

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jure BIZJAK

**UPORABNOST RAZLIČNIH METOD
DOLOČANJA VITALNOSTI KVASOVK V
PIVOVARNI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jure BIZJAK

**UPORABNOST RAZLIČNIH METOD DOLOČANJA
VITALNOSTI KVASOVK V PIVOVARNI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**APPLICABILITY OF DIFFERENT METHODS FOR DEFINING
YEAST VITALITY IN A BREWERY**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju službe kakovosti Pivovarne Union D.D., Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Nežo Čadež in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

Mentorica: doc. dr. Neža Čadež
Recenzentka: doc. dr. Polona Zalar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jure Bizjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.123:582.282.33:579.22/.24(043)=163.6
KG	pivske kvasovke/ <i>Saccharomyces pastorianus</i> /vitalnost/živost/fermentacija/shranjevanje kvasovk/poraba diacetila/vitalna titracija/zmožnost zakisanja
AV	BIZJAK, Jure, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ČADEŽ, Neža (mentorica)/ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
TY	UPORABNOST RAZLIČNIH METOD DOLOČANJA VITALNOSTI KVASOVK V PIVOVARNI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 51 str., 15 pregl., 14 sl., 24 pril., 31 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pri procesu proizvodnje piva pivovarji uporabljajo starter kulturo kvasovke vrste <i>Saccharomyces pastorianus</i>. Kvasovke so med procesom fermentacije izpostavljene mnogim stresom, kar močno vpliva na njihovo vitalnost. V sodobnem pivovarstvu je zelo pomembno, da je končni proizvod konstantne kakovosti med različnimi šaržami, kar pa lahko dosežemo le z zagotavljanjem dobre vitalnosti kvasovk. Namen magistrskega dela je bil preveriti uporabnost različnih metod za določanje vitalnosti kvasovk v pivovarni. Preizkusili smo naslednje metode: test zmožnosti zakisanja, test zmožnosti porabe diacetila ter test vitalne titracije. Metode smo preizkusili na različno oslavljenih kvasovkah in na kvasovkah, ki smo jih shranjevali v dveh tehnološko različnih tankih za shranjevanje kvasa. Ugotovili smo, da so vse tri metode hitre in primerne za delo v rutinskem laboratoriju, pri čemer se je kot najprimernejša izkazala metoda določanja porabe diacetila, ker je najhitrejša ter najzanesljivejša. Pri preizkusu vseh treh metod na realnih vzorcih kvasa iz dveh tehnološko različnih tankov za shranjevanje kvasa smo ugotovili, da kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem ohranja vitalnost in živost dlje kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Ugotovili smo, da je kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem po 21-dnevem shranjevanju podobno vitalen kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem po desetih dneh.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 663.123:582.282.33:579.22/.24(043)=163.6

CX brewing yeasts/*Saccharomyces pastorianus*/vitality/viability/fermentation/yeast
storage/diacetyl reduction/vitaltitration/acidification power

AU BIZJAK, Jure

AA ČADEŽ, Neža (supervisor)/ZALAR, Polona (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2014

TY APPLICABILITY OF DIFFERENT METHODS FOR DEFINING YEAST VITALITY
IN A BREWERY

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XII, 51 p., 15 tab., 14 fig., 24 ann., 31 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Yeast species *Saccharomyces pastorianus* is used as a starter culture in the process of beer fermentation. In the modern brewery it is very important to maintain a consistent final product quality, which can only be achieved by high degree of pitching yeast vitality. The exposure of yeasts to numerous risk factors during the successive fermentations strongly influences their vitality. The aim of the master thesis was to test the applicability of different methods in order to determine yeast vitality in a brewery. The following methods were tested: the acidification power test, the vicinal diketone reduction test, and the vital titration test. These methods were tested on weakened, as well as on viable yeasts stored in two technologically different yeast tanks. The results showed that all three methods were fast and adequate for work in a routine brewery laboratory. The fastest and most reliable of them was the method of vicinal diketone reduction. The results of all three yeast vitality testing methods performed on two technologically different yeast tanks indicated that yeasts from the internal cooling tank system maintains vitality and viability longer than yeasts stored in tank with the external cooling system. The vitality of the yeast which was stored in the storage yeast tank with the internal cooling system for 21 days was similar to the yeast which was stored in the yeast storage tank with the external cooling system for 10 days.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PIVSKE KVASOVKE	3
2.1.1 Zgodovinski pregled pivovarstva in odkritja kvasovk	3
2.1.2 Proizvodnja piva	4
2.1.2.1 Slajenje	4
2.1.2.2 Varjenje sladice	4
2.1.2.3 Precejanje	4
2.1.2.4 Kuhanje	4
2.1.2.5 Sedimentacija	5
2.1.2.6 Fermentacija	5
2.1.2.7 Zorenje	5
2.1.2.8 Spremembe v pivu med fermentacijo in zorenjem	5
2.1.3 Pivske kvasovke in njihova zgradba	7
2.1.4 Metabolni procesi med alkoholno fermentacijo	8
2.2 VITALNOST NI ŽIVOST KVASOVK	8
2.2.1 Vitalnost kvasovk	8
2.2.1.1 Metode merjenja vitalnosti kvasovk, ki temeljijo na metabolni aktivnosti	9
2.2.1.2 Metode merjenja vitalnosti kvasovk, ki temeljijo na merjenju celičnih komponent	10
2.2.1.3 Metode, ki temeljita na merjenju fermentacijske sposobnosti	10
2.2.2 Živost kvasovk in metode merjenja živosti	11
2.3 VPLIV SHRANJEVANJA KVASOVK NA VITALNOST	11
2.3.1 Shranjevanje kvasa pred ponovno fermentacijo	11
2.3.2 Vpliv temperature med shranjevanjem kvasovk v tankih za shranjevanje kvasa	12
2.3.3 Vpliv trajanja shranjevanja kvasovk in vloga glikogena in trehaloze v celici	12
2.3.4 Vpliv etanola na celice kvasovk	12
2.3.5 Vpliv zaporedne uporabe kvasovk na vitalnost	13
2.3.6 Pomen ohranjanja vitalnosti kvasovk med zaporednimi uporabami	13
3 MATERIALI IN METODE	14

3.1.1	Mikroorganizmi	16
3.1.2	Mikrobiološka gojišča	16
3.1.2.1	Pivinski agar	16
3.1.3	Raztopine	16
3.1.3.1	Fiziološka raztopina	16
3.1.3.2	Etanol (8 %, 50 %)	16
3.1.3.3	Diacetil	16
3.1.3.4	NaOH	16
3.1.3.5	Glukoza	16
3.1.4	Laboratorijska oprema	17
3.1.5	Kemikalije	18
3.2	METODE	19
3.2.1	Priprava kvasne kulture	19
3.2.2	Vitalna titracija	20
3.2.3	Test zmožnosti porabe diacetila	21
3.2.4	Določitev skupnega števila kvasovk in odstotka mrtvih celic	22
4	REZULTATI	23
4.1	OVREDNOTENJE METOD ZA DOLOČANJE VITALNOSTI KVASOVK S STALIŠČA NATANČNOSTI	23
4.1.1	Test zmožnosti zakisanja	23
4.1.2	Test vitalne titracije	25
4.1.3	Test zmožnosti porabe diacetila	28
4.2	SPREMLJANJE PADCA VITALNOSTI KVASOVK IZ TANKOV ZA SHRANJEVANJE KVASA	31
4.2.1	Rezultati testa zmožnosti zakisanja iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem	31
4.2.2	Rezultati testa vitalne titracije kvasa iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem	35
4.2.3	Rezultati metode določanja porabe diacetila s plinsko kromatografijo kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	IZBIRA METODE ZA DOLOČANJE VITALNOSTI KVASOVK	42
5.1.1	Test zmožnosti zakisanja	42
5.1.2	Test vitalne titracije	43
5.1.3	Test zmožnosti porabe diacetila	43
5.2	DOLOČITEV TEMPERATURE IN ČASA ZA ODMRTJE KVASOVK	44
5.3	PREVERJANJE METABOLNE NEAKTIVNOSTI MRTVIH CELIC S TREMI METODAMI	44
5.4	SPREMLJANJE PADCA VITALNOSTI KVASOVK IZ TANKA ZA SHRANJEVANJE KVASA Z ZUNANJIM IN TANKA ZA SHRANJEVANJE KVASA Z NOTRANJIM HLAJENJEM	44
5.4.1	Test zmožnosti zakisanja	44
5.4.2	Test vitalne titracije	45
5.4.3	Test porabe diacetila	46
6	SKLEPI	47

7	POVZETEK	48
8	VIRI	49
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Sprememba imen pivske kvasovke (Annemüller in sod., 2011).	3
Preglednica 2:	Merjenje vitalnosti z različnimi metodami (povzeto po Heggart in sod., 2000).	10
Preglednica 3:	Merjenje živosti celic z različnimi metodami (povzeto po Heggart in sod., 2000).	11
Preglednica 4:	Uporabljena laboratorijska oprema.	17
Preglednica 5:	Ostali uporabljeni laboratorijski pripomočki.	17
Preglednica 6:	Test zmožnosti zakisanja kvasovk v različnih fizioloških stanjih. Rezultati so podani kot povprečja treh ponovitev.	24
Preglednica 7:	Rezultati testa vitalne titracije testa kvasovk v različnih fizioloških stanjih.	26
Preglednica 8:	Rezultati porabe diacetila kvasnih celic v različnih fizioloških stanjih, merjenje s plinskim kromatografom.	28
Preglednica 9:	Pretvorba diacetila mrtvih kvasovk.	30
Preglednica 10:	Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	31
Preglednica 11:	Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	32
Preglednica 12:	Rezultati testa vitalne titracije shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	35
Preglednica 13:	Rezultati testa vitalne titracije shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	36
Preglednica 14:	Rezultati testa zmožnosti porabe diacetila shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	39
Preglednica 15:	Rezultati testa zmožnosti porabe diacetila shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.	40

KAZALO SLIK

Slika 1:	Molekula diacetila (Kunze in sod., 2010).	6
Slika 2:	Metabolizem diacetila v kvasni celici (Yamauchi in sod., 1995).	6
Slika 3:	Shema pred-poskusa in izbire metode za določanje vitalnosti kvasovk	14
Slika 4:	Shema poskusa shranjevanja kvasovk v dveh tankih za shranjevanje kvasa in preverjanje vitalnosti	15
Slika 5:	Skica Carlsbergove posode in potek propagacije (Alfa Laval, 2014).	19
Slika 6:	Kinetika spremembe pH v odvisnosti od časa: sveži kvasa (živost >94 %), oslavljen kvas (živost >92,5 %) z 8 % etanolom, štiri ure pri sobni temperaturi in staran kvas (živost >89 %), 7 dni v destilirani vodi pri 8 °C določena s testom zmožnosti zakisanja. Za vsak vzorec so prikazane tri neodvisne ponovitve eksperimenta.	25
Slika 7:	Kinetika spremembe pH v odvisnosti od časa: sveži kvas (živost >94 %), oslavljen kvas (živost >92 %) z 8 % etanolom, štiri ure pri sobni temperaturi in staran kvas (živost >90 %), 7 dni v destilirani vodi pri 8 °C določena s testom vitalne titracije. Za vsak vzorec so prikazane tri neodvisne ponovitve eksperimenta.	27
Slika 8:	Gojišče pivinski agar po inkubaciji pri 30 °C, štiri dni. A: Kvasovke na gojišču pri temperaturi 60 °C, 20 min, B: Prazno gojišče pri temperaturi 80 °C, 20 min.	29
Slika 9:	Dinamika znižanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kontrolnih eksperimentov, določen s testom zmožnosti zakisanja in s testom vitalne titracije.	30
Slika 10:	Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom zmožnosti zakisanja in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.	33
Slika 11:	Dinamika znižanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kvasa 1., 7., 14. in 21. dan po fermentaciji: A: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, B: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določen s testom s testom zmožnosti zakisanja. Za vsak vzorec sta prikazani dve neodvisni ponovitvi eksperimenta.	34
Slika 12:	Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom vitalne titracije in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.	37
Slika 13:	Dinamika znižanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kvasa 1., 7., 14. in 21. dan po fermentaciji: A: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, B: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določen s testom s testom vitalne titracije. Za vsak vzorec sta prikazani dve neodvisni ponovitvi eksperimenta.	38
Slika 14:	Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom zmožnosti porabe diacetila in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.	41

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Test zmožnosti zakisanja kvasovk v različnih fizioloških stanjih.
- Priloga B: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih kvasovk pri testu zmožnosti zakisanja.
- Priloga C: Tabela rezultatov izbire metode testa zmožnosti zakisanja.
- Priloga D: Rezultati testa vitalne titracije testa kvasovk v različnih fizioloških stanjih
- Priloga E: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih kvasovk pri testu vitalne titracije
- Priloga F: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga G: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih celic pri testu zmožnosti zakisanja iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga H: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga I: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu zmožnosti zakisanja iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga J: Rezultati testa vitalne titracije shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga K: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu vitalne titracije iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga L: Rezultati testa vitalne titracije shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga M: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu vitalne titracije iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.
- Priloga N: Tabela z rezultati kontrole testa zmožnosti zakisanja.
- Priloga O: Tabela z rezultati kontrole testa vitalne titracije.
- Priloga P: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, prvi dan po fermentaciji.
- Priloga Q: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, sedmi dan po fermentaciji.
- Priloga R: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, 14. dan po fermentaciji.
- Priloga S: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, 21. dan po fermentaciji.
- Priloga T: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, prvi dan po fermentaciji.
- Priloga U: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, sedmi dan po fermentaciji.
- Priloga V: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, 14. dan po fermentaciji.
- Priloga W: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, 21. dan po fermentaciji.
- Priloga X: Titratore Mettler Toledo, s katerim smo izvajali test vitalne titracije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	Adenozin-5'-trifosfat
CCK	Cikel citronske kisline
CO ₂	Ogljikov dioksid
dH ₂ O	Destilirana voda
HGB	Fermentacija piva z visoko koncentrirano sladico (ang. high gravity brewing)
KMI	Kvasni metabolni indeks
KT	Tank za shranjevanje kvasa
NADH	Nikotin adenin dinukleotid
SD	Standardni odklon (ang. Standard Deviation)
ST	Sobna temperatura
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov
ZZ	Zmožnost zakisanja

SLOVARČEK

Alotetraploid	Organizem ima štiri kopije genoma, vendar od tega sta po dve kopiji iz različnih vrst organizmov
Encimatika	Veda, ki se ukvarja z biokemijo in aktivnostjo encimov
Fermentor	Posoda, kjer poteka biotehnološki proces alkoholnega vrenja kvasovk
Tank za shranjevanje kvasa	Posode za shranjevanje kvasovk med zaporednimi uporabami
Kvasovke spodnjega vrenja	Kvasovke se po končani fermentaciji posedejo na dno fermentacijske brozge
Kvasovke zgornjega vrenja	Kvasovke se po končani fermentaciji naplavijo na vrh fermentacijske brozge
Pivo Ale	Pivo, ki ga proizvedejo kvasovke zgornjega vrenja
Pivo Lager	Pivo, ki ga proizvedejo kvasovke spodnjega vrenja
Propagacija	Postopek namnožitve svežega kvasa v pivovarni
Viabilnost kvasovk	Živost kvasnih celic
Vitalnost kvasovk	Fiziološke sposobnosti kvasovk
Žetev kvasovk	Postopek odvzema kvasovk iz fermentacijske brozge po koncu fermentacije

1 UVOD

Pivo je tradicionalna pijača, ki so jo brez znanja o biotehnologiji ali encimatiki proizvajali že tisoče let nazaj. Pivovarstvo ima tako zelo dolgo tradicijo in je bilo že od nekdaj gonilna sila biotehnološkega razvoja (Linko in sod., 1998).

Osnovne sestavine piva so slad, hmelj, voda in kvasovke, proizvodnja piva pa poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji se med kaljenjem ječmena tvorijo encimi, potrebni za razgradnjo škroba do sladkorjev v drugi stopnji, v tretji stopnji pa sledi fermentacija teh sladkorjev do CO₂ in alkohola. Končna kakovost piva je odvisna od vsake surovine in stopnje proizvodnje posebej (Kunze in sod., 2010).

V zadnjih desetletjih so zahteve po kakovosti v pivovarstvu zelo narastle, predvsem v smislu biološke, koloidne in senzorične stabilnosti. Poleg tehnoloških prilagoditev je bilo potrebno optimizirati tudi ravnanje s kvasovkami v pivovarnah (Annemüller in sod., 2011). Kvasovka med fermentacijo namreč ne proizvaja le alkohola, ampak tudi druge snovi. Njen metabolizem tako zelo vpliva na končni okus in karakter piva. Sposobnost alkoholne fermentacije kvasovk je neposredno odvisna od aktivnosti kvasovke, ta pa je odvisna od živosti in fiziološkega stanja kvasovk. Da lahko nadzorujemo kvaliteto fermentacije, je potrebno spremljati vitalnost kvasovk pred fermentacijo, s tem pa se izognemo morebitnim težavam tako v proizvodnem procesu, kot tudi težavam s kvaliteto v končnem proizvodu (Bouix in Leveau, 2001).

V zadnjem času se je zaradi zavedanja o vlogi kvasovke med fermentacijo razvilo veliko nove tehnološke opreme za ravnanje s kvasom, razvile pa so se tudi nove metode za določanje vitalnosti kvasovk. Testi za določanje vitalnosti kvasovk so zasnovani tako, da opazujejo spremembe v aktivnosti in fiziološkem stanju kvasovk (Boulton in sod., 2001).

V našem delu smo opravili pregled metod za določanje vitalnosti kvasovk v literaturi in nato izmed njih izbrali tri, ki so uporabne pri rutinskem delu v pivovarni. Pri izbiri metod so bili glavna merila: hitrost in nezahtevnost izvedbe metode, ter cenovna dostopnost. Z izbranimi metodami smo nato preverili vitalnost kvasovk med shranjevanjem v dveh tehnološko različnih tankih za shranjevanje kvasa.

1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Cilj magistrskega dela je bil primerjati uporabnost treh metod določevanja vitalnosti kvasovk, primernih za rutinsko uporabo, kot so metoda merjenja porabe diacetila, metoda vitalne titracije, ter metoda zmožnosti zakisanja. Poleg tega smo želeli z izbranimi metodami tudi preveriti rezultate vitalnosti kvasovk iz dveh tehnološko različnih tankov za shranjevanje kvasa.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Uporabljene metode so med seboj primerljive, razlikujejo se po zahtevnosti in hitrosti izvedbe.
- Pri vzorcih kvasa z višjo živostjo bo tudi boljša vitalnost.
- Kvas iz tanka za shranjevanja kvasa z notranjim hlajenjem je po daljšem shranjevanju bolj vitalen kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PIVSKE KVASOVKE

2.1.1 Zgodovinski pregled pivovarstva in odkritja kvasovk

Prvi dokazi o obstoju fermentiranih pijač segajo 7000 let nazaj na Kitajsko. Kemijske analize posod iz vasi Jiahu v provinci Henan so potrdile, da so že takrat izdelovali fermentirano pijačo iz riža, medu in sadja (McGovern in sod., 2004). Pivo je bilo prvič omenjeno v junaško-mitološki pesnitvi Ep o Gilgamešu, 3000 let pred našim štetjem v Mezopotamiji, kjer je zapisano, da je Mezopotamski ekvivalent Noeta, Utnapisthim, med gradnjo svoje barke dal delavcem piti pivo (Toussaint-Samat, 1994).

V času pred odkritjem mikroskopa niso vedeli kako in zaradi česa poteka fermentacija. To so dognali veliko kasneje, ko je sin nizozemskega pivovarja Antonie van Leeuwenhoek leta 1680 izdelal prvi mikroskop. Pri pregledu fermentacijske brozge je opazil »zanimive majhne okrogle strukture«, kot jih je poimenoval v svoji knjigi. Teh malih kroglic še ni prepoznal kot žive celice, saj so bile negibljive in zelo podobne škrobnim granulam. Skoraj 200 let je minilo, preden je Louis Pasteur pod mikroskopom prvič videl celice kvasovk. Skozi nadaljnje eksperimente je tudi postavil tezo, da fermentacija ne more potekati brez mikroorganizmov. V 18. stoletju še niso znali izolirati čiste kulture kvasovk, zato so v pivino nacepljali mešano kulturo kvasovk. Leta 1883 je Christian Hansen uporabil prvo čisto kulturo kvasovk. Pri poskusih v dveh pivovarnah je uporabil samo en sev kvasovk in ugotovil, da je tovrstna inokulacija bolj učinkovita pri proizvodnji piva. Ugotovili so tudi, da so kvasovke rodu *Saccharomyces* sposobne najhitrejše fermentacije in da so najodpornejše na visoke koncentracije etanola. Pivo je danes, za vodo in čajem, tretja najpopularnejša pijača na svetu.

Z imenom *Saccharomyces cerevisiae* je kvasovko poimenoval J. Meyen (Preglednica 1), kar pomeni »sladkor ljubeča« kvasovka (Annemüller in sod., 2011).

Preglednica 1: Sprememba imen pivske kvasovke spodnjega vrenja (Annemüller in sod., 2011).

Avtor	Leto	Ime
Meyen	1836	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hansen	1908	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Kudrjawzew	1960	<i>Saccharomyces uvarum</i>
Lodder	1970	<i>Saccharomyces uvarum</i>
Barnett, Payne, Yarrow	1983	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pedersen	1988	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> / <i>pastorianus</i>

Danes v pivovarstvu delimo kvasovke v dve skupini, in sicer na kvasovke spodnjega vrenja ali lager oz. ležak kvasovke (*Saccharomyces pastorianus*) in na kvasovke zgornjega vrenja ali ale kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*).

Pivo tipa ale so proizvajali verjetno že več kot 6000 let nazaj. Pivo tipa ležak pa je precej mlajše, zanj je značilna nizka temperatura fermentacije (5 °C-14 °C). Verjetno so ga začeli variti na Bavarskem v srednjem veku (Dunn in Sherlock, 2008).

2.1.2 Proizvodnja piva

2.1.2.1 Slajenje

Slad, ki ga potrebujemo pri proizvodnji piva, proizvajajo v sladarni iz pivovarskega ječmena s postopkom imenovanim slajenje. Pivovarski ječmen namakajo v vodi, da začne kaliti. Ob kalitvi se tvorijo encimi, ki kalčku omogočajo pridobiti enostavnejše sladkorje iz škroba za rast.

Vsebnost vode v zrnju ječmena se giblje od 13-14 %, z namakanjem v vodi pa se vsebnost vode zviša na 42-48 %. Povišana vsebnost vode je pogoj za kaljenje. Tvorijo se kalčki in nastanejo koreninice. Začnejo se tudi izločati encimi za razgradnjo škroba in beljakovin, ki jih nato v kasnejših procesih izkoriščamo. Po petih dneh kaljenja zrna ječmena posušijo in kasneje odstranijo koreninice in kalčke. Med sušenjem se vsebnost vode v zrnju zniža na približno 5 %, s tem pa se tudi zavre delovanje encimov (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.2 Varjenje sladice

Slad v pivovarni zmeljejo in presujejo v drozgalno posodo, kjer pri temperaturi okrog 50 °C poteka razgradnja proteinov iz sladu do aminokislin s pomočjo proteinaz in peptidaz, in pa razgradnja β -glukanov s pomočjo β -glukanaz. Proteinaze so naravno prisotne v sladu, β -glukanazo pa dodajajo. Beta-glukani so polisaharidi, ki so prisotni v celičnih stenah in v endospermu ječmena, vezani so z visokomolekularnimi proteinskimi snovmi in pentoznimi verigami. Če ostanejo nerazgrajeni, povečujejo viskoznost in povzročajo težave pri filtraciji, ker se med seboj povezujejo v gel formacije. Endo- β -glukanaza cepi vezi ter neraztopljene visokomolekularne β -glukane pretvori v nizkomolekularne β -glukane in glukozo. Med drozganjem poteka tudi razgradnja lipidov s pomočjo lipaz. Med drozganjem se torej netopne snovi pretvorijo v topne, saj lahko samo topne vstopijo v pivino. Vse snovi, ki so v raztopini, imenujemo ekstrakt (sladkorji, proteini, dekstrini, anorganske substance). Netopne snovi (visokomolekularni proteini, celuloza, del škroba) ostanejo v filtrni pogači med precejanjem (Kunze in sod., 2010). Sledi proces, pri katerem v drozgalno posodo dodajajo segreto brozgo neslajenih žit. Drozgo segrejejo na 64 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje β -amilaze. Drozgo nato segrejejo na 72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje α -amilaz. Na koncu iz škroba dobijo fermentabilne sladkorje, kot so maltoza, maltotrioza, saharoza, glukoza in fruktoza (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.3 Precejanje

Sledi precejanje, kjer poteka ločevanje trdnih delcev od tekočine: ločujemo sladico od tropin. Tropine skupaj z oborinami ustvarijo filtrno pogačo, skozi katero cedimo sladico. Tako dobimo sladico, ki ima višji ekstrakt, kot končno pivo. Ko sladico precedimo skozi filtrno pogačo, ostane še kar nekaj ekstrakta. Filtrno pogačo zato speremo z vročo vodo, da se izloči še preostali ekstrakt (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.4 Kuhanje

Segreto pivino prečrpajo v kuhalno posodo, kjer se sladica sterilizira, izločijo se visokomolekularne beljakovine in dimetil sulfid. Na tej stopnji denaturirajo vsi encimi. Vroči sladici nato dodajo hmelj. Med kuhanjem se iz hmelja izločijo aromatske spojine, grenčice, hmeljna olja in hmeljni polifenoli. Alfa kisline iz hmelja so popolnoma netopne v hladni sladici. Pri visoki temperaturi α -kisline izomerizirajo (izomerizacija je približno 30

%), izomerizirane α -kislina pa so precej bolj topne. Če ne bi potekla izomerizacija, bi lahko hmelj povzročal tudi motnost piva (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.5 Sedimentacija

Produkt kuhanja je pivina. To pivino nato prečrpajo v sedimentacijsko posodo, ki je horizontalna cilindrična posoda z ravnim dnom, v katero se z veliko hitrostjo tangencialno črpa pivino. Zaradi centripetalne sile se na sredini posode zbere usedlina, ki sestoji iz med kuhanjem oborjenih proteinov in ostankov hmelja (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.6 Fermentacija

Ohlajeno in zračeno pivino nato prečrpajo v fermentor. V fermentor dodajo tudi kvas (14×10^6 celic/mL). Kvasovke zaradi aerobnih razmer začnejo hitro rasti, po 16-20 urah porabijo ves kisik in začno fermentirati. Med fermentacijo kvasovke s svojimi encimi pretvorijo fermentabilne sladkorje iz pивine v CO_2 in etanol. Nastanejo tudi stranski produkti fermentacije kot so diacetil, višji alkoholi, estri in žveplove spojine. Če je na začetku fermentacije koncentracije glukoze visoka, potem pride do t.i. Crabtree efekta. Zgodi se, da kljub oksidativnim pogojem poteka razgradnja glukoze s pomočjo fermentacije, saj so respiratorni geni inhibirani, respiratorni encimi pa inaktivirani z glukozo (De Deken, 1966).

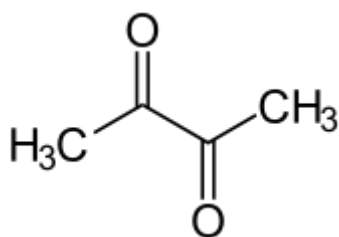
V času fermentacije temperatura v enem do dveh dni naraste na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. To je optimalna temperatura za fermentacijo, saj pri višji temperaturi nastane več estrov in višjih alkoholov. Kvasovke se ob koncu fermentacije (ko zmanjka hrane) povežejo v skupke in začnejo flokulirati na dno fermentorja. Med samo fermentacijo pade vsebnost ekstrakta, vsebnost diacetila pa se po začetnem zvišanju na koncu zniža. Na koncu fermentacije nastane tako približno dvakratna količina dodanega kvasa, ki ga odvezamo in shranimo v tankih za shranjevanje kvasa, kjer počaka na nadaljnjo uporabo. Isti kvas se uporabi približno šestkrat, nato se ga zavrže (Kunze in sod., 2010).

2.1.2.7 Zorenje

Sledi zorenje piva, kjer se posede še del preostalega kvasa, odstranijo se tudi nekateri sekundarni metaboliti fermentacije, pivo se na ta način t.i. stabilizira. Ob koncu zorenja je v mililitru piva 1-2 milijona kvasnih celic (Kunze in sod., 2010).

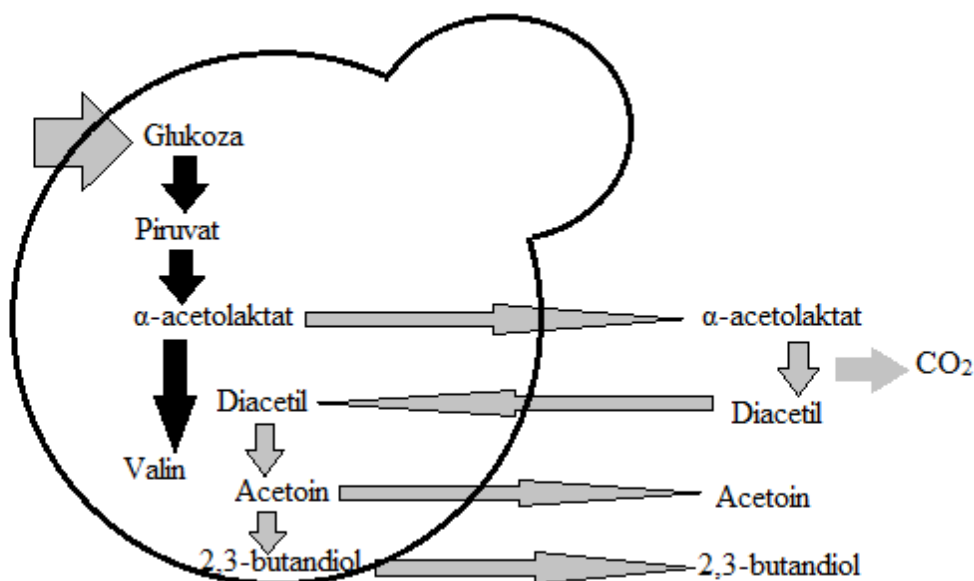
2.1.2.8 Spremembe v pivu med fermentacijo in zorenjem

Ko kvasovke inokuliramo v pivino, se začne lag faza, nato sledi faza eksponentne rasti. Med obema fazama kvasovka sintetizira aminokislina, proteine in druge celične komponente. Ena od aminokislin, ki jih kvasovka sintetizira, je tudi valin. Vmesni produkt sinteze valina je tudi acetolaktat, vendar se ves acetolaktat ne porabi za sintezo valina, saj ga gre nekaj iz celice v pivo, kjer se z oksidacijo pretovori v diacetil. Diacetil je majhna organska molekula, ki sodi v kemijsko skupino ketonov (Slika 1).



Slika 1: Molekula diacetila (Kunze in sod., 2010).

Kvasovka nato vstopi v stacionarno fazo, med katero se v pivu vzpostavi pravilno razmerje okusov. Kvasovka lahko med zorenjem piva encimsko razgradi prej tvorjen diacetil. Kvasovka diacetil najprej reabsorbira v celico, kjer ga nato z encimom diacetil reduktazo pretvori najprej v acetoin, z alkoholno dehidrogenazo pa v 2,3-butandiol. Acetoin in 2,3-butandiol lahko izstopita iz celice nazaj v pivo, kjer pa ne povzročata neprijetnih vonjav (Slika 2) (Yamauchi in sod., 1995). Diacetil je stranski produkt metabolizma kvasovk, ki daje pivu neprijeten vonj in maslen okus. Zato je zmanjšanje koncentracije diacetila pod stopnjo zaznave za človeška čutila (0,1 $\mu\text{L/L}$) eden od glavnih razlogov za zorenje piva (Kobayashi in sod., 2005).



Slika 2: Metabolizem diacetila v kvasni celici (Yamauchi in sod., 1995).

Med fermentacijo se tvorijo tudi aldehidi, med katerimi je najpomembnejši acetaldehid, ki je normalen vmesni produkt med alkoholno fermentacijo. Nastajajo tudi višji alkoholi, ki se tvorijo ob pretvorbi aminokislin v višje alkohole z deaminacijo, redukcijo in karboksilacijo. Večina, 80 %, jih torej nastane med primarno fermentacijo.

Nastanek višjih alkoholov preprečimo z nižjo temperaturo fermentacije, znižano vsebnostjo aminokislin v pivini ter z intenzivnim zračenjem med inokulacijo kvasovk.

Estri so najpomembnejši aromati v pivu. Tvorijo se med fermentacijo z esterifikacijo maščobnih kislin, na njihov nastanek pa vpliva veliko dejavnikov, kot so temperatura in dolžina fermentacije, količine kvasa (št. celic/mL), ... Prav tako se pojavijo žveplove spojine, kot so H₂S in merkaptani, ki imajo pomembno vlogo pri okusu piva zaradi svoje aromatičnosti. Nastanejo med fermentacijo iz aminokislin, ki vsebujejo žveplo. Iz aminokislin pivine nastajajo tudi organske kisline. Kvasovke odstranijo amino skupino in jo vgradijo v celico, organske kisline pa se sprostijo v okolje. Med fermentacijo potečejo tudi druge spremembe: kvasovke izločajo metabolite, ki znižajo pH, spremeni se redoks potencial, spremeni se barva piva, precipitirajo grenčice in polifenoli, poviša se koncentracija CO₂.

Kvasovke lahko izločajo različne snovi, ki pomembno vplivajo na polnost okusa. Take snovi so določene aminokisline in peptidi, vitamini, fosfati, glikoproteini in encimi. To je pomemben proces pri zorenju piva. Če kvasovk ne odvzamemo pravočasno, lahko pride do avtolize celic in s tem poslabšanja okusa, povišanja pH, zmanjšanja biološke stabilnosti piva in povišanih stopenj diacetila (Kunze in sod., 2010).

2.1.3 Pivske kvasovke in njihova zgradba

Kvasovke spodnjega vrenja in kvasovke zgornjega vrenja se razlikujejo genetsko in fiziološko, kar verjetno izhaja iz prilagoditve na selekcijski pritisk zaradi nizke temperature, pri kateri fermentira kvasovka spodnjega vrenja. Pri kvasovkah spodnjega vrenja se kvas po koncu fermentacije usede na dno fermentacijske posode, pri kvasovkah tipa zgornjega vrenja pa se kvasovke zberejo na vrhu fermentacijske posode (Dunn in Sherlock, 2008). Kvasovke zgornjega vrenja se od kvasovk spodnjega vrenja razlikujejo tudi po tem, da so večinoma diploidni mikroorganizmi, kvasovke spodnjega vrenja pa so delen alotetraploid, kar pomeni, da imajo po eno kopijo kromosoma od dveh vrst kvasovk. Deseti in enajsti kromosom sta pri kvasovkah spodnjega vrenja prisotna v štirih kopijah, ker je njihov genom sestavljen iz po dveh kromosomov svojih prednikov (Nakao in sod., 2009). Domnevajo, da dve kopiji kromosoma izvirata iz kvasovke zgornjega vrenja *Saccharomyces cerevisiae*, drugi dve kopiji pa izvirata iz kvasovke *Saccharomyces eubayanus*, ki je divja kvasovka, ki so jo našli v Patagoniji v Argentini. Prav ta divja kvasovka, naj bi kvasovski spodnjega vrenja dala sposobnost preživetja in fermentacije pri nižjih temperaturah (Libkind in sod., 2011).

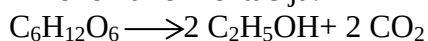
Kvasovka je enocelični mikroorganizem, ki si lahko energijo zagotovi na dva načina, in sicer, z respiratornim in fermentativnim metabolizmom. Kvasovke so ovalne oblike, dolžine 8 do 10 µm, ter širine 5 do 7 nm. Kvasovko sestavlja približno v 75 % voda. Suha snov pa sestoji iz beljakovin (45 do 60 %), ogljikovih hidratov (26 do 35 %), maščob (4-7 %) in mineralov (6 do 9 %) (Kunze in sod., 2010).

Vsaka kvasna celica ima celično plazmo (citoplazma in citosol), ki jo obdaja celična membrana. V citoplazmi se nahajajo celični organeli. Citoplazma predstavlja več kot 50 % volumna celice. Najpomembnejši organel je celično jedro, ki je obdano z dvojno jedrno membrano. Jedro vsebuje kromosome, na katerih je kodiran genetski zapis. Kvasovka vsebuje tudi mitohondrije, ki so »tovarna energije« v celici, saj na njih poteka respiracija.

V mitohondrijih poteka pretvorba piruvatov v CO₂ in vodo, ob tem pa se sprošča energija v obliki adenozin trifosfata (ATP). Endoplazmatski retikulum je pomemben zaradi sinteze beljakovin in lipidov. Obstajata gladki in zrnati endoplazmatski retikulum. Na gladkem endoplazmatskem retikulumu poteka razstrupljanje celice in sinteza lipidov za gradnjo celične membrane, na zrnatem endoplazmatskem retikulumu pa so pripeti ribosomi, na katerih poteka sinteza beljakovin. Te beljakovine se transportirajo v Golgijev aparat, ki pa ima nalogo razvrščati, modificirati in pakirati končne produkte biosinteze. V lizosomih poteka razgradnja proteinov in drugih makromolekul. Celična membrana je v glavnem sestavljena iz fosfolipidov, ki so v značilni dvoplastni strukturi in je zelo pomembna za delovanje celice. Celična membrana je prepustna le za vodo in v vodi raztopljene pline, ostale snovi, kot so sladkorji, aminokisline, minerali, pa morajo v celico priti skozi številne kanalčke v celični membrani. Ti kanalčki so izredno selektivni in prepuščajo le določene snovi. Celična membrana je obdana s približno 70 nm debelo strukturo imenovano celična stena. Ta je pri kvasovkah sestavljena iz 55-65 % glukana, 35-40 % manana, 9 % je lipidov in 2 % hitina. Celična stena ima vlogo zaščite celice (Annemüller in sod., 2011).

2.1.4 Metabolni procesi med alkoholno fermentacijo

Alkoholna fermentacija:



Razgradnja glukoze v alkohol je zaporedje več reakcij, pri katerih imajo glavno vlogo encimi citoplazme. Pri kvasovkah poteka razgradnja sladkorjev do piruvata po Embden–Mayerhof-Parnasovi poti. Piruvat se pri alkoholni fermentaciji razgradi do CO₂ in alkohola. Alkohol, ki pri tem nastane vsebuje še veliko energije, zato je energijski izplen fermentacije 2 ATP molekuli, veliko manjši kot energijski izplen iz respiracije - 36 ATP. Med alkoholno fermentacijo nastane tudi veliko število stranskih produktov fermentacije, ki imajo vlogo pri končnem okusu in vonju piva. Glavni stranski produkti so: diacetil, višji alkoholi, estri, aldehidi in žveplove spojine (Kunze in sod., 2010).

2.2 VITALNOST NI ŽIVOST KVASOVK

2.2.1 Vitalnost kvasovk

Hitrost poteka fermentacije je neposredno odvisna od metabolne aktivnosti oziroma vitalnosti kvasovk. S pojmom vitalnost kvasovk opisujemo fiziološko stanje kvasne celice. Vitalnost je neposredno odvisna od zaloga glikogena v celici, vsebnosti ATP in odpornosti celice na stres (Annemüller in sod., 2011).

V sodobnem pivovarstvu je zelo pomembno, da je končni proizvod konstantne kakovosti med različnimi šaržami, kar lahko dosežemo le, če so kvasovke vitalne. Vitalnost kvasovk vpliva na količine organskih kislin, estrov, višjih alkoholov, aldehidov in diacetila, ter s tem na organoleptične lastnosti v končnem pivu. Prav zaradi tega je zelo pomembno, da so kvasovke, ki jih uporabljamo za fermentacijo, vitalne. Na vitalnost in živost kvasovk vpliva več stvari, kot so: temperatura, zračenje s kisikom, genetika kvasovk, starost kvasne celice in koncentracija celic ob začetku fermentacije (Heggart in sod., 2000).

V Preglednici 2 in v spodnjem tekstu so opisane različne metode merjenja vitalnosti kvasovk z različnimi metodami.

2.2.1.1 Metode merjenja vitalnosti kvasovk, ki temeljijo na metabolni aktivnosti

Vitalno barvanje: vitalne kvasovke lahko tetrazolijeve soli reducirajo v netopen formazan. Formazan se obarva modro ali rumeno in ga lahko zaznamo s svetlobno mikroskopijo. Metoda ni popolnoma zanesljiva, nam pa lahko oriše približno stanje vitalnosti celic v vzorcu. Uporabljajo se lahko tudi različna fluorescentna barvila, ki se vežejo na določeno celično komponento (na primer protein) in se nato opazuje njihovo razporeditev po celici (Heggart in sod., 2000).

Mikrokolorimetrija: merimo toploto, ki jo proizvedejo žive celice pri rasti in metabolizmu. Metoda kaže visoko stopnjo povezanosti med proizvedeno toploto in metabolizmom (Heggart in sod., 2000).

Poraba vicinalnih diketonov: kvasovke so sposobne reducirati diacetil. Porabo diacetila lahko spremljamo spektrofotometrično, pri čemer velja, da bolj vitalne kvasovke porabijo več diacetila iz mešanice. Heggart in sodelavci (2000) so centrifugirali mešanico kvasovk in diacetila, ter nato supernatantu dodali 0,5 mL α -naftola in 0,25 mL kreatina. Po desetih minutah inkubacije so nato merili absorbanco pri 540 nm, ter posredno preračunali količine porabljenega diacetila (Heggart in sod., 2000).

Sproščanje magnezijevih ionov: če kvasovke nacepimo v gojišče z glukozo, kvasovke hitro sprostijo nizko-molekularne snovi, kot so magnezij, fosfatne ione in kalij. To se zgodi zaradi spremembe prepustnosti celične membrane, ker se celica pripravlja na drugačne pogoje sprejema sladkorjev v celico (Heggart in sod., 2000).

Mochaba in sodelavci (1997) so opisali hiter test, kjer bolj vitalne celice sprostijo več magnezijevih ionov kot manj vitalne celice. Hornsey (2013) pa je opisal komercialen testni kit (MRT, Magnesium Release Test, Sigma-Aldrich), kjer lahko kolorimetrično merimo sproščanje magnezijevih ionov v gojišče.

Specifičen prevzem kisika: kvasovke pri metodi nacepimo v gojišče, preprihano s kisikom. Nato odstranimo vir kisika in opazujemo stopnjo porabe kisika. Porabo kisika nato delimo s suho maso celic. Izkaže se, da poraba kisika sovпада z vitalnostjo celic (Heggart in sod., 2000).

Test zmožnosti zakisanja: kvasovke zaradi delovanja metabolizma izločajo CO₂ in H⁺ ione v okolje. Če spremljamo znižanje vrednosti pH suspenzije kvasovk v določenem časovnem obdobju, lahko sklepamo na zaloge glikogena, ki ga kvasovka ima v celici. Po določenem času se ves glikogen porabi in kvasovka potrebuje zunanji vir ogljika, ki je pri testu glukoza. Kvasovka nato porablja to glukozo in pH suspenzije se še bolj zniža. Zmožnost zakisanja suspenzije s strani kvasovk lahko uporabimo kot metodo merjenja vitalnosti te kvasovke (Sigler in sod., 2006).

Test vitalne titracije: test temelji na istem principu kot test zmožnosti zakisanja, le da pri tem testu kvasni suspenziji dvignemo pH na 10 z bazično raztopino, in nato merimo čas, v katerem pH pade na 6.5. Iz časa in količine dodane bazične raztopine lahko sklepamo, kako vitalne so kvasovke v suspenziji, saj bolj vitalne kvasovke hitreje znižajo pH (Gonçalves Rodrigues in sod., 2004).

Merjenje znotrajceličnega pH: znotrajcelični pH in protonske črpalke so zelo pomembne pri rasti celic in glikolizi. ATP-aza v plazemski membrani regulira znotrajcelični pH z regulacijo transmembranskega protonskega gradienta in tako omogoča enostavnim sladkorjem in aminokislinam prehod skozi membrane. Od znotrajceličnega pH je odvisno tudi delovanje nekaterih pomembnih encimov med glikolizo in glukoneogenezo. Imai in Ohno (1995) sta razvila metodo za merjenje znotrajceličnega pH, kjer z uporabo na pH občutljivega fluorescentnega barvila in spektrofotometrom lahko izmerimo vrednost znotrajceličnega pH.

2.2.1.2 Metode merjenja vitalnosti kvasovk, ki temeljijo na merjenju celičnih komponent

Merjenje NADH: količine fluorofora NADH lahko določimo s spektrofotometrom, z merjenjem fluorescence pri 460 nm (vzbujevalna svetloba pri 366 nm). Koncentracije NADH se pri celicah v različnih metabolnih in fizioloških stanjih spreminjajo (Heggart in sod., 2000).

Glikogen in trehaloza: Koncentracije se pri celici v različnih fizioloških stanjih spreminjajo. Količine glikogena v celici lahko merimo spektrofotometrično z NIR spektrofotometrijo (NIR, near infra-red spectrofotometry), z barvanjem z jodom ali encimatsko (Heggart in sod., 2000).

2.2.1.3 Metodi, ki temeljita na merjenju fermentacijske sposobnosti

Produkcija CO₂: ogljikov dioksid je neposreden produkt fermentacije. Posredno ga lahko merimo z Warburgovim manometrom, kjer merimo naraščanje tlaka med fermentacijo zaradi nastanka CO₂ (Heggart in sod., 2000).

Test hitrosti porabe substrata: fermentacijsko sposobnost lahko merimo v pilotnem fermentorju, kjer fermentacija poteka pod točno določenimi pogoji. V laboratorijih se pogosto izvaja test, kjer se točno določena količina kvasa zmeša s pivino, ter se nato ob koncu testa izmeri s padec ekstrakta. Iz tega lahko neposredno sklepamo, kako vitalen kvas smo uporabili pri testu (Heggart in sod., 2000).

Preglednica 2: Merjenje vitalnosti z različnimi metodami (povzeto po Heggart in sod., 2000).

Metoda temelji na:	Primeri:
Metabolni aktivnosti	• Vitalno barvanje • Mikrokalorimetrija • Poraba vicinalnih diketonov • Proteazna aktivnost • Sproščanje magnezijevih ionov • Specifičen prevzem kisika • Test zmožnosti zakisanja • Merjenje znotrajceličnega pH
Merjenju celičnih komponent	• Merjenje količin NADH
Fermentacijski sposobnosti	• Merjenje količin nastalega CO₂ • Test kratke fermentacije

2.2.2 Živost kvasovk in metode merjenja živosti

S pojmom živost označujemo odstotek živih celic v vzorcu (Annemüller in sod., 2011). Po vsaki končani fermentaciji je odstotek mrtvih celic od 1 % do 3 %, včasih lahko tudi do 20 % mrtvih celic. Če odstotek naraste nad 20 %, to lahko povzroči počasnejši potek fermentacije in vpliva na spremenjen aromatski profil končnega proizvoda-piva (Kunze in sod., 2010).

Živost lahko merimo s preprostim testom barvanja z metilenskim barvilom, kjer z 0,01 % metilenskega barvila obarvamo kvasovke. Nato pod mikroskopom preštejemo modro obarvane kvasovke, v katere je zaradi poškodovane celične membrane vdrla modrilo. Evropska pivovarska konvencija (European Brewing convention, EBC) priporoča gojenje kvasovk na objektu stekelcu, kjer se po inkubaciji prešteje število mikro-kolonij, kjer so več kot tri kvasne celice. Mikrokolonije, kjer je zrastle samo ena ali dve celici štejemo kot nežive. Lahko pa uporabimo druge, novejša tehnika štetja kvasovk (Preglednica 3), kjer fluorescentna barvila vstopijo skozi celično membrano in jih nato žive celice kemijsko spremenijo tako, da začnejo fluorescirati. Ali pa je stopnja fluorescence barvila odvisna od transmembranskega elektrokemijskega potenciala. Obstajajo tudi metode, ki zaznavajo celične komponente, kot je ATP (adenozin trifosfat) in temelji na bioluminiscenci, saj je pri neživih kvasovkah veliko manjša koncentracija ATP kot v živih kvasovkah. Lahko merimo tudi koncentracije NADH (nikotinamid dinukleotid) in sicer s fluorescenco pri 460 nm (Heggart in sod., 2000).

Preglednica 3: Merjenje živosti celic z različnimi metodami (povzeto po Heggart in sod., 2000).

Metoda temelji na:	Primeri:
Podvojevanju celic	• Standardna gojitvena tehnika • Gojenje na objektu stekelcu in mikroskopsko šteje mikro-kolonij
Barvanju	• Fluorescentna barvanja • Barvanje z metilenskim barvilom
Merjenju celičnih komponent	• Merjenje količin ATP • Merjenje količin NADH

2.3 VPLIV SHRANJEVANJA KVASOVK NA VITALNOST

2.3.1 Shranjevanje kvasa pred ponovno fermentacijo

Ko je fermentacija končana, je potrebno kvasovke do naslednje fermentacije shraniti. Shranjujemo jih lahko le nekaj ur ali pa celo več tednov. Kvasovka med shranjevanjem izgublja fermentacijske sposobnosti, zato mora biti čas shranjevanja čim krajši. Temperatura shranjevanja kvasovk do naslednje fermentacije mora biti 1-4 °C, da se metabolizem v celicah skoraj popolnoma ustavi. Če je temperatura prenizka (pod 0 °C), se lahko v celicah pojavijo ledeni kristali in povzročijo poškodbe celic. Zelo pomembno je tudi, da se kvasovke med shranjevanjem stalno meša, da temperatura v sredici preveč ne naraste (Annemüller in sod., 2011).

2.3.2 Vpliv temperature med shranjevanjem kvasovk v tankih za shranjevanje kvasa

Membrana kvasovke je med fermentacijo izpostavljena stresnim situacijam kot sta oksidativni stres in stradanje, kvasovka pa je izpostavljena tudi visokim koncentracijam alkohola in temperaturnim nihanjem. Ta stres je vzrok kasnejšim težavam pri naslednji fermentaciji, kot so: počasnejša rast kvasovk, poškodbe celične membrane, zmanjšanje metabolne aktivnosti in izguba transmembranskega potenciala, kar vse vodi v zmanjšano vitalnost kvasne celice (Annemüller in sod., 2011).

2.3.3 Vpliv trajanja shranjevanja kvasovk in vloga glikogena in trehaloze v celici

Celice med shranjevanjem vsebujejo glikogen, ki predstavlja rezervno zalogo energije v celici. Glikogen je polimer α -D-glukoze in predstavlja znotrajcelično rezervo ogljikovih hidratov pri kvasovkah. Glikogen se asimilira med zadnjo fazo aktivne fermentacije, ko je v pivini na voljo veliko sladkorjev, primanjkuje pa ostalih hranil. Kot znotrajcelična zaloga energije je pomemben pri sintezi sterolov in nenasičenih maščobnih kislin na začetku fermentacije piva, ko je v pivini prisoten še kisik. Glikogen je pomemben tudi po »žetvi« kvasovk in shranjevanju do naslednje fermentacije, saj takrat predstavlja edino zalogo energije za kvasovko. Zelo je pomembno, da se fermentacija prekine takoj po tem, ko zmanjka sladkorjev v pivini, saj bi v nasprotnem primeru kvasovka porabila ves glikogen iz svoje celice, ter tako ne bi bila sposobna preživeti stradanja med shranjevanjem do naslednje fermentacije. Količina glikogena v celici tako posredno kaže, kakšna je vitalnost kvasovke (Bolat, 2008).

Rotar in Stoicescu (2006) sta pokazali, da že po šestih dneh shranjevanja kvasovk pri 5 °C, zaradi stradanja, raven glikogena v celici pade na četrtino količine ob začetku shranjevanja. Pri temperaturi shranjevanja 1 °C upade koncentracija glikogena počasneje in šesti dan dosega polovico začetne koncentracije.

Trehaloza je pomemben disaharid, ki nastopa pri kvasni celici v vlogi zaščite pred stresom. Trehaloza se lahko akumulira v plazemski membrani in je lahko tudi vir ogljika, v času stradanja celice. Akumulira se, ko je kvasovka pod etanolnim stresom, temperaturnim šokom, ko je dolgo izpostavljena toksičnim kemikalijam, ozmotskem stresu in mnogim drugim stresnim dejavnikom. Ker je akumulacija trehaloze povezana s stresnimi dejavniki je količina trehaloze v celici pomemben pokazatelj fiziološkega stanja celice (Jenkins in sod., 2003). Guldfelt in Arneborg (1998) sta pokazala, da kvasovke s povišanimi koncentracijami trehaloze in glikogena v celici počasneje uporabljajo sladkorje iz pivine, saj najprej porabijo notranje zaloge energije. Tako se v pivu povečajo koncentracije višjih alkoholov, kot sta izoamil alkohol in izobutanol.

2.3.4 Vpliv etanola na celice kvasovk

Kvasovke so sicer prilagojene na nižje koncentracije etanola, vendar v višjih koncentracijah etanol lahko poškoduje celično membrano. Pri fermentaciji piva z visoko koncentrirano sladico (HGB, High gravity brewing) koncentracije alkohola dosežejo od 7-14 volumskih odstotkov alkohola. Zaradi povišanih koncentracij etanola se poveča priliv protonov v celico, ker se poveča prepustnost celične membrane. Celica se odzove z akumulacijo nenasičenih maščobnih kislin, spremenjeno razmerje med nenasičenimi maščobnimi kislinami in nasičenimi maščobni kislinami v celični membrani vodi v večjo

fluidnost celične membrane (Rotar in Stoicescu, 2006). Povišane koncentracije etanola vplivajo na kvasovke po deveti zaporedni uporabi bolj, kot na kvasovke po četrti zaporedni uporabi. To kaže na to, da etanol res vpliva na celično membrano, saj je pri kvasovkah takoj po propagaciji ta najbolj stabilna. Povišane koncentracije etanola vplivajo tudi na zmanjšano aktivnost membranske ATP-aze, ki tako težje črpa protone iz celice. Pri izpostavitvi kvasovk 8 % etanolu se izkaže, da že po dveh urah izpostavljenosti vitalnost pade za več kot 50 odstotkov, kar kaže na to, da etanol res vpliva na funkcionalnost celične membrane (Rotar in Stoicescu, 2006).

2.3.5 Vpliv zaporedne uporabe kvasovk na vitalnost

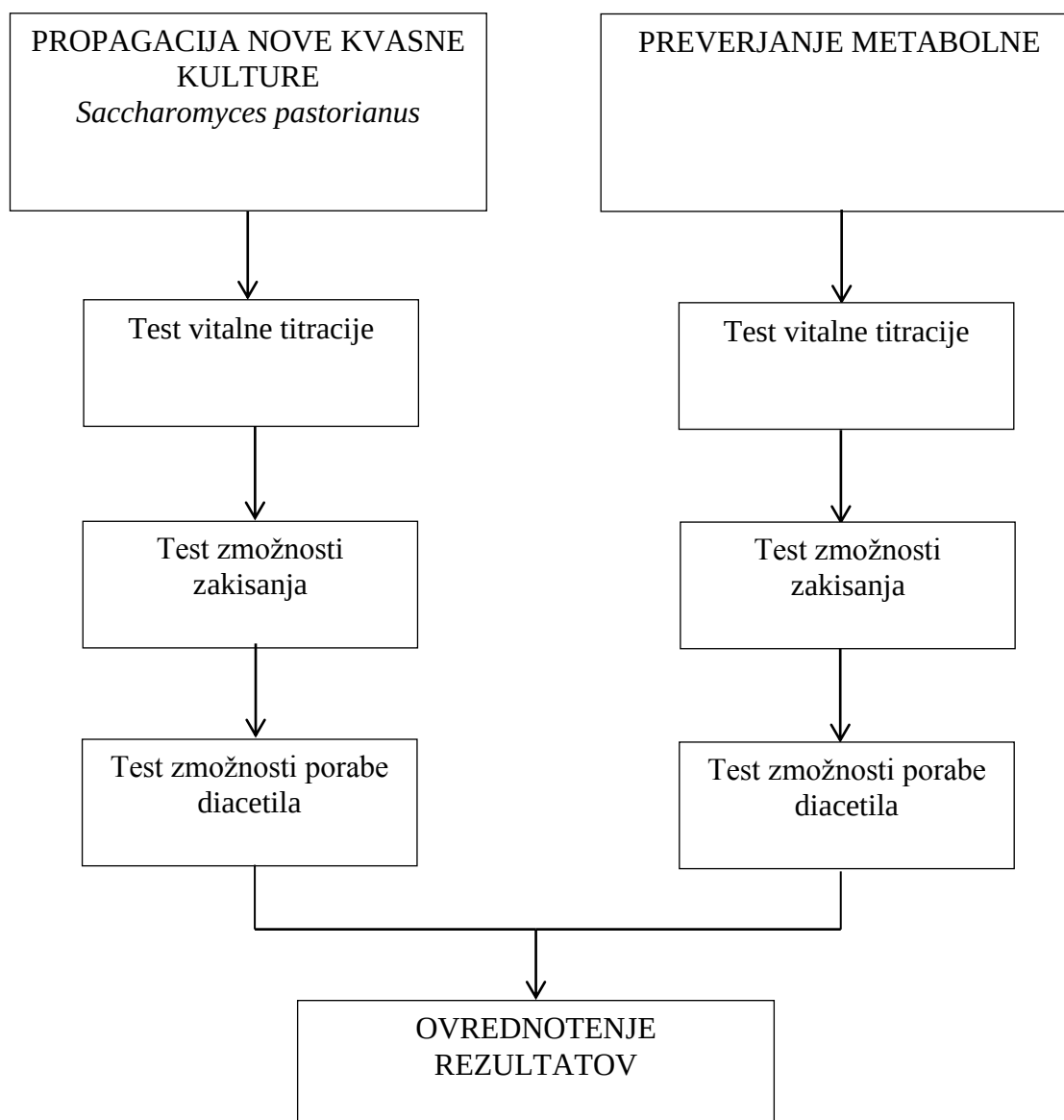
Koncentracija glikogena je višja v celicah po četrti zaporedni uporabi kvasovk kot pri kvasovkah takoj po propagaciji. Koncentracija glikogena pri kvasovkah po deveti zaporedni uporabi kvasovk pa je nižja, kot pri kvasovkah po četrti zaporedni uporabi in pri kvasovkah po propagaciji. To nakazuje, da se vitalnost znižuje zaradi staranja celic med zaporednimi uporabami. Višje koncentracije znotrajceličnih zalog glikogena pri kvasovkah po četrti zaporedni uporabi, kot pri kvasovkah po propagaciji bi lahko pomenile, da so kvasovke po četrti zaporedni uporabi že adaptirane na pogoje v fermentorju (Rotar in Stoicescu, 2006). Kvasovke z vsako zaporedno uporabo izgubljajo vitalnost in živost. To je posledica mnogih stresnih dejavnikov, kot so temperatura, ozmotski stres, povišan pritisk, oksidativni stres, nihanja pH, visoke koncentracije etanola, hidrostatski stres, pomanjkanje hranil ... Ti dejavniki stresa akumulirajo reverzibilne in ireverzibilne poškodbe, posledica pa je zmanjšana vitalnost in živost celic (Jenkins in sod., 2003).

2.3.6 Pomen ohranjanja vitalnosti kvasovk med zaporednimi uporabami

Kvasovka *S. cerevisiae* ima omejeno podvojitveno življenjsko dobo. Vsaka celica je namreč sposobna omejenega števila podvojitv pred staranjem. Celica je med staranjem izpostavljena morfološkim, metabolnim in genetskim spremembam. Kakovost piva je najbolj odvisna od obnašanja kvasovke med fermentacijo. Zelo je pomembno, da se kvasovke v pivu posedejo pravi čas, da sladkorje iz pivine hitro in učinkovito pretvorijo v etanol, pri tem pa vzdržujejo ravnovesje spojin, ki vplivajo na karakter piva. Pivovarska industrija je edina industrija alkoholnih pijač, ki uporablja eno generacijo kvasovk večkrat zapored. Študije kažejo, da se lahko eno generacijo kvasovk uporabi od 7-krat do 20-krat (Powell in sod., 2003).

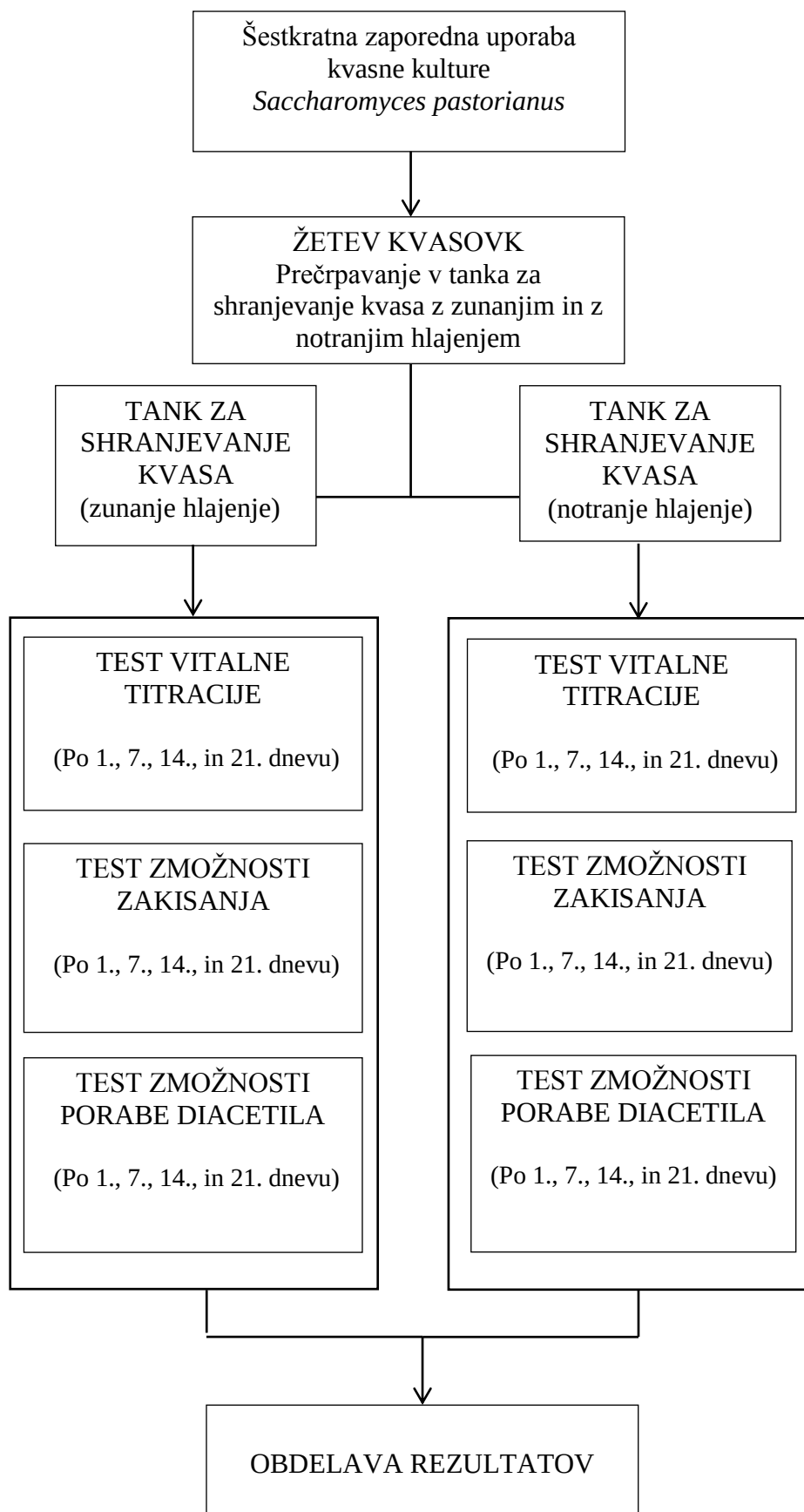
3 MATERIALI IN METODE

Pred izborom metod smo naredili kontrolne teste vsake metode, ter preverili učinke različnih načinov oslabitve kvasovk na rezultate testov vitalnosti (Slika 3).



Slika 3: Shema pred-poskusa in izbire metode za določanje vitalnosti kvasovk

Sledilo je preverjanje vitalnosti kvasovk iz dveh tehnološko različnih tankov za shranjevanje kvasa skozi 21-dnevno časovno obdobje. Na podlagi eksperimenta smo nato določili najprimernejšo metodo za določanje vitalnosti kvasovk v pivovarni.



Slika 4: Shema poskusa shranjevanja kvasovk v dveh tankih za shranjevanje kvasa in preverjanje vitalnosti

3.1.1 Mikroorganizmi

Uporabili smo sev *Saccharomyces pastorianus* C16 (ZIM 158) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili trdno obliko gojišča Pivinski agar.

3.1.2.1 Pivinski agar

V 500 mL dvakrat destilirane vode smo natehtali 22,5 g gojišča Pivinski agar. Nato smo gojišče segrevali v Kochovem loncu, da se je popolnoma raztopilo. Nato smo ga avtoklavirali (121 °C/20 min) in razlili v male petrijevke premera 70 mm.

3.1.3 Raztopine

3.1.3.1 Fiziološka raztopina

Natehtali smo 8,5 g natrijevega klorida (Merck 1.06404) in raztopili v 1000 mL destilirane vode. Počakali smo, da so se kristali raztopili in nato razlili raztopino v sterilne steklenice. Nato smo jih avtoklavirali 20 min pri 121 °C.

3.1.3.2 Etanol (8 %, 50 %)

Za pripravo 8 % etanola smo v merilno bučko odpipetirali 80 mL 100 % etanola in do 1000 mL dodali sterilno destilirano vodo, za pripravo 50 % etanola pa smo v merilno bučko odpipetirali 500 mL 100 % etanola in do 1000 mL dodali sterilno destilirano vodo.

3.1.3.3 Diacetil

Založno raztopino diacetila smo pripravili tako, da smo v digestoriju natehtali 0,045 g 97 % diacetila (Sigma-Aldrich, Nemčija) v 250 mL 50 % etanola. Iz te raztopine smo odpipetirali 20 mL v 250 mL 50 % etanola. 20 mL nastale redčitve smo nato odpipetirali v testni vzorec. Končna koncentracija v vzorcu je bila tako 4,0 µL/L.

3.1.3.4 NaOH

0,1 M NaOH smo pripravili iz 1 M NaOH, tako da smo v 100 mL merilno bučko odpipetirali 10 mL 0,1 M NaOH, ter dodali vodo do 100 mL.

3.1.3.5 Glukoza

50 % glukozo smo pripravili tako, da smo v 500 mL sterilne destilirane vode raztopili 250 g D+glukoze.

3.1.4 Laboratorijska oprema

V Preglednici 4 je zbrana laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri delu.

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema.

Naziv	Oznaka modela	Proizvajalec
Aparat za štetje kvasnih celic	NucleoCounter®YC100TM	Chemometec, Danska
Avtoklav	A500/700	Kambič, Slovenija
Avtomatska pipeta	Accu-Jet Pro	Brand, Nemčija
Brezprašna komora	Pio LFV 12/12	Iskra, Slovenija
Centrifuga	Centric 322-A	Tehtnica, Slovenija
Digestorij	Systemkanal 165/39	Wesemann, Nemčija
Hladilnik	RB4215W	Gorenje, Slovenija
Inkubator	Heratherm IGS 100	ThermoScientific, Nemčija
Kochov lonec	/	/
Magnetno mešalo	Rotamix MM-531	Tehtnica, Slovenija
Plinski kromatograf	Autosystem XL s HS 40	Perkin Elmer, ZDA
Stresalnik	204 EV	Tehtnica, Slovenija
Tehtnica	Sartorius AG CP 2202 S	Sartorius, Nemčija
Termometer	Hg	Tios, Hrvaška
Titratore	Mettler DL 25	Mettler-Toledo, Nemčija

V Preglednici 5 so zbrani ostali laboratorijski pripomočki, ki smo jih uporabili pri delu.

Preglednica 5: Ostali uporabljeni laboratorijski pripomočki.

Naziv	Proizvajalec
Carlsbergova posoda	Alfa Laval, Švedska
Erlenmayerice 330 mL, 1000 mL	Schot Duran, Nemčija
Freundlichove stekleničke	Witeg, Nemčija
Merilni valji	Schot Duran, Nemčija
Mikrocentrifugirke 1,5 mL	Brand, Nemčija
Nastavki za pipete	Eppendorf, Nemčija
Nucelocassete	Chemometec, Danska
Pasteurjeva steklenica	Schot Duran, Nemčija
Pipete 5 mL	Plastika Kavčič, Slovenija
Steklenice 330 mL, 1000 mL	Schot Duran, Nemčija
Sterilne petrijeve plošče	Labortechnika Golias, Slovenija
Viale	/

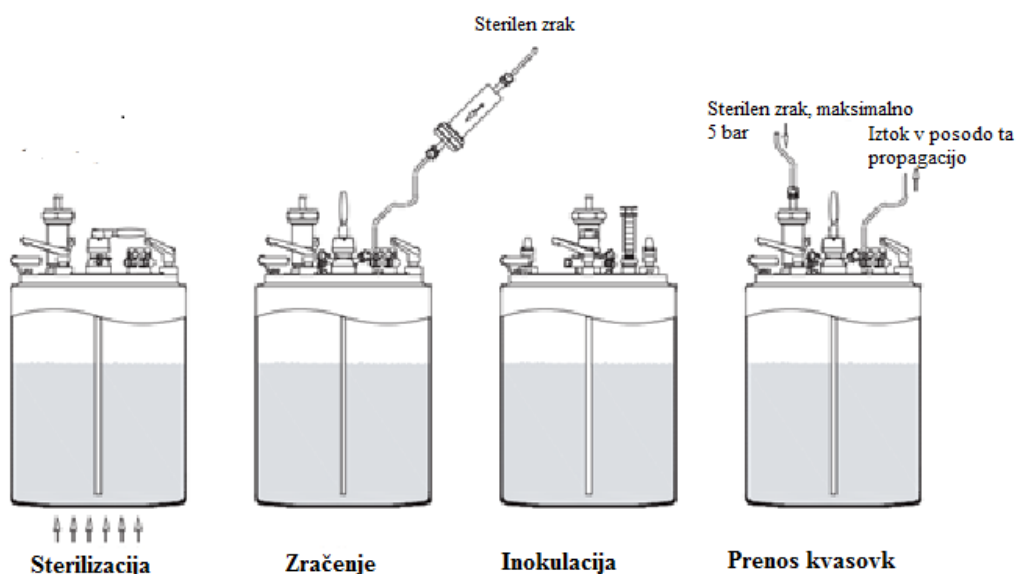
3.1.5 Kemikalije

- | | |
|-----------------|------------------------|
| ○ Diacetil | Sigma-Aldrich, Nemčija |
| ○ D (+) Glukoza | Sigma-Aldrich, Nemčija |
| ○ NaCl | Merck, Nemčija |
| ○ NaOH | Merck, Nemčija |
| ○ Reagent Y-100 | Chemometec, Danska |

3.2 METODE

3.2.1 Priprava kvasne kulture

S poševnega pivinskega agarja, kjer je bila shranjena čista kultura kvasovk *Saccharomyces pastorianus* C-16, smo s sterilno stekleno palčko prenesli del kvasne biomase v 50 mL pripravljene sladice v dveh Freundrichovih stekleničkah (100 mL stekleničke s poudarjenim stranskim lijem). Kvasno kulturo v Freundlichovih stekleničkah smo nato inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo celoten volumen kulture iz Freundrichovih stekleničk prelili v dve Pasteurjevi steklenici (dvolitrski steklenice s poudarjenim stranskim lijem) z 1 L sterilizirane pивine, premešali in inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi. Po 24-tih urah smo prelili kulturo iz Pasteurjeve steklenice v 25 litrsko Carlsbergovo posodo preko nastavka za precepljanje, v kateri je bilo 25 L sterilizirane pивine. V Carlsbergove posode smo nato 48 ur vpihovali steriliziran atmosferski zrak in s tem zagotovili zadostne količine kisika ter enakomerno mešanje. Peti dan smo precepili laboratorijsko čisto kulturo v propagator, v katerem je bila pivina, ki smo jo predhodno sterilizirali v predpropagatorju (Slika 5). Kvas se je po treh dneh prečrpal v fermentor, po sedmih dneh pa se je opravila t.i. žetev kvasa, kjer smo kvas shranili v tanku za shranjevanje kvasa do nadaljnje uporabe.



Slika 5: Skica Carlsbergove posode in potek propagacije (Alfa Laval, 2014)

Test temelji na metaboli aktivnosti kvasovk: kvasovke namreč izločajo snovi, ki povzročijo zakisanje medija. Te snovi in procesi so: CO_2 , organske kisline, delovanje H^+/K^+ ATP-aze in delovanje membranske H^+ ATP-aze. Med testom izmerimo pH, in sicer 10 min pred dodatkom glukoze in nato še 10 min po dodatku glukoze. Po dodatku glukoze se pH zniža, ker nastane elektrokemijski gradient protonov skozi plazemsko membrano med absorbiranjem hranil. Ob odsotnosti sladkorja, ki ga kvasovka lahko fermentira, pa kvasovka vzdržuje ravnovesje med znotrajceličnimi in zunajceličnimi koncentracijami

vodikovih ionov s porabo notranjih zalog energije v obliki glikogena in/ali trehaloze (Heggart in sod., 2000).

Kvasno suspenzijo smo centrifugirali pri 159 RCF (Relative Centrifugal Force), eno minuto, da so se kvasovke ločile od piva. Devet gramov peleta smo nato sprali trikrat s 50 mL deionizirane vode pri 4 °C, z vmesnimi centrifugiranjem (159 RCF, 1 minuto), da smo odstranili material, ki je bil na celični površini. Končni pelet smo resuspendirali v 50 mL destilirane vode pri 25 °C. Za začetek merjenja smo dodali 50 mL sterilne destilirane vode pri 25 °C, ter ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu (700 min⁻¹) začeli odšteti čas (20 minut). Vrednost pH smo izmerili vsako minuto. Po 10 min smo dodali 5 ml 50 % D-glukoze in nato smo merili pH še 10 min, vsako minuto. Po 20 minutah smo dobili končni pH. Za izračun smo od začetnega pH (pH destilirane vode 6,3) odšteli pH po 20 min inkubacije. Dobili smo spremembo pH ali vrednost zmožnosti zakisanja v enotah $\Delta \text{pH}/20\text{min}$ (Sigler in sod., 2006).

$$\text{Zmožnost zakisanja } 10 = 6,3 - \text{pH } 10 \text{ min} \quad \dots (1)$$

$$\text{Zmožnost zakisanja } 20 = 6,3 - \text{pH } 20 \text{ min} \quad \dots (2)$$

$$\text{Zmožnost zakisanja} = \Delta \text{pH} / 20 \text{ min} \quad \dots (3)$$

Vrednost zmožnosti zakisanja je podana v spremembi pH v 20 minutah.

3.2.2 Vitalna titracija

Metoda meri metabolno aktivnost kvasovke, ki z izločanjem CO₂ in H⁺ ionov znižuje pH okolja. Z dodatkom 0,1 M NaOH dvignemo pH okolja kvasovke, nato pa CO₂ in H⁺ ioni iz kvasnih celic povzročijo znižanje vrednosti pH. Bolj aktivne kvasovke izločajo več CO₂ in H⁺ ionov, to pa vodi v hitrejšo znižanje vrednosti pH. Pri tej metodi kvasovke porabljajo le notranje zaloge energije. Rezultati so podani v KMI (kvasni metabolni indeks), ki je pokazatelj metabolne vitalnosti kvasovk (Gonçalves Rodrigues in sod., 2004).

Kvasovke smo najprej sprali z destilirano vodo (Milipore) pri 4 °C. Nato smo trikrat zapored centrifugirali pri 159 RCF in biomaso vmes spirali z destilirano vodo pri 4 °C. Supernatant smo odlili in natehtali 2,5 g kvasne biomase, jo resuspendirali v 250 mL 0,9 % NaCl pri 25-27 °C v stekleni čaši. Vrednost pH smo nato z 0,1 M NaOH dvignili na 10. Nato smo ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu (700 min⁻¹) merili čas, v katerem se je pH znižal na 6,5. Sproti smo si zapisovali vrednosti pH vsako minuto merjenja. Iz količine dodanega NaOH in časa potrebnega za znižanje pH na 6,5 smo izračunali kvasni metabolni indeks (Gonçalves Rodrigues in sod., 2004).

$$\text{KMI } [\mu\text{mol}/\text{min}] = \frac{\{\text{koncentracija NaOH } [\mu\text{M}] \times \text{volumen dodanega NaOH } [\mu\text{M}] \times 10^6\}}{\text{padec pH } [\mu\text{M}]} \quad \dots (4)$$

3.2.3 Test zmožnosti porabe diacetila

Boulton in sodelavci (2001) so opisali test porabe vicinalnih diketonov za določanje vitalnosti kvasovk. Test določa sposobnost porabe eksogenega diacetila s strani kvasovk in temelji na kolorimetriji, kjer s spektrofotometrom zaznavamo različne koncentracije diacetila.

Odločili smo se test prilagoditi tako, da smo namesto spektrofotometra uporabili plinski kromatograf za zaznavanje koncentracij diacetila.

Pri tej metodi je stopnja porabe diacetila odvisna od fiziološkega stanja kvasovk. Bolj vitalne kvasovke v splošnem porabijo več diacetila, manj vitalne kvasovke pa porabijo manj diacetila iz vzorca. Vzorec za merjenje diacetila smo odvzeli takoj po dodatku diacetila, ter po 30 min inkubaciji, da smo izmerili, koliko diacetila so kvasovke porabile, ter tako izračunali razliko v začetni in končni koncentraciji diacetila (Boulton in sod., 2001).

Kvasovke smo sprali z destilirano vodo pri 4 °C in jih centrifugirali v ohlajeni sterilni destilirani vodi pri 4 °C, ter jih redčili do koncentracije 10⁸ celic/mL (4 g kvasovk/50 mL). Nato smo raztopini s kvasovkami dodali 20 mL redčenega diacetila, do končne koncentracije 4 µL/L. Po dodatku diacetila smo odvzeli 25 mL vzorca, ki smo ga centrifugirali pri 159 RCF, 2 minuti. Nato smo 5 mL zgornje vodne faze odpipetirali v posamezne vialke za merjenje diacetila na plinskem kromatografu. Preostalo mešanico kvasovk in diacetila smo inkubirali ob konstantnem stresanju na stresalniku, 30 min pri 20 °C. Po 30 min smo spet odvzeli 25 mL vzorca, ter ponovno centrifugirali pri 159 RCF, 2 minuti. Nato smo 5 mL zgornje vodne faze odpipetirali v posamezne vialke za merjenje diacetila na plinskem kromatografu. Koncentracije diacetila nato izmerimo s plinskim kromatografom. Plinski kromatograf z detektorjem zajema elektronov (ECD, electron capture detector) izmeri količine diacetila v vzorcu. Glede na površine vrhov smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali koncentracije diacetila v posameznem vzorcu.

ECD detektor zaznava spremembe stalnega toka elektronov med elektrodama, ki ga vzdržuje vir – β-sevanj (pri našem kromatografu Ni⁶³), ki je nameščen v ionizacijski komori.



Komponente iz vzorca vežejo elektrone in tvorijo stabilne ione in nekateri ioni lahko dalje reagirajo z nabitim nosilnim plinom.



Te reakcije povzročijo spremembo stalnega toka elektronov, kar zaznamo kot spremembo signala (Stopar in sod., 2009).

3.2.4 Določitev skupnega števila kvasovk in odstotka mrtvih celic

Meritve smo izvajali z aparatom NucleoCounter®YC-100TM. Aparat za določitev števila celic v vzorcu temelji na fluorescenci. Celice najprej raztopimo v reagentu Y100, ki lizira celice, da lahko izstopijo jedra. Nato s pomočjo vakuumu, ki ga naredi NucleoCassette potegnemo vzoreček. V kasetah se na DNA celic veže fluorescentno barvilo propidijev jodid. Aparat vzbuja fluorescenco pri 540 nm, ter nato zaznava emitirano svetlobo pri 600 nm. Z dobljenim signalom aparat tako prešteje celice (Boisen, 2005).

$$\% \text{ mrtvih celic} = \frac{\text{Izmerjena vrednost mrtvih celic}}{\text{Izmerjena vrednost celokupnega števila}} \times 100 \quad \dots (8)$$

V epruveto smo odpipetirali 450 µL reagenta Y100, dodali 50 µL pripravljene suspenzije kvasnih celic in dobro premešali. Napolnili smo NucleoCassette tako, da smo jo potopili v vzorec, nato pritisnili gumb na vrhu kasete in počakali, da je ustvarjeni vakuum potegnil v kaseto 50 µL vzorca. Kaseto smo vstavili v aparat, ki je izpisal meritev.

Pri določitvi odstotka mrtvih celic namesto reagenta Y100 uporabimo fiziološko raztopino. Ker je membrana mrtvih celic načeta, se lahko propidijev jodid veže na DNA in aparat tako prešteje samo mrtve celice (Boisen, 2005).

V epruveto smo odpipetirali 450 µL 0,9 % fiziološke raztopine, dodali 50 µL pripravljene suspenzije kvasnih celic in dobro premešali. Nato smo napolnili NucleoCassette tako, da smo jo potopili v vzorec, pritisnili gumb na vrhu kasete in počakali, da je ustvarjeni vakuum potegnil v kaseto 50 µL vzorca. Kaseto smo vstavili v aparat, ki je izpisal meritev.

Na aparatu NucleoCounter®YC-100TM se je izpisala izmerjena vrednost kot koncentracija celic v enem mililitru. Upoštevati smo morali še redčitev pri pripravi osnovnega vzorca (suspenzije kvasnih celic) in desetkratno redčitev pri pripravi vzorca za merjenje (dodatek 450 µL reagenta Y100 oz. fiziološke raztopine) (Boisen, 2005).

4 REZULTATI

V nadaljevanju so prikazani rezultati eksperimentalnega dela, ki je potekalo v Pivovarni Union D. D. od januarja do aprila 2014. Rezultati so podani v obliki grafov in preglednic, nekateri podrobnejši rezultati pa so v poglavju Priloge. Najprej so predstavljeni rezultati ovrednotenja izbranih metod za določanje vitalnosti, sledilo je ovrednotenje sposobnosti vsake izmed izbranih metod, da določi vitalnost kvasovk v različnih fizioloških stanjih. Tekom celotnega eksperimenta smo za vsako metodo določali tudi število kvasnih celic in odstotek mrtvih celic kvasovk v različnih fizioloških stanjih.

4.1 OVREDNOTENJE METOD ZA DOLOČANJE VITALNOSTI KVASOVK S STALIŠČA NATANČNOSTI

4.1.1 Test zmožnosti zakisanja

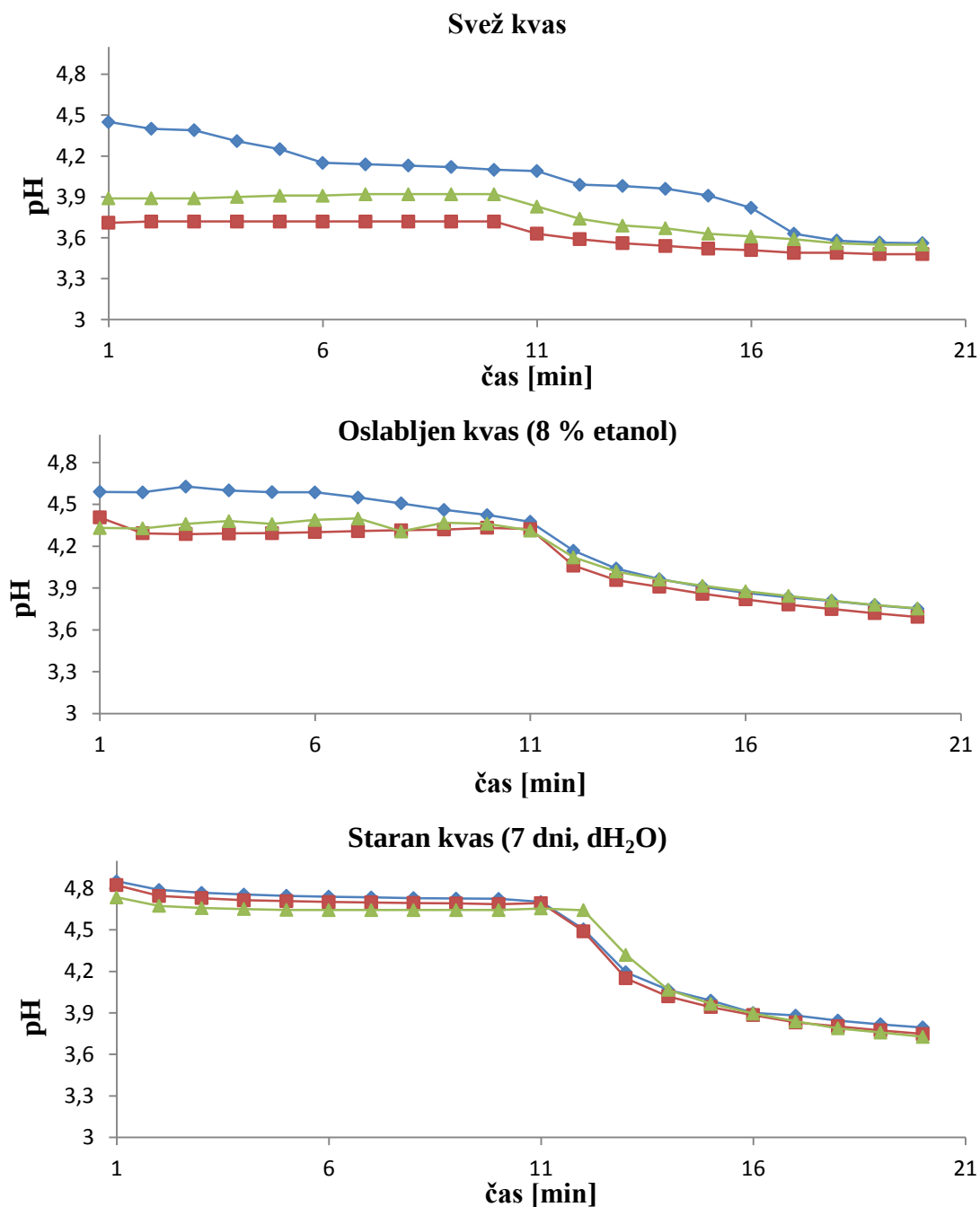
S testom zmožnosti zakisanja smo poskušali ovrednotiti, kako metoda razlikuje v stopnji vitalnosti med različno oslavljenimi kvasovkami. Vitalnost kvasovk smo spremljali s testom zmožnosti zakisanja, po dodatku 0,05 g/mL glukoze v suspenzijo kvasovk. Uporabili smo svež kvas po prvi zaporedni fermentaciji, staran kvas, ki smo ga inkubirali sedem dni pri 8 °C v sterilni destilirani vodi, ter oslavljen kvas, ki smo ga inkubirali štiri ure pri sobni temperaturi v 8 % etanolu. Pri vseh testih smo izvedli eksperiment v treh ponovitvah. V preglednici 6 so rezultati podani kot indeks zmožnosti zakisanja (ZZ), pri čemer višji ko je indeks zmožnosti zakisanja, boljša je vitalnost kvasovk. Iz rezultatov iz Preglednice 6 vidimo, da ima svež kvas najvišjo zmožnost zakisanja ($2,77 \pm 0,04 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$), kar je bilo pričakovano. Vitalnost kvasovk se je ob oslavitvah z etanolom ($2,57 \pm 0,02 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) oz. s staranjem ($2,54 \pm 0,03 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) znižala. Enako smo dokazali tudi za živost, saj se je odstotek mrtvih celic ob oslavitvi in ob staranju kvasovk zviševal, največ mrtvih (10,2 % celic/mL) je bilo pri vzorcu, ki je bil oslavljen z 8 % etanolom. Število kvasovk v mililitru je pri vseh treh različnih vzorcih podobno (Preglednica 6). Nizki kvocienti variacije iz Preglednice 6 kažejo, da so rezultati statistično zanesljivi.

Preglednica 6: Test zmožnosti zakisanja kvasovk v različnih fizioloških stanjih. Rezultati so podani kot povprečja treh ponovitev.

	Svež kvas	Staran kvas, 7 dni, ST, dH ₂ O	Oslabljen kvas, 4 ure, ST, 8 % etanol
Koncentracija celic ± SD [celice/mL]	1,8*10 ⁸ ± 0,26	1,7*10 ⁸ ± 0,14	1,3*10 ⁸ ± 0,08
Povprečen % mrtvih	5,1	7,5	10,2
Indeks zmožnosti zakisanja [Δ pH/20min] ± SD	2,77 ± 0,04	2,54 ± 0,03	2,57 ± 0,02
Kvociient variacije [%]	1,28	1,16	0,92

Na Sliki 6 smo prikazali kinetiko vrednosti pH svežega kvasa, oslabljenega kvasa in staranega kvasa v odvisnosti od časa določenega s testom zmožnosti zakisanja. Zmožnost zakisanja svežega kvasa v treh ponovitvah je bila $2,77 \pm 0,04 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$. Vrednost pH kvasa oslabljenega z etanolom ($2,57 \pm 0,02 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) pri testu zmožnosti zakisanja upade manj kot pH svežega kvasa ($2,77 \pm 0,04 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$). Vrednost pH kvasovk, ki smo jih starali sedem dni pri sobni temperaturi v destilirani vodi se pri testu zmožnosti zakisanja zniža najmanj, to je $2,54 \pm 0,03 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$, kar pomeni, da je ta vzorec kvasovk tudi najmanj vitalen. Različne začetne vrednosti pH pri posameznem vzorcu kvasovk so posledica zakisanja medija s strani kvasovk preden smo izvedli posamezno ponovitev vzorca kvasovk. Iz Slike 6 je razvidno, da se pH pri svežem kvasu niža najbolj postopoma, saj ima svež kvas notranjo zalogo energije. Pri oslabljenem kvasu in zlasti pri staranem kvasu je notranja zaloga energije manjša, zato se glavnina znižanja vrednosti pH zgodi po dodatku glukoze.

V Prilogah A, B in C so priložene razširjene tabele rezultatov testa zmožnosti zakisanja in štetja celic posameznih vzorcev.



Slika 6: Kinetika spremembe pH v odvisnosti od časa: sveži kvasa (živost >94 %), oslavljen kvas (živost >92,5 %) z 8 % etanolom, štiri ure pri sobni temperaturi in staran kvas (živost >89 %), 7 dni v destilirani vodi pri 8 °C določena s testom zmožnosti zakisanja. Za vsak vzorec so prikazane tri neodvisne ponovitve eksperimenta.

4.1.2 Test vitalne titracije

Spremljali smo vitalnost kvasovk s testom vitalne titracije. Uporabili smo svež kvas po prvi fermentaciji, staran kvas, ki smo ga shranjevali sedem dni pri 8 °C v sterilni destilirani vodi ter oslavljen kvas, ki smo ga shranili za štiri ure pri sobni temperaturi v 8 odstotnem etanolu. Pri vseh testih smo izvedli eksperiment v treh ponovitvah. Rezultati so podani kot

količina (μmol) dodanega NaOH v minuti oz. kot kvasni metabolni indeks (KMI), pri čemer višji kot je kvasni metabolni indeks, boljša je vitalnost kvasovk.

Z metodo vitalne titracije smo poskušali ugotoviti, kako metoda pokaže zmanjšano vitalnost različnih vzorcev kvasovk. Rezultati iz Preglednice 7 pričakovano kažejo, da ima najvišji KMI vzorec svežega kvasa ($6,63 \pm 2,9 \mu\text{mol NaOH/min}$). Le malo nižji KMI (za $0,18 \mu\text{mol NaOH/min}$) ima vzorec staranih kvasovk, kar je presenetljivo, saj je KMI pri kvasovkah oslabljenimi z 8 % etanolom kar za $3,28 \mu\text{mol NaOH/min}$ nižji. Odstotek mrtvih celic je najvišji pri vzorcu kvasovk oslabljenih z etanolom. Rezultati štetja mrtvih celic so skladni s testom zmožnosti zakisanja (preglednica 6 in 7). Rezultati kažejo na povezanost odstotka mrtvih celic s štetjem mrtvih celic pri testu vitalne titracije, saj je pri oslavljenem kvasu z etanolom najnižji kvasni metabolni indeks, vzorec pa ima tudi najvišji delež mrtvih celic. Sledi mu vzorec staranega kvasa v destilirani vodi, najmanjši delež mrtvih celic pa je pri svežem kvasu, ki ima tudi najvišji kvasni metabolni indeks. Sklepamo, da je tak padec vitalnosti posledica vpliva etanola na celice kvasovk. Povišane koncentracije etanola negativno vplivajo na celično membrano, hidrofilne in hidrofbne proteine ter na endoplazmatski retikulum. Pri celicah tako etanol povzroči slabšo vitalnost, povišan odstotek mrtvih celic, upočasnen metabolizem celic, počasnejša je sinteza makromolekul v celici in oslabi ali izgubi se funkcionalnih glikolitičnih encimov (Stanley in sod., 2010). Pri staranemu kvasu takega učinka na celice ni bilo in zato smo s testom vitalne titracije pri vzorcu staranega kvasa pokazali boljšo vitalnost kot pri vzorcu oslavljenega kvasa. Kvocianti variacije pri testu vitalne titracije so pri vseh treh vzorcih gibajo okrog 44 %, kar kaže na nizko statistično zanesljivost rezultatov, saj so standardni odkloni pri vseh treh vzorcih veliki. Pri metodi zmožnosti zakisanja (Preglednica 6) so kvocianti variacije veliko nižji (pod 1,5 %).

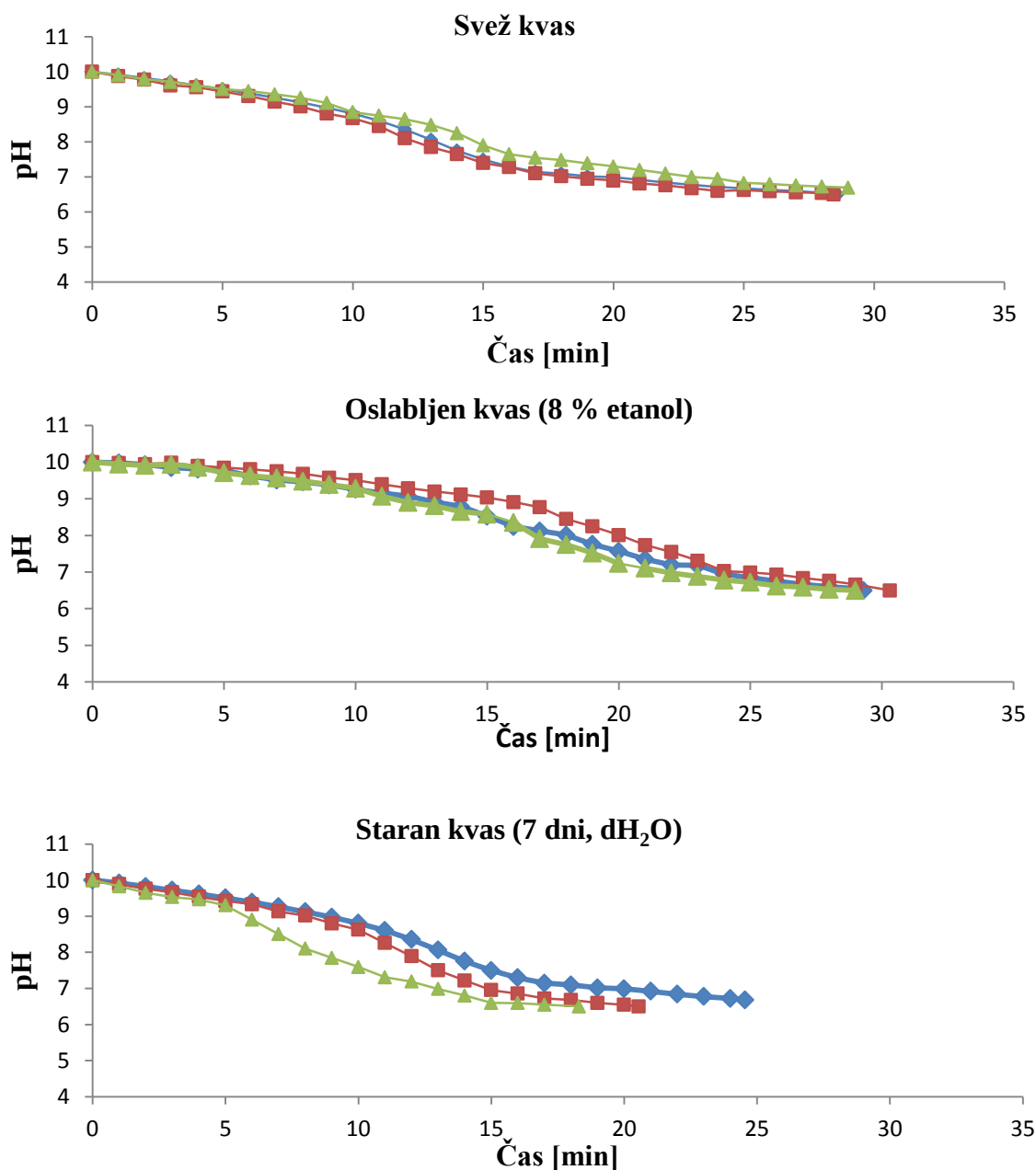
Preglednica 7: Rezultati testa vitalne titracije testa kvasovk v različnih fizioloških stanjih.

	Svež kvas	Staran kvas, 7 dni, ST, dH ₂ O	Oslabljen kvas, 4 ure, ST, 8 % etanol
Koncentracija celic [celic/mL] $\pm$ SD	$1,9 \cdot 10^7 \pm 0,14$	$2,1 \cdot 10^7 \pm 0,09$	$1,5 \cdot 10^7 \pm 0,0$
Povprečen % mrtvih	5,8	7,2	9,5
Kvasni metabolni indeks [μmol NaOH/min] $\pm$ SD	$6,63 \pm 2,9$	$6,45 \pm 2,8$	$3,38 \pm 1,5$
Kvocieni variacije [%]	44,0	43,5	43,3

Na Sliki 7 smo prikazali znižanje vrednosti pH svežega kvasa, staranega kvas in oslavljenega kvasa v odvisnosti od časa. Vitalnost svežega kvasa, izračunana z metodo vitalne titracije je bila $6,63 \pm 2,9 \mu\text{mol NaOH/min}$. Na Sliki 7 lahko vidimo, da je kinetika znižanja vrednosti pH staranega kvasa v destilirani vodi podobna kot pri vzorcu svežega kvasa. Pri vzorcu staranega kvasa smo za titracijo porabili manj NaOH, tako da je po izračunu vitalnost staranega kvasa v destilirani vodi nižja, kot vitalnost svežega kvasa. Znižanje vrednosti pH oslavljenega kvasa z etanolom je najbolj strm, glede na preostala

dva vzorca kvasovk iz Slike 7. Po izračunu smo ugotovili, da je to posledica najmanj dodanega NaOH, saj je vitalnost kvasovk izražena kot kvasni metabolni indeks zelo nizka, 3,28 $\mu\text{mol NaOH/min}$.

V Prilogah D in E so priložene razširjene tabele rezultatov testa vitalne titracije in štetja celic posameznih vzorcev. V prilogi X je slikovni prikaz titracijske naprave z mešalom za izvajanje testa vitalne titracije.



Slika 7: Kinetika spremembe pH v odvisnosti od časa: sveži kvas (živost >94 %), oslavljen kvas (živost >92 %) z 8 % etanolom, štiri ure pri sobni temperaturi in staran kvas (živost >90 %), 7 dni v destilirani vodi pri 8 °C določena s testom vitalne titracije. Za vsak vzorec so prikazane tri neodvisne ponovitve eksperimenta.

4.1.3 Test zmožnosti porabe diacetila

Vitalnost kvasovk smo določili z merjenjem zmožnosti porabe diacetila s plinsko kromatografijo. Uporabili smo svež kvas po prvi fermentaciji, oslabljen kvas, ki smo ga shranjevali v sterilni destilirani vodi, pri 8 °C, sedem dni, ter oslabljen kvas, ki smo ga shranili za štiri ure pri sobni temperaturi v 8 % etanolu. Pri vseh testih smo izvedli eksperiment v petih ponovitvah. Rezultati so podani v Preglednici 8 v odstotkih porabljenega diacetila, pri čimer je višji odstotek porabljenega diacetila pokazatelj boljše vitalnosti kvasovk.

Pri tej metodi smo porabo diacetila merili s plinskim kromatografom. Ugotavljali smo, kako različna oslabitev vzorcev kvasovk vpliva na vitalnost kvasovk. Rezultati iz Preglednice 8 kažejo, da največ diacetila pretvori svež kvas (39 %). Kvasovke, ki smo jih starali pri 8 °C so zmogle pretvoriti 25,3 % začetnega diacetila, najmanj diacetila pa pretvori vzorec, ki smo ga oslabili z 8 % etanolom pri sobni temperaturi (23,5 %). Kvocien variacije kaže na največjo statistično zanesljivost pri vzorcu svežega kvasa, saj znaša le 8,4 %, pri preostalih dveh vzorcih pa je višji (16,3 %). Rezultati štetja mrtvih celic se skladajo s štetjem pri prejšnjih dveh metodah (Preglednici 7 in 8), in potrjujejo da največ celic odmre pri slabljenju z 8 % alkoholom.

Preglednica 8: Rezultati porabe diacetila kvasnih celic v različnih fizioloških stanjih, merjenje s plinskim kromatografom.

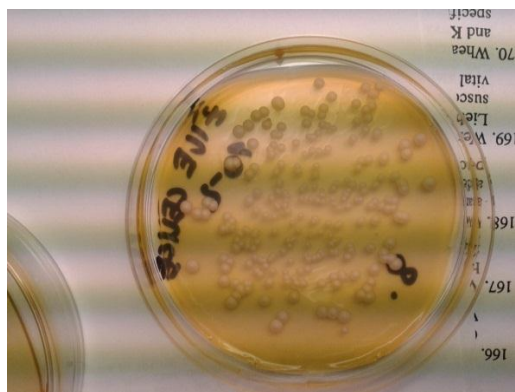
Vzorec	Koncentracija celic [cel/mL]	% mrtvih	Začetni diacetil [nL/L] ± SD	Končni diacetil [nL/L] ± SD	Poraba diacetila [nL/L] ± SD	Poraba diacetila [%]	Kvocien variacije porabe diacetila [%]
Svež kvas	9,2*10 ⁷	5,43	4105 ± 28,7	2502,8 ± 138,1	1602,2 ± 133,8	39,0	8,4
Staran kvas 7 dni, 8 °C, dH ₂ O	1,0*10 ⁸	7,22	3938 ± 240,2	2942,4 ± 124,4	995,6 ± 162,3	25,3	16,3
Oslabljen kvas 4h, ST, 8 % etanol	1,0*10 ⁸	9,33	3843,8 ± 57,1	2940,4 ± 148,8	903,4 ± 146,9	23,5	16,3

4.2 OVREDNOTENJE METOD MERJENJA VITALNOSTI S STALIŠČA OBČUTLJIVOSTI

Za ovrednotenje uporabnosti različnih metod merjenja vitalnosti smo morali dokazati, da različne metode ne zaznajo metabolne aktivnosti kvasovk, če smo kvasovke inaktivirali s toplotnim šokom.

V predposkusu smo s spreminjanjem temperature in časa inkubacije določili čas in temperaturo, kateri moramo izpostaviti celice kvasovk, da dobimo sto-odstotni delež mrtvih celic. Za kontrolne teste smo namreč potrebovali izključno mrtve celice kvasovk. Kvasne celice smo izpostavili temperaturi 60 °C in 80 °C za 20 min. Nato smo kvasovke nacepili na gojišče Pivinski agar, ter inkubirali štiri dni na 30 °C. Po štirih dneh smo pri pregledu plošč ugotovili, da je potrebnih 20 min pri temperaturi 80 °C (Slika 8 B), da so vse celice v 50 mL raztopine mrtve. Temperatura 60 °C se je izkazala za prenizko (Slika 8 A).

A)



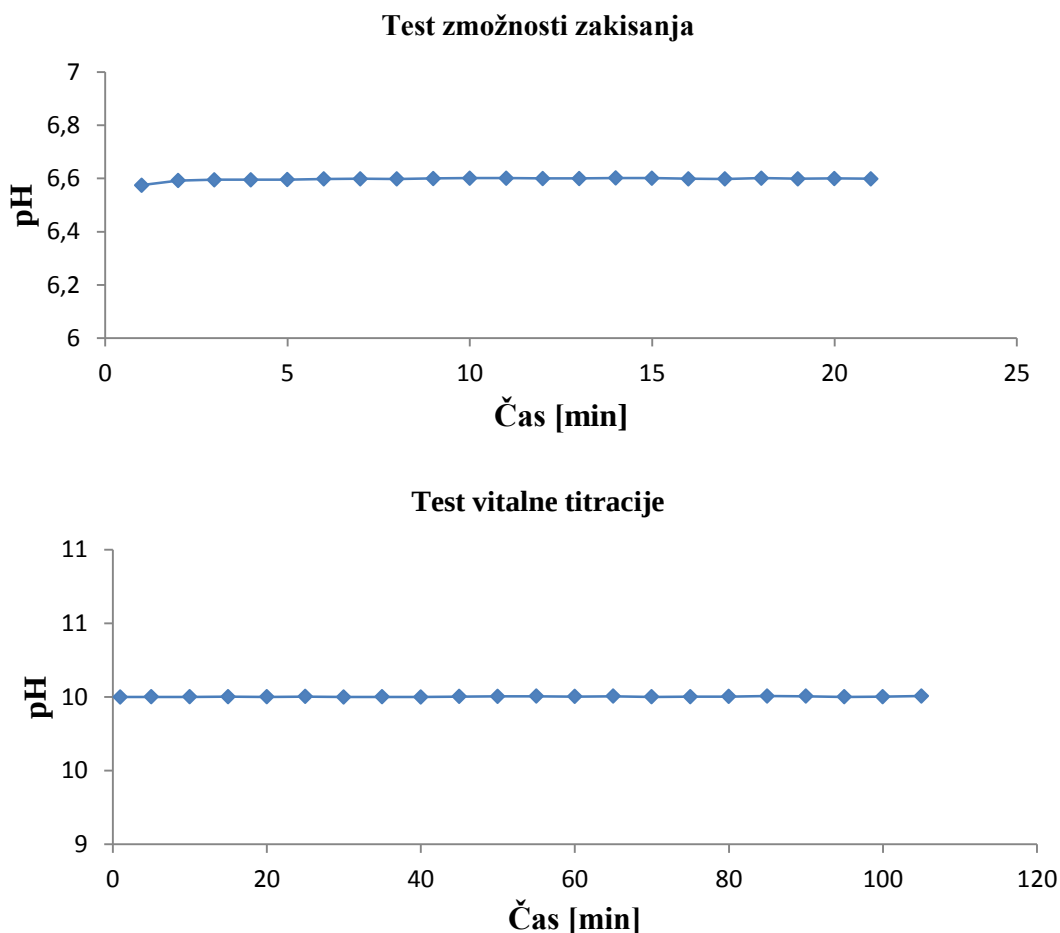
B)



Slika 8: Gojišče pivinski agar po inkubaciji pri 30 °C, štiri dni. A: Kvasovke na gojišču pri temperaturi 60 °C, 20 min, B: Prazno gojišče pri temperaturi 80 °C, 20 min.

Na Sliki 9, v Preglednici 9 in v Prilogah N in O so prikazani rezultati kontrolnih testov, ki smo jih naredili zato, da bi dokazali, da na spremembo pH oz. na porabo diacetila vplivajo le žive kvasovke.

Iz Slike 9 in Priloge N vidimo, da pri kontroli testa zmožnosti zakisanja, kjer smo uporabili mrtve kvasne celice, ne pride do sprememb pH, torej je bila sprememba pH pri tem testu, prikazana na Sliki 6, posledica delovanja živih kvasovk. Prav tako je iz Slike 9 in Priloge O razvidno, da pri kontroli vitalne titracije, kjer smo uporabili mrtve kvasne celice, ne pride do sprememb pH, torej je bila sprememba pH prikazana na Sliki 7 posledica delovanja živih kvasovk.



Slika 9: Dinamika gibanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kontrolnih eksperimentov, določen s testom zmožnosti zakisanja in s testom vitalne titracije.

Iz Preglednice 9 je razvidno, da v destilirani vodi ni bilo prisotnega diacetila in prav tako je bila v raztopini kvasa in vode zanemarljiva koncentracija diacetila, ki se ni spreminjala s časom inkubacije. Iz tega smo sklepali, da so kvasovke pri našem eksperimentu zares porabljale diacetil.

Preglednica 9: Pretvorba diacetila mrtvih kvasovk.

Vzorec	Koncentracija diacetil na začetku [nL/L]	Koncentracija diacetila po 30 min inkubaciji [nL/L]	Poraba diacetil [%]	Povp. poraba diacetila [%]
Voda	0	0	0	0
Voda	0	0	0	
Voda	0	0	0	
Kvas + voda	15	15	0	0
Kvas + voda	10	10	0	
Kvas + voda	7	7	0	
Diacetil + voda	4234	4230	0,1	0,2
Diacetil + voda	4191	4180	0,3	
Diacetil + voda	4294	4280	0,3	

4.2 SPREMLJANJE PADCA VITALNOSTI KVASOVK IZ TANKOV ZA SHRANJEVANJE KVASA

Kvasovke po šesti zaporedni fermentaciji smo shranili v dva tanka za shranjevanje kvasa in sicer v tank za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, kjer je temperatura kvasne brozge dosegla od šest do osem stopinj Celzija in v tank za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, kjer je bila kvasna brozga ohlajena na tri stopinje Celzija. Tank za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem je prostorsko hlajen, tank za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem pa ima hlajenje vgrajeno v tanku samem. Kvasovke v teh dveh tankih smo shranjevali skupno 21 dni, ter jim določiti vitalnost prvi dan po zaključku fermentacije, sedmi dan po fermentaciji, 14. dan po fermentaciji ter 21. dan po fermentaciji.

4.2.1 Rezultati testa zmožnosti zakisanja iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem

Test smo izvajali v dveh ponovitvah, sočasno s testom smo merili skupno število celic in odstotek mrtvih celic. Rezultati so podani v obliki grafov in preglednic.

Iz Preglednice 10 vidimo, da vitalnost kvasovk tekom eksperimenta v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem hitro pada, in da je po 21-dnevem shranjevanju kvasa vitalnost že zelo nizka ($1,17 \pm 0,03 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$). Vitalnost največ upade že prvi teden po fermentaciji, saj se zniža za $0,86 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$. Rezultat ($1,51 \pm 0,01 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) kaže na višjo vitalnost 14. dan po fermentaciji kot sedmi dan ($1,37 \pm 0,05 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) po fermentaciji, kar je presenetljivo in gre verjetno za napako pri meritvi. Skozi celoten 21-dnevni eksperiment vidimo, da se odstotek mrtvih celic (Preglednica 10) hitro povečuje in da je po 21-ih dneh mrtvih že 47,1 % celic. Verjetno gre pri zadnjem štetju mrtvih celic za napako, saj pri ostalih dveh metodah odstotek mrtvih kvasovk po 21-ih dneh ni tako visok.

Preglednica 10: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

	TZK zunanje hlajenje, 1. dan	TZK zunanje hlajenje, 7. dan	TZK zunanje hlajenje, 14. dan	TZK zunanje hlajenje, 21. dan
Zmožnost zakisanja [$\Delta \text{pH}/20 \text{ min}$] $\pm$ SD	$2,23 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,03$
Kvocien variacije [%]	0,90	3,28	0,66	2,14
Koncentracija celic [celic/mL] $\pm$ SD	$1,60 \cdot 10^8 \pm 0,10$	$1,51 \cdot 10^8 \pm 0,01$	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,05$	$1,35 \cdot 10^8 \pm 0,0$
Povprečen % mrtvih	10,7	18,3	32,7	47,1

TZK: tank za shranjevanje kvasovk

Vitalnost kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem tekom celotnega eksperimenta pada (Preglednica 11), vendar počasneje kot pri rezultatih iz tanka za

shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem (Preglednica 10), saj je po 21-dnevnem shranjevanju ($1,31 \pm 0,01 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) le malo nižja kot zmožnost zakisanja tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem po sedmih dneh ($1,37 \pm 0,05 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$). Odstotek mrtvih celic tekom celotnega eksperimenta narašča, vendar je po 21ih dneh le ta 20,1 %, kar je veliko manj kot pri rezultatih iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem (47,1 %) (Preglednica 10). Kvocient variacije je pri metodi za oba tanka za shranjevanje kvasa nizek (Preglednici 10 in 11) iz česar sklepamo, da so rezultati statistično značilni.

Preglednica 11: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

	TZK notranje hlajenje, 1. dan	TZK notranje hlajenje, 7. dan	TZK notranje hlajenje, 14. dan	TZK notranje hlajenje, 21. dan
Zmožnost zakisanja [$\Delta \text{pH}/20 \text{ min}$] $\pm$ SD	$2,23 \pm 0,02$	$1,93 \pm 0,00$	$1,68 \pm 0,00$	$1,31 \pm 0,01$
Kvocient variacije [%]	0,90	0,00	0,90	0,38
Koncentracija celic [celic/mL] $\pm$ SD	$1,60 \cdot 10^8 \pm 0,10$	$1,75 \cdot 10^8 \pm 0,05$	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,00$	$1,8 \cdot 10^8 \pm 0,00$
Povprečen % mrtvih	10,7	12,2	18,3	20,1

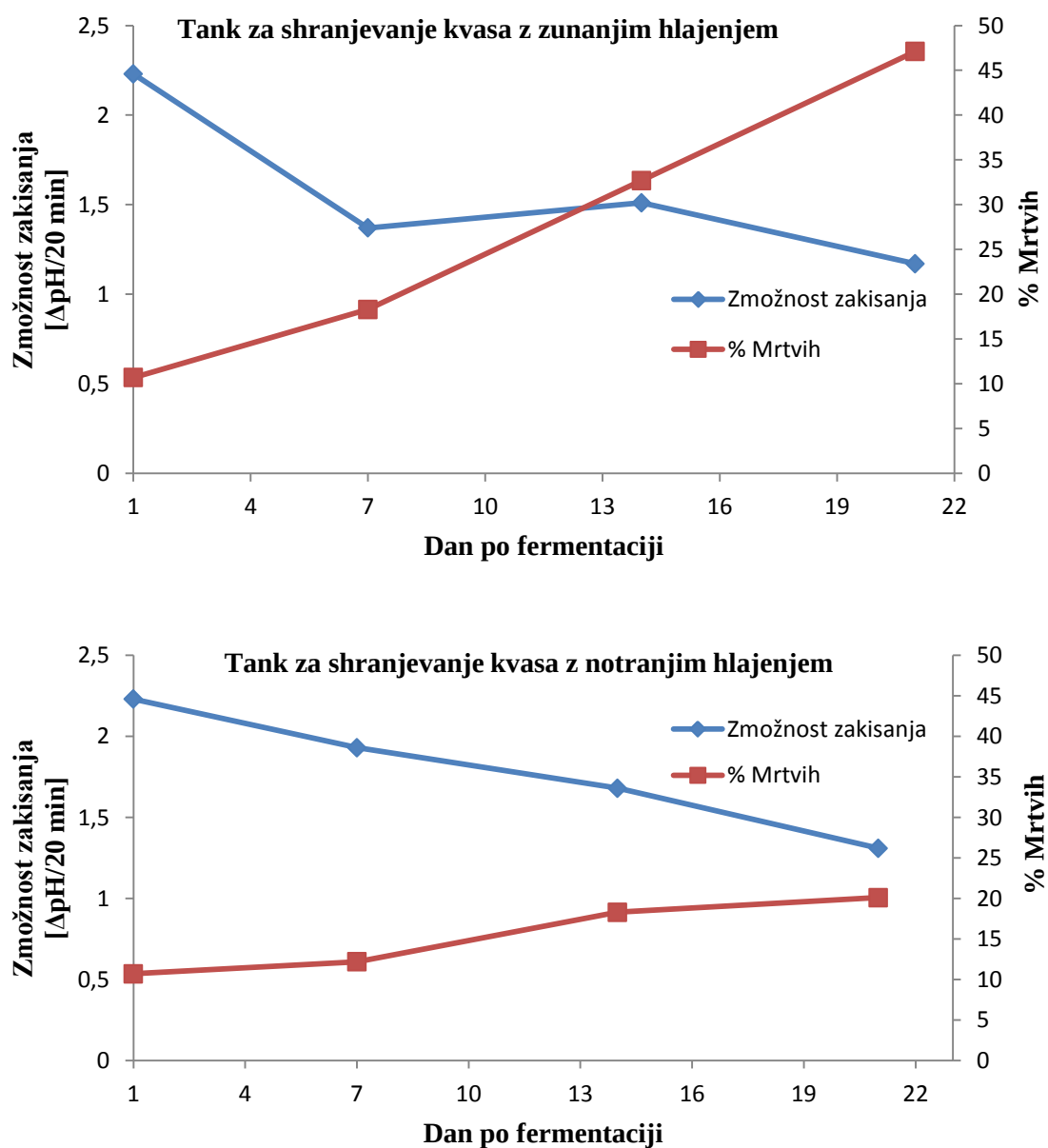
TZK: tank za shranjevanje kvasovk

Na Sliki 10 je prikazana kinetika padanja vrednosti pH določena s testom zmožnosti zakisanja, vzorcev kvasa iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem, v povezavi z naraščanjem deleža mrtvih celic med 21-dnevnim eksperimentom. Razvidno je, da kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem ohranja boljše vitalnost dlje kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem.

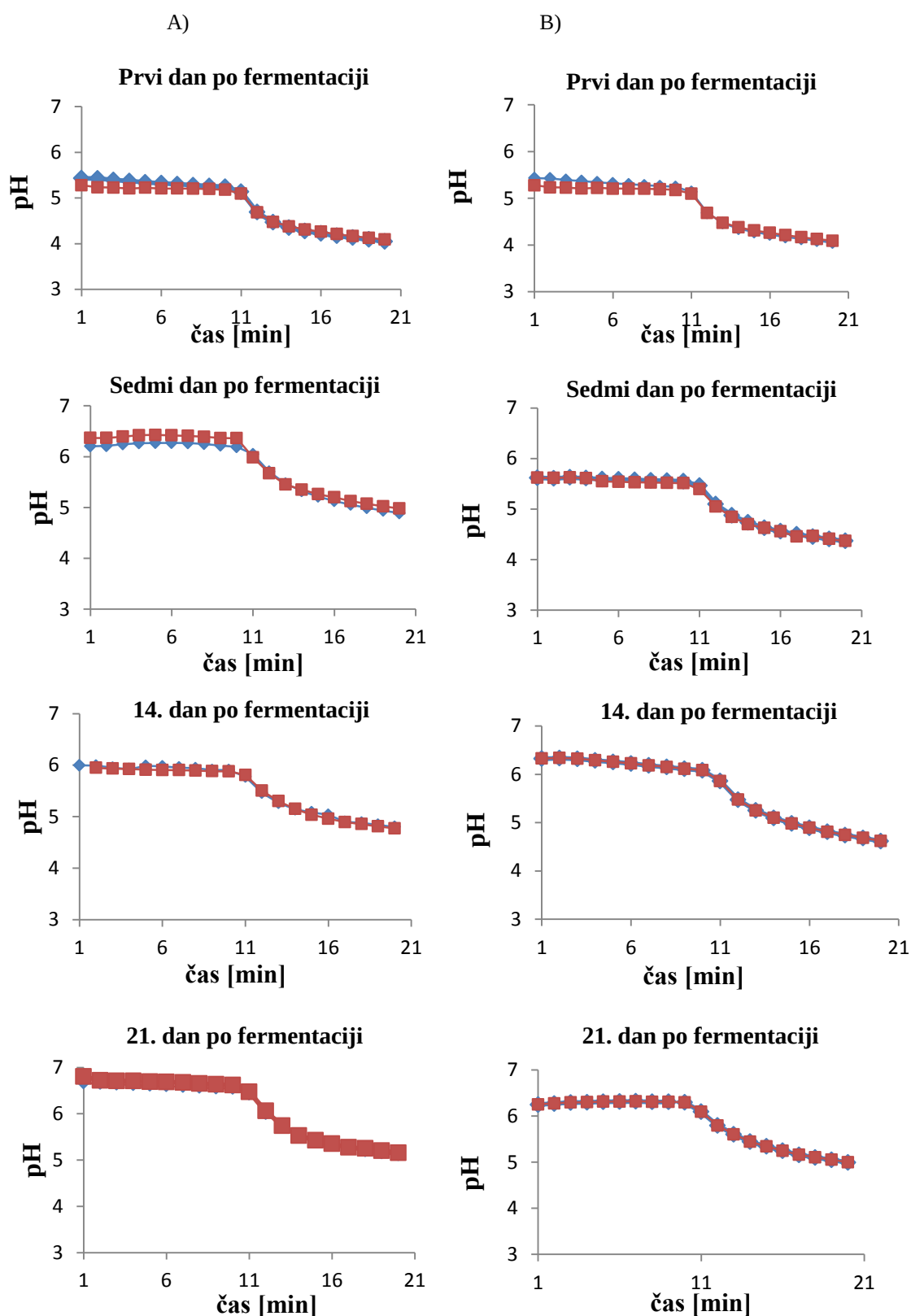
Na Sliki 11 je prikazan znižanje vrednosti v odvisnosti od časa tekom 21-dnevnega eksperimenta, kvasa iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem, določen s testom zmožnosti zakisanja. Iz slike je razvidno, da kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem izgublja vitalnost počasneje, kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Razlika v začetnem pH pri posameznih meritvah (Slika 6) so nastale zaradi delovanja metabolizma kvasovk med posameznimi ponovitvami, saj je minilo 20 minut med posameznimi ponovitvami, v tem času pa so kvasovke že porabile vso notranjo zalogo energije. Na končne rezultate testa to odstopanje ne vpliva. Razlika v začetnih vrednostih pH različnih vzorcev pa je posledica shranjevanja kvasovk in akumulacije različnih produktov metabolizma kvasovk med shranjevanjem. Kvasovke smo sicer spirali z destilirano vodo, toda s staranjem se kopičijo kisli produkti metabolizma in jih je zelo težko popolnoma odstraniti. Večkratno spiranje ne bi imelo učinka (Sigler in sod., 2006).

Iz grafov na Sliki 11 je razvidno, da pri starejših vzorcih kvasovk vedno bolj upada zaloga notranje energije v celicah, saj so krivulje do 10 minute vedno bolj položne, kar pomeni, da so bile celice manj aktivne in so manj znižale pH. V Prilogah F in G so priložene razširjene tabele rezultatov testa zmožnosti zakisjanja in štetja celic kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. V Prilogah H in I so priložene razširjene tabele rezultatov testa zmožnosti zakisjanja in štetja celic kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem.

Metoda se je zaradi nizkega kvocienta variacije izkazala za statistično zanesljivo, v prid metodi je tudi dejstvo, da lahko vzorce kvasovk shranimo do izvedbe metode (do 6 ur) (Sigler in sod., 2006)



Slika 10: Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom zmožnosti zakisjanja in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.



Slika 11: Dinamika znižanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kvasa 1., 7., 14. in 21. dan po fermentaciji: A: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, B: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določen s testom s testom zmožnosti zakisanja. Za vsak vzorec sta prikazani dve neodvisni ponovitvi eksperimenta.

4.2.2 Rezultati testa vitalne titracije kvasa iz tankov za shranjevanje kvasa z zunanjim in notranjim hlajenjem

Test vitalne titracije smo izvajali v dveh ponovitvah. Sočasno s testom smo merili tudi koncentracijo celic in odstotek mrtvih celic. Iz preglednice 12 je razvidno, da kvasni metabolni indeks (KMI) tekom celotnega eksperimenta pada in je ob koncu že zelo nizek ($0,42 \mu\text{mol NaOH/min}$). Največji padec KMI se je zgodil med sedmim ($2,78 \pm 0,00 \mu\text{mol NaOH/min}$) in 14. dnem ($1,08 \pm 0,01 \mu\text{mol NaOH/min}$) shranjevanja kvasovk. Odstotek mrtvih celic se med celotnim eksperimentom prav tako znižuje (Preglednica 12). Po 21-ih dneh je odstotek mrtvih celic 38,6.

Preglednica 12: Rezultati testa vitalne titracije shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

	TZK zunanje hlajenje, 1. dan	TZK zunanje hlajenje, 7. dan	TZK zunanje hlajenje, 14. dan	TZK zunanje hlajenje, 21. dan
Kvasni metabolni indeks [$\mu\text{mol NaOH/min}$] $\pm$ SD	$3,49 \pm 0,10$	$2,78 \pm 0,00$	$1,08 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$
Kvocien variacije [%]	2,72	0,18	0,46	2,38
Koncentracija celic [cel/mL] $\pm$ SD	$1,65 \cdot 10^7 \pm 0,05$	$1,85 \cdot 10^7 \pm 0,05$	$1,40 \cdot 10^8 \pm 0,10$	$2,1 \cdot 10^7 \pm 0,10$
Povprečen % mrtvih	10,7	20,1	30,0	38,6

TZK: tank za shranjevanje kvasovk

Pri rezultatih vitalne titracije iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem (Preglednica 13) lahko vidimo, da KMI tekom eksperimenta pada, vendar ob koncu eksperimenta ne upade na tako nizke vrednosti ($0,72 \pm 0,03 \mu\text{mol NaOH/min}$) kot pri rezultatih iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem ($0,42 \pm 0,01 \mu\text{mol NaOH/min}$). KMI 14. dan ($0,81 \pm 0,00 \mu\text{mol NaOH/min}$) bi verjetno moral biti nekoliko višji in gre verjetno za napako pri meritvi.

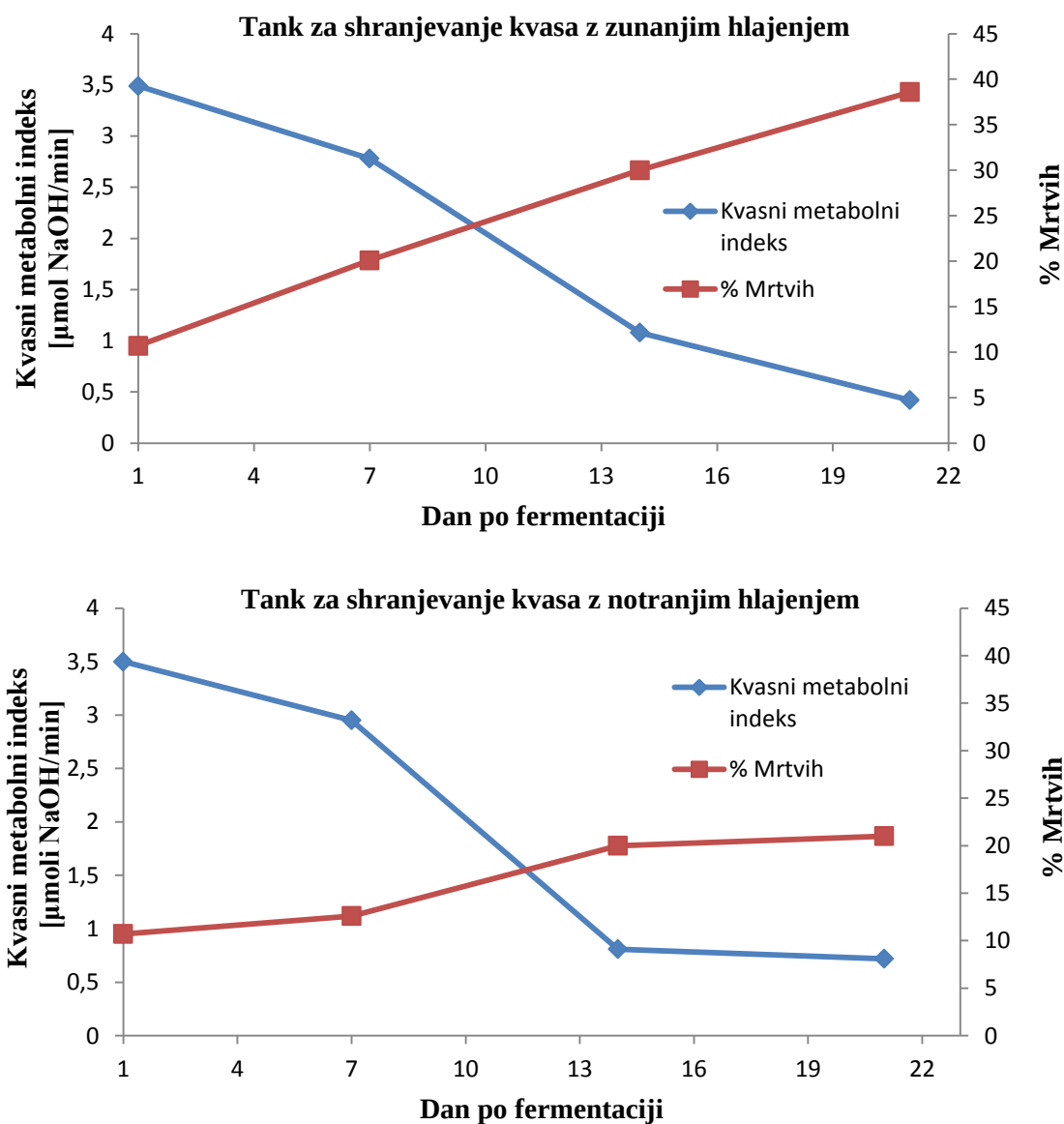
Preglednica 13: Rezultati testa vitalne titracije shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

	TZK notranje hlajenje, 1. dan	TZK notranje hlajenje, 7. dan	TZK notranje hlajenje, 14. dan	TZK notranje hlajenje, 21. dan
Kvasni metabolni indeks [μmol NaOH/min] $\pm$ SD	3,5 $\pm$ 0,10	2,95 $\pm$ 0,20	0,81 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,03
Kvocien variacije [%]	2,71	6,61	0,00	3,47
Koncentracija celic [celic/mL] $\pm$ SD	1,65*10 ⁷ $\pm$ 0,05	1,65*10 ⁷ $\pm$ 0,05	1,40*10 ⁸ $\pm$ 0,05	2,10*10 ⁷ $\pm$ 0,05
Povprečen % mrtvih	10,7	12,6	20,0	21,0

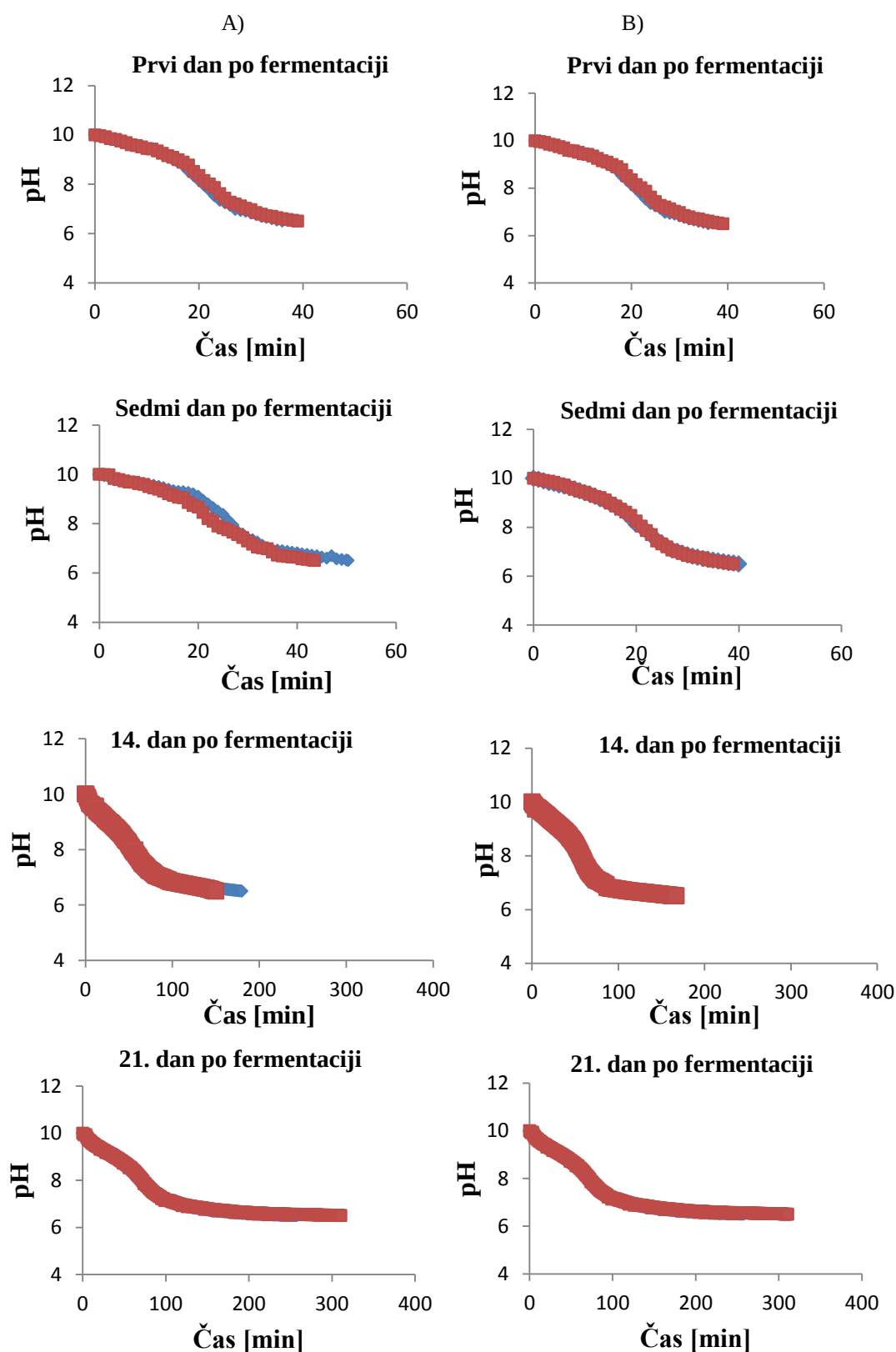
TZK: tank za shranjevanje kvasa

Odstotek mrtvih celic podobno kot pri testu zmožnosti zakisanja po 21-ih dneh pade na približno 20 % (Preglednica 23). Kvocien variacije je pri metodi za oba tanka za shranjevanje kvasa nizek (< 7 %), iz česar sklepamo da so rezultati statistično značilni. Na Sliki 12 je prikazana dinamika padanja vitalnosti kvasovk, določena s testom vitalne titracije, kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, v povezavi z naraščanjem deleža mrtvih celic med 21-dnevnim eksperimentom. Prikazana je tudi dinamika padanja vitalnosti kvasovk, določena s testom vitalne titracije, kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, v povezavi z naraščanjem deleža mrtvih celic med 21-dnevnim eksperimentom. Tako kot pri metodi zmožnosti zakisanja, je iz grafa razvidno, da smo tudi z metodo vitalne titracije pokazali boljšo vitalnost kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem 21. dan po fermentaciji v primerjavi s kvasom iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Na Sliki 13 je prikazan znižanje vrednosti pH v odvisnosti od časa tekom 21- dnevnega eksperimenta, kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določen s testom vitalne titracije. Razvidno je, da kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem izgublja vitalnost počasneje, kot kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Čas v katerem kvasovke uspejo znižati pH na 6,5 se tekom eksperimenta podaljšuje. Razlike v času med posameznimi ponovitvami istega vzorca so posledica slabšega spiranja kvasovk, saj so se med shranjevanjem v tankih za shranjevanje kvasa kopičili kisli produkti. Kvasovke smo sicer spirali z destilirano vodo, toda zelo težko je bilo sprati vse kisle produkte. V Prilogah J in K so priložene razširjene tabele rezultatov testa vitalne titracije in štetja celic kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. V Prilogah L in M so priložene razširjene tabele rezultatov testa vitalne titracije in štetja celic kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem.

Metoda se je zaradi nizkega kvocien variacije izkazala za statistično zanesljivo, problem predstavlja dejstvo, da je potrebno vzorce kvasovk testirati takoj po spiranju. Metoda je bila tudi časovno bolj potratna kot test zmožnosti zakisanja.



Slika 12: Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom vitalne titracije in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.



Slika 13: Dinamika znižanja vrednosti pH v odvisnosti od časa kvasa 1., 7., 14. in 21. dan po fermentaciji: A: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, B: kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določen s testom s testom vitalne titracije. Za vsak vzorec sta prikazani dve neodvisni ponovitvi eksperimenta.

4.2.3 Rezultati metode določanja porabe diacetila s plinsko kromatografijo kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem

Test smo izvajali v petih ponovitvah, sočasno s testom smo merili tudi koncentracijo celic in odstotek mrtvih celic. Iz rezultatov merjenja vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem (Preglednica 14) je razvidno, da se odstotek porabe diacetila med 21-dnevnim shranjevanjem kvasovk zelo zniža. Prvi dan po šesti fermentaciji kvasovke porabijo 33 % diacetila, ob koncu 21-dnevnega eksperimenta pa kvasovke lahko porabijo le še 1,2 % začetnega diacetila. Odstotek mrtvih celic se med celotnim eksperimentom zvišuje (Preglednica 14). Podobno kot pri metodi zmožnosti zakisanja je odstotek mrtvih celic po 21-dnevnem shranjevanju kvasovk okoli 35 %. Kvocien variacije skozi celoten eksperiment narašča in je ob koncu že 80,1 %. Upoštevati je potrebno, da kvocien variacije pri nizkih porabah diacetila verjetno ni zanesljiv podatek o variaciji, saj je napaka izmerjenih visokih koncentracij diacetila s plinskim kromatogramom velika, posledično pa je velik tudi standardni odklon meritev (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rezultati testa zmožnosti porabe diacetila shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

Vzorec	Začetni diacetil [nL/L] ± SD	Končni diacetil [nL/L] ± SD	Poraba diacetila [nL/L] ± SD	Poraba diacetila [%]	Kvocien variacije porabe diacetila [%]	Koncentracija celic [cel/mL]	% mrtvih
1. dan po fermentaciji	3728 ± 52,9	3506 ± 16,0	1240 ± 52,9	33,3	4,3	1,3*10 ⁸	10,1
7. dan po fermentaciji	3961 ± 33,4	3506 ± 34,7	454,15 ± 46,0	11,5	10,1	1,2*10 ⁸	19,7
14. dan po fermentaciji	3822,9 ± 29	3747 ± 6,89	76 ± 23	2	30,3	1,6*10 ⁸	28,8
21. dan po fermentaciji	3807 ± 56	3760 ± 12,6	64,6 ± 55,6	1,2	80,1	1,5*10 ⁸	23,5

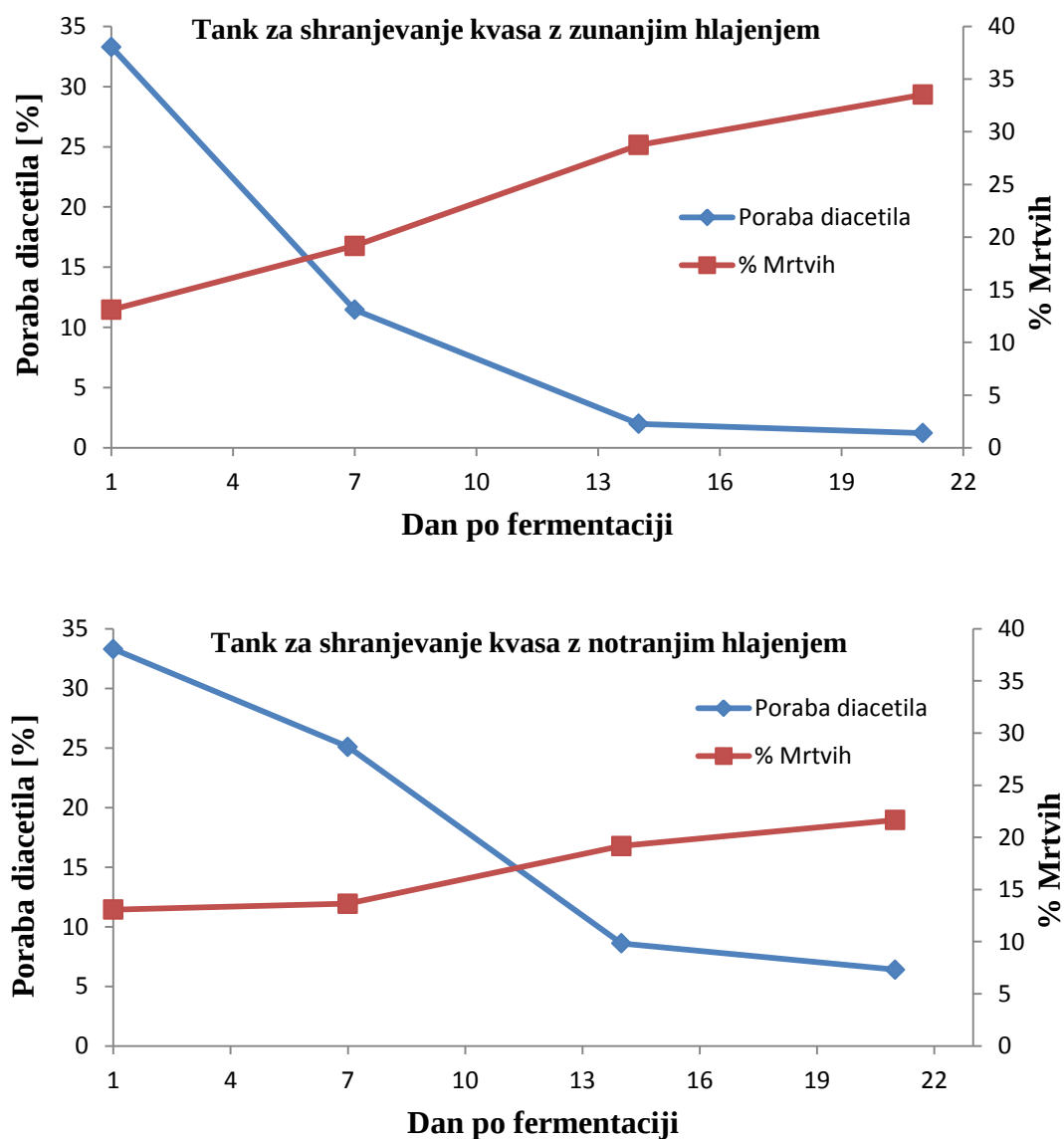
Pri rezultatih iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem se odstotek porabljenega diacetila (Preglednica 15) med 21-dnevnim shranjevanjem kvasovk znižuje bolj postopoma kot v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem (Preglednica 14), in po 21ih dneh se porabi 6,4 % diacetila. Odstotek mrtvih celic (Preglednica 14) se zvišuje podobno kot pri testu zmožnosti zakisanja in testu vitalne titracije. Končni odstotek mrtvih je tako približno 21 %. Kvocien variacije skozi celoten eksperiment, podobno kot pri kvasu iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, narašča in je ob koncu 50,3 %. Upoštevati je potrebno, da kvocien variacije pri nizkih porabah diacetila verjetno ni

zanesljiv podatek o variaciji, saj je napaka izmerjenih visokih koncentracij diacetila s plinskim kromatogramom velika (Preglednica 15).

Na Sliki 14 je prikazana dinamika porabe diacetila določena s testom določanja porabe diacetila kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem. Dinamika sovпада z naraščanjem deleža mrtvih celic v vzorcu. V Prilogah P, Q, R in S so razširjene tabele rezultatov posameznih meritev merjenja koncentracij porabe diacetila za kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, tekom 21-dnevnega eksperimenta. V Prilogah T, U, V in W so razširjene tabele rezultatov posameznih meritev merjenja koncentracij porabe diacetila za kvas iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta. Metoda se je pri manj oslabljenih kvasovkah, zaradi nizkega kvocienta variabilnosti izkazala za statistično zanesljivo. Metoda je bila časovno najmanj potratna, hkrati pa ni bilo potrebno tako temeljito spirati celic zaradi akumulacije kislih produktov, kot pri prejšnjih dveh metodah.

Preglednica 15: Rezultati testa zmožnosti porabe diacetila shranjenega kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem tekom 21-dnevnega eksperimenta.

	Začetni diacetil [nL/L] ± SD	Končni diacetil [nL/L] ± SD	Poraba diacetila [nL/L] ± SD	poraba diacetila [%]	Kvocient variacije porabe diacetila [%]	Konce- ntracija celic [cel/mL]	% mrtvih
1. dan po fermen- taciji	3728 ± 52,9	3506 ± 16,0	1240 ± 52,9	33,3	4,3	1,3*10 ⁸	10,1
7. dan po fermen- taciji	3806 ± 8,1	3850 ± 42,7	956 ± 37,3	25,1	3,9	1,1*10 ⁸	13,6
14. dan po fermen- taciji	3806 ± 91,5	3850 ± 52,7	337 ± 100,9	8,6	29,9	1,2*10 ⁸	19,7
21. dan po fermen- taciji	3928 ± 86,5	3678 ± 59,1	250 ± 125,7	6,4	50,3	1,2*10 ⁸	21,7



Slika 14: Dinamika vitalnosti kvasovk iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim in tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, določena s testom zmožnosti porabe diacetila in naraščanje deleža mrtvih tekom 21-dnevnega eksperimenta.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Magistrsko nalogo smo izvedli z namenom izbire metode za določanje vitalnosti kvasovk v pivovarni. Z izbranimi metodami smo preverili tudi vitalnost kvasovk iz dveh različnih tankov za shranjevanje kvasa, tank za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem pri 7 °C in tank za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, temperatura je bila 4 °C.

5.1 IZBIRA METODE ZA DOLOČANJE VITALNOSTI KVASOVK

5.1.1 Test zmožnosti zakisanja

Za izbiro metode smo uporabili svež kvas po prvi fermentaciji, kvas, ki smo ga predhodno starali sedem dni pri osmih stopinjah Celzija v destilirani vodi in kvas, ki smo ga štiri ure oslabili v osem odstotnem etanolu pri sobni temperaturi. S tem smo želeli preučiti vpliv fiziološkega stanja na vitalnost kvasovk.

Pri testu zmožnosti zakisanja smo ugotovili, da ima najvišjo vrednost zmožnosti zakisanja svež kvas po prvi propagaciji ($2,77 \pm 0,04 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$), sledi mu kvas oslabljen z osem odstotnim etanolom ($2,57 \pm 0,02 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$), najmanj vitalen pa je kvas oslabljen sedem dni pri osmih stopinjah Celzija ($2,54 \pm 0,03 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$) (Preglednica 6). Razlika v začetnem pH pri posameznih meritvah (Slika 6) so nastale zaradi delovanja metabolizma kvasovk med posameznimi ponovitvami, saj je minilo 20 minut med posameznimi ponovitvami, v tem času pa so kvasovke že porabile vso notranjo zalogo energije. Na končne rezultate testa to odstopanje ne vpliva (Sigler in sod., 2006). Pričakovali smo, da bo test zmožnosti zakisanja prikazal večje padce vitalnosti pri oslabljenih vzorcih. Pri štetju celic smo ugotovili, da je bila živost celic pri vzorcu oslabljenim z etanolom 10,2 % (koncentracija celic $1,3 \cdot 10^8$ celic/mL, pri vzorcu oslabljenim sedem dni v vodi pa 7,5 % (koncentracija celic $1,7 \cdot 10^8$ celic/mL) (Preglednica 6). Razvidno je, da kljub manjšemu številu celic ter višjem odstotku mrtvih celic pri vzorcu oslabljenem z etanolom vrednost zmožnosti zakisanja dosega višjo stopnjo, kot pri vzorcu oslabljenem sedem dni v vodi. Iz tega lahko sklepamo, da etanol bolj vpliva na živost celic kot na vitalnost, in da s shranjevanjem kvasovk v destilirani vodi pri 8 °C bolj vplivamo na vitalnost kvasovk kot na živost. Kvocient variacije je pri vseh treh vzorcih nizek, iz česar smo sklepali, da so rezultati pridobljeni z metodo zmožnosti zakisanja statistično zanesljivi (Preglednica 6). Metoda je ponovljiva in natančna, za še manjši vpliv zunanjih dejavnikov pa bi verjetno potrebovali avtomatski grelec in natančnejše avtomatske pipete, da bi pri vsaki ponovitvi vzorca imeli popolnoma iste pogoje.

Po pregledu objav drugih avtorjev smo ugotovili, da je naš vzorec kvasovk po prvi uporabi vitalen. Gabriel in sodelavci (2008) navajajo, da je kvas, ki ima vrednost zmožnosti zakisanja od 2,4 do $2,7 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$ vitalen, ter da ima posledično dober fermentacijski potencial. Če zmožnost zakisanja pade pod $2 \Delta \text{pH}/20 \text{ min}$, potem imamo opravka s kvasovkami, ki imajo omejene metabolne sposobnosti. Če je zmožnost zakisanja pod 1,8, pa to lahko vodi v zelo počasno fermentacijo. Vseeno so vrednosti zmožnosti zakisanja odvisne od posameznega seva (Gabriel in sod., 2008).

5.1.2 Test vitalne titracije

Uporabili smo enake vzorce kvasovk kot pri testu zmožnosti zakisanja. Iz preglednice 7 je razvidno, da, ima najvišji kvasni metabolni indeks (KMI) vzorec svežih kvasovk po prvi propagaciji ($6,63 \pm 2,9 \mu\text{mol NaOH/min}$), zelo malo je upadel KMI vzorcu kvasovk oslavljenih sedem dni v destilirani vodi ($6,45 \pm 2,8 \mu\text{mol NaOH/min}$), Kvasni metabolni indeks pri vzorcu oslavljenem z etanolom pa je padel na $3,38 \pm 1,5 \mu\text{mol NaOH/min}$. Rezultati kažejo, da je najmanj vitalen kvas oslavljen z etanolom. Pri vzorcu kvasovk oslavljenim sedem dni pri 8°C namreč vitalnost zelo malo upade (le za $0,18 \mu\text{mol NaOH/min}$). Tako velika razlika v KMI je verjetno posledica dejstva, da se pri metodi vitalne titracije ne uporablja zunanji vir sladkorja in da lahko kvasovka porablja le notranje zaloge glikogena. Pri sobni temperaturi pa metabolizem kvasovke deluje veliko hitreje kot pri 8°C , zato je rezultat pri kvasovkah oslavljenih z etanolom toliko nižji kot pri kvasu, ki smo ga sedem dni shranili pri 8°C , kar potrjujejo tudi ugotovitve Gonçalves Rodrigues-a in sodelavcev (2004). Najvišji delež mrtvih celic je pri vzorcu kvasovk, oslavljenih z etanolom. Rezultati štetja mrtvih celic so skladni z rezultati štetja mrtvih celic pri testu zmožnosti zakisanja (Preglednici 6 in 7). Rezultati kažejo na povezanost odstotka mrtvih celic s testom vitalne titracije, saj je pri kvasu oslavljenem z etanolom najnižji kvasni metabolni indeks, vzorec pa ima tudi največji odstotek mrtvih celic (9,5 %). Sledi mu vzorec staranega kvasa v destilirani vodi (7,2 %), najmanj mrtvih celic pa je pri svežem kvasu (5,8 %), ki ima tudi najvišji kvasni metabolni indeks. Bleoancă in sodelavci (2013) prav tako navajajo, da metoda vitalne titracije prikaže večji upad vitalnosti pri etanolnem stresu, kot pri drugih stresnih dejavnikih. Kvocien variacije je bil pri vseh treh vzorcih razmeroma visok (okoli 44 %), kar kaže na statistično nezanesljivost pridobljenih rezultatov (Preglednica 7).

Metoda je ponovljiva in natančna, za še manjši vpliv zunanjih dejavnikov pa bi verjetno potrebovali avtomatski grelec in avtomatski titrator, da bi pri vsaki ponovitvi vzorca imeli popolnoma iste pogoje. Ker etanol zelo vpliva na rezultate testa vitalne titracije, lahko rečemo, da test zmožnosti zakisanja bolj natančno pokaže dejansko vitalnost kot test vitalne titracije.

5.1.3 Test zmožnosti porabe diacetila

Tudi pri tem testu smo uporabili enake vzorce kvasovk, kot pri testu zmožnosti zakisanja in testu vitalne titracije. Ugotovili smo (Preglednica 8), da največ diacetila porabi vzorec svežega kvasa (39 %). Vzorec kvasovk, ki smo jih starali 7 dni pri 8°C porabi 25,3 % začetne koncentracije diacetila, najmanj diacetila pa porabi vzorec, ki smo ga oslabili z 8 % etanolom pri sobni temperaturi (23,4 %). Kvocien variacije je bil pri vzorcu svežega kvasa 8,4 %, kar je statistično bolj zanesljivo kot pri vzorcih oslavljenega kvasa in staranega kvasa, kjer je bil kvocien variacije 16,3 % (Preglednica 8). Rezultati štetja mrtvih celic iz Preglednice 8 se skladajo s štetjem pri prejšnjih dveh metodah (Preglednici 6 in 7), in potrjujejo, da največ celic odmre pri slabljenju z 8 % alkoholom. Rezultati kažejo, da etanol najbolj oslabi celice kvasovk, ter da so najbolj vitalne kvasovke po prvi zaporedni uporabi pri fermentaciji piva. To je pričakovano, saj Boulton in sodelavci (2001) navajajo, da kvasovke, ki imajo na voljo največ kisika, porabijo tudi največ diacetila. Kisik je namreč potreben za sintezo sterolov v celični membrani. Steroli so nujno potrebni za normalno delovanje celične membrane. Če celična membrana ni poškodovana, lahko privzame tudi več diacetila. Pri vzorcu kvasovk oslavljenim z etanolom pa je tak padec v

porabi verjetno povzročil etanol, ki je poškodoval celično membrano in tako otežil aktiven prehod diacetila skozi celično membrano. Pri staranih kvasnih celicah je posledica padca vitalnosti verjetno osmotski stres med staranjem kvasovk v destilirani vodi. Kvocien korelacije je pri merjenju porabe diacetila pri svežem kvasu 8,4 %, kar kaže na večjo statistično zanesljivost rezultata kot pri ostalih dveh vzorcih kvasovk, kjer je kvocien variacije 16,3 % (Preglednica 6).

Metoda je zelo ponovljiva in natančna, vpliv zunanjih dejavnikov je manjši kot pri prejšnjih dveh metodah. Časovno je metoda merjenja porabe diacetila tudi manj zahtevna od metod vitalne titracije in metode zmožnosti zakisanja.

5.2 DOLOČITEV TEMPERATURE IN ČASA ZA ODMRTJE KVASOVK

Gonçalves Rodrigues in sodelavci (2004) so ugotovili, da po 20 minutah inkubacije pri 60 °C vse celice kvasovke spodnjega vrenja NCYC 1324 (Brewing Research International, U. K.) odmrejo. Naši rezultati testiranja seva C16 pa kažejo odmrtje vseh celic po 20 minutni inkubaciji pri 80 °C (Slika 8).

5.3 PREVERJANJE METABOLNE NEAKTIVNOSTI MRTVIH CELIC S TREMI METODAMI

Gonçalves Rodrigues in sodelavci (2004) so dokazali, da pri testu vitalne titracije ob uporabi mrtvih kvasovkah ne pride do sprememb pH. Kontrolna eksperimenta, pri katerih smo za test vitalne titracije in test zmožnosti zakisanja uporabili mrtve kvasovke, sta pokazala, da tudi obe naši uporabljeni metodi delujeta (Slika 9). Pri testu vitalne titracije in testu zmožnosti zakisanja namreč ni prišlo do spremembe začetnega pH, kar pomeni, da na spremembo pH pri testu vplivajo le kvasovke. Boulton in sodelavci (2001) so dokazali, da morajo biti za porabo diacetila iz vzorca prisotne kvasovke. Prav tako so dokazali, da pri vzorcih brez diacetila ne pride do barvne spremembe, torej da pri testu sodeluje le diacetil, ki so ga dodali sami. Pri našem testu porabe diacetila (Preglednica 9) pri vzorcih z vodo, ter z vodo in s kvasom ni prišlo do sprememb v koncentracijah diacetila, saj je bila povsod enaka nič. To pomeni, da voda ne vsebuje diacetila, kakor tudi ne mrtve kvasovke. Pri kontrolnem eksperimentu, pri katerem smo uporabili samo diacetil in vodo pride do minimalne porabe diacetila (0,2 odstotka), kar pa lahko pripišemo izhlapevanju, saj je diacetil zelo hlapna snov. Iz tega lahko zaključimo, da tudi test zmožnosti porabe diacetila deluje, saj je poraba diacetila odvisna le od metabolne aktivnosti kvasovk.

Pri vseh treh metoda smo dokazali, da so za spremembe končnih parametrov posameznega testa potrebne kvasovke, kar pomeni, da vse tri metode uporabne pri določanju vitalnosti kvasovk.

5.4 SPREMLJANJE PADCA VITALNOSTI KVASOVK IZ TANKA ZA SHRANJEVANJE KVASA Z ZUNANJIM IN TANKA ZA SHRANJEVANJE KVASA Z NOTRANJIM HLAJENJEM

5.4.1 Test zmožnosti zakisanja

S testom zmožnosti zakisanja smo spremljali vitalnost kvasovk, prvi dan po šesti zaporedni fermentaciji, tekom 21-dnevnega eksperimenta (Preglednici 10 in 11) v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tanku za shranjevanje kvasa z notranjim

hlajenjem. Vitalnost je pri obeh vzorcih padla, pri čemer je pričakovano veliko hitreje padla vitalnost kvasu iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Spremljali smo tudi odstotek mrtvih celic (Preglednici 10 in 11) in ugotovili, da se odstotek mrtvih celic tekom celotnega eksperimenta povečuje, kar je pričakovano. To kaže na to, da hlajenje kvasne brozge pri 3 °C v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem veliko bolj ohranja vitalnost in živost kvasovk, kot hlajenje pri 6-8 °C v tanku za shranjevanje kvasovk z zunanjim hlajenjem. Annemüller in sodelavci (2011) navajajo, da je najbolj optimalna temperatura shranjevanja kvasne brozge od 1 °C do 4 °C. Pri višjih temperaturah shranjevanja se poveča vsebnost maščobnih kislin, nastane več proteinaze A, ki negativno vpliva na peno pri pivu, zniža se vsebnost vodikovih ionov ter poveča se vsebnost celičnih strupov, kar vse vpliva na vitalnost in živost kvasovk. Pri temperaturah shranjevanja pod 0 °C se v celicah kvasovk pojavijo kristali, ki poškodujejo celične membrane. Med shranjevanjem kvasovk v kvasnih tankih se porablja glikogen, notranja zaloga energije kvasovke. Pri shranjevanju kvasovk pri nižji temperaturi (1 °C) se porabi manj glikogena, kot pri višji temperaturi shranjevanja kvasovk (5 °C) (Rotar in Stoicescu., 2006). V mnogih pivovarnah se uporablja tudi zmerno mešanje kvasne brozge, da se zagotovi enakomerna temperatura celotne brozge, saj se lahko v nasprotnem primeru temperatura v središču kvasne brozge nekontrolirano poveča (Kunze in sod., 2010).

Rezultati uporabljene metode so imeli zelo nizke kvociente variacije (Preglednici 10 in 11), kar kaže na veliko statistično zanesljivost metode. Rezultati metode se skladajo z literaturo (Rotar in Stoicescu, 2006; Sigler in sod., 2006). Minus pri metodi predstavlja velik vpliv človeškega dejavnika, saj se pri spiranju kvasovk, segrevanju kvasne brozge in pipetiranju lahko zgodijo signifikantne napake.

5.4.2 Test vitalne titracije

S testom vitalne titracije smo poskušali določiti padec vitalnosti kvasovkam, prvi dan po šesti zaporedni fermentaciji, shranjenim 21 dni v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem in tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Rezultati pričakovano kažejo na padec vitalnosti kvasovk, še posebej hitro se vitalnost zniža kvasu iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem (Preglednici 12 in 13). Tudi živost celic je padala hitreje pri kvasu iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem kot pri kvasu iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem. Gonçalves Rodrigues in sodelavci (2004) so pokazali, da shranjevanje kvasne brozge pri 5 °C veliko manj prizadene vitalnost celic kot shranjevanje pri 12 °C. Pokazali so, da je vitalnost kvasovk ob shranjevanju pri 4 °C 35. dan enaka kot vitalnost pri 12 °C 8. dan. Ugotovili so, da je z metodo vitalne titracije lažje zaznati spremembe vitalnosti kvasovk v prvih dneh po fermentaciji, z metodo zmožnosti zakisanja pa je lažje zaznati spremembe vitalnosti dalj časa po fermentaciji.

Rezultati metode se skladajo s pričakovanji. Kvocien variacije (Preglednici 12 in 13) je pri vseh ponovitvah nizek, kar kaže na statistično zanesljivost rezultatov. Tudi pri tej metodi minus predstavlja velik vpliv človeškega dejavnika. Metoda je tudi časovno zelo potratna, vzorce pa moramo testirati takoj po spiranju, kar pri metodi zmožnosti zakisanja ni potrebno.

5.4.3 Test porabe diacetila

Kvasovke smo prvi dan po šesti fermentaciji shranili za 21 dni v tank za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem in tank za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem (Preglednici 14 in 15). Tekom eksperimenta smo tedensko opravljali meritve porabe diacetila, ter nato izračunali vitalnost kvasovk. Kot pri prejšnjih dveh metodah smo ugotovili, da kvasovke iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem ohranjajo vitalnost dlje kot kvasovke iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem. Prav tako smo spremljali živost celic (Preglednici 14 in 15) in ugotovili, da pada podobno kot pri meritvah ostalih dveh metod in prav tako kaže na veliko bolj ugodne pogoje shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem v primerjavi s kvasnim tankom z zunanjim hlajenjem.

Kvocient variacije narašča z zmanjšano porabo diacetila. Pri zelo oslabljenih kvasovkah je kvocient variacije pričakovano visok, saj kvasovke porabijo zelo malo diacetila, posledično pa se napake pri meritvah plinskega kromatografa bolj poznajo na rezultatih.

Test porabe diacetila se je pri manj oslabljenih kvasovkah izkazal kot najbolj zanesljiv in najpreprostejši za uporabo. Na izvedbo testa ne vplivajo produkti metabolizma kvasovk med shranjevanjem. Pri rutinskem delu s kvasovkami v pivovarni ponavadi nimamo opravka s preveč oslabljenimi kvasovkami, tako da bi metodo določanja porabe diacetila lahko rutinsko uporabljali. Prav tako je pri testu porabe diacetila vpliv človeškega dejavnika manjši kot pri ostalih dveh metodah, saj je merjenje diacetila avtomatizirano. Pri tej metodi lahko vzorce kvasovk shranimo do testiranja in jih ni potrebno testirati takoj, kot pri testu vitalne titracije. Pri metodi zmožnosti porabe diacetila lahko tudi analiziramo veliko število vzorcev naenkrat, kar pri metodi vitalne titracije in testu zmožnosti zakisanja ni mogoče.

6 SKLEPI

Iz rezultatov našega raziskovalnega dela se lahko sklepa naslednje:

- S kontrolnimi eksperimenti smo potrdili, da metoda vitalne titracije, metoda določanja zmožnosti zakisanja in metoda določanja porabe diacetila delujejo, saj le žive kvasovke vplivajo na spremembe testiranih parametrov.
- Ugotovili smo, da so vse tri metode nezahtevne za delo v laboratoriju.
- Ugotovili smo, da je pri vzorcih z višjo živostjo tudi vitalnost kvasovk višja.
- Kot najprimernejša metoda spremljanja vitalnosti kvasovk se je izkazala metoda merjenja porabe diacetila, ker pridobimo zanesljive rezultate hitro in z minimalnim vplivom človeškega dejavnika.
- Ugotovili smo, da je metoda vitalne titracije manj primerna, saj je potrebno eksperimente izvesti takoj po odvzemu vzorca, medtem ko lahko pri testu zmožnosti zakisanja in testu porabe diacetila vzorce shranimo do analize. Test zmožnosti zakisanja in test vitalne titracije sta manj zanesljiva zaradi vpliva človeškega dejavnika in zaradi časovne potratnosti, saj lahko sočasno analiziramo le majhno število vzorcev.
- Kvasovke iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem ohlajene na 4 °C ohranjajo boljšo vitalnost kot kvasovke iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, ohlajene na 7 °C.

7 POVZETEK

Namen magistrskega dela je bil ugotoviti uporabnost različnih metod za določanje vitalnosti kvasovk *Saccharomyces pastorianus* v pivovarni. Za določanje vitalnosti kvasovkam smo uporabili tri različne metode: metodo vitalne titracije, metodo določanja zmožnosti zakisanja in metodo ugotavljanja porabe diacetila.

Najprej smo pripravili čisto kvasno kulturo, ki smo jo potem uporabili pri nadaljnjih eksperimentih. Nato smo naredili kontrolne teste, da smo ugotovili ali metode delujejo. Določiti smo morali čas in temperaturo, da smo pridobili metabolno neaktivne kvasovke. Izkazalo se je, da so pri temperaturi 80 °C za 20 minut mrtve vse celice kvasovk. S kontrolnimi testi smo ugotovili, da vse tri metode delujejo. Vse tri metode smo nato preizkusili na kvasovkah prvi dan po prvi fermentaciji. Uporabili smo svež kvas, kvas oslavljen z 8 % etanolom za 4 ure pri sobni temperaturi in kvas, ki smo ga starali 7 dni v destilirani vodi pri 8 °C. Ugotovili smo, da vse tri metode pokažejo najvišjo vitalnost pri svežem kvasu, s slabljenjem pa se vitalnost pričakovano zmanjša pri vseh treh metodah. Metoda zmožnosti porabe diacetila je pokazala največji padec vitalnosti oslavljenega kvasa. Pri metodi vitalne titracije smo ugotovili, da je največji padec vitalnosti zaznati pri oslavljenem kvasu, ki smo ga shranjevali sedem dni na sobni temperaturi, kar je verjetno posledica velike porabe notranje zaloge energije-glikogena med samim shranjevanjem. Poleg testov vitalnosti smo spremljali tudi živost kvasovk in ugotovili, da so vzorci kvasovk z višjo živostjo tudi bolj vitalni.

Vse tri metode smo preizkusili tudi na kvasu prvi dan po šesti fermentaciji, ki smo shranjevali v dveh tehnološko različnih tankih za shranjevanje kvasa 21 dni, in sicer v tanku z notranjim hlajenjem, kjer je bila temperatura 4 °C in v tanku z zunanjim hlajenjem, kjer je bila temperatura shranjevanja kvasovk 7 °C. Vitalnost smo spremljali 1., 7., 14. in 21. dan po fermentaciji. Vitalnost kvasovk je pri vseh treh metodah veliko hitreje padla pri tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, kjer je bila temperatura 7 °C, kot pri tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, kjer je bila temperatura 4 °C. Pri bolj vitalnih vzorcih kvasa je bila pričakovano tudi živost celic višja.

Z vsemi tremi metodami smo pridobili pričakovane rezultate. Metoda določanja porabe diacetila se nam je zdela najbolj uporabna, saj je bila najmanj zahtevna za izvedbo, poleg tega pa smo pri tej metodi lahko analizirali največ vzorcev naenkrat.

8 VIRI

- Alfa Laval. 2014. Scandi brew ® Carlsberg flask. Stockholm, Alfa Laval: 2 str.
www.alfalaval.com/solution-finder/products/scandi-brew-carlsberg%20flask/Documents/Scandi%20Brew%20Carlsberg%20flask.pdf (april, 2014)
- Annemüller G., Manger H.J., Lietz P. 2011. The yeast in the brewery: Management, pure yeast cultures, propagation. 1st ed. Berlin, VLB: 440 str.
- Boisen S. 2005. Precise and objective cell counting. BIOforum Europe, 4: 38-39
- Bolat I. 2008. The importance of trehalose in brewing yeast survival. Innovative Romanian Food Biotechnology, 2: 1-10
- Bleoancă I., Borda D. 2013. Vialtitration used for predicting fermentation performance of ethanol stressed brewing yeast. Innovative Romanian Food Biotechnology, 12: 84-91
- Bouix M., Leveau J.Y. 2001. Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. Journal of the Institute of Brewing, 107, 4: 217-225
- Boulton C.A., Quain D.F., Molzahn S.W. 2001. Vicinal diketone reduction as a measure of yeast vitality. Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas, 38, 2: 89-93
- De Deken R.H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. Journal of General Microbiology, 44, 1: 149-156
- Dunn B., Sherlock G. 2008. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. Genome Research, 18, 10: 1610-1623
- Gabriel P., Dienstbier M., Matoulková D., Kosař K., Sigler K. 2008. Optimised acidification power test of yeast vitality and its use in brewing practice. Journal of the Institute of Brewing, 114, 3: 270-276
- Gonçalves Rodrigues P., Barros A., Rodrigues J., Ferreira A., Gonçalves C., Hammond J. 2004. Vialtitration: a new method for assessment of yeast vitality. Technical Quarterly-Master Brewers Association of the Americas, 41, 3: 277-281
- Guldfeldt L.U., Arnfborg N. 1998. The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. Journal of the Institute of Brewing, 104, 1: 37-39

- 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. Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas, 37, 4: 409-430
- Hornsey I. 2013. Brewing. 2nd ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 332 str.
- Imai T., Ohno T. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 10: 3604-3608
- Jenkins C.L., Kennedy A.I., Hodgson J.A., Thurston P., Smart K.A. 2003. Impact of serial repitching on lager brewing yeast quality. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 61, 1: 1-9
- Kobayashi K., Kusaka K., Takahashi T., Sato K. 2005. Method for the simultaneous assay of diacetyl and acetoin in the presence of α -acetolactate: Application in determining the kinetic parameters for the decomposition of α -acetolactate. Journal of Bioscience and Bioengineering, 99, 5: 502-507
- Kunze W., Manger H.J., Pratt S. 2010. Technology brewing & malting. 4th ed. Berlin, VLB: 1074 str.
- Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 35: 14539-14544
- Linko M., Haikara A., Ritala A., Penttilä M. 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. Journal of Biotechnology, 65, 2: 85-98
- McGovern P.E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G.R., Meoreau R., Nunez A., Butrym E.D., Richards P.M., Cheng G., Wang C.S., Cheng G., Zhao Z., Wang C. 2004. Fermented beverages of pre-and proto-historic China. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 51: 17593-17598
- Mochaba F. M., O'Connor-Cox E. S. C. and Axcell B. C. 1997, A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. Journal of the Institute of Brewing, 103, 2: 99-102
- Nakao Y., Kanamori T., Itoh T., Kodama Y., Rainieri S., Nakamura N., Shimonaga T., Hattori M., Ashikari T. 2009. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. DNA Research, 16, 2: 115-129
- 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 Research, 3, 2: 149-157

- Rai M., Bridge P.D. 2009. Applied mycology. Wallingford, CABI Publishing: 318 str.
- Rotar R., Stoicescu A.G. 2006. Modified acidification power test applied to evaluate temperature and ethanol stress impact on yeast fermentation performance. Journal of Agroalimentary Processes and Technology, 12, 5: 481-488
- Sigler K., Mikyška A., Kosař K., Gabriel P., Dienstbier M. 2006. Factors affecting the outcome of the acidification power test of yeast quality: Critical reappraisal. Folia Microbiologica, 51, 6: 525-534
- Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J., Stanley G.A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, 109, 1: 13-24
- Stopar D., Stres B., Mahne I. 2009. Praktikum iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-13
- Toussaint-Samat M. 1994. A history of food. New York, Wiley: 824 str.
- Yamauchi Y., Okamoto T., Murayama H., Kajino K., Nagara A., Noguchi K. 1995. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. Journal of Biotechnology, 38, 2: 109-116

ZAHVALA

Zahvaljujem se podjetju Pivovarna Union D. D., Ljubljana, ki mi je omogočilo opravljanje praktičnega dela magistrske naloge. Posebna zahvala gre g. Domnu Verbiču iz proizvodnje piva, direktorici službe kakovosti ge. Ireni Lenarčič in g. Janezu Kešnarju, svetovalcu za kakovost Skupine Laško.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Neži Čadež za prevzem mentorstva in nasvete pri izvedbi magistrske naloge.

Nadvse pa se iz srca zahvaljujem svojim najdražjim za potrpežljivost in podporo tekom celotnega študija.

PRILOGE

Priloga A: Test zmožnosti zakisanja kvasovk v različnih fizioloških stanjih.

	Svež kvas	Staran kvas, 7 dni, 8 °C, dH ₂ O	Oslabljen kvas, 4 ure, ST, 8 % etanol
Zmožnost zakisanja 1	2,74	2,5	2,55
Zmožnost zakisanja 2	2,82	2,55	2,6
Zmožnost zakisanja 3	2,75	2,57	2,55
Povp. kvasni metabolni indeks ± SD*	2,77± 0,04	2,54± 0,03	2,57± 0,02
Kvocient variacije [%]	1,28	1,16	0,92
Povprečno število [celic/mL]	1,8*10 ⁸	1,7*10 ⁸	1,3*10 ⁸
Povprečen % mrtvih	5,1	7,5	10,2

Enote zmožnosti zakisanja so Δ pH/20 min

Priloga B: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih kvasovk pri testu zmožnosti zakisanja.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% mrtvih	Povprečno število [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
Svež kvas 1	1,90*10 ⁸	4,9	1,8*10 ⁸	5,1
Svež kvas 2	2,00*10 ⁸	4,9		
Svež kvas 3	1,40*10 ⁸	5,6		
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 1	1,80*10 ⁸	6,8	1,7*10 ⁸	7,5
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 2	1,50*10 ⁸	8,8		
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 3	1,80*10 ⁸	6,9		
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 1	1,30*10 ⁸	10,0	1,3*10 ⁸	10,2
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 2	1,20*10 ⁸	10,8		
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 3	1,40*10 ⁸	9,9		

Priloga C: Tabela rezultatov izbire metode testa zmožnosti zakisanja.

	Staran kvas, 7 dni, 8 °C, dH ₂ O			Oslabljen kvas, 4h, 8 % EtOH			Svež kvas		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Čas [s]	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
1	4,97	/	/	4,97	/	/	/	/	/
60	4,852	4,823	4,735	4,59	4,407	4,331	4,45	3,71	3,89
120	4,789	4,745	4,674	4,587	4,293	4,328	4,4	3,72	3,89
180	4,768	4,73	4,658	4,628	4,287	4,36	4,39	3,72	3,89
240	4,756	4,714	4,651	4,6	4,292	4,381	4,31	3,72	3,9
300	4,747	4,708	4,645	4,588	4,294	4,36	4,25	3,72	3,91
360	4,74	4,702	4,644	4,587	4,301	4,389	4,15	3,72	3,91
420	4,735	4,699	4,644	4,55	4,309	4,399	4,14	3,72	3,92
480	4,73	4,695	4,644	4,508	4,315	4,307	4,13	3,72	3,92
540	4,727	4,691	4,644	4,461	4,32	4,368	4,12	3,72	3,92
600	4,725	4,686	4,644	4,424	4,332	4,361	4,1	3,72	3,92
660	4,702	4,694	4,655	4,376	4,323	4,313	4,09	3,63	3,83
720	4,504	4,49	4,643	4,168	4,061	4,121	3,99	3,59	3,74
780	4,194	4,15	4,32	4,039	3,957	4,019	3,98	3,56	3,69
840	4,066	4,019	4,067	3,964	3,91	3,961	3,96	3,54	3,67
900	3,989	3,942	3,966	3,91	3,859	3,917	3,91	3,52	3,63
960	3,9	3,884	3,896	3,865	3,819	3,878	3,82	3,51	3,61
1020	3,881	3,831	3,839	3,833	3,782	3,843	3,63	3,49	3,59
1080	3,845	3,803	3,789	3,808	3,75	3,811	3,58	3,49	3,56
1140	3,818	3,774	3,758	3,777	3,72	3,78	3,565	3,48	3,55
1200	3,795	3,748	3,727	3,752	3,693	3,754	3,56	3,48	3,55

Priloga D: Rezultati testa vitalne titracije testa kvasovk v različnih fizioloških stanjih.

	Svež kvas	Staran kvas, 7 dni, ST, dH ₂ O	Oslabljen kvas, 4 ure, ST, 8 % etanol
Kvasni metabolni indeks 1	5,94	6,19	3,52
Kvasni metabolni indeks 2	7,44	6,33	3,3
Kvasni metabolni indeks 3	6,5	6,83	3,31
Povp. kvasni metabolni indeks ± SD	6,63 ± 2,9	6,45 ± 2,8	3,38 ± 1,5
Kvocienit variacije [%]	44,0	43,5	43,3
Povprečno število [celic/mL]	1,9*10 ⁷	2,1*10 ⁷	1,5*10 ⁷
Povprečen % mrtvih	5,8	7,2	9,5

Enote KMI so µmoli dodanega NaOH/min.

Priloga E: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih kvasovk pri testu vitalne titracije.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% mrtvih	Povprečno število [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
Svež kvas 1	1,7*10 ⁷	5,7	1,9*10 ⁷	5,8
Svež kvas 2	2*10 ⁷	6		
Svež kvas 3	2*10 ⁷	5,7		
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 1	2*10 ⁷	7	2,1*10 ⁷	7,2
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 2	2*10 ⁷	7		
Staran kvas (7 dni, 8 °C) 3	2,2*10 ⁷	7,7		
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 1	1,5*10 ⁷	9,3	1,5*10 ⁷	9,5
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 2	1,5*10 ⁷	9,3		
Oslabljen kvas (8 % etanol, 4h, sobna T.) 3	1,5*10 ⁷	10,0		

Priloga F: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

	TZK zunanje hlajenje, 1. dan	TZK zunanje hlajenje, 7. dan	TZK zunanje hlajenje, 14. dan	TZK zunanje hlajenje, 21. dan
Zmožnost zakisanja 1	2,25	1,41	1,5	1,19
Zmožnost zakisanja 2	2,21	1,32	1,52	1,14
Povprečna zmožnost zakisanja $\pm$ SD	$2,23 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,03$
Kvocien variacije [%]	0,90	3,28	0,66	2,14
Povprečno število [celic/mL]	$1,60 \cdot 10^8$	$1,51 \cdot 10^8$	$1,40 \cdot 10^8$	$1,35 \cdot 10^8$
Povprečen % mrtvih	10,7	18,3	32,7	47,1

Enote zmožnosti zakisanja so Δ pH/20 min; TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga G: Rezultati štetja celic in odstotek mrtvih celic pri testu zmožnosti zakisanja iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% Mrtvih	Povprečno število celic [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	$1,7 \cdot 10^8$	10,0	$1,60 \cdot 10^8$	10,7
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	$1,5 \cdot 10^8$	11,3		
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	$1,52 \cdot 10^8$	18,4	$1,51 \cdot 10^8$	18,3
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	$1,51 \cdot 10^8$	18,2		
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	$1,4 \cdot 10^8$	32,9	$1,40 \cdot 10^8$	32,7
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	$1,4 \cdot 10^8$	32,7		
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	$1,3 \cdot 10^8$	48,5	$1,35 \cdot 10^8$	47,1
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	$1,4 \cdot 10^8$	45,7		

TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga H: Rezultati testa zmožnosti zakisanja shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

	TZK notranje hlajenje, 1. dan	TZK notranje hlajenje, 7. dan	TZK notranje hlajenje, 14. dan	TZK notranje hlajenje, 21. dan
Zmožnost zakisanja 1	2,25	1,93	1,68	1,31
Zmožnost zakisanja 2	2,21	1,93	1,68	1,3
Povprečna zmožnost zakisanja ± SD	2,23 ± 0,02	1,93 ± 0,00	1,68 ± 0,00	1,31 ± 0,01
Kvocien variacije [%]	0,90	0,00	0,90	0,38
Povprečno število [celic/mL]	1,60*10 ⁸	1,75*10 ⁸	1,40*10 ⁸	1,8*10 ⁸
Povprečen % mrtvih	10,7	12,2	18,3	20,1

Enote zmožnosti zakisanja so Δ pH/20 min; TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga I: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu zmožnosti zakisanja iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% Mrtvih	Povprečno število celic [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	1,7*10 ⁸	10	1,60*10 ⁸	10,7
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	1,5*10 ⁸	11,3		
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	1,8*10 ⁸	12,2	1,75*10 ⁸	12,2
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	1,7*10 ⁸	12,1		
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	1,8*10 ⁸	18,3	1,40*10 ⁸	18,3
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	1,8*10 ⁸	18,3		
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	1,8*10 ⁸	20	1,8*10 ⁸	20,1
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	1,8*10 ⁸	20,1		

TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga J: Rezultati testa vitalne titracije shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

	TZK zunanje hlajenje, 1. dan	TZK zunanje hlajenje, 7. dan	TZK zunanje hlajenje, 14. dan	TZK zunanje hlajenje, 21. dan
Kvasni metabolni indeks 1	3,59	2,77	1,08	0,43
Kvasni metabolni indeks 2	3,4	2,78	1,07	0,41
Povprečni kvasni metabolni indeks $\pm$ SD	$3,49 \pm 0,10$	$2,78 \pm 0,00$	$1,08 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$
Kvocient variacije [%]	2,72	0,18	0,46	2,38
Povprečno število [celic/mL]	$1,65 \cdot 10^7$	$1,85 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$
Povprečen % mrtvih	10,7	20,1	30,0	38,6

Enote kvasnega metabolnega indeksa so μ mol/dodanega NaOH/min; TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga K: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu vitalne titracije iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% Mrtvih	Povprečno število celic [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
TZK notranje hlajenje, 1. dan	$1,6 \cdot 10^7$	10	$1,65 \cdot 10^7$	10,7
TZK notranje hlajenje, 1. dan	$1,7 \cdot 10^7$	11,3		
TZK notranje hlajenje, 7. dan	$1,9 \cdot 10^7$	20	$1,85 \cdot 10^7$	20,1
TZK notranje hlajenje, 7. dan	$1,8 \cdot 10^7$	20,1		
TZK notranje hlajenje, 14. dan	$2,4 \cdot 10^7$	30	$1,40 \cdot 10^8$	30,0
TZK notranje hlajenje, 14. dan	$2,2 \cdot 10^7$	30		
TZK notranje hlajenje, 21. dan	$2,0 \cdot 10^7$	39,5	$2,1 \cdot 10^7$	38,6
TZK notranje hlajenje, 21. dan	$2,2 \cdot 10^7$	37,7		

TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga L: Rezultati testa vitalne titracije shranjevanja kvasa v tanku za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

	TZK notranje hlajenje, 1. dan	TZK notranje hlajenje, 7. dan	TZK notranje hlajenje, 14. dan	TZK notranje hlajenje, 21. dan
Kvasni metabolni indeks 1	3,59	2,75	0,81	0,74
Kvasni metabolni indeks 2	3,4	3,14	0,81	0,69
Povprečni kvasni metabolni indeks $\pm$ SD	$3,5 \pm 0,10$	$2,95 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,00$	$0,72 \pm 0,03$
Kvocien variacije [%]	2,71	6,61	0,00	3,47
Povprečno število [celic/mL]	$1,65 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^8$	$2,10 \cdot 10^7$
Povprečen % mrtvih	10,7	12,6	20,0	21,0

Enote KMI so μ moli dodanega NaOH/min; TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga M: Rezultati koncentracije celic in odstotek mrtvih celic pri testu vitalne titracije iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem med 21-dnevnim eksperimentom.

Vzorec	Koncentracija celic [celic/mL]	% Mrtvih	Povprečno število celic [celic/mL]	Povprečen % mrtvih
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	$1,6 \cdot 10^7$	10	$1,65 \cdot 10^7$	10,7
TZK zunanje hlajenje, 1. dan	$1,7 \cdot 10^7$	11,3		
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	$1,6 \cdot 10^7$	13,3	$1,65 \cdot 10^7$	12,6
TZK zunanje hlajenje, 7. dan	$1,7 \cdot 10^7$	11,8		
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	$1,6 \cdot 10^7$	20	$1,40 \cdot 10^8$	20,0
TZK zunanje hlajenje, 14. dan	$1,7 \cdot 10^7$	20		
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	$1,6 \cdot 10^7$	21	$2,10 \cdot 10^7$	21,0
TZK zunanje hlajenje, 21. dan	$1,7 \cdot 10^7$	21		

TZK: tank za shranjevanje kvasa

Priloga N: Tabela z rezultati kontrole testa
zmožnosti zakisanja.

čas [min]	pH
1	6,575
2	6,592
3	6,595
4	6,595
5	6,596
6	6,598
7	6,599
8	6,598
9	6,6
10	6,601
11	6,601
12	6,6
13	6,6
14	6,602
15	6,601
16	6,599
17	6,598
18	6,601
19	6,599
20	6,6

Priloga O: Tabela z rezultati
kontrole testa vitalne titracije.

čas [min]	pH
1	10
5	10,001
10	10,001
15	10,002
20	10,001
25	10,003
30	10
35	10,001
40	10
45	10,003
50	10,004
55	10,005
60	10,003
65	10,005
70	10,001
75	10,002
80	10,003
85	10,006
90	10,005
95	10,001
100	10,002

Priloga P: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, prvi dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3703	2467	3728±52,9	3506±16,0	1240±52,9	33,3
3823	2492				
3707	2477				
3704	2497				
3705	2507				

Priloga Q: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, sedmi dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3914	3503	3961±33,4	3506±34,7	454,15±46,0	11,5
3959	3561				
3947	3465				
3996	3495				
3989	3511				

Priloga R: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, 14. dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3810	3744	3822,9±29	3747±6,89	76±23	2,0
3852	3751				
3778	3736				
3838	3751				
3837	3753				

Priloga S: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z zunanjim hlajenjem, 21. dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3770	3743	3807±56	3760±12,6	64,6±55,6	1,2
3765	3761				
3921	3777				
3799	3766				
3780	3755				

Priloga T: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, prvi dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3703	2467	3728±52,9	3506±16,0	1240±52,9	33,3
3823	2492				
3707	2477				
3704	2497				
3705	2507				

Priloga U: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, sedmi dan po fermentaciji.

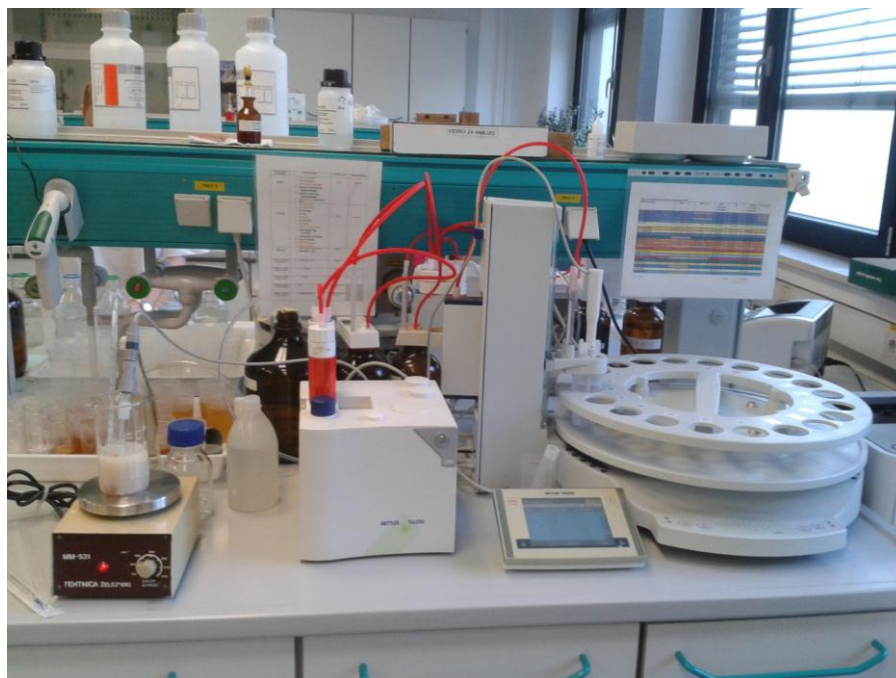
Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3811	2914	3806±8,1	3850±42,7	956±37,3	25,1
3798	2827				
3797	2817				
3806	2818				
3816	2875				

Priloga V: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, 14. dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3824	3627	3806±91,5	3850±52,7	337±100,9	8,6
4038	3655				
4004	3532				
3876	3546				
3881	3574				

Priloga W: Tabela z rezultati testa zmožnosti porabe diacetila kvasa iz tanka za shranjevanje kvasa z notranjim hlajenjem, 21. dan po fermentaciji.

Koncentracija diacetila [nL/L]	Koncentracija diacetila [nL/L]	Povprečje začetni diacetil [nL/L]	Povprečje končni diacetil [nL/L]	Povprečna poraba diacetila [nL/L]	Poraba diacetila [%]
3952	3726	3928±86,5	3678±59,1	250±125,7	6,4
3815	3756				
3996	3642				
3861	3624				
4014	3641				



Priloga X: Titrator MettlerToledo, s katerim smo izvajali test vitalne titracije.