

DOI: 10.18832/kp201707

Skladování násadních kvasnic v pivovaru

Storage of Pitching Yeast in Brewery

Jana KOPECKÁ¹, Petra KUBIZNIAKOVÁ², Lukáš FIDRICH¹, Dagmar MATOULKOVÁ²¹ Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno / *Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University Brno, Czech Republic, Kotlářská 2, 611 37 Brno*, e-mail: 223187@mail.muni.cz² Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha / *Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Praha, Czech Republic*
e-mail: kubizniakova@beerresearch.cz, matoulkova@beerresearch.czRecenzovaný článek / *Reviewed Paper***Kopecká, J., Kubizniaková, P., Fidrich, L., Matoulková, D., 2017: Skladování násadních kvasnic v pivovaru.** Kvasny Prum. 63, č. 2, s. 52–56

Článek je stručným shrnutím problematiky skladování násadních kvasnic v pivovaru. Při opakovaném použití kvasnic jsou podmínky jejich skladování před dalším nasazením stěžejní pro kvalitu finálního produktu. V přehledu jsou uvedeny faktory ovlivňující viabilitu a vitalitu kvasnic během jejich skladování, vliv způsobu a teploty skladování na průběh následujícího kvašení, diskutováno je míchání kvasnic v průběhu jejich uskladnění a ošetření kvasnic kyselým praním.

Kopecká, J., Kubizniaková, P., Fidrich, L., Matoulková, D., 2017: Storage of pitching yeast in brewery. Kvasny Prum. 63, No. 2, pp. 52–56

This article deals with the issue of pitching yeast storage in brewery. The storage conditions before its repitching are a key factor for the quality of the final product. A short overview of factors affecting viability and vitality of yeast during its storage is given, as well as the effect of the way and temperature of its storage on the following fermentation. The stirring of yeast during the storage and acid washing treatment are also discussed.

Kopecká, J., Kubizniaková, P., Fidrich, L., Matoulková, D., 2017: Die Lagerung der Einsatzhefe in der Brauerei. Kvasny Prum. 63, Nr. 2, S. 52–56

Der Artikel stellt eine kurze Zusammenfassung der Problematik einer Hefelagerung in der Brauerei dar. Für die hohe Finalqualität des Bieres bei der wiederholten Hefeanwendung sind die Hefelagerbedingungen vor ihren weiteren Einsatz sehr wichtig. In der Übersicht sind die Viabilität- und Vitalität der Hefe während der Lagerung beeinflussten Faktoren, der Einfluss des Verfahrens und der Lagerungstemperatur auf den Verlauf des nächsten Gärungsprozesses angeführt, weiterhin wird die Mischung der Hefe während des Lagerungsprozesses und Hefebehandlung durch saure Waschen diskutiert.

Klíčová slova: skladování kvasnic, teplota skladování, kyselá praní kvasnic, stres, viabilita, vitalita**Keywords:** yeast storage, storage temperature, acid washing of yeast, stress, viability, vitality

1 ÚVOD

Opakované používání násadních pivovarských kvasnic s sebou přináší nutnost jejich skladování za vhodných podmínek. Podmínky skladování by měly zajistit zachování viability (životaschopnosti) a vitality kvasnic a zároveň zabránit jejich kontaminaci. Skladování kvasnic je pro kvasničné buňky obdobím hladovění a mělo by tedy být co nejkratší. Maximální doba skladování násadních kvasnic je závislá na podmínkách skladování, mikrobiologické čistotě kvasnic, generaci kvasnic (tj. počtu jejich nasazení v předchozích fermentacích) a jejich fyziologickém stavu v okamžiku stažení z mladého piva a liší se také v závislosti na daném kmeni (Boulton a Quain, 2001; Murray et al., 1984). Fyziologický stav kvasnic, označovaný také pojmy „vitalita“, „aktivita“ nebo „fermentační schopnost“, má přímý vliv na kvalitu hotového piva (Boulton a Quain, 2001; Guido et al., 2004).

Cílem této práce je podání stručného literárního přehledu problematiky skladování násadních kvasnic v pivovaru.

2 PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ KVASNIC

Při opakovaném nasazení jsou kvasnice po ukončení hlavního kvašení staženy z kvasné nádoby a umístěny do skladovací nádoby, kde by měly být za vhodné teploty skladovány po co nejkratší dobu před dalším použitím (O'Connor-Cox, 1997; 1998b; Stewart, 1996). V praxi to ale funguje tak, že jsou kvasnice skladovány i po dobu delší než 3 dny (Sall et al., 1988). Při skladování je vitalita kvasinek ovlivňována zejména teplotou (McCaig a Bendiak, 1985b; O'Connor-Cox, 1998a; Somani et al., 2012), dobou hladovění (Martens et al., 1986), oxidativním stresem (Boulton, 1991; Maemura et

1 INTRODUCTION

Storage under suitable conditions is necessary for reusing pitching yeast. The storage conditions should preserve viability and vitality of yeast and also prevent their contamination. The storage represents a period of yeast cell starvation should thus be shortened as much as possible. The maximum storage period depends on storage conditions, microbiological purity of yeast, yeasts generation (i.e. number of pitches in previous fermentations) and their physiological state at the moment of siphoning of green beer. The period also varies according to strain used (Boulton and Quain, 2001; Murray et al., 1984). Physiological state of yeasts, also identified as “vitality”, “activity” or “fermentative ability”, has a direct effect on the beer quality (Boulton and Quain, 2001; Guido et al., 2004).

The aim of this work is to give a short overview of the storage of pitching yeast in brewery.

2 YEAST STORAGE CONDITIONS

After the main fermentation, the yeast to be repitched is siphoned from the fermentation container and placed in a storage container where it should be stored at a suitable temperature for the shortest time before another use (O'Connor-Cox, 1997, 1998b; Stewart, 1996).

In practice, the yeast is stored for more than 3 days (Sall et al., 1988). During the storage its vitality is affected mainly by temperature (McCaig and Bendiak, 1985b; O'Connor-Cox, 1998a; Somani et al., 2012), the starvation period (Martens et al., 1986), oxidative stress (Boulton, 1991; Maemura et al., 2007; McCaig and Bendiak, 1985a;

al., 1998; McCaig a Bendiak, 1985a; Sall et al., 1988), mícháním (McCaig a Bendiak, 1985a). Uvedené stresové faktory nepůsobí odděleně – jejich účinky se kumulují (Gibson et al., 2007). Vliv stresových faktorů je znásoben opakovaným nasazením – každé následné použití kvasnic a skladování přispívá ke snížení jejich viability a vitality (Powell et al., 2003). Mimo fázi skladování jsou kvasnice vystaveny podmínkám hladovění také v pozdní fázi hlavního kvašení. S opakovaným zakvašením tak dochází k postupným změnám fyziologie, flokulace, povrchového náboje a viability kvasinek (Sigler a Matoulková, 2011).

Životaschopnost kvasinek je ovlivněna i obsahem hořkých látek v pivu. Kvasinky stažené z piva s nižší hořkostí vykazovaly větší životaschopnost než ty, které byly použity pro piva s vyšším obsahem chmelových látek (Edgerton, 2005).

2.1 Kvasinky a zásobní cukry

V průběhu skladování jsou kvasinky závislé na endogenních zásobách uhlikatých látek. Kvasinky využívají dva typy zásobních cukrů – glykogen a trehalosu.

Glykogen má strukturu podobnou škrobu – glukosa je v něm vázána α -(1,4)-glykosidickou vazbou s větvením α -(1,6) (Imai, 1999). Obsah glykogenu přesahuje 40 % sušiny buňky a je ovlivňován podmínkami kvašení a skladování a také závisí na vlastním kmenu kvasinek (O'Connor-Cox et al., 1996). Jako zdroj energie je glykogen využíván při biosyntese lipidů, sterolů a vyšších mastných kyselin, zejména v lag fázi v následující fermentaci (Bolát, 2008; Sall et al., 1988). K akumulaci glykogeny v buňkách dochází ve střední až pozdní fázi kvašení. V průběhu skladování mezi jednotlivými nasazeními kvasnic se spotřebovává až 40 % glykogeny (Heggart et al., 2000). Při nevhodných podmínkách skladování kvasnic dochází k jeho zvýšené spotřebě. V následujícím kvašení pak nízký obsah glykogeny v kvasnicích vede ke snížení jejich viability, poruchám flokulace, zpomalení kvašení, a tím k nižší produkci alkoholu a prokvašení mladiny a k vyšší produkci vicinálních diketonů, acetaldehydu, oxidu siřičitého a DMS (Bolát, 2008; Heggart et al., 1999; Pickerell et al., 1991).

Trehalosa je neredukující disacharid složený ze dvou molekul glukosy, které jsou k sobě napojeny svými redukujícími konci, je tedy isomerem maltosy. Trehalosa slouží jako rezervní materiál a zároveň jako stresový metabolit. Akumulace trehalosy v buňkách zabráňuje tepelné denaturaci buněčných bílkovin a funguje jako stabilizátor plasmatické membrány v podmínkách buněčného stresu (Bolát, 2008; O'Connor-Cox et al., 1996). Syntesu trehalosy vyvolávají různé stresy, kterým jsou pivovarské kvasinky vystaveny – teplota, aerace, koncentrace živin a metabolitů aj. (Yancey et al., 2005).

2.2 Sběr kvasnic a způsob jejich skladování

Skladování kvasnic úzce souvisí s podmínkami jejich sbírání (odstřelu), a zejména s jeho načasováním. V okamžiku sedimentace kvasnic je vhodné jejich odstranění z kvasné nádoby – kvasnice, které sedimentovaly, se již nebudou podílet na zakvašování zbytkového cukru. Prodlužování doby skladování kvasnic na dně kvasné nádoby může vést k jejich poškození a odumírání (O'Connor-Cox, 1997). Nepříznivé faktory, působícími na kvasnice na dně kvasné nádoby, jsou vysoká hustota buněk, nedostatek živin, vysoké koncentrace ethanolu a oxidu uhličitého, a v případě CKT také vysoký hydrostatický tlak (Barker a Smart, 1996; Loveridge et al., 1997; Smart et al., 1995).

Po ukončení kvašení v CKT jsou kvasnice někdy z operačních důvodů skladovány přímo v kónusu CKT – takový způsob vede k vystavení kvasnic různým typům stresů, zejména teplotnímu, ethanolovému a vlivu kyselého pH. Kumulativní působení těchto stresových faktorů může poškodit fyziologický stav kvasnic (Lawrence et al., 2013). Při protaženém skladování kvasnic v kónusu CKT začínají buňky degradovat zásobní zdroje energie (zejména glykogen), a stávají se tak méně vhodnými pro opakované nasazení (Hodgson, 1997). Skladování kvasnic v kónusu CKT může vést ke značným výkyvům teplot daných vysokou hustotou buněk a uvolňováním tepla při bazálním metabolismu buněk. Mezi středem kónusu a jeho stěnou může být rozdíl teplot až 5 °C (Boughton, 1983). Vyšší teplota v kónusu CKT urychluje poškození buněk nebo jejich odumírání způsobené ethanolovým stresem (Casey a Ingledew, 1986; Sigler a Matoulková, 2011).

V optimálním případě jsou kvasnice ihned po stažení z kvasné nádoby zchlazeny a dopraveny do skladovací nádoby. Cílem tohoto kroku je rychlé ochlazení kvasnic na teplotu, při které se metabolismus zpomalí na minimum. Nejvhodnější systém pro rychlé chlazení je in-line chladič, kterým jsou kvasnice ochlazeny na teplotu 2–4 °C

(Sall et al., 1988), and by stirring (McCaig and Bendiak, 1985a). These stress factors do not affect the yeast separately – their effects are cumulated (Gibson et al., 2007). The repitching increases the effect of stress factors – every following usage and storage of yeasts contribute to the decrease of their viability and vitality (Powell et al., 2003). Beside the phase of storage yeast is exposed to starvation also in the late phase of main fermentation. The repitching results in gradual physiology changes as well as in yeast flocculation, surface charge and viability (Sigler and Matoulková, 2011).

The vitality of yeast is affected also by the content of bitter compounds in beer. The yeast siphoned from beer with lower bitterness was found to exhibit higher vitality than that which was used for beers with higher content of hop compounds (Edgerton, 2005).

2.1 Yeast and reserve carbohydrates

During storage, yeast is dependent on endogenous resources of carbonaceous substances. The yeast utilizes two types of reserve carbohydrates – glycogen and trehalose.

Glycogen structure is similar to starch – glucose units are linked together by α -(1,4)-glycosidic bond with α -(1,6) branching (Imai, 1999). Glycogen content exceeds 40% of cell dry weight and it is affected by the fermentation and storage conditions and also depends on the yeast strain (O'Connor-Cox et al., 1996). Glycogen is used as the source of energy for the biosynthesis of lipids, sterols and higher fatty acids, especially during the lag phase in the following fermentation (Bolát, 2008; Sall et al., 1988). Glycogen accumulation in cells occurs in the middle to late fermentation phase. During storage and between yeast pitchings about 40 % of glycogen is consumed (Heggart et al., 2000). Unsuitable storage conditions lead to its higher consumption. The low content of glycogen results in a decrease of viability, flocculation defects, retardation of fermentation and further in lower alcohol production, over-fermenting of wort and higher production of vicinal diketones, acetaldehyde, sulfur dioxide and DMS in subsequent fermentations (Bolát, 2008; Heggart et al., 1999; Pickerell et al., 1991).

Trehalose is a nonreducing disaccharide composed of two molecules of glucose, which are bound by their reducing ends; it is an isomer of maltose. Trehalose is a reserve compound and also a stress metabolite. Accumulation of trehalose inhibits thermal denaturation of cell proteins and also acts like plasma membrane stabilizer under cell stress conditions (Bolát, 2008; O'Connor-Cox et al., 1996). Trehalose is synthesized in response to a variety of stresses to which brewer yeasts are exposed – temperature, aeration, content of nutrients and metabolites and others (Yancey et al., 2005).

2.2 Collecting yeast and its storage

The storage of yeast is closely linked with the conditions of its harvesting (blasting of the yeast), especially its timing. At the moment of yeast sedimentation it is appropriate to remove the cells from fermentation container – sedimented yeast does not participate in fermenting residual carbohydrates. Extension of the storage time of yeast on the bottom of the fermentation container may result in yeast damage and death (O'Connor-Cox, 1997). Yeast resting on the bottom of fermentation container is affected by adverse factors like the high density of cells, lack of nutrients, high concentration of ethanol and carbon dioxide and high hydrostatic pressure in case of CCT (Barker and Smart, 1996; Loveridge et al., 1997; Smart et al., 1995).

After the end of fermentation in CCT, yeast is sometimes stored for operational reasons in the cone of CCT – this method results in the exposure of yeast to various stresses such as high temperature, ethanol and effect of acid pH. Cumulative effects of these stress factors may damage the yeast physiological state (Lawrence et al., 2013). During a protracted yeast storage in the cone of CCT cells begin to degrade their reserve energy sources (mainly glycogen) and become less suitable for repitching (Hodgson, 1997). Storing yeasts in the cone of the CCT may result in temperature fluctuations because of high cell density and the heat released by basal metabolism of cells. A temperature difference of as much as 5 °C may arise between the center and the wall of the cone (Boughton, 1983). Higher temperature in the CCT cone accelerates the damage of cells and their death caused by ethanol stress (Casey and Ingledew, 1986; Sigler and Matoulková, 2011).

Ideally, yeast is cooled off and transported to the storage container directly after siphoning from the fermentation container. The purpose of this step is cooling off to the temperature at which metabolism slows down to a minimum. Optimal system for fast cooling is the in-line cooler, in which yeast is cooled off to 2–4 °C and transported to

a dopraveny do skladovací nádoby. Částečného zchlazení kvasnic lze dosáhnout také přidáním odplyněné chladné vody, která zároveň zředí koncentraci ethanolu v kvasničné hmotě. Toto ředění má smysl pouze tehdy, když jsou kvasnice před dalším použitím skladovány více než 24 hodin (O'Connor-Cox, 1998a). Míchání kvasnic s vhodnou kapalinou se provádí také při zakvašování práškovitými kvasnicemi, které je nutné sebrat centrifugací. Proces odstředování snižuje viabilitu kvasinek a způsobuje pokles vnitrobuněčného pH (ukazatele fyziologického stavu). Dochází k vyčerpání glykogenu a trehalosy a z buněčných stěn se uvolňuje mannan, který vytváří nefiltrovatelný zákal (Chlup et al., 2008).

Skladování kvasnic pod pivem je spojováno se vznikem respiračně-deficientních mutantů (RD mutantů) (McCaig a Bendiak, 1985a;b). Respiračně-deficientní mutace vznikají v menší míře samovolně; zvýšené procento mutací se tvoří např. vlivem působení ethanolu (Bandas a Zakharov, 1980; Casey a Ingledew, 1986). Skladování kvasnic pod pivem za současného působení vyšší teploty, které jsou vystaveny kvasnice uprostřed biomasy, může vést k hromadění RD mutantů (Jenkins et al., 2009).

2.3. Teplota skladování

Stejně důležité jako rychlé dosažení optimální skladovací teploty je i její udržení během celé doby skladování. Při skladování kvasinek za vyšších teplot může docházet k prodloužení lag fáze při následném kvašení, vyššímu pH mladého piva, slabšímu prokvašení a tzv. autofermentaci, kdy jsou spotřebovávány zásobní uhlovodíky (glykogen a trehalosa) za současné produkce CO₂ a ethanolu, a snižuje se životaschopnost kvasnic (McCaig a Bendiak, 1985b). S vyšší teplotou se také zvyšuje toxicita ethanolu (Casey a Ingledew, 1986).

Spodní i svrchní kvasinky vykazují shodnou míru tolerance k nižším teplotám. Teplota v rozmezí 3–4 °C je obecně považována za ideální pro dlouhodobější skladování kvasnic (Boulton a Quain, 2001; Heggart et al., 1999). Správný postup zchlazení kvasnic, jejich uchovávání za vhodné teploty a promíchávání nezaručují, že kvasnice mohou takto být uchovávány „věčně“. I při udržovacím metabolismu vyžadují buňky energii a rezervy glykogenu jsou tak se pomalu ale jistě vyčerpávány (McCaig a Bendiak, 1985b; O'Connor-Cox et al., 1996). Protrahované skladování kvasnic navíc vede k poruchám flokulace kvasnic (Rhymes a Smart, 1997).

Na nerostoucí buňky uchovávané při nízké teplotě nepůsobí ethanol toxicky, při delším působení se však jeho přítomnost může projevit poškozením buněčných membrán (Casey a Ingledew, 1986). Různé kmeny vykazují různý stupeň rezistence k ethanolu, nejvhodnější je proto zbytečně neprodlovat dobu skladování kvasnic. Morrison a Suggett (1983) uvádí jako optimum skladování kvasnic při 4 °C po dobu maximálně 24 hodin.

Vysoké koncentrace CO₂ při skladování snižují viabilitu kvasnic (Cahill et al., 2003). Debourg (2010) uvádí jako ideální podmínky skladování kvasnic při teplotě 1 °C, se zahrnutím kroku uvolnění CO₂ ze skladovacích nádob. Naopak ve studii autorského kolektivu Somani et al. (2012) nebyly u kmene *S. pastorianus* W34/70 pozorovány rozdíly ve viabilitě, obsahu glykogenu a trehalosy u kvasnic uchovávaných anaerobně „pod pivem“ při teplotě 4 a 10 °C. Teplota 25 °C byla prokázána jako nevyhovující. U kvasnic skladovaných při 4 °C byla zjištěna nižší glukosou indukovaná acidifikace nežli u kvasnic skladovaných při teplotě 10 °C. Autoři uvádějí, že skladování kvasnic může být realizováno i při teplotách vyšších, než je v praxi běžné. Skladování při teplotě 10 °C je energeticky mnohem méně náročné, nežli udržování teploty 4 °C; podmínkou je ovšem zachování optimálního fyziologického stavu kvasnic (Somani et al., 2012).

Ve své studii z roku 1985 uvádějí McCaig a Bendiak, že u kvasnic skladovaných „pod pivem“ při teplotách 10, 15, 20 a 25 °C došlo k výraznému snížení obsahu glykogenu a životaschopnosti. Finální koncentrace diacetylu a DMS byla vyšší při následné fermentaci s kvasinkami uchovávanými při 10 °C oproti kvasinkám skladovaným při 1 či 5 °C. Fermentace s násadními kvasnicemi uchovávanými při vyšších teplotách (15, 20 a 25 °C) probíhala odlišně a bylo dosahováno výrazně nižších hodnot prokvašení (McCaig a Bendiak, 1985b).

2.4 Míchání

Pro zajištění homogenity kvasnic během jejich skladování je používáno různých systémů promíchávání. Buňky ve stacionární fázi růstu jsou mnohem méně citlivé k mechanickému stresu (O'Connor-Cox, 1998a). Obecně platí, že mechanické poškození kvasnic během míchání je dáno nikoliv délkou a intenzitou míchání, ale spíše aktuálním fyziologickým stavem kvasnic a pH prostředí (Lewis a Poerwanto, 1991; McCaig a Bendiak, 1985a). Odolnost buněk

storage container. The cooling of yeast may be partially secured by degassed cool water, which also reduces the ethanol concentration in the yeast mass. This dilution makes sense only when the yeast is stored more than 24 hour before its further use (O'Connor-Cox, 1998a). Yeast is also mixed with a suitable liquid during pitching by powdered yeast, which has to be collected by centrifugation. The centrifugation process reduces yeast viability and causes a decrease of intracellular pH (an indicator of the physiological state). It leads to the depletion of glycogen and trehalose and to the release of mannans from the cell walls, which then forms unfilterable haze (Chlup et al., 2008).

Storing yeast under beer is connected with the appearance of respiratory-deficient mutants (RD mutants) (McCaig and Bendiak, 1985a;b). The respiratory-deficient mutations occur partly spontaneously; increased percentage of mutations is produced e.g. by the effect of ethanol (Bandas and Zakharov, 1980; Casey and Ingledew, 1986). Storing yeast under beer at high temperatures which may arise inside the yeast biomass may result in accumulation of RD mutants (Jenkins et al., 2009).

2.3 Storage temperature

As important as the fast attainment of optimal storage temperature is the maintenance of this temperature during the whole storage time. Storage of yeast at higher temperature may result in extension of the lag phase during further fermentation, increase beer pH, weaker fermentation and the so-called auto-fermentation during which are consumed all reserve carbohydrates (glycogen and trehalose), with simultaneous production of CO₂ and ethanol and reduction of yeast vitality (McCaig and Bendiak, 1985b). The toxicity of ethanol is also increased at higher temperature (Casey and Ingledew, 1986).

Bottom-fermenting and top-fermenting yeasts have an identical level of tolerance to lower temperatures. Temperature in the range of 3–4 °C is generally considered an optimal temperature for long-term storage (Boulton and Quain, 2001; Heggart et al., 1999). However, a proper yeast cooling procedure, storage at optimal temperature and optimum stirring do not guarantee that yeast may be stored “forever” in this way. Even cells during maintenance metabolism require energy, and glycogen reserves are slowly but certainly depleted (McCaig and Bendiak, 1985b; O'Connor-Cox et al., 1996). Protracted storage additionally results in damage to yeast flocculation (Rhymes and Smart, 1997).

Ethanol has no effect on nongrowing cells stored at low temperature, but a prolonged exposure to it may cause damage of cell membranes (Casey and Ingledew, 1986). Various strains have different levels of resistance to ethanol and the storage time therefore should not be unduly prolonged. Morrison and Suggett (1983) defined optimal storage conditions at 4 °C for a maximum of 24 hours.

High concentrations of CO₂ during storage decrease the yeast vitality (Cahill et al., 2003). According to Debourg (2010) optimal yeast storage conditions are at 1 °C with the inclusion of a step allowing the release of CO₂ from the storage containers. On the other hand, Somani et al. (2012) did not observe any differences in viability and the content of glycogen and trehalose in *S. pastorianus* W34/70 yeast strain kept anaerobically “under beer” at 4 °C and 10 °C. The temperature of 25 °C was proved as unsuitable. Yeast stored at 4 °C exhibited lower glucose-induced acidification than yeast stored at 10 °C. The authors also reported that yeast storage may be performed at higher temperatures than is common in practice. Storage at 10 °C is energetically much less difficult than storage at 4 °C; the only requirement is the maintenance of optimal physiological state of the yeast (Somani et al., 2012).

McCaig and Bendiak in their study from 1985 reported that yeasts stored “under beer” at 10, 15, 20 and 25 °C displayed a significant reduction of glycogen content and vitality. In subsequent fermentation, the final concentrations of diacetyl and DMS for yeast stored at 10 °C were higher than for yeast stored at 1 or 5 °C. Fermentation with pitching yeast stored at higher temperatures (15, 20 a 25 °C) proceeded differently and significantly lower fermentation extents were attained (McCaig and Bendiak, 1985b).

2.4 Stirring

Various stirring systems are used to secure yeast homogeneity during its storage. Cells in the stationary phase of growth are much less sensitive to mechanical stress (O'Connor-Cox, 1998a). Mechanical damage of yeast during stirring is generally due to the actual physiological state of yeast and environment pH rather than to the length and intensity of stirring (Lewis and Poerwanto, 1991; McCaig and Bendiak, 1985a). Cell tolerance against mechanical

vůči mechanickému poškození a jiným stresům může být i kmenově specifická (Rhymes and Smart, 2001).

Mírné promíchávání kvasnic během jejich skladování zabraňuje výskytu tzv. hot spots – míst s vyšší teplotou způsobenou metabolickou aktivitou buněk (McCaig a Bendiak, 1985a). Nadměrné míchání sebraných kvasnic však může během následujícího kvašení vést k prodloužení lag fáze, nízkému prokvašení a k uvolňování buněčného materiálu, který negativně ovlivňuje čirost piva a stabilitu pěny (Lewis a Poerwantaro, 1991; McCaig a Bendiak, 1985a; Pickerell et al., 1991). V práci Stoupise et al. (2002) byl sledován vliv rotační rychlosti míchání na fermentační schopnost svrchních kvasinek *S. cerevisiae*. Sebrané kvasnice byly vystaveny míchání s rotační rychlostí 550, 750 a 900 rpm. Se stoupající rotační rychlostí docházelo ke snižování viability, vyššímu zákalu piva, snížení stability pivní pěny, zvýšení pH piva a mechanickému poškození buněk (Stoupis et al., 2002).

2.5 Kyselá prání kvasnic

Kyselá promývání kvasnic se používá pro dekontaminaci kvasnic. Nejčastějšími kyselinami jsou fosforečná, sírová a vinná (Basařová et al., 2010). Kyselá prání by mělo probíhat při pH 2,2 po dobu 2-4 hodin, při teplotě do 4 °C za neustálého míchání pro zajištění homogenních podmínek v celém objemu ošetřovaných kvasnic a ihned po promytí by kvasnice měly být použity pro další nasazení (Boulton a Quain, 2001). Někdy je kombinován proces kyselého praní kyselinou a oxyseleným peroxidisíranem amonným, který vykazuje vyšší dekontaminační účinky (Bruch et al., 1964). Použití kyseliny fosforečné v kombinaci s peroxidisíranem amonným při pH 2,8 je účinnější nežli samotná kyselina při pH 2,2 (Simpson, 1987).

Při nižším pH a teplotě nad 5 °C už může docházet k poškození kvasnic – kvasničné buňky musí vynaložit energii na udržení vnitrobuněčného pH a viability (Fernandez et al., 1993; Simpson a Hammond, 1989). Běžné pivovarské kontaminanty, jako jsou mléčné bakterie nebo divoké kvasinky, jsou poměrně rezistentní ke kyselému mytí (Cunningham a Stewart, 1998). Účinek kyselého praní na mléčné bakterie se zvyšuje s obsahem chmelových pryskyřic, které se běžně vyskytují v sebraných kvasnicích. Aplikace kyselého praní by tedy měla proběhnout ihned po sběru kvasnic, bez jejich předchozího promývání vodou (Simpson, 1987).

Kyselá promývání kvasnic může přinášet i jiné výhody než mikrobiální dekontaminaci – bylo pozorováno zkrácení lag fáze v následujícím kvašení a rychlejší redukce diacetylu (a tedy zkrácení doby kvašení) (O'Connor-Cox, 1998a), což však může být dáno konkrétním kmenem kvasnic a nemusí to platit obecně (Cunningham a Stewart, 1998). Aplikace kyselého praní a současně opakovaného nasazení kvasnic do HGB mladiny (EPM 20 %) vede ke snížení životaschopnosti kvasinek (Cunningham a Stewart, 1998). Rezistence kvasnic k nízkému pH a dobrý fyziologický stav kvasnic před kyselým praním jsou základním předpokladem úspěšného kyselého praní (Cunningham a Stewart, 2000).

Odišné od kyselého mytí kvasnic je tzv. kyselá kondicionování („příprava“), jehož cílem je deflokulace kvasnic při pH 3-3,3 a s tím související již uvedené zkrácení lag fáze v následujícím kvašení a rychlejší odbourávání diacetylu (O'Connor-Cox, 1998a).

PODĚKOVÁNÍ

Článek byl zpracován s využitím institucionální podpory Ministerstva zemědělství ČR na dlouhodobý koncepční rozvoj VÚPS – Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin (RO1916) a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR – Výzkumné sensorické centrum v Praze a Výzkumná a vývojová varna – udržitelnost a rozvoj (LO1312).

LITERATURA / REFERENCES

- Bandas, E.L., Zakharov, I.A., 1980: Induction of rho- mutations in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Mutat. Res.*, 71: 193–199.
- Barker, M.G., Smart, K.A., 1996: Morphological changes associated with the cellular aging of a brewing yeast strain. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54: 121–126. DOI: 10.1094/ASBCJ-54-0121
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010: Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha, ISBN: 978-80-7080-734-7.
- Bolat, I., 2008: The importance of trehalose in brewing yeast survival. *Innovative Romanian Food Biotechnol.*, 2: 1–10.
- Boughton, R., 1983: Are you getting the best out of your yeast? *Brewer*, 69: 260–264.

and other stresses may be even strain specific (Rhymes and Smart, 2001).

Gentle stirring of yeast during its storage prevents the occurrence of so-called hot spots – places with higher temperature caused by the metabolic activity of cells (McCaig and Bendiak, 1985a). Excessive stirring of harvested yeast may result in elongation of the lag phase during the following fermentation, low fermentation and a release of cell material which has a negative impact on beer clarity and foam stability (Lewis and Poerwantaro, 1991; McCaig and Bendiak, 1985a; Pickerell et al., 1991). Stoupise et al. (2002) monitored the effect of rotational speed on fermentative ability of top-fermenting yeast *S. cerevisiae*. Harvested yeast was exposed to stirring with rotational speed 550, 750 and 900 rpm. Higher rotational speed results in a decrease of viability, higher beer haze, reduction of beer foam stability, increasing beer pH and mechanical damage of cells (Stoupis et al., 2002).

2.5 Acid washing of yeast

Acid washing of yeast is used for yeast decontamination. The most commonly used acids are phosphoric, sulfuric and tartaric acid (Basařová et al., 2010). Acid washing should be carried out at pH 2.2 for 2-4 hours at 4 °C with constant stirring to ensure homogeneous conditions in the whole volume of treated yeast; yeast should be used for repitching immediately after washing (Boulton and Quain, 2001). Acid washing is sometimes combined with a treatment by acidified ammonium persulfate, which has higher decontamination effect (Bruch et al., 1964). Phosphoric acid used in combination with ammonium persulfate at pH 2,8 is more effective than acid itself at pH 2,2 (Simpson, 1987).

Lower pH and temperature above 5 °C may result in yeast damage – yeast cells have to spend energy to maintain intracellular pH and viability (Fernandez et al., 1993; Simpson and Hammond, 1989). Common brewery contaminants like lactic acid bacteria or wild yeasts are relatively resistant to acid washing (Cunningham and Stewart, 1998). The effect of acid washing on lactic acid bacteria increases with the content of hop resins which commonly occur in harvested yeast. Acid washing should be done immediately after yeast harvesting without its previous washing with water (Simpson, 1987).

Acid washing may also have benefits other than microbial decontamination – it was reported to shorten the lag phase in the following fermentation and faster reduction of diacetyl (and hence shortening of fermentation time) (O'Connor-Cox, 1998a); however, this phenomenon may be strain-specific and it may not have general validity (Cunningham and Stewart, 1998). Acid washing and simultaneous repitching of the yeast to HGB wort (20 °C Plato) result in reduction of yeast vitality (Cunningham and Stewart, 1998). Yeast resistance to low pH and good physiological state before acid washing are necessary for successful acid washing (Cunningham and Stewart, 2000).

Different from acid washing of yeast is the so-called acid conditioning (“preparation”). Its purpose is deflocculation of yeast at pH 3-3.3 and shortening of the lag phase, and faster degradation of diacetyl in the following fermentation (O'Connor-Cox, 1998a).

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was written with institutional support of CR Ministry of Agriculture for long-term conceptual development of RIBM – Research of quality and processing of malting and brewery raw materials (RO1916) and support of CR Ministry of Education, Sports and Youth – Research sensory center in Prague and Research and development brewhouse – sustainability and development (LO1312).

- Boulton, C.A., 1991: Yeast management and the control of brewery fermentations. *Brew. Guard.*, 120: 25–29.
- Boulton, C., Quain, D., 2001: Brewing yeast and fermentation. 1st edition, Blackwell Science Ltd., London, England.
- Bruch, C.W., Hoffman, A., Gosine, R.M., Brenner, M.W., 1964: Disinfection of brewing yeast with acidified ammonium persulfate. *J. Inst. Brew.*, 70: 242–248. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1964.tb01987.x
- Cahill, G., Walsh, P.K., Donnelly, D., 2003: A study of the variation in temperature, solids concentration and yeast viability in agitated stored yeast. In: *Proc. 29th Congr. Eur. Brew. Conv.*, p. 42.

- Casey, G.P., Ingledew, W.M., 1986: Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 13: 219–280. DOI: 10.3109/10408418609108739
- Chlup, P.H., Bernard, D., Stewart, G.G., 2008: Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology. *J. Inst. Brew.*, 114: 45–61. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00305.x
- Cunningham, S., Stewart, G.G., 1998: Effects of high-gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56: 12–18. DOI: 10.1094/ASBCJ-56-0012
- Cunningham, S., Stewart, G.G., 2000: Acid washing and serial re-pitching brewing ale strain of *Saccharomyces cerevisiae* in high gravity wort and the role of wort oxygenation conditions. *J. Inst. Brew.*, 106: 389–402. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2000.tb00530.x
- Debourg, A., 2010: Yeast management and high gravity fermentation. *Cerevisia*, 35: 16–22. DOI: 10.1016/j.cervis.2010.05.001
- Edgerton, J., 2005: The impact of bitterness on the viability of harvested yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 63: 28–30. DOI: 10.1094/ASBCJ-63-0028
- Fernandez, S.S., Gonzalez, M.G., Sierra, J.A., 1993: Evaluation of the effect of acid washing on the fermentative and respiratory behavior of yeasts by the acidification power test. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 30(2): 1–8.
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., Smart, K.A., 2007: Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 535–569. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x
- Guido, L.F., Rodrigues, P.G., Rodrigues, J.A., Gonçalves, C.R., Barros, A.A., 2004: The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chem.*, 87 (2): 187–193. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.033
- Heggart, H. M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R. J., Dowhanick, M., Russell, I., 1999: Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 36: 383–406.
- Heggart, H., Margaritis, A., Stewart, R.J., Pilkington, H., Sobczak, J., Russell I., 2000: Measurement of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 37: 409–430.
- Hodgson, J., 1997: Impact of yeast management on fermentation performance. *Proc. Brew. Yeast Ferm. Perform. Cong.* 1: 16.
- Imai, T., 1999: The assessment of yeast vitality – the past and the future. *Brewer's Guardian*, 20–27.
- Jenkins, C.L., Lawrence, S.J., Kennedy, A.I., Thurston, P., Hodgson, J.A., Smart, K.A., 2009: Incidence and formation of petite mutants in lager brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* (syn *S. pastorianus*) populations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 67: 72–80. DOI: 10.1094/ASBCJ-2009-0212-01
- Lawrence, S.J., Nicholls, S., Box, W.G., Sbuely, R., Bealin-Kelly, R., Axcell, B., Smart, K.A., 2013: The relationship between yeast cell age, fermenter cone environment, and petite mutant formation in lager fermentations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 71: 90–96. DOI: 10.1094/ASBCJ-2013-0405-01
- Lewis, M.J., Poerwanto, W.M., 1991: Release of haze material from cell walls of agitated yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49: 43–46. DOI: 10.1094/ASBCJ-49-0043
- Loveridge, D., Ruddlesden, J.D., Quain, D.E., Noble, C.S., 1997: Improved fermentation consistency through early yeast cropping and short storage times. *Proc. Brew. Yeast Ferm. Perform. Cong.*, 1: 14.
- Maemura, H., Morimura, S., Kida, K., 1998: Effects of aeration during the cultivation of pitching yeast on its characteristics during the subsequent fermentation of wort. *J. Inst. Brew.*, 104: 207–211. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1998.tb00993.x
- Matoulková, D., Sigler, K., 2011: Impact of the long-term maintenance method of brewer's yeast on fermentation course, yeast vitality and beer characteristics. *J. Inst. Brew.*, 117(3): 383–388. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00483.x
- McCaig, R., Bendiak, D.S., 1985a: Yeast handling studies. I. Agitation of stored pitching yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 43: 114–118. DOI: 10.1094/ASBCJ-43-0114
- McCaig, R., Bendiak, D.S., 1985b: Yeast handling studies. II. Temperature of storage of pitching yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 43: 119–122. DOI: 10.1094/ASBCJ-43-0119
- Morrison, K.B., Suggett, A., 1983: Yeast handling, petite mutants, and lager flavour. *Proc. Eur. Brew. Conv.*, 19: 489–496.
- Murray, C.R., Barich, T., Taylor, D., 1984: The effect of yeast storage conditions on subsequent fermentations. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 21: 189–193.
- O'Connor-Cox, E., 1997: Improving yeast handling in the brewery, part 1: yeast cropping. *Brewers' Guardian*, December, 26–32.
- O'Connor-Cox, E., 1998a: Improving yeast handling in the brewery, part 2: yeast collection. *Brewers' Guardian*, February, 22–34.
- O'Connor-Cox, E., 1998b: Improving yeast handling in the brewery, part 3: yeast pitching and measurement of yeast quality. *Brewers' Guardian*, March, 20–25.
- O'Connor-Cox, E., Majara, M., Lodolo, E.J., Mochaba, F.M., Axcell, B.C., 1996: The use of yeast glycogen and trehalose contents as indicators for process optimisation. *Ferment*, 9: 321–328.
- Pickerell, A.T.W., Hwang, A., Axcell, B.C., 1991: Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 49: 87–92. DOI: 10.1094/ASBCJ-49-0087
- Powell, C.D., Quain, D.E., Smart, K.A., 2003: The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.*, 3: 149–157. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00002-3
- Powell, C.D., Quain, D.E., Smart, K.A., 2004: Impact of sedimentation on cone yeast heterogeneity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 62: 8–17. DOI: 10.1094/ASBCJ-62-0008
- Rhymes, M.R., Smart, K.A., 2001: Effect of storage conditions on the flocculation and cell wall characteristics of an ale brewing yeast strain. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 59: 32–38. DOI: 10.1094/ASBCJ-59-0032
- Rhymes, M.R., Smart, K.A., 1997: Yeast storage and flocculation performance. *Proc. Brew. Yeast Ferm. Perf. Cong.* 1: 21.
- Sall, C.J., Seipp, J.F., Pringle, A.T., 1988: Changes in brewer's yeast during storage and the effect of these changes on subsequent fermentation performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 46: 23–25. DOI: 10.1094/ASBCJ-46-0023
- Sigler, K., Matoulková, D., 2011: Stress responses in brewing yeast. *Kvasny Prum.*, 57 (7-8): 277–284. DOI: 10.18832/kp2011032
- Simpson, W.J., 1987: Synergism between hop resins and phosphoric acid and its relevance to acid washing yeast. *J. Inst. Brew.*, 93: 405–406.
- Simpson, W.J., Hammond, J.R.M., 1989: The response of brewing yeasts to acid washing. *J. Inst. Brew.*, 95: 347–354. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1989.tb04642.x
- Smart, K.A., Boulton, C.A., Hinchliffe, E., Molzahn, S., 1995: Effect of physiological stress on the surface properties of brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 53: 33–38. DOI: 10.1094/ASBCJ-53-0033
- Somani, A., Bealin-Kelly, F., Axcell, B., Smart, K.A., 2012: Impact of storage temperature on lager brewing yeast viability, glycogen, trehalose, and fatty acid content. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 70: 123–130. DOI: 10.1094/ASBCJ-2012-0427-01
- Stewart, G.G., 1996: Yeast performance and management. *Brewer*, 82: 211–215.
- Stoupis, T., Stewart, G.G., Stafford, R.A., 2002: Mechanical agitation and rheological considerations of ale yeast slurry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 60: 58–62. DOI: 10.1094/ASBCJ-60-0058
- Yancey, P.H., 2005: Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.*, 208: 2819–2830. DOI: 10.1242/jeb.01730