá srovnáním mezi pravoúhlými a válcovitými kyvetami, používanými pro fotometrickou a centrifugační metodu měření koncentrace kvasinkových buněk.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2.1 Kvasnice

Spodní pivovarské kvasinky (*S. pastorianus*) pocházely ze zásobních kvasničných tanků obsahujících várečné kvasnice z výroby, promyté a pročištěné na vibračních sítích. Vzorky kvasnic se promyly varní vodou a lisovaly v laboratorním tlakovém filtru. Vylisovaný kvasnicový koláč (1 až 20 g/l, přibližně 30 % sušiny) se rozmíchal v destilované vodě nebo ve filtrované mladině, aby se dosáhla koncentrace kvasinek v rozmezí  $6 \times 10^6$  až  $2 \times 10^8$  buněk/g. V suspenzích se stanovila kvasničná sušina a koncentrace buněk s použitím Thomovy komůrky.

### 2.2 Centrifugace (odstředování) kvasinek

Kvasničná suspenze se odstředovala 10 minut při 3000 min<sup>-1</sup> ve válcovité kyvetě s plochým dnem. Původní kyvety LCW 906 (1,1 cm vnitřní průměr) pocházely od firmy Hach Lange, Česká republika). 1 ml objemu ve válcovité kyvetě odpovídá vnitřnímu průměru kyvety LCW 906 (1,1 cm) v této studii. Poměr výšky sedimentu k celkové výšce obsahu kyvety po centrifugaci se nazývá objemový podíl odstředěných kvasnic. K získání horizontální mladiny kvasničné sedimentu se použila odstředivka s výkyvným rotorem.

### 2.3 Turbidimetrie kvasničné suspenze

Absorbance a koncentrace kvasničné suspenze se měřila v destilované vodě nebo mladině bez a s přidavkem hydroxidu sodného (20% m/m, 1,0 ml k 10 ml suspenze). Pravoúhlá (1x1 cm), nebo válcovitá kyveta se několikrát obrátila a absorbance se měřila ve spektrofotometru CADAS 5000 (Hach Lange, Česká republika).

## 2.4 Deflocculation test

The original version of this test was mentioned in 1984 as photometric test, which was lately changed into deflocculation test (Basařová et al., 2017). In the temporary paper, the condition influencing test results are mentioned.

## 2.5 Yeast washing efficiency

Harvested yeast was centrifuged, supernatant poured off (water 0), distilled water equal to sediment volume was added and after decantation the sample was centrifuged again. The supernatant was collected and its absorption spectrum recorded. This procedure was repeated three times to receive third washing water (water 3). The spectra measurement was repeated after the addition sodium hydroxide (20% w/w, 1 ml/10 ml washing water).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Relation between yeast dry matter and its concentration

#### Calculation of yeast concentration

The dry matter of pitching yeast can be expressed using yeast mass fraction:

$$1. \quad w_y = \frac{m_d}{m_y} = \frac{m_d}{m_d + m_{H_2O}}$$

where  $w_y$  is the mass fraction of yeast dry matter,  $m_d$  is the mass of dry yeast matter,  $m_y$  is the mass of pitching yeast before drying,  $m_{H_2O}$  is the mass of water. It can be also expressed as percent after multiplying by 100.

Yeast concentration can be also given as cell count per mass or volume unit, which can be interchanged because specific gravity of yeast is near 1 for water. Pitching rate is amount of pitching yeast (yeast dose,  $m_y$ ,  $w_y$ ) added to a volume or mass of substrate to achieve a desired yeast concentration:

$$2. \quad PR = \frac{m_y}{V} \cong \frac{m_y}{m_y + m_s}$$

where  $PR$  is pitching rate,  $m_y$  is yeast dose,  $V$  is the total volume of pitched substrate,  $m_s$  is the mass of substrate.

Yeast mass depends on its dry matter:

$$3. \quad m_y w_y = (m_y + m_s) w_{ps}$$

where  $w_{ps}$  is the mass yeast concentration in yeast,  $w_{ps}$  is the mass fraction of dry yeast in pitched substrate.

Yeast cell count can be also usually given per mass unit of pitching yeast.

$$4. \quad n_y = n_d w_y$$

where  $n_y$  is the cell count per 1 g pitching yeast,  $n_d$  is the cell count per 1 g yeast dry matter, but the numbers depends on top or bottom yeast, trub amount of and dry matter determination procedure.

Yeast dry mass fraction or yeast concentration can be also determined through yeast centrifugable volume:

$$5. \quad V_R = \frac{V_c}{V_c} = \frac{V_c}{(V_c + V_s)}$$

where  $V_R$  is the volume ratio of centrifuged yeast,  $V_c$  is the volume of yeast sediment,  $V_s$  the volume of substrate above it,  $V_c$  is total volume after centrifugation. Mass fraction of yeast dry matter of centrifuged yeast ( $w_c = 0.28$ ) is close to dry matter of vacuum or mechanically pressed yeast ( $w_y = 0.30$ ). Yeast is therefore less compressed during centrifugation than at mechanical pressing. For the estimation of pressed yeast mass fraction, the  $V_R$  has to be multiplied by ratio 0.30/0.28.

In the case of the cylindrical cuvette with flat bottom the formula can be written as:

$$6. \quad V_R = \frac{h_c}{h_v}$$

## 2.4 Deflokulační test

Původní verze testu pochází z roku 1984, kde se označuje jako fotometrický test. Později byl tento test označen jako deflokulační test (Basařová et al., 2017). V současném sdělení se ověřují podmínky, ovlivňující výsledky tohoto testu.

## 2.5 Vliv prání kvasnic na absorpční spektra

Sebrané kvasnice se odstředily a supernatant odlil (voda 0). K sedimentu se přidal stejný objem destilované vody a po dekantaci se odstředování opakovalo. Tento postup byl třikrát opakován pro získání třetí prací vody. Měření spekter se opakovalo bez a po přidavku hydroxidu sodného (20% hmotnostních, 1 ml/10 ml mycí vody).

## 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 3.1 Vztah mezi sušinou kvasnic a jejich koncentrací

#### Výpočet koncentrace kvasnic

Sušina kvasinek se může vyjádřit hmotnostním zlomkem:

$$1. \quad w_y = \frac{m_d}{m_y} = \frac{m_d}{m_d + m_{H_2O}}$$

kde  $w_y$  je hmotnostní podíl kvasničné sušiny,  $m_d$  je hmotnost sušiny kvasnic,  $m_y$  je hmotnost násadních kvasnic před sušením,  $m_{H_2O}$  je hmotnost vody. Sušina se může také vyjádřit v procentech po vynásobení 100.

Koncentrace kvasinek může být také dána jako počet buněk na jednotku hmotnosti nebo objemu, které lze zaměnit, protože relativní hustota kvasinek je přibližně 1 jako pro vodu. Zákvasný poměr je množství násadních kvasnic (zákvasná dávka,  $m_y$ ,  $w_y$ ) přidané k objemu nebo hmotnosti substrátu k dosažení požadované koncentrace kvasinek

$$2. \quad PR = \frac{m_y}{V} \cong \frac{m_y}{m_y + m_s}$$

kde  $PR$  je zákvasný poměr,  $m_y$  je zákvasná dávka,  $V$  je celkový objem zakvašeného substrátu,  $m_s$  je jeho hmotnost.

Hmotnost kvasnic závisí na jejich sušině.

$$3. \quad m_y w_y = (m_y + m_s) w_{ps}$$

kde  $w_{ps}$  je hmotnostní zlomek sušiny kvasnic v zakvašeném substrátu.

Počet kvasničných buněk se může také vztahovat na hmotnostní jednotku násadních kvasnic.

$$4. \quad n_y = n_d w_y$$

kde  $n_y$  je počet buněk v 1 g násadních kvasnic,  $n_d$  je počet buněk v 1 g suchých kvasnic, ale tyto počty závisí na svrchních nebo spodních kvasinkách, množství kalů a způsobu stanovení sušiny.

Hmotnostní zlomek sušiny, nebo koncentrace kvasinek se také mohou stanovit jako objemový podíl odstředěných kvasnic.

$$5. \quad V_R = \frac{V_c}{V_c} = \frac{V_c}{(V_c + V_s)}$$

kde  $V_R$  je objemový podíl odstředěných kvasnic,  $V_c$  je objem kvasničného sedimentu,  $V_s$  je objem substrátu nad ním,  $V_c$  je celkový objem v kvetě po centrifugaci. Hmotnostní zlomek sušiny kvasnic odstředěných kvasnic ( $w_c = 0.28$ ) je blízký sušině vakuově nebo mechanicky lisovaných kvasnic ( $w_y = 0.30$ ). Kvasinky jsou proto během centrifugace méně stlačeny než při mechanickém lisování. Pro odhad hmotnostní frakce lisovaných kvasnic musí být  $V_R$  násoben poměrem 0,30/0,28.

Pro válcovitou květu s plochým dnem se tento vztah může vyjádřit jako:

$$6. \quad V_R = \frac{h_c}{h_v}$$

where  $h_c$  is the height of yeast centrifugate  $h_v$  is the total height of cuvette content above flat bottom after centrifugation. From the same reason if the pressed yeast ( $w_y = 0.3$ ) is used at yeast suspension preparation the higher  $h_c$  is obtained and has to be corrected.

The height of yeast centrifugate in cylindrical cuvette can be estimated according to equation

$$7. \quad w_c = \frac{h_c}{h_v}$$

where  $w_c$  is the mass fraction of dry matter of yeast centrifugate

$$8. \quad h_c d^2 = v_c$$

where  $d$  is the cuvette diameter.

### 3.2 Relation between turbidity and yeast concentration

#### 3.2.1 Low range of yeast concentration

Cell concentration and absorbance of the yeast suspension prepared from pressed yeast (0 – 2g pressed yeast / l pitched suspension) were measured without and with sodium hydroxide addition

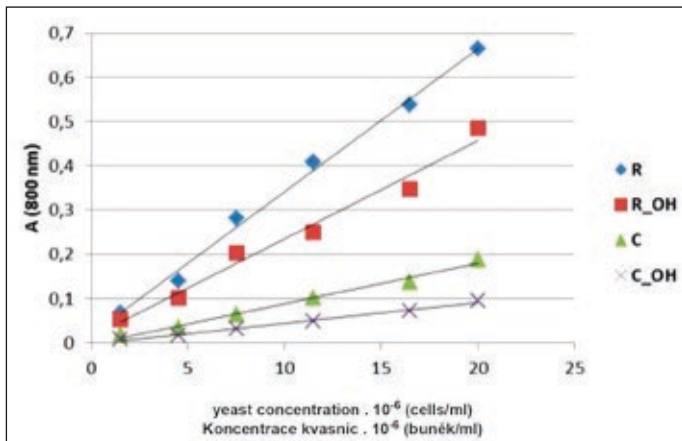


Fig. 1 Absorbance (800 nm) of yeast suspension in distilled water with alkali (OH) and non alkali addition in rectangular (R) or cylindrical (C) cuvette versus yeast concentration  
Obr. 1 Absorbance (800 nm) kvasničné suspenze v destilované vodě s přidavkem hydroxidu sodného (OH) a bez něj v pravoúhlé (R) nebo válcovité (C) kyvetě v závislosti na kvasničné koncentraci

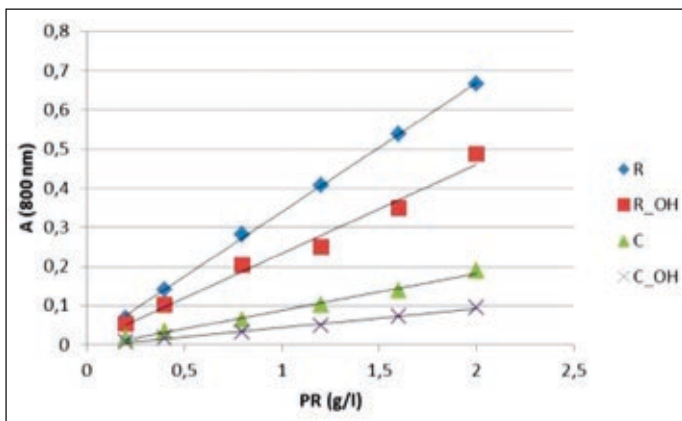


Fig. 2 Absorbance (800 nm) of yeast suspension in distilled water with alkali (OH) and non alkali addition in rectangular (R) or cylindrical (C) cuvette versus pitching rate (PR)  
Obr. 2 Absorbance (800 nm) kvasničné suspenze v destilované vodě s přidavkem hydroxidu sodného (OH) a bez něj v pravoúhlé (R) nebo válcovité (C) kyvetě v závislosti na zákvasném poměru (PR)

kde  $h_c$  je výška odstředěných kvasinek,  $h_v$  je celková výška obsahu kyvety nad plochým dnem po odstředění. Ze stejného důvodu se při použití lisovaných kvasnic ( $w_y = 0.3$ ) při přípravě suspenze kvasinek získá  $h_c$  vyšší a musí se korigovat.

Výška odstředěných kvasnic ve válcovité kyvetě se může odhadnout podle rovnice

$$7. \quad w_c = \frac{h_c}{h_v}$$

kde  $w_c$  je hmotnostní podíl sušiny odstředěných kvasnic

$$8. \quad h_c d^2 = v_c$$

kde  $d$  je průměr kyvety.

### 3.2 Vztah mezi absorbancí a kvasničnou koncentrací

#### 3.2.1 Nízký rozsah koncentrace kvasinek

Koncentrace buněk a absorbance kvasničné suspenze připravené z lisovaných kvasnic (0-2g lisovaných kvasnic / l suspenze) byly měřeny bez a s přidavkem hydroxidu sodného (1 ml 20% NaOH / 10 ml

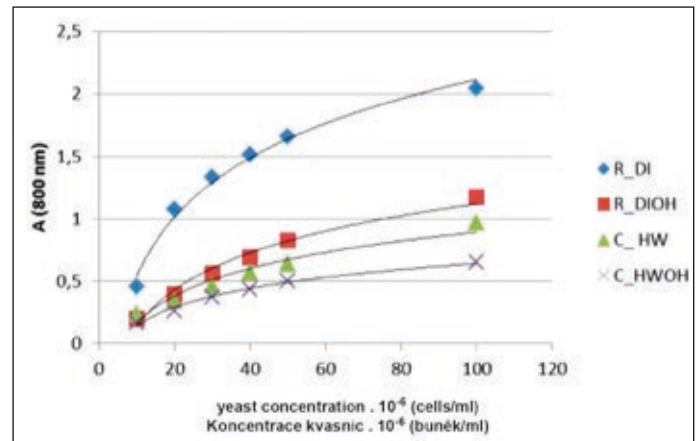


Fig. 3 Absorbance (800 nm) of yeast suspension in distilled water (DI) and hopped wort (HW) with alkali (OH) and non alkali addition in rectangular (R) or cylindrical (C) cuvette versus cell count  
Obr. 3 Absorbance (800 nm) kvasničné suspenze v destilované vodě (DI) a mladině (HW) s přidavkem hydroxidu sodného (OH) a bez něj v pravoúhlé (R) a válcovité (C) kyvetě v závislosti na koncentraci kvasinek

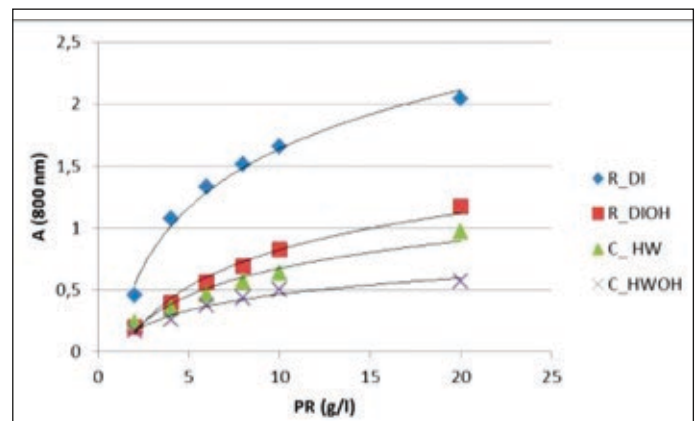


Fig. 4 Absorbance (800 nm) of yeast suspension in distilled water (DI) and hopped wort (HW) with alkali (OH) and non alkali addition in rectangular (R) or cylindrical (C) cuvette versus pitching rate (PR)  
Obr. 4 Absorbance (800 nm) kvasničné suspenze v destilované vodě (DI) a mladině (HW) s přidavkem hydroxidu sodného (OH) a bez něj v pravoúhlé (R) nebo válcovité (C) kyvetě v závislosti na zákvasném poměru (PR)

tion (1 ml 20% NaOH/10 ml suspension). If the absorbances are plotted against yeast concentrations, the linear relations are obtained with different slopes depending on kind of cuvette and the addition of sodium hydroxide to yeast suspension in distilled water (Fig. 1,2).

### 3.2.2 High range of yeast concentration

Cell concentration and absorbance of the yeast suspension prepared from pressed yeast (2 – 20 g pressed yeast/l pitched suspension) were measured without and with sodium hydroxide addition (1 ml 20% NaOH/10 ml). If the absorbances are plotted against yeast concentrations logarithmic relations are obtained with different constants of dependence on kind of cuvette and the addition of sodium hydroxide to yeast suspension in distilled water (Fig. 3,4).

The addition of NaOH solution decreased the absorbance in both kinds of cuvettes, which was caused by dissolution of the material released from the yeast cell or presented in wort. Dry matter of yeast is often determined after alkali washing, but such value doesn't respond to live yeast used for the pitching.

The absorbance in the rectangular cuvette was always higher than that in cylindrical one, although the optical path was near the same. It could be caused by different light scattering and its absorption.

### 3.3 Relation between pitching rate and yeast concentration

Yeast suspensions in distilled water were prepared from pressed yeast ( $w_y = 0.3$ ) covering low and high range of  $PR$  (0 to 20 g/l) to relate pitching rate to yeast concentration measured in rectangular cuvette (800 nm, 1 cm). Linear relation between yeast concentration and pitching rate was used (Table 1).

$$9. \quad n_y = 0.001 PR n_d w_y$$

where  $y$  is yeast concentration in millions cells/ml, 0.001 is the conversion factor between g and l,  $PR$  is the pitching rate (g/l),  $n_y$  is explained in the equation (4). The values  $n_d = 2 \cdot 10^{10} / \text{g}$  was found for dried yeast and ( $w_y = 1.0$ ),  $n_y = 6 \cdot 10^9 / \text{g}$  for the pressed yeast ( $w_y = 0.3$ ), Tab. 1.

The first degree of polynomial equation was used with the intercept = 0 was used to estimate cell count over both range of yeast concentration although Fig. 1 and 2 should be used for low range and Fig. 3 and 4 for the high concentration.

### 3.4 Deflocculation test

Deflocculation test is based on the centrifugation immediately pitched substrate to obtain thin layer of yeast with light beam passing above it. The stirred suspension of pressed yeast in distilled water ( $PR = 200 \text{ g/l}$ ,  $w_y = 0.3$ ) was pipetted together with saccharose solution (10% w/w) into cylindrical cuvette. After 2 min centrifugation (3000 rpm, 10 min) the absorbance was measured to determine the height of this layer.

The height of yeast layer lower than 8 mm in cylindrical cuvette was sufficient for this test because it did not block light beam through the cuvette. The same stirred suspension of yeast was mixed with saccharose solution to record influence of yeast concentration on the deflocculation process. The initial concentration  $3 \cdot 10^9 \text{ cell/ml}$  allows recognized active yeast in several minutes. The test might be useful for the testing yeast viability (Fig. 5).

### 3.5 Yeast washing efficiency

Absorption spectra of supernatant from unwashed and three times repeated yeast washing by the same amount of distilled water to receive washing water 0 and 3. The spectra measurement was re-

suspenze). Pokud se absorbance vynášejí proti koncentracím kvasnic, získají se lineární vztahy s různými směrniciemi v závislosti na druhu kyvety a přidavku hydroxidu sodného k suspenzi kvasinek v destilované vodě (obr. 1, 2).

### 3.2.2 Vysoký rozsah kvasničné koncentrace

Koncentrace buněk a absorbance kvasničné suspenze připravené z lisovaných kvasnic (2 až 20 g lisovaných kvasnic) se měřily s přidavkem hydroxidu sodného (1 ml 20% NaOH/10 ml) a bez něj. Pokud se hodnoty absorbance vynesou proti koncentracím kvasnic, získají se logaritmické vztahy s různými konstantami v závislosti na druhu kyvety a přidavku hydroxidu sodného k suspenzi kvasinek v destilované vodě (obr. 3, 4).

Přídavek roztoku NaOH snížil absorbanci u obou druhů kyvet, což bylo způsobeno rozpuštěním látek uvolněných z kvasinkové buňky nebo přítomných ve sladině. Sušina kvasinek se často stanovuje po alkalickém praní, ale tato hodnota nezahrnuje živé kvasinky používané při zakvašení.

Absorbance v pravoúhlé kyvetě byla vždy vyšší než ve válcovité, ačkoli délka optické dráhy v kyvetě byla téměř stejná, což mohlo být způsobeno různým poměrem mezi rozptylem světla a jeho absorpcí.

### 3.3 Vztah mezi zákvasným poměrem a kvasničnou koncentrací

Kvasničné suspenze v destilované vodě byly připraveny z lisovaných kvasnic ( $w_y = 0,3$ ) pokrývajících nízký a vysoký rozsah zákvasného poměru (0 až 20 g/l), aby se koreloval zákvasný poměr s koncentrací buněk měřenou v pravoúhlé kyvetě. Použil se lineární vztah mezi sušinou kvasničné suspenze a zákvasným poměrem (tab. 1).

$$9. \quad n_y = 0,001 PR n_d w_y$$

kde  $y$  je koncentrace kvasinek v zakvašeném substrátu (miliony buněk/ml, 0,001 je konverzní faktor mezi g a l,  $PR$  je zákvasný poměr (g/l), význam  $n_y$  je vysvětlen v rovnici (4). Hodnoty  $n_d = 2x \cdot 10^{10} / \text{g}$  se nalezly pro ( $w_y = 1,0$ ),  $n_y = 6x \cdot 10^9 / \text{g}$  pro lisované kvasnice ( $w_y = 0,3$ ), Tab. 1.

Lineární regrese s hodnotou 0 v počátku se použila pro obě rozmezí koncentrací, ačkoliv obr. 1 a 2 by se měly použít pro nízké rozmezí a obr. 3 a 4 pro vysoké koncentrace buněk.

### 3.4 Deflokulační test

Deflokulační test se zakládá na odstředění bezprostředně zakvašeného substrátu, aby se dosáhlo tenké vrstvy kvasinek se světelným paprskem procházejícím nad ním. Míchaná suspenze lisovaných kvasinek v destilované vodě ( $PR = 200 \text{ g/l}$ ,  $w_y = 0,3$ ) se pipetovala spolu s roztokem sacharosu (10% hm.) do válcovité kyvety. Po 2 min odstředování (3000 ot/min, 10 min) se měřila absorbance roztoku pro stanovení maximální použitelné výšky kvasnic (tab. 2).

Výška kvasnicové vrstvy menší než 8 mm ve válcovité kyvetě byla pro tento test postačující, protože tato vrstva nezakrývala průchod světelného paprsku kyvetou. Stejná míchaná suspenze kvasinek se smíchala se sacharosovým roztokem, aby se zaznamenal vliv koncentrace kvasnic na proces deflokulace. Při počáteční koncentraci  $3x \cdot 10^9 \text{ buněk /ml}$  bylo možné rozeznat aktivní kvasinky během několika minut. Test by mohl být užitečný pro testování aktivity kvasinek (obr. 5).

### 3.5 Vliv praní kvasnic na absorpční spektra

Absorpční spektra supernatantu nepraných kvasnic a po třikrát opakovaným praním kvasnic stejným množstvím destilované vody se měřila bez přidavku hydroxidu sodného (20% w/w, 1 ml/ 10 ml supernatantu) a s ním (obr. 6).

Tab. 1 The relation between yeast dry matter and yeast concentration  
Tab. 1 Vztah mezi kvasničnou sušinou a koncentrací kvasinek

Yeast consistency <i>Konzistence kvasnic</i>	Yeast dry matter (%) <i>Kvasničná sušina (%)</i>	Yeast concentration cell/g <i>Počet kvasinek/ml</i>
Dry yeast matter <i>Suché kvasnice</i>	100	$2 \cdot 10^{10}$
Centrifugated or pressed yeast <i>Odstředěné nebo lisované kvasnice</i>	25 to 35	$6 \cdot 10^9$
Thick yeast <i>Husté kvasnice</i>	15 to 25	$4 \cdot 10^9$
Thin yeast <i>Řídké kvasnice</i>	5 to 15	$2 \cdot 10^9$

Tab. 2 The determination of the maximal height yeast layer for the deflocculation determination  
Tab. 2 Stanovení maximální použitelné výšky kvasničné vrstvy pro deflokulační test

Yeast Kvasnice (200 g/l) ml	Saccharose Sacharosa (10 % w/w) ml	Mixture / Směs		Centrifugate / Sediment	
		Yeast (cell/ml) Kvasinky (buněk/ml)	Saccharose Sacharosa (% w/w)	Yeast layer height Vrstva kvasnic výška (mm)	Absorbance (800 nm)
1	3	3 10 <sup>8</sup>	7.5	3	0.000
2	2	6 10 <sup>8</sup>	5.0	5	0.001
3	1	9 10 <sup>8</sup>	2.5	8	0.001
4	0	12 10 <sup>8</sup>	0	10	0.218

peated after the addition sodium hydroxide (20% w/w, 1 ml/ 10 ml washing water) (Fig. 6).

The brown color of unwashed brewery yeasts is caused by adsorbed polyphenol and melanoid substances and their oxidation products which intensifies in alkali solution. Brewer's yeast can be decolorized by long washing with cold water. Browning is almost absent in pressed baker's yeasts, which are grown on sugar substrates with a low content of polyphenols. It is therefore appropriate to measure the degree of the yeast browning determination by brewery yeast water spectrum in the visible area. In the simple case it is sufficient to measure the absorbance of washing water at one wavelength, e.g., 430 nm, commonly used for measuring beer color.

#### 4 CONCLUSIONS

Centrifugation and turbidimetric method present rapid and easy method for the determination of yeast concentration. A simple calculation procedure is based on two parameters, which have to be determined for the local condition of each brewery. They cover yeast dry matter content of yeast sample and the yeast count related to 1 g completely dry yeast. It enables to calculate the probable cell count in pitched substrate, which can be used for the photometric calibration curve construction. Rectangular and cylindrical cuvette with the same length of light path provided substantially different result.

Wavelength 800 nm is recommended for the turbidimetric yeast determination because the lower wavelength can strongly influence the result of the measurement. On the other hand the lower wavelength can be used to determine the washing efficiency.

The presence of wort and yeast trub can strongly influence the variables obtained even with well water washed yeast. Yeast trub can be dissolved by alkali treatment which can be used in both centrifugation and photometric method. The alkali addition makes the results apparently more precise, but it is strongly influenced by both alkali concentration and time between its addition and the measurement. The main disadvantage of such procedure is rapid yeast killing by alkali hydroxide and the damage of the cell structures.

Two forms of calibration curve have been suggested for the photometric measurement of yeast concentration. Logarithmic curve

Hnědé zbarvení nepraných pivovarských kvasnic je způsobeno hlavně adsorbovanými polyfenolovými i melanoidními látkami a jejich oxidačními reakcemi a hnědnutí zesiluje v alkalickém prostředí. Odbarvení pivovarských kvasnic je obtížný úkol a dosud se provádělo dlouhým praním studenou vodou. Tento vliv se téměř nevyskytuje u lisovaných pekařských kvasnic, které se pěstují na cukerných substrátech s nízkým obsahem polyfenolových látek. Pro orientační stanovení stupně znečištění várečných kvasnic je proto vhodné měření pracích vod pivovarských kvasnic ve viditelné oblasti spektra, v jednoduchém případě i měření absorbance při jedné vlnové délce, např. 430 nm, běžně používané pro měření barvy piva.

#### 4 ZÁVĚR

Centrifugační a turbidimetrická metoda představují rychlou a snadnou metodu pro stanovení koncentrace kvasnic. Jednoduchý postup výpočtu se zakládá na dvou parametrech, které se musí určit pro místní podmínky každého pivovaru a zahrnují obsah kvasničné sušiny a počet kvasinek v 1 g suchých kvasnic. Tento postup lze použít pro konstrukci fotometrické kalibrační křivky. Pravoúhlá a válcovitá kyveta se stejnou délkou optické dráhy poskytovaly podstatně odlišné výsledky.

Vlnová délka 800 nm se doporučuje pro fotometrické měření stanovení kvasinek, protože nižší vlnové délky mohou silně ovlivnit tato měření. Na druhé straně měření absorbance kvasničného supernatantu ve viditelné oblasti může snadno rozlišit mezi dobře a špatně promytými kvasnicemi.

Přítomnost mladinových a kvasničných kalů může silně ovlivnit hodnoty, získané dokonce s dobře promytými kvasnicemi vodou. Kvasničné kaly se mohou snadno rozpustit, což se může využít při centrifugační i fotometrické metodě, ale čas a způsob rozpouštění se musí vhodně nastavit. Přídavek alkalických látek zdánlivě výsledky zpřesňuje, ale je silně ovlivněno jak koncentrací prostředku, tak časem mezi jeho přidáním a měřením. Hlavní nevýhodou tohoto měření je rychlé zabíjení kvasinek alkalickým hydroxidem a poškození jejich buněčných struktur.

Pro fotometrické měření koncentrace kvasinek byly vhodné dva tvary kalibrační křivky. Logaritmická křivka slouží k hrubému odhadu

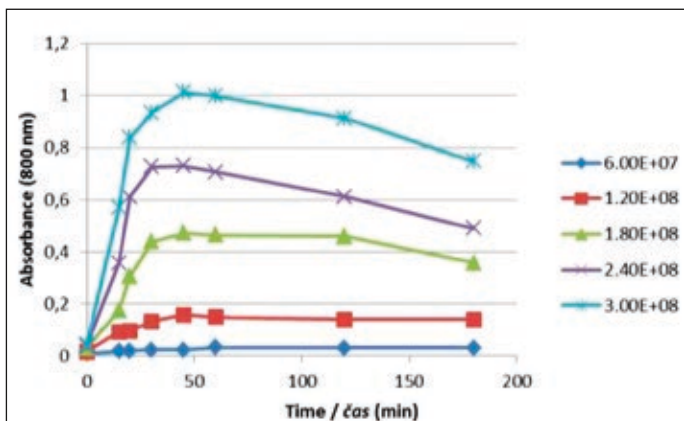


Fig. 5 Absorbance of yeast suspension on its initial concentration before centrifugation

Obr. 5 Závislost absorbance odstředěné kvasničné suspenze na čase pro různé počáteční koncentrace kvasinek před odstředěním

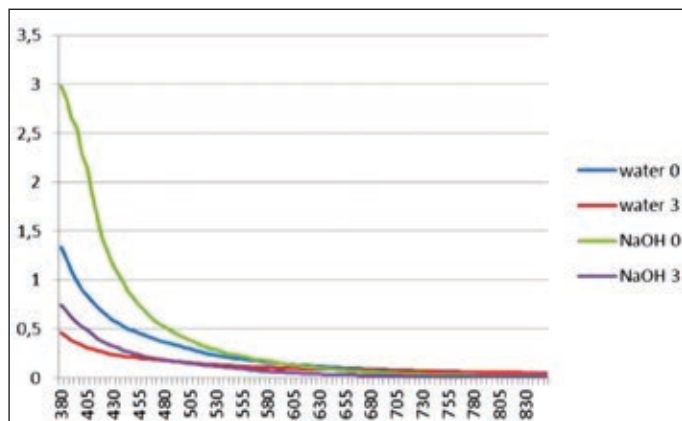


Fig.6 Absorption spectra of supernatant of unwashed (water 0) and three times repeated washing (water 3) without and with NaOH addition  
Obr. 6 Absorpční spektrum supernatantu nepraných kvasnic (voda 0) po trojnásobném opakovaném praní kvasnic (voda 3) bez a s přídavkem NaOH

serves for the rough estimation of yeast concentration in thick yeast sample or fermentation substrate whereas the linear model is suitable for low yeast content after water pitching.

There is another possibility to use photometric method to monitor the laboratory fermentation in small containers. The wort haze can be strongly decreased by filtration before pitching which enables to monitor small fermentation trials for high numbers of various yeast or worts

### List of symbols

$d$	cylindrical cuvette diameter
$h_c$	height of yeast centrifugate
$h_v$	total height of cuvette content after centrifugation
$m_d$	mass of dry yeast matter
$m_s$	mass of added substrate
$m_y$	mass of pitching yeast before drying
$m_{H_2O}$	mass of water
$n_d$	cell count per 1 g yeast dry matter
$n_y$	cell count per 1 g pitching yeast or fermenting substrate
$w_c$	mass fraction of yeast dry matter of centrifuged yeast
$w_{ps}$	the mass fraction of yeast dry matter in the pitched substrate
$w_y$	the mass fraction of yeast dry matter
$PR$	pitching rate
$v_c$	volume of yeast sediment after centrifugation
$v_s$	volume of the substrate above sediment
$V$	$V$ is the total volume of pitched substrate
$V_c$	total volume of pitching yeast or fermenting substrate after centrifugation
$V_R$	the volume ratio of centrifuged yeast

koncentrace kvasnic v hustých kvasničných suspenzích, zatímco lineární model je vhodný pro nízké koncentrace kvasničných buněk.

Takzvaný objemový poměr odstředěných kvasnic zahrnuje poměr objemu odstředěných kvasinek k objemu kvasničné suspenze obsahu kyvet před odstředěním. Tato hodnota také může být vyjádřena poměrem obou výšek oběma objemy ve válcovité kyvetě s plochým dnem.

Existuje další možnost použití fotometrické metody pro sledování laboratorního kvašení v malých nádobkách. Zákal mladiny se snadno může snížit její filtrací před zakvašením, což umožňuje monitorování malých kvasných zkoušek vysokého počtu kvasinek, nebo sladin.

### Seznam symbolů

$d$	průměr válcovité kyvety
$h_c$	výška kvasničného sedimentu
$h_v$	celková výška obsahu kyvety po odstředění
$m_d$	hmotnost sušiny kvasnic
$m_s$	hmotnost přidaného substrátu
$m_y$	hmotnost násadních kvasnic před sušením
$m_{H_2O}$	hmotnost vody
$n_d$	počet buněk na 1 g suchých kvasnic
$n_y$	počet buněk na 1 g násadních kvasnic
$w_c$	sušina odstředěných kvasnic
$w_{ps}$	hmotnostní zlomek sušiny kvasnic v zakvašeném substrátu
$w_y$	hmotnostní podíl kvasničné sušiny
$PR$	zákvasný poměr
$v_c$	objem kvasničného sedimentu po odstředění
$v_s$	objem substrátu nad sedimentem
$V$	celkový objem zakvašeného substrátu
$V_c$	celkový objem sedimentu v kyvetě po odstředění
$V_R$	objemový poměr odstředěných kvasnic

### REFERENCES / LITERATURA

- Analytica-EBC: on-line [www.analytica-ebc.com](http://www.analytica-ebc.com) (accessed Aug. 3, 2018)
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Basařová, P., Lejsek, T., 2017: The comprehensive guide to brewing. From raw material to packaging. Fachverlag Hans Carl GmbH, Nuremberg, Germany. ISBN 978-3-418-00842-4.
- Kunze, W., 2004: Technology brewing and malting. 3rd ed. VLB Berlin, Germany, ISBN 3-921690-4-8.
- Lake, J. C., Speers, R. A., Porter, A. V., Gill, T. A., 2008: Miniaturizing the fermentation assay: Effects of fermentor size and fermentation kinetics on detection of premature yeast flocculation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 66(2): 94–102.
- MacIntosh, A. J., Adler, J., Eck, E., Speers, R. A., 2012: Suitability of the miniature fermentability method to monitor industrial fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70(3): 205–211.
- Narziss, L., 1986: Abriss der Bierbrauerei. 5th ed., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. ISBN 3-432-84135-3.
- Palmer, F., 1969: The determination of pitching yeast concentration. *Tech. Q. Master Brew Assoc. Am.*, 6(2): 141–145.
- Rainbow, C., 1968: Measurement of yeast concentration. *J. Inst. Brew.*, 74(5), 427–429.
- Šavel, J., Prokopová, M., 1994: Sedimentační a turbidimetrické stanovení koncentrace kvasnic. *Kvasny Prum.* 40(1): 9–12.
- Speers, R. A., Stokes, S., 2009: Effects of vessel geometry, fermenting volume and yeast repitching on fermenting beer. *J. Inst. Brew.* 115(2): 148–150.
- Šruma, T., 1999: Zahušťování odpadních pivovarských kvasnic. *Kvasny Prum.* 45(4): 94–96.
- Upperton, A.M., 1969: A rapid spectrophotometric method for the determination of yeast concentrations. *J. Inst. Brew.*, 75(5): 464–475.

Manuscript received / Do redakce došlo: 27/05/2018  
Accepted for publication / Přijato k publikování: 17/07/2018