

DOI: 10.18832/kp201816

# Use of Laboratory Pressure Measurement for Fermentation Process Monitoring

## Využití laboratorního měření tlaku pro sledování kvasného procesu

Jan ŠAVEL, Petr KOŠIN, Jan STREJC, Adam BROŽ  
Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, 370 21 České Budějovice  
Budějovický Budvar, n.p., Karolíny Světlé 4, CZ-370 21 České Budějovice  
e-mail: jan.savel@budvar.cz

Reviewed paper / Recenzovaný článek

Šavel, J., Košin, P., Strejc, J., Brož, A., 2018: Use of laboratory pressure measurement for fermentation process monitoring. Kvasny Prum. 64(3): 117–121

Laboratory pressure fermentation can be used for process monitoring such as measurement of yeast activity, its resistance to temperature, carbon dioxide, sanitation agents or determination of fermentation process yield. This method does not replace precise analytical methods but it can be used if they are economically or time demanding. This paper deals with the determination of fermentable sugars in brewing substrates, yeast activity kinetic measurement and rapid estimation of conditions influencing the fermentability determination. The advantages of pressure fermentation in a closed container are the elimination of volatile fermentation products escape including water vapor and the possibility of serial processing of large quantities of raw materials with simple equipment.

Šavel, J., Košin, P., Strejc, J., Brož, A., 2018: Využití laboratorního měření tlaku pro sledování kvasného procesu. Kvasny Prum. 64(3): 117–121

Laboratorní tlakové kvašení se může využít při sledování kvasného procesu, jako je měření aktivity kvasnic, jejich odolnosti k teplotě, oxidu hlinitému, sanitacním prostředkům, nebo při stanovení výtěžku kvasného procesu. Tato metoda nenahrazuje přesné analytické postupy, ale může se využít, jestliže jsou ekonomicky a časově náročné. Článek pojednává o stanovení zkvasitelných cukrů v pivovarských substrátech, kinetické metodě kvasničné aktivity, nebo rychlém ověření podmínek pro měření dosažitelného kvašení. Výhodami tlakové fermentace v uzavřené nádobce jsou zabránění úniku těkavých produktů včetně vodní páry a možnost sériového zpracování velkého množství vzorků surovin s jednoduchým vybavením.

**Keywords:** yeast, pressure, fermentation, fermentometer, degree of fermentation, yield fermentation

**Klíčová slova:** kvasnice, tlak, kvašení, fermentometr, stupeň prokvašení, výtěžek kvašení

## 1 INTRODUCTION

Pressure fermentation can be used for process monitoring such as measurement of yeast activity, its resistance to temperature, carbon dioxide, sanitation agents or fermentation yield determination. This method does not replace precise analytical methods but it can be used if they are economically or time demanding.

Carbon dioxide formation monitoring is a popular laboratory and operational measurement technique. Usually, the weight loss of fermenting medium or volume/flow rate of escaping carbon dioxide is measured. A pressure fermentometer is a device that measures carbon dioxide pressure in a closed volume container. This kind of device using mercury as sealing liquid was called the fermentometer in the detailed study (Rahn, 1929). The similar instrument was originally constructed by Russian inventor Ivanov and called a pressure manometer in Czech literature (Teyssler-Kotyška et al., 1932).

The manometric principle was also used for Warburg's manometer to measure metabolic activity of yeast using aqueous sealing liquid (Bendova and Kahler, 1981). Its modification was used to measure rheological properties and activity of yeasts stored at different temperatures (Lenoël et al., 1987).

Pressure fermentometers have been improving in recent years using advanced automation. They were used to measure yeast contamination or yeast activity (Müller-Aufermann et al., 2014; Michell et al., 2016).

This paper deals with the determination of fermentable sugars in brewing substrates, yeast activity kinetic measurement and rapid estimation of conditions influences the course of fermentability determination.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Fermenting substrates

Reference solution of 10% (w/w) sucrose (Merck, Germany) in brewing water, samples of laboratory sweet wort shortly boiled after congress mashing and samples of production hopped wort.

### 2.2 Pressed yeast

Freshly harvested yeast (300g) was decanted with 3l of cold brewing water that was poured off after natural sedimentation in a re-

## 1 ÚVOD

Měření tlaku při kvašení se může využít při sledování kvasného procesu jako jsou měření aktivity kvasnic, jejich odolnosti k teplotě, oxidu uhličitého, sanitacním prostředkům nebo stanovení výtěžku kvašení. Tato metoda nenahrazuje přesné analytické metody, ale může se použít, jestliže jsou ekonomicky, nebo časově náročné.

Sledování průběhu kvašení podle tvorby oxidu uhličitého je oblíbenou laboratorní i provozní technikou. Obvykle se měří ztráta hmotnosti kvasícího média, popř. objem, nebo průtok unikajícího oxidu uhličitého. Tlakový fermentometr je přístroj, který měří tlak oxidu uhličitého v uzavřené nádobce se stálým objemem. Tento druh přístroje, využívající rtuti jako uzavírací kapaliny byl nazván fermentometr v podrobné studii (Rahn, 1929). V české literatuře se podobný přístroj, původně sestavený ruským badatelem Ivanovem, nazýval tlakový manometr (Teyssler-Kotyška et al., 1932).

Na manometrickém principu se také zakládal Warburgův manometr pro měření metabolické aktivity kvasinek s vodnou uzavírací kapalinou (Bendová a Kahler, 1981). Jeho modifikace se využila pro měření rheologických vlastností a aktivity kvasnic, skladovaných při různých teplotách (Lenoël et al., 1987).

Tlakové fermentometry se v poslední době stále zdokonalují v souvislosti s jejich automatizací. Používají se k měření průkazu kvasničné kontaminace a měření kvasničné aktivity (Müller-Aufermann, S. et al., 2014; Michell, M. et al., 2016).

Tento článek se zabývá stanovením zkvasitelných cukrů v pivovarských substrátech, kinetickým měřením aktivity kvasnic a rychlým stanovením podmínek, ovlivňujících průběh stanovení fermentability.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Kvasné substráty

Referenční roztok 10% (w/w) sacharosu (Merck, Německo) ve varní vodě, vzorky laboratorní sladiny, krátce považené po kongresním rmutování a vzorky provozních mladin.

### 2.2 Lisované kvasnice

Čerstvě sebrané kvasnice (300g) se rozmíchaly v 3l varní vody, po přirozené sedimentaci v chladničce se voda slila a kvasnice vylisovaly laboratorním lisem. Lisované kvasnice obsahovaly 30% sušiny.

frigerator and yeast sediment was pressed in a laboratory press. Pressed yeast contained 30% dry matter.

### 2.3 Instruments

A manometric meter measuring CO<sub>2</sub> content in beer with a fermentation container lockable with a crown caps (1-CUBE, Czech Republic). The instrument gives gauge pressure (against atmospheric pressure) with help of a mechanical or electronic manometer. Alcolyzer Beer Analyzer (Anton Paar, Austria).

A rotary loopster rotating samples in containers placed on a carrier plate moved by selectable station speeds and with adjustable inclination of its axis against a horizontal pedestal (IKA Loopster, Germany).

### 2.4 Measurement procedure

Pressed yeast previously washed with brewing water was weighed into containers together with fermentation substrate and a drop of silicone antifoam agent. The containers were crowned, their content mixed thoroughly and the samples were kept at rest or with stirring (30°, 7 rpm). Pressure of CO<sub>2</sub> was measured at selected time intervals.

### 2.5 Calculations

In brewing, formulas according to Balling are used. Balling used the Gay-Lussac equation of alcoholic fermentation corrected for sugar consumption required for yeast biomass and carbon dioxide production. In this paper, we present a formula for the calculation of carbon dioxide amount  $m_{CO_2}$  from the gauge pressure in a closed fermentation container, derived from the data in previous work (Šavel et al., 2014).

The derivation of the  $m_{CO_2}$  calculation formula is based on the following assumptions:

- the yeast suspension densities ( $\rho_y, \rho_s$ ) in the substrate/yeast mixture are close to 1 g.cm<sup>-3</sup>
- The amount of liquid in the fermenting mixture is the weight of the substrate  $m_s$  increased by the weight of water  $m_w$  in yeast of the amount  $m_y$  valid for yeast containing 30% of dry matter (0.7  $m_y$ ).

The head space of the fermentation containers filled with air at beginning of the fermentation. After oxygen consumption by yeast, the absolute pressure of CO<sub>2</sub> is lower by the pressure of remaining nitrogen (80 kPa). For measurement by an overpressure manometer, the absolute pressure is equal to  $p + 101.325 - 80$  kPa. The CO<sub>2</sub> equilibrium between the gaseous and liquid phases allows to calculate the total amount of produced CO<sub>2</sub>  $m_{CO_2}$ :

$$1. m_{CO_2} = (p + 21.325) \left[ 0.00529 \frac{V_g}{t + 273.15} + 0.0001 (m_s + 0.7 m_y) \right]$$

$$\exp \left( -10.74 + \frac{2617.25}{t + 273.15} \right)]$$

where  $p$  is the pressure measured by the gauge sensor (kPa),  $V_g$  is the volume of the head space (ml),  $t$  is the temperature (°C),  $m_s, m_y$  are the weights of substrate and pressed yeast (g):

$$2. V_g \cong \left( V_c - \frac{m_s}{\rho_s} - \frac{m_y}{\rho_y} \right)$$

where  $V_c, V_g$  are the approximations of total volume and headspace of fermentation container in ml, because numerically 1 g ( $m_s$  or  $m_y$ ) occupies volume of 1 ml. From the same reason, if 5 ml of substrate was pipetted instead of weighted,  $m_s = 5$  ml is written in text.

The original Balling real degree of fermentation was calculated using the formula:

$$3. RDF (Balling) = 100 \frac{m_{CO_2}}{E_0}$$

where  $RDF$  is the real degree of fermentation (%),  $E_0$  is the original extract of the substrate (% w/w) and  $n$  is the real extract.

According to the Balling formula, 2.0665 g of the extract consumption responds to 0.9565 g of CO<sub>2</sub>, which means that the degree of extract utilization  $\alpha$  is:

### 2.3 Přístroje

Manometrický měřič obsahu CO<sub>2</sub> v pivu s kvasnou nádobkou uzavíratelnou korunkovým závěrem (1-CUBE, ČR). Přístroj udává hodnotu tlaku proti atmosférickému tlaku (gauge pressure) s mechanickým, nebo elektronickým manometrem. Laboratorní analyzátor piva Alcolyzer (Anton Paar, Rakousko).

Rotiční směšovač obrácením vzorků v kvetkách na nosném talíři s volitelným počtem otáček a nastavením sklonu jeho osy proti vodorovnému podstavci (IKA Loopster, Německo).

### 2.4 Postup měření

Do kvytety přístroje se navázily lisované provozní kvasnice předtím proprané vodovodní vodou, přidal kvasný substrát a kapka silikonového odpěňovače a po uzavření korunkou a promíchání se vzorky nechaly přirozeně kvasit v klidu, nebo při jejich převrácení (30°, 7 min<sup>-1</sup>). Ve zvolených časových intervalech se odečítal přetlak CO<sub>2</sub>.

### 2.5 Výpočty

V pivovarství se k průběhu kvašení využívají vztahy podle Ballinga, který použil Gay-Lussacovu rovnici alkoholického kvašení upravenou o korekci na cukr, spotřebovaný na tvorbu kvasničné biomasy a oxid uhličitý. V tomto článku uvádíme vzorec pro výpočet množství oxidu uhličitého  $m_{CO_2}$  z přetlaku  $p$  uzavřené kvasné nádoby, odvozený z údajů v předchozí práci (Šavel et al., 2014).

Odvození vzorce pro výpočet  $m_{CO_2}$  vychází z těchto předpokladů:

- hustoty kvasničné suspenze ( $\rho_y, \rho_s$ ) ve směsi substrátu a kvasnic jsou blízké hodnotě 1 g.cm<sup>-3</sup>
- množství kapaliny v kvasící směsi je hmotnost substrátu  $m_s$  zvětšeného o hmotnost vody  $m_w$  v kvasnicích hmotnosti  $m_y$ , platný pro kvasnice s 30 % sušiny (0,7  $m_y$ )

Hrdlový prostor kvasné nádoby je na počátku kvašení vyplněný vzduchem a po spotřebě kyslíku kvasnicemi je absolutní tlak oxidu uhličitého nižší o tlak zbývajícího dusíku (80 kPa), což se při měření přetlakovým manometrem ( $p$ ) rovná absolutnímu tlaku  $p + 101,325 - 80$ . Za předpokladu rovnováhy CO<sub>2</sub> v plynné a kapalné fázi nádoby je celkové množství vzniklého CO<sub>2</sub>  $m_{CO_2}$ :

$$1. m_{CO_2} = (p + 21,325) \left[ 0,00529 \frac{V_g}{t + 273,15} + 0,0001 (m_s + 0,7 m_y) \right]$$

$$\exp \left( -10,74 + \frac{2617,25}{t + 273,15} \right)]$$

kde  $p$  je tlak, měřený přetlakovým manometrem (kPa),  $V_g$  je objem hrdlového prostoru (ml),  $t$  je teplota (°C),  $m_s, m_y$  jsou hmotnosti substrátu a lisovaných kvasnic (g):

$$2. V_g \cong \left( V_c - \frac{m_s}{\rho_s} - \frac{m_y}{\rho_y} \right)$$

kde  $V_c, V_g$  jsou odhady celkového a hrdlového objemu kvasné nádoby v ml, protože numericky 1 g kvasnic nebo substrátu ( $m_s$  nebo  $m_y$ ) zaujímají 1 ml. Ze stejného důvodu když se 5 ml substrátu pipetovalo místo navažovalo, uvádí se v textu 5g.

Původní skutečný stupeň prokvašení podle Ballinga se počítal podle vzorce:

$$3. RDF (Balling) = 100 \frac{m_{CO_2}}{E_0}$$

kde  $RDF$  je skutečný stupeň prokvašení (%),  $E_0$  je původní extrakt substrátu (% w/w) a  $n$  je skutečný extrakt.

Podle koeficientů Ballingova vzorce vznikne z 2,0665g extraktu 0,9565g CO<sub>2</sub>, což znamená, že tvorbě 1g CO<sub>2</sub> odpovídá spotřeba 2,1605g extraktu a stupeň využití extraktu  $\alpha$  je:

$$4. \alpha = 2,1605 \frac{m_{CO_2}}{m_{E_0}}$$

kde  $m_{CO_2}$  je množství vzniklého CO<sub>2</sub>,  $m_{E_0}$  je množství extraktu v přidávaném substrátu, které se získá násobením jeho hmotnosti koncentrací substrátu. Hodnota  $\alpha$  umožňuje také vypočítat koncentraci zkvasitelného extraktu. Hodnota  $\alpha$  souvisí s  $RDF (Balling)$  podle vztahu:

$$4. \alpha = 2.1605 \frac{m_{CO_2}}{m_{E_0}}$$

where  $m_{CO_2}$  is the amount of  $CO_2$  produced,  $m_{E_0}$  is the amount of extract in added substrate obtained by multiplying its weight by substrate concentration. The  $\alpha$  value also allows to calculate the concentration of fermentable extract. Value  $\alpha$  is related to *RDF* (Balling) according to the formula:

$$5. RDF (Balling) = 100 \alpha$$

The pressure in the container is proportional to the initial amount of the extract and it can be calculated from the volume of container, the temperature and the amount of yeast and substrate.

In this article, the experiment parameters ranged within the following limits:  $V_c = 35$  ml,  $m_y = 0.1 - 5.0$  g,  $m_s = 5$  g (~5 ml),  $t = 23-25$  °C.

The relationship between *RDF* (Balling) and *ADF* expresses the coefficient  $q$  and its dependence on the original extract. For Czech beers, the mean  $q = 1.239$  was determined (Šavel et al., 2015). With a completely fermented substrate ( $\alpha = 1$ ), values of *ADF* > 100 are obtained, which is unlikely for brewing substrates. Currently, the real degree of fermentation is used in the form of:

$$6. RDF (EBC) = 100 \frac{2.0665 A}{2.0665 A + n}$$

which takes into account the amount of yeast and carbon dioxide removed during fermentation (Cutaia and Munroe, 1979). This correction is not necessary for fermentation in a closed container.

### 3 RESULTS

#### 3.1 Determination of conditions for fermentability measurement by fermentometer

##### 3.1.1 Effect of yeast dose and agitation on pressure growth during fermentation of sucrose

Analytica EBC allows to determine fermentability of laboratory sweet wort, production wort and final attenuation of beer after addition of yeast. The high yeast dosage, fermentation cap and stirring are used to make the test rapid. The reference (15 g of yeasts/200 ml, 24 h of stirring) and accelerated (32 g yeasts/200 ml, 7 h of stirring) methods occur. *ADF* is calculated from the beer analysis obtained by the fermentation at 20 °C under the atmospheric pressure with an aqueous fermentation cap. Another possibility is to determine the concentration of particular fermentable sugars in substrate.

5 ml of sucrose (10% w/w) was fermented at a temperature of 23-25 °C with the yeast dose of 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0 g for 1, 3 and 6 h at rest and with stirring. The averages of three repeated determinations are shown in Fig. 1.

$CO_2$  formation finished after 3 hours fermentation at rest or with stirring of 5 ml sucrose solution with the dosage 1 to 5 g of pressed

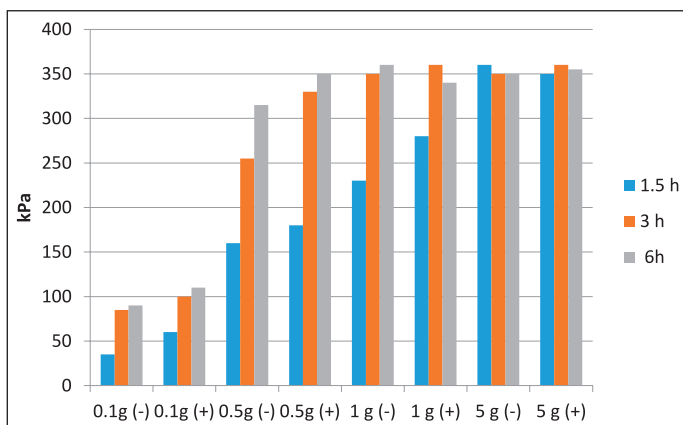


Fig. 1 The  $CO_2$  pressure growth during the fermentation of sucrose (5 ml, 10% w/w) with 0.1 – 5.0 g of pressed yeast at rest (-) or with stirring(+)

Obr.1 Růst tlaku během kvašení sacharosy (5 ml, 10% w/w) s 0,1 – 5,0 g lisovaných kvasnic v klidu (-) nebo za pohybu (+)

$$5. RDF (Balling) = 100 \alpha$$

Tlak v uzavřené nádobce při kvašení je úměrný počátečnímu množství extraktu a je možné ho vypočítat z objemu nádoby, teploty, množství a koncentrace kvasnic i substrátu.

V tomto článku se parametry pokusů pohybovaly v těchto mezích:  $V_c = 35$  ml,  $m_y = 0,1 - 5,0$  g,  $m_s = 5$  g (~5 ml),  $t = 23 - 25$  °C.

Vztah mezi *RDF* (Balling) a *ADF* vyjadřuje koeficient  $q$  a jeho závislost na původním extraktu. Pro česká piva se stanovila střední hodnota  $q = 1,239$  (Šavel et al., 2015). Při dokonale zkvasitelném substrátu ( $\alpha = 1$ ) se tak získají hodnoty *ADF* > 100, což u pivovarských substrátů není pravděpodobné. V současnosti se používá skutečný stupeň prokvašení ve tvaru:

$$6. RDF (EBC) = 100 \frac{2,0665 A}{2,0665 A + n}$$

kteř bere v úvahu množství kvasnic a oxidu uhličitého, odstraněného během kvašení (Cutaia a Munroe, 1979). Při kvašení v uzavřené nádobce není tato korekce nutná.

### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Stanovení podmínek pro měření fermentability tlakovým fermentometrem

##### 3.1.1 Vliv dávky kvasnic a míchání na tlakový růst při kvašení sacharosy

Analytica EBC umožňuje určit zkvasitelnost (fermentability) laboratorní sladiny, mladiny i konečné prokvašení (final attenuation) hotového piva po přidavku kvasnic a k těmto substrátům. Aby se stanovení zrychlilo, volí se vysoká koncentrace kvasnic, kvasí se pod kvasným uzávěrem a směs se míchá. Existují referenční (15 g kvasnic/200 ml, 24 h míchání) a zrychlené (32 g kvasnic/200 ml, 7 h míchání) stanovení, stupeň zdánlivého prokvašení *ADF* se počítá z analýzy piva, vzniklého kvašením při 20 °C za atmosférického tlaku pod vodním uzávěrem. Další možností je stanovení koncentrace jednotlivých zkvasitelných cukrů v substrátu před zakvašením.

5 ml sacharosy (10% w/w) kvasilo při laboratorní teplotě 23-25 °C s dávkou kvasnic 0,1, 0,5, 1,0 a 5,0 g kvasnic po dobu 1, 3 a 6 h v klidu a třepání. Průměry tří stanovení uvádí obr. 1.

Tvorba  $CO_2$  skončila po 3 h v klidu nebo míchání 5 ml roztoku sacharosy s dávkou 1 až 5 g lisovaných kvasnic, což odpovídá 40 až 400 g kvasnic na 200 ml substrátu. Dávky kvasnic se pro srovnání přepočítávají na dávky používané v metodice EBC. Průměrnému přetlaku 353 kPa odpovídala hodnota  $\alpha = 0,95 - 0,98$ . Míchání urychlilo tlakový nárůst zejména při nízkých dávkách kvasnic.

##### 3.1.2 Vliv dávky kvasnic a míchání na tlakový nárůst při kvašení laboratorní sladiny a provozní mladiny

Průměrné hodnoty přetlaku a hodnot  $\alpha$  ze tří různých dávek laboratorních i provozních substrátů uvádějí obr. 2 a 3. Rozmezí původního extraktu před zakvašením bylo u zkvašovaných substrátů LW 8,8 – 9,2, u provozní mladiny HW1 11,4 – 11,5, u HW2 12,7 – 13,4% w/w.

Podle očekávání byl tlak  $CO_2$  závislý na množství původního extraktu pivovarského substrátu. Tvorba  $CO_2$  skončila po 3 h v klidu nebo míchání 5 ml roztoku substrátu s dávkou 1 až 5 g lisovaných kvasnic.

Pro střední hodnotu  $\alpha = 0,60 - 0,66$  se s použitím hodnoty  $q = 1,239$  pohybuje odhad zdánlivého dosažitelného prokvašení *AFD* mezi 74 až 82%, což odpovídá kolísání teploty a rozdílům ve výpočtu *AFD* z měření tlaku nebo při přesném stanovení z rozboru piva. Koeficient  $q$  podle Ballinga rovněž závisí na původním extraktu substrátu.

#### 3.2 Stanovení aktivity kvasnic

Roztoky sacharosy a pivovarských substrátů kvasily za klidu v tlakovém fermentometru se záznamem tlaku (obr. 4).

Vzorek sladiny HW1 poskytl nejrychlejší tlakový nárůst (nejvyšší aktivitu kvasnic), ačkoliv u roztoku sacharosy byl dosažitelný stupeň prokvašení nejvyšší.

### 4 DISKUSE

Zkvasitelnost pivovarských substrátů i hotového piva je vlastně stanovením obsahu zkvasitelných cukrů. Vysoká koncentrace kvas-

yeast (corresponding to 40 to 400 g of yeast per 200 ml of substrate). The yeast dose was converted for the batch used in the EBC methodology. The average overpressure of 353 kPa corresponded to  $\alpha = 0.95 - 0.98$ . The stirring accelerated the pressure growth, especially at the low dose of yeast.

### 3.1.2 Effect of yeast dose and mixing on pressure growth during fermentation of laboratory sweet wort and production wort

The average values of pressure and  $\alpha$  values from the three samples of laboratory and production substrates are shown in Fig. 2 and 3. The range of original extract before the fermentation was for the laboratory sweet wort LW 8.8 – 9.2 and for the production worts HW1 11.4 – 11.5 and HW2 12.7 – 13.4% w/w.

As expected, the CO<sub>2</sub> pressure was dependent on the amount of the brewery substrate original extract. CO<sub>2</sub> formation from 5 ml of substrate solution at the dosage 1 and 5 g of pressed yeast finished within 3 hours at rest or with stirring.

For the mean value of  $\alpha = 0.60 - 0.66$ , the estimation of ADF is between 74 and 82% using the value  $q = 1.239$ , which corresponds to temperature fluctuation during measurement and the differences in the ADF calculation in comparison to the beer analysis. The Balling coefficient  $q$  also depends on the original extract of the substrate.

### 3.2 Determination of yeast activity

Sucrose and the brewery substrate solutions were fermented at rest in the pressure fermentometer with the pressure recorder (Fig. 4).

The production wort HW1 showed the most rapid pressure growth although the sucrose solution produced the highest final pressure value.

## 4 DISCUSSION

The fermentability of brewing substrates or finished beer is actually the determination of the fermentable sugars content. High concentration of yeast and stirring should facilitate fermentation of last remaining fermentable sugars even in well-fermented beer.

In sweet wort and hopped wort, fermentable sugars are the portion of the extract which can be converted into alcohol by fermentation, thereby assessing its maximum possible use. Fluctuation of experimental conditions causes greater variance of the pressure determination of fermentable sugars but it represents another alternative to the classical analysis. Its advantage is the possibility of large number of raw material samples with simple and inexpensive equipment. Its accuracy can be increased by both the hardware (thermostat, stirrer) and the software (calibration) means.

Fermentation in a closed container prevents the escape of alcohol, water vapor and the removal of propagated yeast which cannot be otherwise completely removed. The absence of fermentable sugars corresponds to  $\alpha = 0$ , their maximum content corresponds to  $\alpha = 1$ . The pressure fermentometer also allows to assess the effect of CO<sub>2</sub> pressure on fermentation since it can be adjusted by the initial extract.

Using the pressure measurement, the influence of the yeast dose (0.1-5g) to 5 ml of 10% sucrose (Fig. 1) was verified at rest and with stirring, which correspond to dose of 40-400 g of yeast per 200 ml of substrate according to the EBC methodology. Almost complete fermentation ( $\alpha \sim 1$ ) was achieved in 6 hours of stirring at yeast dose of 0.5 g/5 ml. For brewing substrates, complete fermentation was achieved at the yeast dose of 1 g/5 ml, which can be also expected for the fermentation at rest in 24 hours.

The manometric method allows measurement of fermentation kinetics as can be seen from Fig. 1 and 4. In a sealed container at rest and with stirring, the pressure growth depends on the yeast dose as well as the amount of fermentable substrate according to the first-order kinetic.

$$1. p = p_{\infty} (1 - e^{-k\tau})$$

where  $p$  is the gauge pressure at the time  $\tau$  and  $k$  is the rate constant. After substrate consumption, final pressure  $p(\infty)$  is established that corresponds to the total utilization of fermentable sugars. However, it is necessary to reach equilibrium between the liquid and the solid phase by intense movement; otherwise, the last measured values are lower. The rate constant depends on the dose of yeast and the kind of substrates including concentration of stimulators and inhibitors.

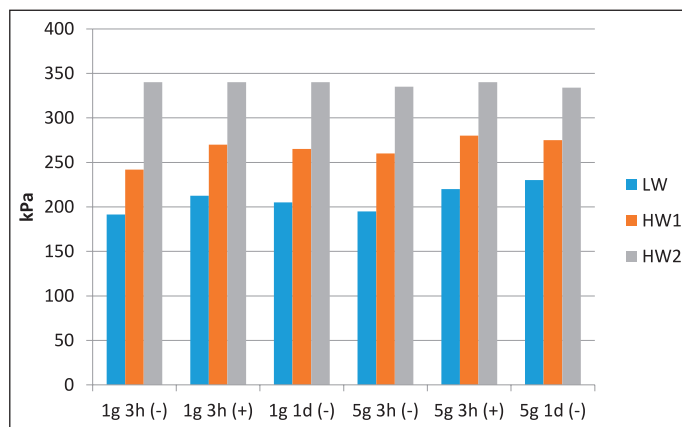


Fig. 2 The CO<sub>2</sub> pressure after the fermentation of 5 ml of the laboratory sweet wort (LW 8.8 – 9.0% w/w) and the production worts HW1 (11.4 – 11.5% w/w) and HW2 (12.7 – 13.4% w/w) with 1 and 5 g of yeast at rest (-) or with stirring(+).

Obr. 2 Tlak CO<sub>2</sub> po kvašení 5 ml laboratorní sladiny (LW 8,8 – 9,0 % w/w), mladiny HW1 (11,4 – 11,5 % w/w) a HW2 (12,7 – 13,4 % w/w) s 1 a 5 g kvasnic v klidu (-) a za pohybu (+)

nic a míchání mají usnadnit prokvašení posledních zbytků zkvasitelných cukrů i v dobře prokvašeném pivu.

Ve sladince a mladince udává tato hodnota podíl extraktu, který lze kvašením přeměnit na alkohol a tím posoudit jeho maximální možné využití. Kolísání pokusných podmínek způsobuje větší rozptyl výsledků, než při výpočtu z analýzy prokvašeného piva, ale manometrické stanovení zkvasitelných cukrů představuje další alternativu. Její výhodou je možnost sériového zpracování velkého množství vzorků surovin s jednoduchým a levným vybavením. Jeho přesnost je možné zvýšit jak hardwarovými (termostat, mičačka), tak softwarovými (korekční členy) prostředky.

Kvašení v uzavřené nádobce zamezuje úniku alkoholu, vodních par a odstraňování pomnožených kvasnic, které nelze jinak úplně odstranit. Nepřítomnosti zkvasitelných cukrů odpovídá  $\alpha = 0$ , jejich maximálnímu obsahu  $\alpha = 1$ . Tlakový fermentometr umožňuje také posoudit vliv přetlaku CO<sub>2</sub> na kvašení, neboť jeho velikost lze nastavit počátečním množstvím extraktu.

V manometrickém měření se v klidu a za pohybu ověřoval vliv dávky 0,1 – 5 g na 5 ml 10 % sacharosu (obr. 1), což odpovídalo dávkám 4 – 200 g kvasnic na 200 ml substrátu podle Analytiky EBC. Téměř úplného prokvašení ( $\alpha \sim 1$ ) se dosáhlo i za 6 h pohybu již při dávce kvasnic 0,5 g/ 5 ml (20 g/200 ml). U pivovarských substrátů se dosáhlo úplného prokvašení při dávce kvasnic 1 g/5 ml, které lze očekávat i při kvašení v klidu po 24 h.

Manometrický způsob umožňuje měřit i kinetiku kvašení, jak je patrné i z obr. 1 a 4. V uzavřené nádobce v klidu i při míchání roste tlak

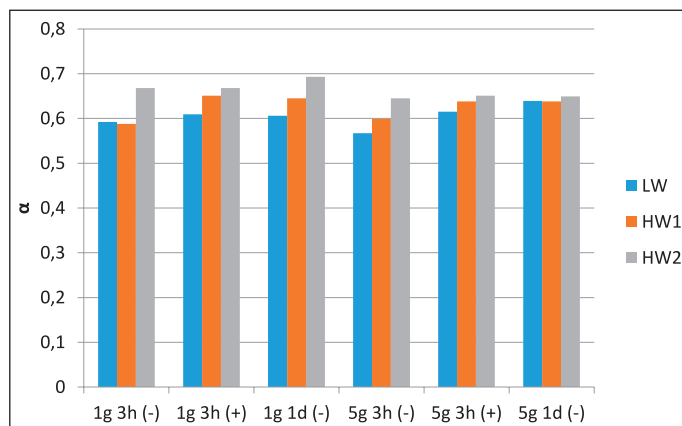


Fig. 3 The degree of extract utilization  $\alpha$  after the fermentation of the laboratory sweet wort (LW 8.8 – 9% w/w) and the production worts HW1 (11.4 – 11.5% w/w) and HW2 (12.7 – 13.4% w/w) with 1 and 5 g of yeast at rest (-) or with stirring (+)

Obr. 3 Stupeň využití substrátu  $\alpha$  po kvašení laboratorní sladiny (LW 8,8 – 9,0 % w/w), mladiny HW1 (11,4 – 11,5 % w/w) a HW2 (12,7 – 13,4 % w/w) s 1 a 5 g kvasnic v klidu (-) a za pohybu (+)

Kinetic equations can also be used to determine yeast activity and fermentability of substrate. In this way, it is possible to predict the yield of alcohol from sugar raw material and the amount of fermentable sugars that is important for predicting nutritional value of beverages. Determination is simple and requires only the small amount of sample. By changing test parameters, the resulting pressure and the carbon dioxide content in the fermentation container can be adjusted.

The knowledge of manometric fermentation can be used in the combination of fermentation under pressure and determination of the final degree of fermentation from ADF using chemical analysis. For finished beer, the fermentation in a closed container, from which the fermentation products are not removed can be used. According to our experience, dose of 5 g of yeast per 100 ml of beer can be used in the 0.5 liter PET bottle with fermentation time of 6 hours with stirring or at rest until the next day. For beers with low residual extract content, fermentation products are prevented from removing even at low pressure growth.

The pressure fermentometer allows by the sample volume reduction and the yeast concentration increase to shorten the analysis time without the need for classical beer analysis.

#### List of symbols

$\alpha$	degree of extract utilization
$\rho_y, \rho_s$	density of yeast, substrate ( $\sim 1 \text{ g cm}^{-3}$ )
$A$	alcohol (% w/w)
$E_0$	original extract of added substrate (% w/w)
$m_{E0}$	amount of extract in added substrate (g)
$m_{CO_2}$	total amount of carbon dioxide resulting from fermentation (g)
$m_s$	mass of substrate solution (g)
$m_y$	mass of yeast (dry matter 30% w/w) (g)
$m_w$	mass of water in added yeast (0,7 $m_y$ , g)
$n$	real extract (% w/w)
$p$	gauge pressure (kPa)
RDF	real degree of fermentation (%)
ADF	apparent degree of fermentation (%)
$t$	temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
$V_c$	volume approximation of fermentation container (ml)
$V_g$	volume approximation of head space (ml)
$\tau$	time (s)
$k$	kinetic constant ( $\text{s}^{-1}$ )

#### REFERENCES / LITERATURA

- Bendová, O., Kahler, M., 1981: Pivovarské kvasinky. 1. vyd., SNTL, Praha.
- Cutaia, A.J., Munroe, J.H., 1979: NOTE A method for the consistent estimation of real degree of fermentation. J. Am. Soc. Brew. Chem., 37(4): 188–189.
- Lenoël, M., Meunier, J.-P., Moll, M., Midoux, N., 1987: Improved system for stabilizing yeast fermenting power during storage. Proc. 21st Congress Madrid 1987, contribution 43, 425–432. Oxford: IRL Press, 1991. 731 p. ISBN 1852210516/9781852210519.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Kleucker, A., Jacob, F., Hutzler, M., 2016: A new approach for detecting spoilage yeast in pure bottom-fermenting and pure *Torulaspora delbrueckii* pitching yeast, propagation yeast, and finished beer. J. Am. Soc. Brew. Chem., 74(3): 200–205.
- Müller-Aufermann, S., W., Hutzler, M., Jacob, F., 2014: Evaluation and development of an alternative analysis method for rapid determination of yeast vitality. Brewing Science, 67(5/6): 72–80.
- Rahn, O., 1929: The fermentometer. J. Bacteriol. 18(3): 199–205.
- Šavel, J., Košin, P., Brož, A., 2014: Výpočet tlaku při kvašení v uzavřené nádobce. Kvasny Prum., 60(9): 233–238.
- Šavel, J., Košin, P., Brož, A., 2015: Ballingovy alkoholové faktory z pohledu současného pivovarství. Kvasny Prum., 61(4): 120–128.
- Teyssler-Kotyška, 1932: Technický slovník naučný. Ilustrovaná encyklopedie věd technických. Nakladatelé Borský a Šulc, Praha XII, Díl VII: 427–428.

Manuscript received / Do redakce došlo: 02/03/2018  
Accepted for publication / Přijato k publikování: 09/04/2018

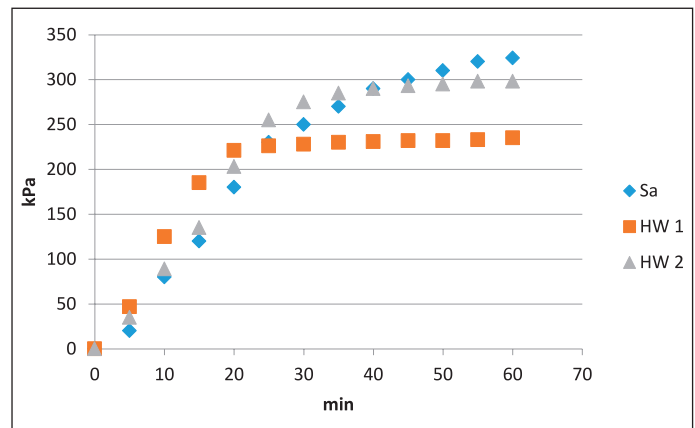


Fig 4 The pressure growth during the fermentation of 5 ml of sucrose (10% w/w) and the production worts HW1 (11.5% w/w) and HW2 (13% w/w) with 1 and 5 g of yeast at rest or with stirring  
Obr. 4 Tlakový růst během kvašení 5 ml sacharosu (10% w/w) a mladiny HW1 (11,5% w/w) a HW2 (13% w/w) s 1 a 5 g kvasnic v klidu a za pohybu

v závislosti na kvasné dávce i množství zkvasitelného substrátu, což odpovídá kinetice prvního řádu.

$$1. p = p_{\infty} (1 - e^{-kt})$$

kde  $p$  je aktuální přetlak v čase  $\tau$  a  $k$  je rychlostní konstanta. Po vyčerpání substrátu se ustaví konečný rovnovážný tlak, který odpovídá úplné spotřebě zkvasitelných cukrů, je však nutné dosáhnout rovnováhy mezi kapalnou a pevnou fází intenzivním pohybem, jinak jsou poslední měřené hodnoty nižší. Velikost rychlostní konstanty závisí i na dávce kvasnic a složení substrátů, včetně koncentrace stimulantů a inhibitorů kvašení.

Kinetické rovnice lze využít také k stanovení aktivity kvasnic i zkvasitelnosti substrátu. Tímto způsobem lze předpovědět výtěžek alkoholu z cukerné suroviny i množství využitelných cukrů, které je důležité pro předpověď nutriční hodnoty nápojů. Stanovení je jednoduché a vyžaduje pouze malé množství vzorku. Změnou parametrů pokusu lze nastavit i výsledný tlak a obsah oxidu uhličitého v kvasné nádobce.

Poznatků z manometrického kvašení lze využít v kombinaci kvašení pod tlakem se stanovením konečného stupně prokvašení podle hodnoty AFD z chemického rozboru. U hotových piv lze využít kvašení v uzavřené nádobce, z níž neunikají produkty kvašení. Podle našich zkušeností lze použít dávky 5 g kvasnic na 100 ml piva v 0,5 l PET láhvi s dobou kvašení 6 h za míchání, nebo v klidu do druhého dne. U piv s nízkým zbytkovým obsahem extraktu se zabrání úniku kvasných produktů i při nízkém tlakovém růstu.

Tlakový fermentometr umožňuje zmenšením objemu vzorku a zvýšením koncentrace kvasnic zkrátit dobu rozboru bez nutnosti přímé analýzy piva.

#### Seznam symbolů

$\alpha$	stupeň využití extraktu
$\rho_y, \rho_s$	density of yeast, substrate ( $\sim 1 \text{ g cm}^{-3}$ )
$A$	koncentrace etanolu (% w/w)
$E_0$	koncentrace extraktu v přidaném substrátu (% w/w)
$m_{E0}$	množství extraktu v přidaném substrátu (g)
$m_{CO_2}$	množství oxidu uhličitého vzniklého kvašením (g)
$m_s$	hmotnost roztoku substrátu (g)
$m_y$	hmotnost přidaných kvasnic s 30% sušiny (g)
$m_w$	obsah vody v přidaných kvasnicích (0,7 $m_y$ , g)
$n$	skutečný extrakt (% w/w)
$p$	údaj přetlakového manometru (kPa)
RDF	skutečný stupeň prokvašení (%)
ADF	zdánlivý stupeň prokvašení (%)
$t$	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )
$V_c$	odhad objemu kvasné nádoby (ml)
$V_g$	odhad objemu hrdlového prostoru (ml)
RDF	skutečný stupeň prokvašení (%)
$\tau$	čas (s)
$k$	rychlostní konstanta ( $\text{s}^{-1}$ )