

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



Problematika propagace násadních kvasnic v minipivovaru

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. Tomáš Gregor, Ph.D.

Vypracovala:
Veronika Bloudková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Problematika propagace násadních kvasnic v minipivovaru vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

Veronika Blažková

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu Ing. Tomáši Gregorovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi byly poskytnuty ohledně zpracování bakalářské práce a zároveň za čas, který věnoval konzultacím při zpracování mé práce. Další poděkování patří pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně, kteří mi umožnili přístup do knihovny ústavu a k časopisům Kvasný průmysl. Velký dík patří dále také všem korespondentům z minipivovarů na Vysočině, kteří mi věnovali čas a dovolili nahlédnout do interních dokumentů minipivovarů a poskytli mi tak informace z praxe. Další poděkování patří celé mojí rodině a přátelům, kteří mě podporovali a dodávali sílu, která někdy byla potřeba.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je cílena na problematiku propagace kvasinkových kmenů využitelných při výrobě piva. V jednotlivých kapitolách se zabývám popisem a charakteristikou pivovarských kvasinek, jejich využitím a odlišnostmi mezi rody, dále propagací kvasnic a problematikou v laboratorní a provozní fázi, je popsána propagační stanice a její náležitosti, zmíněny pracovní postupy, které jsou užívány. Další část práce je zaměřena na sbírku pivovarských kvasinek, její historii, z čeho se skládá a k čemu slouží. Je zde nastíněna i otázka sladiny, jelikož je důležitou součástí právě při propagaci, popsány její vlastnosti a vznik. Další kapitola pojednává o laboratorním fermentoru, jeho úloze a popisu. Jsou zde vysvětleny druhy kultivačních metod, navrženo řešení vlastní propagace pro minipivovary, což bylo hlavním cílem mé práce. Poslední část je věnována analýze finálních kvasnic a jejich jakostním parametrům.

Klíčová slova: pivovarské kvasinky, propagace kvasnic, laboratorní fermentor, propagační stanice

ABSTRACT

Bachelor thesis is focused on the issue of promotion yeast strains usable in the production of beer. The chapters deal with the description and characteristics of brewer's yeast, their use and differences between the genders, as well as the promotion of yeast and issues in the laboratory and operational phase, described promotional station and its requirements, mentioned workflows that are used. Another part is focused on the collection of brewer's yeast, its history, what it is composed, and for what it is. There is solved an issue wort because it is very important part in the promotion, describes its features and appearance. Another chapter discusses the laboratory fermenter, its role and its description. There are explained the kinds of cultivation methods, suggested solutions for self-promotion microbreweries, which was the main objective of my work. The last part is devoted to analysis of the final yeast and their quality parameters.

Keywords: brewer's yeast, yeast propagation, laboratory fermenter, promotional station

Obsah

1 ÚVOD.....	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Historie kvasinek	11
3.2 Proč se používají aneb využití kvasinek v potravinářských technologiích	11
3.2.1 Průmysl a věda	11
3.2.2 Potravinářství	11
3.3 Metabolismus kvasinek.....	12
3.4 Taxonomie kvasinek.....	12
3.4.1 Kam kvasinky řadíme	12
3.4.2 Dva základní druhy kvasinek	13
3.4.3 Kmeny <i>S. Cerevisiae</i>	14
3.5 Morfologie kvasnic.....	16
3.5.1 Tvar a velikost kvasničné buňky.....	16
3.5.2 Funkční a strukturní specifické části kvasinkové buňky.....	16
3.5.3 Chemické složení pivovarských kvasinek	17
3.6 Propagace kvasnic.....	18
3.6.1 Co je propagace kvasnic.....	18
3.6.2 Propagační stanice, popis a její součásti	19
3.6.3 Laboratorní propagace.....	20
3.6.4 Provozní propagace.....	22
3.6.5 Obavy z kontaminace	24
3.6.6 Pracovní postupy.....	25
3.6.7 Procesy propagace v praxi	27
3.6.8 Technické požadavky na propagační stanice	27

3.7 Kvasničné hospodářství.....	28
3.8 Dávkování kvasnic	29
3.9 Sběrka pivovarských kvasinek.....	29
3.9.1 Proč vznikla	29
3.9.2 Historie sbírky	30
3.9.3 Sběrkové kmeny.....	30
3.9.4 ECCO, WFCC a úloha sbírky.....	31
3.9.5 Uchování a vedení sbírky	31
3.9.6 Produkční (pracovní) kmeny	32
3.10 Propagace v minipivovarech od jedné buňky až do plného provozu	33
3.11 Výroba sladiny.....	36
3.11.1 Proč je sladina potřeba	36
3.11.2 Důležité teploty	37
3.11.3 Definice vzniklé sladiny	37
3.12 Kultivace kvasnic v laboratorních fermentorech	38
3.12.1 Úvod	38
3.12.2 Laboratorní fermentor	38
3.12.3 LAMBDA	40
3.13 Charakteristiky kultivačních metod.....	41
3.13.1 Druhy kultivací	42
3.14 Kontrolní metody růstu.....	45
3.14.1 Růstové křivky	45
3.15 Návrh experimentu pro minipivovary.....	47
3.16 Analýza finálních kvasnic aneb hodnocení droždí.....	50
3.16.1 Fyzikálně chemické vlastnosti droždí	50
3.16.2 Chemický rozbor droždí	51
3.16.3 Biochemické zkoušky	51

3.16.4 Zkoušky jakosti z hlediska pekárenského.....	51
4. ZÁVĚR.....	53
5. SEZNAM LITERATURY.....	54
6. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	59
7. SEZNAM TABULEK.....	59
8. PŘÍLOHY.....	60

1 ÚVOD

Pivo již po staletí patří k historii České republiky. Tento nápoj se u nás těší velké popularitě a jeho spotřeba neustále stoupá. Díky tomu zaznamenávají právě minipivovary velký boom a jejich řady jsou neustále rozšiřovány. Pivovarnictví se stává zajímavým zdrojem obživy, popřípadě koníčkem.

Aby mohlo pivo vzniknout, jsou zapotřebí pivovarské kvasinky. Jejich role je při výrobě piva nezastupitelná. Právě ony při hlavním kvašení neúplně zkvašují cukerné látky extraktu mladiny za tvorby etanolu, oxidu uhličitého a vedlejších metabolitů. Výchozí suroviny, tedy slad, chmel a voda, jsou touto cestou přeměněny na pivo.

Důležitý je i počet kvasinek a jejich namnožení v dostatečném množství a kvalitě pro výrobní šarži. Velké pivovary s tímto krokem nemají problém, malé pivovary však stále hledají svoji vlastní cestu, popřípadě propagaci neřeší a odebírají kvasinky pro svoji výrobu od velkých pivovarů, které je už ze své výroby vyřadily. Právě problematiku propagace kvasnic v minipivovarech bakalářská práce popisuje. Technologických postupů jak propagaci kvasnic řešit existuje celá řada. Všechny mají své klady, ale i zápory. V dnešní době je neustále snaha přecházet od více složitých verzí k méně náročným, ať už z hlediska obsluhy personálu, financí, popřípadě výtěžku celého procesu. Je tedy pouze na sládcích jaký postup v propagaci upřednostní. Na trhu už existuje i mnoho pomocných přístrojů pro propagaci kvasnic speciálně pro minipivovary. Toto vybavení je poměrně nové a moderní, tedy i poněkud drahé. Na cestě k osamostatnění v propagaci pro minipivovary se tedy objevuje často překážka v podobě finanční náročnosti dostupné techniky.

Téma své práce jsem si vybrala z důvodu jeho aktuálnosti, neboť si myslím, že tato otázka stále čeká na své úplné vysvětlení a řešení. Dalším důvodem bylo absolvování své bakalářské praxe v pivovaru a fakt, že se po dokončení studia na škole chci uplatnit právě v pivovarském průmyslu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši na propagaci kvasnic, postupy které jsou v praxi užívány, jejich porovnání, zaměřit se na problematiku propagace kvasnic především v minipivovarech, nalézt řešení, které by vedlo k samostatnosti z hlediska propagace a k nezávislosti na velkých pivovarech a zároveň by bylo pro minipivovary z hlediska financí přijatelným.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Historie kvasinek

O procesu kvašení piva sládkové dřívě neměli moc informací, teprve práce a objevy francouzského mikrobiologa Louise Pasteura (1822- 1895) objasnily celý proces. Je pozoruhodné, že nezastupitelná role kvasnic při výrobě piva byla objevena mnohem déle, a to v druhé polovině 19. století, kdy německý vědec T. Schwann pozoroval kvasinky pod mikroskopem a pojmenoval je „Zuckerpilz“ (cukerná houba). Z tohoto názvu byl odvozen dnešní název kvasinek *Saccharomyces* (saccharus-cukr, myces - houby) (Chládek, 2007).

3.2 Proč se používají aneb využití kvasinek v potravinářských technologiích

3.2.1 Průmysl a věda

I přes to, že řadíme kvasinky mezi velmi malé jednobuněčné organismy dosahující maximálně 15 μm , je známo jejich široké využití v řadě oblastí průmyslu, ale také vědy. Můžeme jmenovat například medicínu (produkce léčiv, hormonů, enzymů, vakcín aj.), environmentální biotechnologie zahrnující bioremediace, degradace polutantů a například produkci rekombinantních proteinů. Dále se mohou uplatňovat například při biokontrolě jako ochrana plodin a v potravinářských technologiích (Walker, 1998; Janderová a Bendová, 1999).

3.2.2 Potravinářství

Pro nás je hlavní význam kvasinek zejména při produkci potravin a fermentovaných nápojů. Vědecké a technologické porozumění jejich rolí v průběhu těchto procesů začalo prvotními studiemi vědců Pastera a Hansena, kteří se během druhé poloviny 19. století ve svých pracích zaměřili na mikrobiologii fermentačního procesu výroby piva a vína. Po nich je následovali Guilliermond a Kluyver, kteří prohlásili, že kvasinky představují unikátní skupinu mikroorganismů, jejichž role je při výrobě některých potravin a nápojů nenahraditelná (Fleet, 2006).

Výrobní proces předpokládá použití standartních kvasnic, u kterých jsou dobře definované vlastnosti, pokud možno které se nemění i při opakovaném nasazení. Kvasnice jsou surovinou, která je kontrolovatelná jednoduchými metodami a kvalitní kvasnice zaručují bezproblémovou výrobu hodnotného nápoje. Termín kvasinky se

většinou používá v laboratorním měřítku, zatímco termín kvasnice nebo várečné kvasnice slouží pro označení aktivní biomasy většího množství kvasinek užívaných v provozu. Kvasinky se staly předmětem mnoha vědeckých studií, které rozšířily vědomosti o jejich použitelnosti při výrobě alkoholických nápojů. Studium kvasinek a jejich procesů je rovněž součástí pivovarské mikrobiologie (Basařová, 2010).

3.3 Metabolismus kvasinek

Metabolismus kvasinek, neboli látková výměna, je z pivovarského hlediska v první řadě přeměnou zkvasitelných cukrů na alkohol a oxid uhličitý za zúčastnění řady enzymů a koenzymů. Metabolismus kvasinek souvisí s několika dalšími složkami mladiny (tedy sladiny po chmelovaru) a vzniká přitom rozsáhlé spektrum i vedlejších produktů, které ovlivňují charakter hotového piva. Metabolismus kvasinek je ovlivňován strukturou mladiny, vlastnostmi kvasnic a podmínkami průběhu (Kosař a Procházka, 2000).

3.4 Taxonomie kvasinek

3.4.1 Kam kvasinky řadíme

Obecně pivovarské kvasinky řadíme mezi jednobuněčné houby (Fungi), nižší rostliny bez chlorofylu. Dle morfologických znaků náleží do třídy hub vřeckatých (Ascomycetes) do čeledi Saccharomycetaceae (Endomycetaceae) a rodu *saccharomyces* (Basařová, 2010).

Tab. 1: Taxonomie pivovarských kvasinek (zdroj: Basařová , 2010)

Říše	Fungi
Kmen	Ascomycotina
Podkmen	Saccharomycotina
Třída	Saccharomycetes
Řád	Saccharomycetales
Čeď	Saccharomycetaceae
Rod	<i>Saccharomyces</i>
Typový druh	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

3.4.2 Dva základní druhy kvasinek

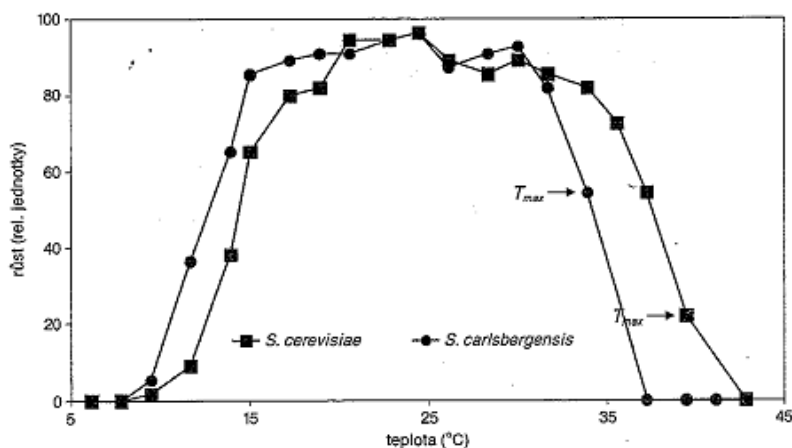
Bez použití kvasnic by nemohl vzniknout kvašený nápoj. Prvním nezbytným postupem k dosažení požadované kvality piva a zabezpečení optimálního procesu výroby podle technologického postupu kvašení a dokvašování je výběr vhodného kmene kvasnic (Chládek, 2007).

V současné době se používají dva základní druhy kvasinek: *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (kvasinky svrchního kvašení) a *Saccharomyces uvarum*, dříve *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen (kvasinky spodního kvašení). Oba druhy se vzájemně odlišují svými vlastnostmi, což se odráží také v jejich technologickém využití (Chládek, 2007).

3.4.2.1 Popis vlastností

Kvasinky svrchního kvašení (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *Cerevisiae*) – pro piva typu „ale“, „porter“, „stout“. Po ukončení kvašení jsou vynášeny na hladinu vznikajícím oxidem uhličitým, kde tvoří tzv. „deku“, a mají vyšší tepelnou odolnost. Tyto kvasinky jsou používány pro výrobu svrchně kvašených piv, teplota kvašení je v rozsahu 20-24 °C.

Kvasinky spodního kvašení (*Saccharomyces carlsbergensis*) – pro piva plzeňského typu. Po ukončení kvašného procesu usedají na dno kvašných nádob, teplota kvašení je v rozsahu 8- 14 °C (Chládek, 2007).



Obr. 1: Optimální teploty růstu spodních a svrchních kvasinek

(zdroj: Walsh a Martin, 1977)

3.4.2.2 Hlavní rozdíly

V základních odlišnostech mezi spodními a svrchními kvasinkami můžeme uvést následující:

- skladba genetického materiálu,
- odlišná struktura buněčných stěn, zjištěná imunochemickými či biochemickými metodami,
- stupeň zkvašování α, α - rafinosy,
- růst na zvláštních půdách,
- nesnadná sporulace spodních kvasinek,
- odlišné technologicky význačné vlastnosti,
- vyšší maximální teplota růstu u svrchních kvasinek,
- vyšší schopnost odolávat teplotě u svrchních kvasinek (Basařová, 2010).

3.4.3 Kmeny *S. Cerevisiae*

3.4.3.1 Testování a úchova

V rámci druhu *S. cerevisiae* je známo asi 1000 technologických kmenů s odlišnými vlastnostmi. U jednotlivých kmenů v mezinárodně uznávaných sériích se někdy uvádějí i technologicky význačné rysy. Pivovarské kvasnice se zajišťují od známých dodavatelů sušených i tekutých kvasnic (<http://www.wyeastlab.com>, www.whitelabs.com.) V mezinárodních sériích lze vidět čisté kultury pivovarských kvasinek (např. www.ncyc.co.uk/, <http://www.atcc.org.>, www.cbs.knaw.nl, www.phaffcollection.org, www.inra.fr/clib, <http://www.chem.sk/activities/yeast/ccy/>) (Basařová, 2010).

V současné době je možno identifikovat jednotlivé produkční kmeny molekulárně biochemickými postupy a uložením v mezinárodních kolekcích si zajistit identifikaci kmenu a průkaz jeho totožnosti pro výrobu určitého piva po delší době, např. v odkazu již zmíněné sbírky NCYC ([www.ncyc.co.uk.](http://www.ncyc.co.uk/)), Sieblově institutu (USA), institutu Kara (Velká Británie), u firmy BioteconDiagnostic (Německo) apod. (Basařová, 2010).

Správná úchova kvasničných kmenů a testování jejich identity má význam i při domácí výrobě piva (homebrewing), která se snaží renovovat a rozšířit výrobu jistých

zvláštních druhů pív, jejichž výstav sice zůstal v souvislosti s přicházející velkovýrobou skromný, ale nyní prochází znovuzrozením (Basařová, 2010).

3.4.3.2 Znaky kvasinek a jejich třídění

Znaky kvasinek jsou testovány imitováním provozních podmínek v termostatových kvasných válcích a kónusem ústícím do sedimentační trubice. Kvasné válce používané odlišnými tvůrci jsou odlišné délkou (50 - 150 cm) i průměrem (okolo 5 cm). Do válců se vlévá zakvašená a provzdušněná mladina a během izomerického kvašení při teplotě 10 až 15 °C se registruje růstová, kvasná a sedimentační křivka. Dle těchto křivek se pak pivovarské kvasinky roztřídí do skupin dle technologicky význačných znaků, mezi které patří rychlost kvašení, stupeň dokvašení, rychlost sedimentace apod. (Šavel 1971a, Šavel 1993). Při monitoringu průběhu kvašení jsou využívány odlišné metody analýzy pív, přičemž zásadním požadavkem je odběr co nejmenšího množství vzorku. Přijatelná je refraktometrie nebo neinvazivní gravimetrický (vážkový) postup umožňující na základě pravidelného vážení kvasné nádoby vypočítat všechny primární parametry piva (Šavel 1993). Průběh kvašení je také ovlivňován geometrií kvasné nádoby (Šavel a Prokopová, 1994b).

Dílní vlastnosti spolu pak více či méně souvisejí, např. práškové kvasnice obtížně flokulují a sedimentují, proto hluboko prokvašují. Společně s jinými fyziologickými a biochemickými rysy tvoří tyto údaje základ pro typizaci pivovarských kvasinek tj. zařazení kvasničných kmenů do určitých kategorií, uváděných potom ve sbírkových katalozích. Z Čech lze zmínit pracovníky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského (VÚPS) v Praze, kteří se podrobnou typizací pivovarských kvasinek zabývali (Bendová a Kahler, 1981).

3.4.3.3 Charakterizace rodů dle nových metod

Kromě těchto hlavních rysů se mohou kvasničné rody dále charakterizovat dle redukční způsobilosti, dle tvorby a odbourávání biacetylu i podle předpokladu vázat hořké látky (Nedervele Van a Debourgh, 2005). Nověji se kvasničné kmeny mohou rozřazovat i dle schopnosti podpory sensorické stability piva při stárnutí, nebo ji naopak snižovat (Opstaele Van a kol., 2006). Analýza tuků, které nalézáme uvnitř mitochondrií a buněčných membrán, také slouží k odlišení různých kvasničných kmenů (Tosch a kol., 2005).

3.5 Morfologie kvasnic

3.5.1 Tvar a velikost kvasničné buňky

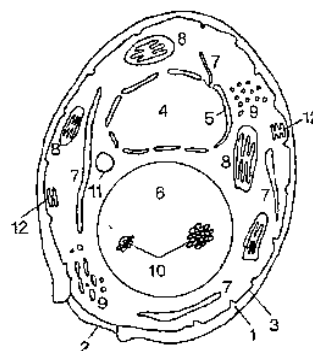
Tvar a velikost buněk souvisí se stavem a podmínkami, v nichž se kvasinky nachází. Pivovarské kvasinky mají většinou mírně oválný tvar s délkou 6 až 10 μm a šířkou 5 až 8 μm . Proporce a tvar buněk vymezují velikost povrchu, a tím i příležitosti transportu a metabolismu kvasničné kultury. Průměrný objem jedné buňky je 175 μm^3 a povrch je okolo 150 μm^2 . Tomu odpovídá úplný činný povrch využitelný pro metabolismus, podle dávky a stupně namnožení to je 200 až 900 m^2 v hektolitru kvasící mladiny (Basařová a Čepička, 1985). U pivovarských kvasinek je však také možné naleznout i protáhlé tvary (Dickinson, 2008).

3.5.2 Funkční a strukturní specifické části kvasinkové buňky

Kvasinky si můžeme představit jako typickou eukaryotickou buňku, proto je jich užíváno i jako modelových buněk pro studium několika procesů probíhajících u vyšších organismů, i když se od nich odlišují pevnou buněčnou stěnou a produkcí pupenů (Chládek, 2007).

Kvasinková buňka obsahuje několik funkčně i strukturně speciálních segmentů, např. buněčnou stěnu, cytoplazmatickou membránu, Golgiho aparát, periplasmu, cytoplazmu, endoplazmatické retikulum, vakuoly a peroxisomy. Tyto úseky můžeme izolovat po rozrušení buněčné stěny, a to mechanicky nebo pomocí enzymů. Ve světelném mikroskopu lze pohlížet přesně na buněčné inkluze a vakuoly. S uplatněním barviv účinných ve viditelné nebo ultrafialové oblasti můžeme zaregistrovat další struktury, jako jsou jádro, chromosomy, mitochondrie a jemné struktury buněčné stěny včetně jizev po pučení (Novák, 2006).

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1 – buněčná stěna | 7 – endoplazmatické retikulum |
| 2 – jizva zrodu | 8 - mitochondrie |
| 3 – cytoplazmatická membrána | 9 - glykogen |
| 4 – jádro | 10 - volutin |
| 5 – jaderná membrána | 11 - lipidy |



Obr. 2: Schematický náčrt kvasničné buňky (zdroj: Šilhánková, 2002)

3.5.3 Chemické složení pivovarských kvasinek

V chemickém složení kvasinek převládá jako v každém organismu s vlastním metabolismem voda, jejíž obsah může kolísat v širokém rozmezí, od 65 do 85 %. Asi tři čtvrtiny z toho jsou tvořeny vodou intracelulární, která je vázána uvnitř buněk, a zhruba čtvrtina vodou hydratační a volnou, vázanou povrchovými silami. Struktura sušiny kvasničné buňky je variabilní v závislosti na fyziologickém stavu a stáří kultury a pozměňuje se s přechody složení substrátu (Basařová, 2010).

V sušině pivovarských kvasinek nalzááme sacharidy, a to monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy, deriváty i substituované sacharidy. Značný díl polysacharidů, především mannanu a glukanu, je obsaženo v buněčné stěně. Ostatní sacharidy se nalzáají v cytoplazmě, kde převládají dva důležité polysacharidy, glykogen a mannan. Obsah glykogenu záleží na mnoha okolnostech, na genetickém základu kvasinek, jejich fyziologickém stavu i podmínkách při fermentaci. Svrchní pivovarské kvasinky obsahují obyčejně více glykogenu než spodní kvasinky. Mannan je fyziologicky spojen se schopností kvasinek aglutinovat (Blasovič a kol., 2005).

Vyjma membránových formací se v cytoplazmě kvasinek nalzáají také barvitelné inkluze bílkovin, lipidů a dalších zásobních látek. Kvasinky obsahují prakticky všechny formy dusíkatých látek. Přítomné aminokyseliny slouží pro proteosyntézu a metabolismus dalších látek. Z peptidů je podstatný hlavně glutathion, který má klíčovou roli v redoxním systému kvasinkové buňky. Převládající část dusíkatých látek sušiny kvasinek utváří jednoduché a složené bílkoviny s různými prostetickými skupinami a většinou je nalzááme v buňce jako apoenzymy. V kvasinkové buňce můžeme identifikovat enzymy všech šesti hlavních tříd podle mezinárodní klasifikace IUPAC-IUBMB, nebo se při projevu životních funkcí indukují (Basařová, 2010).

Lipidy patří mezi nedílnou složku mitochondrií a buněčných membrán. Některé z nich přímo usměřňují propustnost buněčné stěny a tím mohou ovlivnit transport substrátu do buňky. Jsou složeny z fosfolipidů, neutrálních lipidů a mastných kyselin. Na vzájemné zastoupení dílčích složek má prvořadý vliv obsah kyslíku při kultivaci (Blasovič a kol., 2005).

Steroly rovněž utváří podstatnou část membrán kvasinek i všech eukaryotických organismů. Zabezpečují konzistenci a prostupnost buněčných membrán, účastní se na transportu aminokyselin, pyrimidinů a na respirační aktivitě buněk. Jsou významné při

růstu a rozmnožování kvasinek (Volkman, 2003). V kvasinkách nalézáme zejména ergosterol. Počet ergosterolu v sušených kvasinkách kolísá mezi 0,6 až 1,5 µg/kg. Bez postačující zásoby ergosterolu kvasničné buňky kvasí pomaleji a neprokvašují dobře mladinu (Blasovič a kol., 2005).

Tab. 2: Skupiny významných látek v kvasničné buňce (zdroj: Basařová, 2010)

Sloučeniny	Výskyt	Funkce
bílkoviny	cytoskeleton, ribosomy, aktin, tubulin	stavba buňky, enzymy
glykoproteiny	buněčná stěna a její enzymy	flokulace
polysacharidy	buněčná stěna, cytoplasma	stavba buňky, zásobní látky
lipidy	membrány	stavební, zásobní a signální látky
nukleové kyseliny (DNA)	jádro, mitochondrie	zásoba genetické informace
nukleové kyseliny (RNA)	cytosol, mitochondrie	přenos informace

Z minerálních látek v sušině pivovarských kvasinek můžeme jmenovat majoritní prvek fosfor, který je zhruba z poloviny vázán v nukleových kyselinách, bílkovinách, lipidech a vitamínech. Následujícími podstatnými složkami jsou draslík, hořčík, vápník, sodík, síra, křemík, a z minoritních látek a ze stopových prvků železo, mangan, měď a zinek (Blasovič a kol., 2005).

3.6 Propagace kvasnic

3.6.1 Co je propagace kvasnic

Pod pojmem propagace neboli kultivace kvasnic se rozumí aseptické množení čisté kultury v množství potřebném pro laboratorní nebo provozní fermentaci. Z bioinženýrského hlediska lze tyto postupy rozdělit na *vsádkové neaerované*, *vsádkové aerované* a *kontinuální*. Během propagace dochází ke změnám fyziologického stavu a skladby buněčné populace v závislosti na znacích kmene kvasinek a podmínkách propagace. Velikost kvašení ovlivňuje požadavky na fyziologický stav kvasnic (Stewart, 1999).

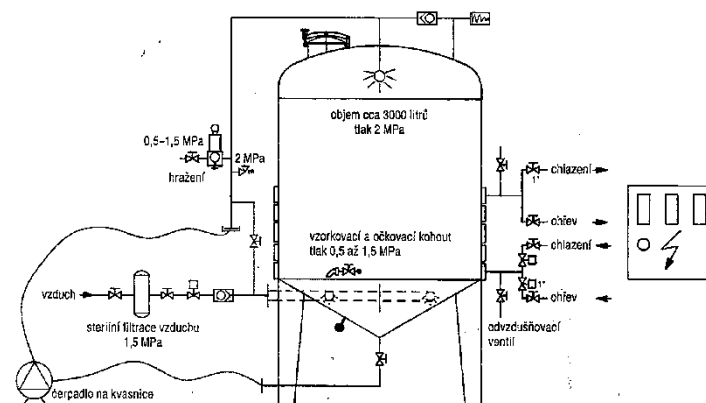
Při propagaci vycházíme z čistých kultur, izolovaných a technologicky osvědčených kmenů požadovaných vlastností. Užívají se sbírkové kmeny, nebo se kvasinky izolují rovnou z kvasničné mladiny klasickými mikrobiologickými metodami, mezi které řadíme čárkování na plotny, zředování v tekuté nebo ztužené živné půdě nebo kapičková metoda (Edgerton, 2001).

Relativně málo pozornosti je věnováno uchovávání čistých kultur. Klasické postupy zahrnovaly úchovu kvasinek v roztoku sacharózy a na šikmých agarech, na vzduchu nebo pod parafinovým olejem. Moderní metody používají lyofilizaci kultur nebo skladování čistých kultur v polypropylenových trubičkách při -196°C (Quain, 1995). Dobré výsledky byly také získány s úschovou kultur na filtračním papíře (Wackerbauer a Beckmann, 1999). Pivovarské kvasinky je možné také dodávat v sušeném stavu (Quain, 2006).

3.6.2 Propagační stanice, popis a její součásti

Pro výrobu čistých násadních kvasnic se používá tzv. propagační stanice, kterou tvoří většinou dvě nádoby:

- Sterilizátor, ve kterém se z varny přivedená mladina při zvýšeném tlaku (a tedy i vyšší teplotě) sterilizuje a poté ochlazuje na zákvasnou teplotu,
- Kvasný válec, neboli propagátor, ve kterém mladina kvasí nejdříve v menším množství, zakvašeném v laboratoři vypěstovanou čistou kvasničnou kulturou. Postupně se toto množství mladiny zvětšuje, až dosáhne potřebného objemu, kterým se zakvasí mladina v kvasné kádi, tanku či v cylindrokónickém tanku (Chládek, 2007).



Obr. 3: Schéma jednoduchého propagačního tanku (zdroj: Basařová, 2010)

V současné době se používají propagační stanice různých konstrukcí, jednonádobové i vícenádobové. Méně často se setkáváme s odděleným sterilizátorem a někdy se kvasinky pomnožují ve sterilizovaném válci, do něhož se přímo z varny napouští horká mladina. Tyto systémy jsou schopné pracovat pouze s jednou nádobou, ale zakvašuje se pokaždé novou kulturou z laboratoře (Chládek, 2007).

Původně měli propagační stanice zvláštní sterilizátor mladiny, nyní převládá odběr mladiny po jejím ochlazení v provozním chladiči (Andersen 1994).

Mezi další součásti stanice patří automatické měření a regulace parametrů, zejména teploty kvašení, popř. i další automatizace provozu stanice. Obtížnou podmínkou je kontrola množství substrátů uvnitř válců. Nejjednodušším řešením je průhled na víku válce s osvětlením, který je i přes časté orosení nezbytným pro kontrolu kvašení. Jiným postupem je vážení nádoby, přičemž čidla jsou v jedné noze nebo ve více nohách nádoby. Vhodné jsou i vodivostní sondy měřící předepsanou úroveň plnění (Chládek, 2007).

Vzhledem k ohřevu a chlazení se musí válce opatřit (zpravidla na vrcholu) přetlakovou a zejména podtlakovou armaturou, která může i za extrémních podmínek (náhlé zchlazení válce naplněného nasycenou párou) zabránit poškození nádoby. Příslušenství stanice tvoří obvykle i kovová Carlsbergská baňka k přepěstování kultury. Baňka má očkovací tubus a může se sterilizovat v autoklávu, na vařiči nebo mít vlastní elektrické topení. Také kvasné válce musí mít odpovídající očkovací tubusy (Basařová, 2010).

3.6.3 Laboratorní propagace

Jedná se o první část přípravy čisté kultury. Práce probíhá v laboratoři a začíná izolací jedné kvasničné buňky a jejím zaočkováním do sladiny nebo na pevnou živnou půdu, kde se vytvoří kolonie, následně přenesená do sladiny. Objem sladiny činí obvykle 5 ml. Obvykle třetí den, kdy odpovídá stádiu bílých kroužků, se kvasícím médiem zakvašuje desetinásobný objem sladiny. Tento krok je opakován až do té doby, než je získán potřebný objem kroužků pro další krok – provozní propagaci (Kociánová, 2007).

Proces se provádí pomocí tradičních mikrobiologických technik za užití především skleněné aparatury, pod dohledem odborného personálu. Význam této fáze je často podceňován (Kociánová, 2007).

V počáteční fázi (iniciační) se používá všeobecně kvasinkové médium, jako je například extrakt z kvasnic nebo peptonu glukózy. Ke konečné (terminální) fázi slouží sterilní pivovarská mladina (Briggs a kol., 2004).

3.6.3.1 Biostart

Biostart je růstové médium pro kvasinky v průběhu přípravy.

Složení: Kvasniční autolyzát, buněčné stěny

Jedná se o frakci nerozpustných polysacharidů (buněčné stěny), které jsou snadno k dispozici v průběhu rehydratace kvasinek a v první fázi fermentace. Je to přírodní výživa přinášející do kapaliny požadované množství esenciálních aminokyselin sloužících jako růstový faktor rehydratovaných kvasinek. Autolyzát kvasinek přítomný v přípravku umožňuje obnovit propustnost buněčných membrán. Redukuje nasycené mastné kyseliny, které jsou pro kvasinky toxické a výrazně snižují jejich faktor přežití. Přípravek poskytuje aminokyseliny a nukleoidy důležité pro množení kvasinek v první fázi propagace. Doporučené dávkování je 1 ku 4 k hmotnosti rehydratovaných kvasinek (Harapes, online).

Celý proces trvá asi dva týdny. Růst kvasinek je podporován kontinuálním provzdušňováním. Počet terminálních kvasinek by měl být v rozmezí 150 - 200 x 10⁶ buněk na ml a s životaschopností vyšší než 98 %. Kultura se provzdušňuje přes skleněnou fritu opatřenou sterilním filtrem pro plyn. Dobré rychlosti přenosu kyslíku jsou podporovány mechanickým mícháním. Vývod na odsávací zařízení je vybaven silikonovými hadičkami a spojkou pro připevnění očkovacího portu na zařízení používaného pro pěstování materiálu laboratorní kultury. Tato část přístroje musí splňovat tři funkce. Musí být schopna odolat autoklávu během sterilizace mladiny. Musí být vhodná pro pěstování čisté kultury kvasinek o vysoké koncentraci bez rizika kontaminace a do třetice, musí být vhodná pro přenášení kvasinky z laboratoře do pivovaru, proto musí mít pevnou konstrukci, aby odolala nepřízní produkčního prostředí (Briggs a kol., 2004).

Zařízení vhodné pro převádění konečné fáze laboratorního množení je znázorněno na obrázku v příloze. Baňka má celkovou kapacitu přibližně 25 litrů a je vyrobena z nerezové oceli. Několik portů prochází přes horní desku, která může být odstraněna při plnění mladiny a při čištění (Briggs a kol., 2004).

Tyto porty jsou připojeny k vedení pro očkování, odběr vzorků, přívod plynu a jeho výstup. V růstové fázi se mladina provzdušňuje pomocí magnetického následovníka. Všechny plynové linky jsou chráněny sterilními filtry a všechny ostatní linky jsou opatřeny konektory, které jsou během sterilizace zabaleny (Briggs a kol., 2004).

3.6.4 Provozní propagace

Úkolem provozní propagace je za aseptických podmínek pomnožit laboratorní kulturu tak, aby získaný objem kroužků byl dostatečný k zakvašení provozní výrobní šarže. Celý proces probíhá v propagátorech. Kvasnice se propagují v provozní mladině, která je nejprve sterilizována (30 minut při 100 °C) (Kociánová, 2007).

Mladina se užívá tedy jako přenosové médium. Přednostně by měla být ve stejné kvalitě, jaká byla použita v procesu kvašení (Briggs a kol., 2004).

Používají se dvě základní metody:

- *klasická propagace* – využívá běžné postupy jako v provozních podmínkách, sterilizátor je koncipován jako separátní zařízení. Teplota kvašení kolísá mezi 12 – 16 °C, kultura bývá pomnožena v menší nádobě nebo v hlavním propagátoru (pomnožení probíhá v několika krocích), poměr zakvašování je obvykle 1:4 až 1:10, počet buněk v mladině zakvašené kroužky může být nižší než při zakvašování kvasnicemi (Kociánová, 2007).

- *aerobní propagace* – základem je taktované nebo kontinuální vzdušnění s velmi intenzivním nárůstem biomasy. Při vyšších koncentracích kyslíku se mohou projevit jeho inhibiční účinky a zpomalí se nárůst biomasy. K zakvašení provozní mladiny se používají kroužky získané po 36 – 48 hodinách a to v poměru 1:20. Mladinou naplněná nádoba v propagační stanici se steriluje, chladí a zakvašuje laboratorní kulturou. Oddělená sterilace mladiny minimalizuje nebezpečí degenerace kvasnic a umožňuje doplnění v propagátorech zbytky kroužků (Kociánová, 2007).

Chyby v této fázi mohou mít dalekosáhlé negativní důsledky. Konstrukce zásobníku, jeho provoz a jeho vnitřní povrch musí být v souladu s nejvyššími

hygienickými normami. Dále by měl být umístěn v místnosti určené k minimalizaci rizika kontaminace. Přístup je omezen pouze personálu, všechny vnitřní povrchy jsou vyrobeny z hygienických materiálů, vzduch v místnosti je odfiltrován a atmosféra se udržuje za mírného přetlaku (Briggs a kol., 2004).

Přednostně jsou propagační nádoby opatřeny prostředky pro var sladiny in situ pomocí parních pláštů, nebo přímým vstřikováním páry. Růst kvasnic je povzbuzen obstaráním vzduchu nebo kyslíku. Přívod plynu a výfukové potrubí musí být vybaveno mikrobiologickými filtry. Odběru vzorků a očkovací porty musí být schopny aseptického provozu (Briggs a kol., 2004).

Tradiční propagátory pracují na principu, že kvasinky by měly být ve stejném fyziologickém stavu jako násadní kvasinky. Předpokládá se, že bude zajištěno, aby nově vypěstované kvasinky produkovaly standardní výkon kvašení, kdy jsou kroužky převedeny do první mladiny. Toho je dosaženo tím, že se omezí množství kyslíku dodávaného do kvasinek v průběhu růstové fáze a řídí se teploty na stejnou hodnotu nebo o něco vyšší, než jsou použity pro fermentaci. Nevýhodou tohoto přístupu je, že výtěžek kvasinek je nízký, obvykle ne více, než by bylo možné získat z běžného kvašení mladiny (typicky: 50 - 60 x 10⁶ buněk / ml). Tyto nízké výnosy spojené s tradičními systémy obvykle vyžadují několik kroků k vytvoření dostatečného množství biomasy k první fermentaci. Doba trvání celého procesu, včetně laboratorní fáze trvá několik týdnů. To znamená, že proces je pomalý. Při použití více nádob je nákladná instalace a obsluha. Rizika kontaminace jsou přímo úměrná počtu kroků po sobě následujících (Briggs a kol., 2004).

Pěstování kvasinek při teplotě vyšší, než byla použita v průběhu fermentace, urychluje proces šíření. Vysoké výnosy mohou být získány zcela aerobními podmínkami. Šíření v aerobní mladině se provádí při teplotě 20-25 °C, obvykle poskytuje konečné počty kvasinek 180 – 220 x 10⁶ buněk / ml. Fáze růstu vyžaduje 24 - 48 hodin k dokončení (Briggs a kol., 2004).

Několik propagačních systémů už bylo popsáno mnoha autory. Všechny jsou opatřeny prostředky k zajištění možnosti dosáhnout vysoké rychlosti přenosu kyslíku. To vyžaduje dvě podmínky. Za prvé, systém pro doručování sterilního kyslíku do rostoucí kultury kvasinek, obvykle rozstřikovací kruh, svíčky nebo podobné zařízení, a za druhé, efektivní mechanické míchání, aby bylo zajištěno, že kyslík je rozptylován

v kultuře rovnoměrně. Poměr stran nádoby je relativně vysoký, aby maximalizoval cestu pro přívod kyslíku. Nádoby jsou připojené k ochlazování. Sterilní mladina se dodává do mladiny přes pastér / tepelný výměník. Sterilní kyslík je dodáván ve spodní části nádoby přes svíčku z nerezové oceli. Pokud je to žádoucí, může být koncentrace rozpuštěného kyslíku regulována na požadované hodnoty ve smyčce systémem zpětné vazby pomocí výstupu. Elektroda je umístěná těsně pod povrchem kapaliny. Proces generuje značné množství pěny, neboť mladina je silně pěnicí kapalina, což může být problém (Briggs a kol., 2004).

3.6.4.1 Užití odpěňovacích přípravků

Pěna, která se tvoří na hladině vzdušných kultur, se převážně rozrušuje přidávkem odpěňovacího přípravku. Tyto přípravky jsou nejrůznější látky jako rostlinné a živočišné olejové tuky, některé frakce odpadající z tukového průmyslu, alkoholy, estery, mastné kyseliny a jejich deriváty a silikonové oleje (Bryant, 1970).

Dobry odpěňovací přípravek má rušit pěnu i v nízké koncentraci, nesmí být toxický pro mikroorganismy, živočichy ani člověka, nemá vyvolávat potíže při zpracování produktu, nemá být zápalný, výbušný ani těkavý, má být levný a snadno dostupný. Nádoba s přípravkem se sterilizuje v autoklávu, někdy současně s fermentorem, propojená hadičkou přes kapací zařízení upevněné na víku. Některé oleje se mohou sterilizovat v horkovzdušném sterilizátoru při 160 °C. Odpěňovací přípravek se obvykle dává ručně podle potřeby tlačkou. U automatizovaného způsobu se používá solenidový ventil, nebo hadičkové čerpadlo. Obojí se ovládá elektrickým impulsem, který vzniká při dotyku pěny s čidlem, umístěným v určité vzdálenosti nad hladinou kultury. Dávkování trvá, dokud pěna neklesne a kontakt se nepřeruší. K pravidelnému dávkování minimálních dávek přípravku se používá zařízení, na kterém se volí časový interval mezi dávkami a jejich velikost. Minimální použití odpěňovacích přípravků má značný význam pro aeraci kultury, neboť tyto látky jako látky povrchově aktivní ovlivňují koeficient přestupu kyslíku do média i přístup k povrchu buněk, a tím i růst kultury. Podle charakteru pěny se přípravek dává na pěnu, na rozstříkovací rotující kotouč, do proudu vzduchu, či do prostoru míchadla (Nečas a kol., 1986).

3.6.5 Obavy z kontaminace

Obavy z kontaminace vedly k potřebě zakvašování veškeré mladiny čerstvou kulturou z propagační stanice. Logickým dopadem bylo zvýšení výkonu propagačních

stanic, které jsou nyní dodávány jako dávkové, semikontinuální i kontinuální. Pracují při vyšších teplotách a s taktovým, nebo kontinuálním vzdušněním. Kromě těchto variant se zejména v některých pivovarech používají otevřené pomnožovací soupravy, které jsou ovšem na ústupu a jsou nahrazovány jednoduchými propagačními stanicemi (Basařová, 2010).

3.6.6 Pracovní postupy

Pracovní postupy jsou kromě způsobu vzdušnění a teploty kvašení odlišné dobou pobytu kultury ve válci, což se projeví v převádění buď ve stádiu kroužků, nebo sedimentovaných kvasnic. Průběh pomnožování kvasinek lze matematicky modelovat za užití kinetických rovnic, podobně jako hlavní kvašení (Kurz a kol., 2002).

3.6.6.1 Vsádková propagace neaerovaná

Při vsádkové neaerované propagaci se provzdušňuje médium jednorázově na počátku. Tím se dosáhne rovnovážné koncentrace rozpuštěného kyslíku. Kvasinky se poté množí za podobných podmínek jako při hlavním kvašení, s nízkým výtěžkem biomasy a relativně pomalu. Ve fázi exponenciálního růstu se kvasinky nacházejí v poměru 1:5 až 1:10. V této fázi jsou doplněny zchlazenou 11 až 12% mladinou a propagace probíhá 48 až 72 hodin v nádobách, které jsou opatřeny duplikátory. Počet buněk se zvýší z výchozích 8 až 15×10^6 / ml na 50 až 80×10^6 /ml, extrakt substrátu poklesne asi na třetinu. Namnoženou kulturou, která je označována jako kroužky, se zakvasí provozní várka a to v poměru 1:5. V hlavním propagačním válci se ponechá část kroužků (10 až 20 % původního objemu), doplní se novou sterilní mladinou a cykly se opakují až po dobu několika měsíců (Novák, 2006).

3.6.6.2 Vsádková propagace aerovaná

Při této propagaci je kvasící mladina provzdušňována sterilním vzduchem nebo kyslíkem periodicky, nebo kontinuálně v celém průběhu propagace (Andersen 1998). Mezi přínosy tohoto postupu patří jednak zvýšení výtěžnostního koeficientu biomasy ze substrátu, rychlejší nárůst biomasy, ale i vyšší aktivita kvasnic (Cholerton 2003, Thiele a Back 2007, Novák a kol., 2007). Při vzdušnění sterilním vzduchem je potřeba velké množství plynu, mnohem více než kyslíku, což působí problémy, neboť mladina je silně pěnicí kapalina, jak už bylo zmíněno, a také dochází ke ztrátám dávkovaného kyslíku. Při použití vzduchu se rovnovážná koncentrace rozpuštěného kyslíku v mladině pohybuje od 8 do 9 mg / l, při použití čistého kyslíku při stejné teplotě je až 30 mg / l.

Při použití sterilního vzduchu se musí proces optimalizovat a zamezit nadměrnému pění. Při vzdušnění čistým kyslíkem může dojít ke stresu, který se projevuje zpomalením růstu kvasničné populace. Celková doba propagace se pohybuje mezi 38 až 48 hodinami, kroužky namnožené biomasy se převádějí do provozu vzhledem k rychlejšímu nárůstu častěji, v poměru 1:15 až 1:20. Kvasnice z aerobní propagace vytvářejí více zásobních látek, rychleji prokvašují a jsou odolnější ke stresům, poskytují také pivo s nižším obsahem těkavých látek, např. esterů, 2 - fenylethanolu a mastných kyselin (Ghul a kol., 2007). Tento způsob se může použít i u jednonádobových propagačních stanic (Kaufmann a Hopulele, 2006).

3.6.6.3 Tanková a kontinuální propagace kvasnic

Německá literatura rozlišuje tento způsob propagace na dvounádobový (dvoutankový) nebo jednonádobový (jednotankový) proces. V dvounádobovém procesu se větrá pouze na počátku a pomnožování sleduje klasickou kvasnou křivku (Basařová, 2010).

V jednonádobovém systému, také zvaném asimilační, se kvašení udržuje v exponenciální fázi růstu s různým způsobem vzdušnění taktovým i kontinuálním. Zbytek v kvasném válci se zanechává pro následující zakvašení. Teploty mohou dosáhnout až 15 °C, počet buněk v exponenciální fázi je až 180×10^6 / ml a obsah alkoholu okolo 1 až 2 % hmotnosti. Obsah oxidu uhličitého se pohybuje v rozmezí 0,5-1,5 g / l. Při převádění se jako zbytek pro další kvašení zanechává asi 15 až 20 % objemu, k němuž se přidává sterilní mladina po 24 hodinách (Basařová, 2010).

Taktková propagační stanice předpokládá zakvašení v poměru 20 % kroužků a 80 % mladiny a vnější nebo vnitřní vzdušnění. Obsah tanku by měl být cirkulací vyměněn jednou za hodinu. Při tomto (asimilačním) způsobu dosahuje koncentrace kvasničných buněk až 10^8 buněk v 1 ml. Jako příklad uveďme asimilační stanici pro 50 várek týdně s jednotlivým objemem 500 hl, přičemž se získá 37,5 hl kvasničné suspenze pro jednu várku. Při teplotě 15 °C a době cyklu 36 h postačí čtyři asimilační tanky s pracovním objemem 187,5 hl a celkovým objemem 375 hl (Lehman a Back, 1997).

Kontinuální propagační stanice se vyrábějí v různém provedení a různé velikosti. Jako příklad poslouží řešení firmy EssauHueber v příloze, využívající dva propagátory s objemy 64 a 610 hl. Oba tanky jsou vybaveny provzdušňovacím zařízením s tryskou. Zákvas se připravuje v laboratoři postupným pomnožením čistého kmene až do objemu

45 l kroužků, což při teplotě 20 °C trvá asi 6 dní. Mladina (35 hl) se pak zaočkuje v poměru 1:72 při teplotě 13 °C a po dvou dnech kvašení se převede do většího propagátoru. Objem velkého propagátoru postačuje na zakvašení 2 900 hl v CKT (Jacob, 2005).

Aerobní postupy se mohou aplikovat nejen na propagační stanice, ale také na pomnožování kvasnic ve větším měřítku (Steenberg a kol., 2003).

Využívání kvasnic z opakovaného nasazování se zabezpečuje výběrem kvasnic podle jejich stavu, zjišťovaným kontrolními postupy, jako fluorescenční spektrofotometrickou mikroskopií nebo průtokovou spektrometrií. Novým přístupem bylo hodnocení kvasnic podle podílu mladých buněk v populaci (Deans a kol., 1997).

3.6.7 Procesy propagace v praxi

Kontinuální proces propagace kvasnic je v praxi málo rozšířen, vsádkové procesy kvašení převažují. Výhodou jsou menší provozní náklady, vyšší výtěžnost, ale na straně opačné kontaminace a ztráty technologických vlastností daného kvasničného kmene a vyšší riziko mutací. V kontinuální propagaci se, pro snížení pění, vzdušní čistým kyslíkem. Kontinuální propagační stanice mohou pracovat po dobu až jednoho roku, ale i déle (Basařová, 2010).

Terminologie při označování propagačních stanic není jednotná, většinou se ve vícenádobových stanicích zákvas uchovává v menším válci a z něj se kultura dodává po vyprázdnění a sterilaci do většího kvasného válce, jednonádobové stanice pracují jak v tankovém, tak v kontinuálním režimu. Postupy zde zmiňované se často kombinují (Basařová, 2010).

3.6.8 Technické požadavky na propagační stanice

Z charakteristických znaků propagačních stanic vyplývají i jejich technické požadavky. Válce musí být zhotoveny z korozi-vzdorné oceli a musí obsahovat chladicí i ohřívací plochy. Vnitřního ohřevu se v současné době téměř neuzívá. Nádoby jsou izolované, ačkoliv to není zásadní podmínkou. Válce musí být opatřeny mycími hlavicemi a alespoň velký válec by měl být vybaven míchadlem, které je schopno homogenizovat obsah nádoby i při sedimentaci kvasnic. Mycí hlavice jsou napojovány na vnější nebo samostatnou sanitační stanici. Nezbytné je cirkulační čištění přívodu horké mladiny z varny, včetně vratné větve pro toto vedení. Někdy je vyžadována

přetlaková sterilizace párou, včetně sterilizace substrátu až na teplotu 110 °C a provzdušňování sterilní mladiny, popř. přivzdušňování během kvašení. Odcházející oxid uhličitý uniká zpravidla pod vodním uzávěrem. Vzorkovací kohoutky musí být schopné sterilizace. Řešení s nižší teplotou sterilace (asi 105 °C) přichází v úvahu také, i když zaručuje poněkud nižší, ale přijatelnou jistotu sterilizace. K propojování cest se běžně používá deska s odnímatelnými koleny a klapkami (Basařová, 2010).

Ustoupí - li se od požadavku zakvašovat veškerou produkci mladiny čerstvou kulturou a používají-li se ke kvašení opakovaně nasazované kvasnice ze zásobních nádob, lze volit menší propagační stanici. V současnosti se v propagačních stanicích kultura převádí ve stádiu kroužků, které mohou obsahovat až 150 milionů buněk v 1 ml. V provozních CKT lze získat (sebrat) z jednoho objemu nasazených hustých kvasnic zpravidla asi tři až čtyři objemy znovu použitelných kvasnic (Chládek, 2007).

Pomnožovací objem kroužků mezi malým a velkým válcem se zpravidla volí pětinásobný (1 díl kroužků, 5 dílů mladiny), směrem k velkým kvasným objemům až desetinásobný. Používá se k tomu buď mezistupeň v podobě třetí nádoby, napuštěné zchlazenou mladinou bez další sterilace, malý kvasný tank, nebo se zakvašuje přímo provozní cylindrokónický tank na ujato (Basařová, 2010).

Zakvašení na ujato znamená přidavek kvasící mladiny v exponenciální fázi k předem připravené studené sterilní mladině. Z tohoto postupu opět vyplývají různé možnosti uspořádání nádob. Velikost pomnožovacích stupňů úzce souvisí s teplotou kvašení a provzdušňováním, přičemž lze dosáhnout vysokých pomnožovacích poměrů (Basařová, 2010).

3.7 Kvasničné hospodářství

Vzhledem k faktu, že nové kvasnice z propagační stanice je možné po skončení kvasného cyklu aplikovat i vícekrát jak už bylo zmíněno (běžně se používá troj- až čtyřnásobné nasazení, avšak větší počet nasazení stejných kvasnic zvyšuje riziko kontaminace), je nezbytné kvasnice získané ze dna kvasných kádí, kvasných tanků nebo z kužele cylindrokónických tanků dopravit vyhovujícím čerpadlem (peristaltické, piškotové čerpadlo) k vibračnímu sítu, kde se kvasnice čistí od nečistot a oxidu uhličitého. Dále se kvasnice mohou propírat v ledové vodě, při této operaci se z nich odstraňují mrtvé buňky. V případě vyššího znečištění kvasnic se užívá tzv. „kyselá

praní“ kvasnic, které se dělá tak, že se kvasnice promíchají ve zředěné fosforečné nebo jiné kyselině a ihned se dávkuje do mladiny (Basařová, 2010).

K úschově vyčištěných kvasnic se dříve užívaly otevřené kvasničné vany, ve kterých byly kvasnice skladovány pod ledovou vodou, později se přešlo ke kvasničným tankům, s chladicím systémem, který udržuje teplotu kvasnic na hodnotě 2 - 3 °C (Basařová, 2010).

Odpadní kvasnice, tedy kvasnice z vícenásobného použití, se buď prodávají přímo, nebo se suší a lisováním se z nich vyrábějí preparáty (např. Pangamin). Ve větších pivovarech se z těchto odpadních kvasnic ještě získává pivo použitím odstředivek, kalolisy (zakvašování mladiny) nebo membránovou technikou (Chládek, 2007).

3.8 Dávkování kvasnic

Do chlazené a provzdušněné mladiny byly dříve kvasnice dávkovány objemově nabíráním kvasnic „šaflíkem“ z otevřených kvasničných van. Později se přešlo (a v řadě pivovarů je stále ještě užíváno) k tzv. vajíčku, v podstatě uzavíratelné tlakové nerezové nádobě (monžík), do které se odměří potřebný objem kvasnic a následně se tlakem sterilního vzduchu přiváděného do uzavřené nádoby přetlačí do potrubí, kterým proudí mladina z chladiče do spilky (Chládek, 2007).

V dnešní době se ve velkých pivovarech, vybavených cylindrokónickými tanky, pro zakvašení mladiny užívají dávkovací čerpadla, která jsou řízena buď podle průtoku mladiny, kterému odpovídá objem nadávkovaných kvasnic, nebo je užíváno rozdílu zákalu nezakvašené a zakvašené mladiny, který je průběžně vyhodnocován zákaloměrem a na základě jeho údaje jsou pak řízeny otáčky dávkovacího čerpadla kvasnic (Chládek, 2007).

3.9 Sběrka pivovarských kvasinek

3.9.1 Proč vznikla

Pro moderní průmyslovou výrobu je požadována čistá kultura mikroorganismů, která splňuje svými biologickými a biochemickými i technologickými vlastnostmi požadovanou kvalitu hotového výrobku. Také podle použité technologie kvašení je třeba se rozhodovat a vybírat k aplikaci kmeny, které splňují nároky na kvalitu hotového piva. Všechny tyto požadavky měly za následek založení Sběrky

pivovarnických kvasinek na mikrobiologickém oddělení VÚPS, mezinárodně registrované pod značkou RIBM (Research Institute of Brewing and Malting) (Hollerová a Kohoutová, 1999).

3.9.2 Historie sbírky

V roce 1946 byla založena ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském v Praze největší československá Sběrka kvasinek a kvasinkových mikroorganismů (velkou zásluhu zde měla RNDr. Anna Kocková - Kratochvílová). Jako základ sbírky byly použity kmeny shromážděné mezi lety 1942 - 1944 v Laboratoři vitamínové a hormonální chemie v Praze, ale také spousta produkčních kmenů pocházejících z Dánska, Holandska a mnoha středoevropských pivovarů. Celá sbírka byla v té době uchovávána na šikmých sladinových agarech pod parafinovým olejem a skladována při pokojové teplotě. Mezi první kmeny v této nové sbírce pivovarských kvasinek řadíme kmeny používané v českých pivovarech, vesměs kvasinky spodního kvašení, tehdy označované jako *Saccharomyces carlsbergensis*. V průběhu let se sbírka neustále rozšiřovala a doplňovala o další nové kmeny, a to ze zahraničních pivovarů a sbírek, ale i nově vyšlechtěné, či geneticky zkonstruované kmeny (Hollerová a Kohoutová, 1999).

V roce 1964 se stala Sběrka pivovarských kvasinek členem Federace československých (nyní už českých a slovenských) sbírek mikroorganismů a jako jedna z mnoha specificky zaměřených průmyslově využitelných sbírek je od roku 1996 také součástí „Národního programu ochrany genofondu mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu a jejich využití v referenční diagnostice“ (Kociánová, 2007).

3.9.3 Sběrkové kmeny

V roce 1999 bylo ve sbírce zahrnuto 124 kmenů pivovarských kvasinek a byla a stále je průběžně doplňována nově vyšlechtěnými perspektivními produkčními kmeny, které vlastní speciální vlastnosti, které jsou vhodné pro nové výrobní postupy. Ve sbírce mají své zástupce oba typy produkčních kmenů, ve větším množství však kvasinky spodního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis* a v menší míře i kvasinky svrchního kvašení *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* (Hollerová a Kohoutová, 1999).

Ve sbírce nalézáme kmeny produkční - pracovní (splňující svými parametry požadavky na výrobu piva) a kmeny vhodné pro výzkum, nebo uplatňující se při výrobě

pivních specialit. Kmeny ze sbírky jsou dodávány výzkumným pracovištím a pivovarům v podobě čistých kultur ve formě šikmých agarů, nebo pomnožené v požadovaném objemu sterilní mladiny (Hollerová a Kohoutová, 1999).

Paralelně k této sbírce ještě existuje sbírka, která obsahuje kvasinky jiných kmenů různé provenience (14 kmenů vinařských a 40 kmenů dalších rodů) a sbírka izolátů pivu škodících G+ bakterií (45 kmenů různých laktobacilů a 7 kmenů pediokoků). Obě tyto sbírky jsou součástí za účelem výzkumu nebo slouží jako srovnávací (Kociánová, 2007).

3.9.4 ECCO, WFCC a úloha sbírky

Sbírka kultur kvasinek je součástí Chemického ústavu SAV. Ve Sbírci je uloženo přibližně 3300 kmenů kvasinek, mimo jiné např. kmeny důležité z hlediska medicínského, kmeny technologicky významné (hlavně pivovarské a vinařské kvasinky) a kvasinky izolované z různých přírodních zdrojů (voda, půda, rostlinný materiál) (Culture collection of yeasts, online).

Sbírka je členem Evropského sdružení sbírek mikroorganismů (ECCO), Světové federace sbírek mikroorganismů (WFCC) a má statut mezinárodního ukládacího místa pro právně chráněné kmeny (Culture collection of yeasts, online).

Sbírka kultur kvasinek poskytuje izolaci a identifikaci kvasinek z různých zdrojů, úschovu a vydávání kvasinkových kmenů různým institucím. Výzkumné projekty jsou zaměřeny na studium rozmanitosti kvasinek izolovaných z různých přírodních zdrojů a jejich vlastností, jakož i na studium vlivu některých druhů stresu na buňky (Culture collection of yeasts, online).

3.9.5 Uchování a vedení sbírky

Sbírka je vedena na šikmých sladínových agarech pod zaparafinovanou vatovou zátkou a uložena odděleně v chladicím boxu. Tato metoda skladování umožňuje dodání kmene žadateli rychleji a v aktivním stavu (sladina je přirozeným prostředím pro pivovarské kvasinky, takto vedené kmeny se lehce převádí do výrobního procesu, dále si zachovávají léta své specifické vlastnosti, pravidelně se 2 x ročně přeočkovává). Současně je vedena sbírka na šikmých sladínových agarech převrstvených parafinovým olejem (přeočkování 1 x za dva roky). Paralelní sbírka je vedena pouze na sladínovém agaru pod parafinovým olejem vždy po dobu dvou let. Jiné způsoby očkování (lyofilizace, kryoprezervace) už nejsou užívány (Hollerová a Kohoutová, 1999).

Aby sbírka správně plnila svůj účel a mohla být využívána, je důležité dávat dostatečné informace o deponovaných kmenech. Proto byly v průběhu minulých let ověřeny a stanoveny základní morfologické a biochemické vlastnosti jednotlivých kmenů (Kociánová, 2007).

Vybrané pivovarské kvasinky jsou pravidelně podrobovány laboratorním testovým kvasným zkouškám, které probíhají ve skleněných kvasných válcích o kvasném objemu 0,5 l v 10% mladině po dobu 7 dnů. Při nich jsou stanovovány nejdůležitější laboratorně postižitelné technologické rysy připraveného mladého piva - prokvašení mladiny, sedimentace kvasinek a také je věnována pozornost tvorbě důležitých metabolitů jako vedlejších produktů při kvašení, tzn. produkci vyšších alkoholů, diacetilu, esterů, oxidu siřičitému a mastným kyselinám. Studie sbírek se rozšířily o posouzení tendencí produkčních kmenů k autolýze a citlivosti ke složení mladiny (Hollerová a Kohoutová, 1999).

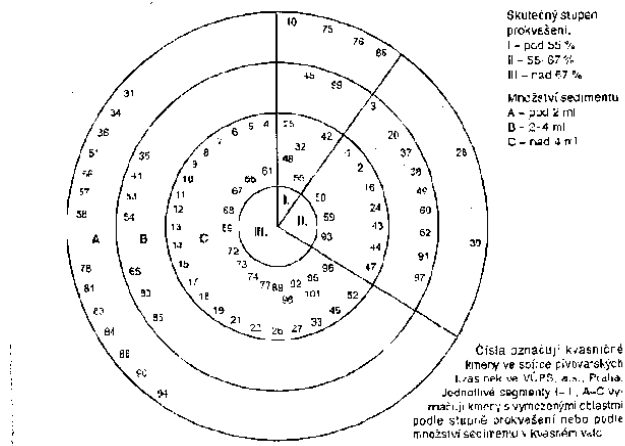
3.9.6 Produkční (pracovní) kmeny

Jde o kmeny sbírkových čísel 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 95 a 96. Více než objem sedimentu se zdá o sedimentační charakteristice jednotlivých kvasničných kmenů vypovídat bod flokulace udávající stupeň prokvašení mladiny v době, kdy je ve vznosu největší počet buněk. To vyplývá při srovnání odpovídajících hodnot tohoto prokvašení s příslušnou provozně zjištěnou charakteristikou sedimentace. Metabolity stanovené v mladém pivu laboratorně vypovídají o tendenci kvasničného kmene k tvorbě nejdůležitějších prekurzorů organoleptických vlastností hotového piva. Provozní charakteristiky naopak vypovídají o vhodnosti kmene pro zavedený či nově zavedený technologický postup při výrobě piva. Někdy si také změna kvality suroviny může následně vyžádat změnu kmene provozních kvasnic při nezměněných senzorických vlastnostech (Hollerová a Kohoutová, 1999). V pivovaru Litovel se používá produkční kmen č. 7. Tento kmen je dle provozních zkušeností a laboratorních testů řazen do II. kvasné skupiny, tj. středně prokvašující. Jedná se o kmen s dobrou prokvašující schopností, vyznačující se nízkou produkcí vedlejších metabolitů během hlavního kvašení a dokvašování, což má příznivý dopad na organoleptické vlastnosti hotových piv (Kociánová, 2007).

Uchování geneticky nezměněného kmene je velice podstatné, a to v zájmu uchování biodiverzity. Také nároky průmyslu na zachování technologicky standardních rysů jsou pro takto specializovanou sbírku mikroorganismů velkým slibem. Sběrka pivovarských kvasinek je svým způsobem unikátní nejen v České republice, ale i v rámci celého východního bloku a je zárukou zásoby stabilně kvalitních kvasničných kultur především pro české pivovarnictví (Kociánová, 2007).

Obr. 4: Typizace kvasnic

(zdroj: Bendová a Kahler, 1981)



3.10 Propagace v minipivovarech od jedné buňky až do plného provozu

Ohledně mé bakalářské práce jsem se zajímala, jak tuto problematiku řeší minipivovary v praxi a dotazovala se minipivovarů na Vysočině. Ve všech případech mi byla dána odpověď, že tento bod při výrobě piva neřeší v rámci vlastní propagace, ale pohodlnější cestou, a to odkupem kvasnic z velkých pivovarů. Pro příklad uvedu odpověď sládka Jaroslava Dorážky z Jihlavského radničního právovárečného pivovaru: „Dobrý den, kvasinky v pivovaru nepropagujeme. Na ležáky používáme kvasnice z velkého pivovaru a na svrchně kvašená piva pak kvasinky sušené.“ Osobně si myslím si, že je škoda neřešit otázku vlastní propagace a to hlavně z několika důvodů.

Pivovar, jenž je vlastníkem propagační stanice, vylučuje možnost nákupu infekce s kvasnicemi, což může být ohrožením pro celou jeho výrobu. Vlastní propagační stanice by byla tedy bezpečnější cestou. Pokud vlastní minipivovar svoji soustavu na propagaci kvasnic, není závislý na konkurentech (Destila, online). Další výhodou bezesporu je, že si minipivovar může řídit produkci kvasnic dle svých vlastních potřeb a

rozsahu své výroby. Pokusím se tedy zabývat otázkou řešení propagační stanice pro minipivovary a možností aplikace vlastního pomnožování kvasnic v praxi.

Jako sládek v minipivovaru bych řešila problematiku propagace kvasnic ideálně z jedné buňky. Odkoupila bych kulturu od Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, popřípadě od Slovenské akademie věd, která vede sbírku v Bratislavě (SAVBA) a je možné si vybrat svůj kmen kvasnic dle požadovaných kritérií. Pro příklad přikládám obrázek z webového vyhledávače na stránkách SAV. Toto řešení není až tak nákladné. Částka za jednu dodanou kulturu se pohybuje okolo 30 Euro, což je v přepočtu asi 800 Kč. Za tuto cenu máte jistotu, že obdržíte pro svůj provoz čistou kulturu kvasnic bez rizika kontaminace.

Katalóg CCY

Rod-Druh (NNN-NNN): Číslo CCY (max 11 zn.): Název (max 40 zn.): Autor (max 40 zn.):

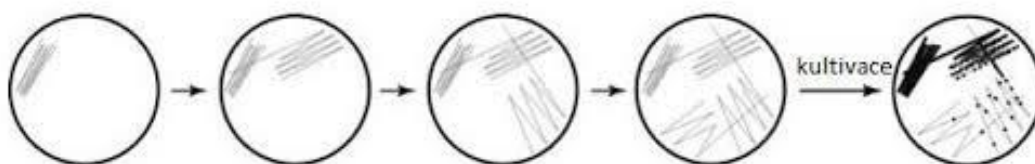
zrušit filter skryt filter

Číslo CCY	Aktuální název druhu, autor	Synonymum	Původ	Geografické údaje	Riziková skupina
022-003-030	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		baker's yeast DCL	UK	
021-004-099	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		river water Danube	Bratislava, Slovakia	
021-004-103	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		river water Morava	Devínska Nová Ves, Slovakia	
021-004-105	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		river water Morava	Devínska Nová Ves, Slovakia	
022-003-045	Saccharomyces cerevisiae, Hansen			Slovakia	
022-003-046	Saccharomyces cerevisiae, Hansen			Slovakia	1
022-003-047	Saccharomyces cerevisiae, Hansen			Slovakia	
021-004-111	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		leaves, plum tree Prunus domestica L., Stanley	Malé Zálužie, Slovakia	
021-004-112	Saccharomyces cerevisiae, Hansen		leaves, plum tree (Prunus domestica)	Malé Leváre, Slovakia	

Obr. 5: Katalóg Culture collection yeasts – SAVBA

(zdroj: <http://ccy.sk/index.php/catalog>)

Kultury jsou většinou dodávány na šikmém agaru. Pro další postup je nutné přeočkovat kulturu sterilně na sladinu v Petriho misce (obvykle 7% sladina se 4 % agaru). Dále se provádí křížový roztěr, kterým docílíme množení kultury na živné půdě.



Obr. 6: Křížový roztěr (zdroj: Mlejnková a Chloupek, online)

K inokulaci se používá nádobka, jejíž hrdlo je potřeba uzavřít pryžovou zátkou. V našem případě užijeme Erlenmayerovu baňku o objemu 500 ml. Zátka má dva vývody,

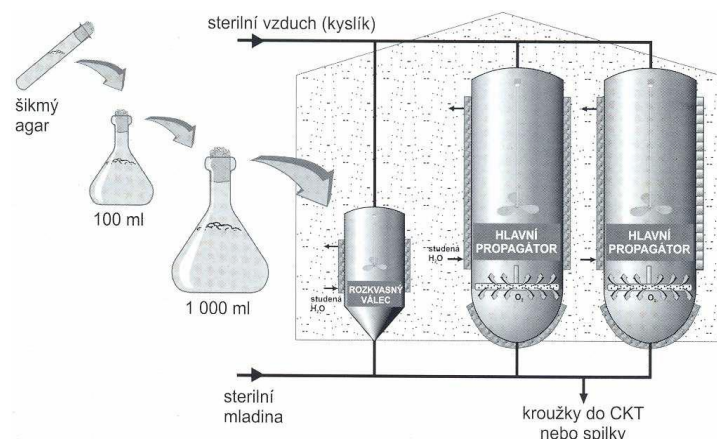
z nichž jeden je opatřen vatovým filtrem. Na druhý vývod se napojuje vypouštěcí hadička, jejíž jeden konec dosahuje ke dnu nádoby a druhý, delší je opatřen sterikonektorem. Těsně před sterikonektorem se hadička uzavře tlačkou. Po naplnění příslušným objemem živného média se zátka i s částí hrdla obalí papírem nebo hliníkovou fólií a nádoba se sterilizuje v autoklávu (Nečas a kol., 1986).

Po vychladnutí se za aseptických podmínek obsah naočkuje materiálem odebraným klíčkou z povrchové kultury nebo suspenzí buněk sterilní pipetou a dále přidáme do baňky 7% sladiny jako živné médium a necháme kultivovat za třepání při 37 °C. Tím docílíme inokulace sladiny naší vybranou kulturou. Objem inokula se pohybuje většinou mezi jednou setinou až jednou desetinou objemu kultury. Teplota zaručí rychlý nárůst počtu buněk a třepání slouží k promíchávání sladiny se zaočkovanou kulturou tak, aby bylo dosaženo homogenní konzistence. V počáteční fázi propagace je možné přidat růstové médium pro kvasinky a zajistit tak jejich správnou výživu. Na trhu je například k dostání Biostart, o kterém jsem se zmínila už výše.

Je dobré vědět, jakou má naše kvasinka růstovou křivku, neboť nejvýhodnější je převod v exponenciální fázi růstu. Dále podle ní poznáme, v jaké je kvasinka růstové fázi a také je ukazatelem kontroly živin v substrátu, které potřebuje kvasinka právě ke svému růstu a množení.

Po dostatečném pomnožení, obvykle třetí den, kdy odpovídá stadiu bílých kroužků, se kvasicím médiem zakvašuje čtyřnásobný až desetinásobný objem sladiny. V našem případě převedeme do baňky o objemu 2 litry. V tomto kroku už můžeme využít laboratorní biofermentor. Na trhu je nyní k dostání Minifor od společnosti Lambda, ale tento fermentor je pro minipivovary nákladný, proto bych zvolila levnější imitaci přístroje. Dobré rychlosti přenosu kyslíku jsou podporovány mechanickým mícháním, je dobré ho tedy zajistit. Opět za sledování růstové křivky kontrolujeme nárůst kultury, popřípadě uijeme některou z nepřímých metod kontrol růstu (stanovení některých buněčných složek, např. bílkovin, dusíku, fosforu, RNA apod.) (Nečas a kol., 1986).

Ve chvíli dostatečného pomnožení přemístíme kulturu do 30 l propagačního tančíku, kde pokračuje proces propagace. V propagačním tančíku docílíme konečné fáze laboratorní propagace a pomnožíme kulturu do objemu, který je dostatečný pro provozní propagaci a zakvašení výrobní šarže minipivovaru. Náskres propagační stanice je znázorněn na obrázku v příloze.



Obr. 7: Schematický náčrt možnosti propagace (zdroj: Kociánová, 2007)

3.11 Výroba sladiny

3.11.1 Proč je sladina potřeba

Výroba sladiny je uskutečněna na varně, o které je známo, že je srdcem pivovaru. Po smíchání rozemletého sladu s vodou, což se nazývá vystíráním, je celý objem zahříván na technologicky důležité teploty. Tím dosáhneme převedení škrobu a dalších látek extraktu sladu do roztoku a především rozštěpení škrobu sladovými enzymy na nízemolekulární látky (Basařová a Hlaváček, 1999).

Dodané kvasinky do hotového díla potřebují k životu využívat jednodušší (zkvasitelné) cukry. Ječmen jako základní pivovarská surovina sice skrývá velké množství cukru, kterým je v tomto případě škrob, ale kvasinky si s ním neporadí. Škrob je polymer, který je složený z molekul glukózy. Pro správnou aktivitu kvasinek je potřeba tento polysacharid rozdělit na jednotlivé molekuly, které jsou přístupné kvasinkám a mohou je metabolizovat na alkohol, oxid uhličitý a energii. Rozklad škrobu probíhá za účasti enzymů, a to především α -amylasy a β -amylasy (Thompson, 2011).

Doba potřebná k dosažení vyhovujícího zcukření je závislá zpravidla od jakosti sladu a stupně rozluštění zrna. Zcukření probíhá tím rychleji, čím je rmut řidší. U teploty je třeba brát v ohledu citlivost amylas (Pelikán a kol., 2002).

Dostatečné zcukření škrobu zjistíme jednoduchým testem. Do kapky rmutu se kápne jodová tinktura. V přítomnosti škrobu se jód zbarví modře. Pokud je rmut správně uvařen, zůstává jód jen lehce narůžovělý (Thompson, 2011).

3.11.2 Důležité teploty

Důležité teploty při výrobě sladiny jsou:

37° zapáčka

45-52° proteolytická

62° I cukrotvorná – zde se tvoří jednoduché cukry

72° II cukrotvorná – zde dojde k rozštěpení škrobu na dextriny a maltózu

(Pelikán a kol., 2002)

3.11.3 Definice vzniklé sladiny

3.11.3.1 Složení sladiny

Sladina je viskózní, sladká, hustá, lepkavá a více či méně barevná. V podstatě je velmi složitá (pravděpodobně je zde přítomno tisíce složek). Žádná sladina nebyla úplně analyzována. Látky přítomné zahrnují jednoduché cukry, dextriny, β - glukany, pentózy, fosfáty, rozpuštěné anorganické ionty, proteiny, peptidy a aminokyseliny, produkty nukleových kyselin, lipidy, růstové faktory kvasinek (vitamíny), organické kyseliny, zásady a fenolické látky. "Typická" sladina může obsahovat pevné částice, jejichž skladba je asi z 90 až 92 % tvořena sacharidy, 4 - 5 % dusíkatými látkami a 1,5 - 2 % minerálními látkami (Mac William, 1968).

3.11.3.2 Fyzikální vlastnosti

Fyzikální vlastnosti sladiny určuje celková doba přípravy a intenzita varu. Sladiny ze třímutových postupů jsou vždy tmavšího odstínu, kdežto ze zkráceného postupu jsou naopak světlejší (Pelikán a kol., 2002).

3.11.3.3 Sladina jako růstové médium

Sladina je dále použitelná jako růstové médium pro množení kvasinek. Sladina je obvykle v koncentraci 7 - 12 %. Je možno ji naředit dle potřeby na 3-5 %. Pro dosažení vyšších výtěžků při propagaci kvasnic, je možné připravit sladinu o koncentraci 20 % a tu pak pomalu přidávat do kvasného tanku při propagaci. Tato forma propagace je nazývána jako semikontinuální přítokový způsob propagace, kdy do růstového média je přičerpáváno neustále malým proudem koncentrované sladinové médium (Pelikán a kol., 2002).

3.11.3.4 Obohacování sladiny

Do sladiny jsou často přidávány minerální látky v podobě solí – chlorid vápenatý, dusičnan amonný, hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, síran hořečnatý a stopové množství železa, bóru, manganu, mědi, zinek ve formě dusičnanů kvůli výživě a metabolismu kvasnic (Mac William, 1968).

3.12 Kultivace kvasnic v laboratorních fermentorech

3.12.1 Úvod

Kultivace v různě upravených zařízeních navazují na kultivace ve zkumavkách a baňkách. Obvykle jsou tato zařízení několikanásobně většího objemu než kultivační baňky, aby byl k dispozici dostatek materiálu pro analýzy, a aby se odběrem vzorků výrazně nezměnil objem kultury, a tím i podmínky vzdušnění a míchání. Za optimální laboratorní velikost pro organismy kvasinek se považuje pracovní objem od 3 do 5 l. Jak jednorázovou, tak kontinuální kultivaci v tomto měřítku lze ještě v běžně vybavené mikrobiologické laboratoři dobře zvládnout. Získávají se v nich údaje o kinetice růstu a tvorbě produktu, fyziologickém stavu kultury, o fyzikálních parametrech a některé z nich lze dokonce převádět přímo do výrobního měřítka (Nečas a kol., 1986).

3.12.2 Laboratorní fermentor

Laboratorní kultivační zařízení je většinou sestaveno ze dvou částí: zvláštního fermentoru a z přístrojové části ovládající provoz fermentoru. Laboratorní fermentor jako vhodné zařízení pro submerzní kultivaci nám dává možnost zkoumání a řešení biotechnických, fyzikálních a fyziologických otázek, které jsou spojeny s technologií, neboť způsobem míchání, vzdušnění a svým geometrickým tvarem a uspořádáním se podobá značně fermentoru průmyslovému. Tím, že nám zprostředkuje hodnotné výsledky získané z nevelkého objemu kultury za nízkých provozních nákladů a je cenově poměrně dostupný, stává se hospodárným zařízením základních laboratoří a efektivním mezičlánkem procesu převádění výsledků výzkumu do výrobního měřítka. Laboratorní fermentor je obvykle konstruován tak, že je snadno rozebíratelný, dá se dobře čistit a znovu sestavovat. Pro zvláštní způsoby kultivace musí být fermentor velice přizpůsobivý, aby bylo možné učinit různé technické modifikace (Nečas a kol., 1986).

3.12.2.1 Složení fermentoru

Laboratorní fermentor se skládá ze skleněného válce, který uzavírá horní a spodní víko. Obvykle je použit dílec průmyslového potrubí formovaný z chemicky inertního skla, odolného vůči prudkým změnám teploty. Nerezová víka jsou upevňována k válci přírubami a šrouby. Mezi kovové části a sklo se vkládá těsnění, nejlépe zhotovené z kvalitní silikonové pryže či podobného materiálu. Úkolem těsnění je kompenzovat rozdíly v tepelné roztažnosti skla a kovu a má dokonale těsnit i během chladnutí po sterilizaci, bez jakékoliv změny tvaru. Je nutné dávat pozor, aby všechny kovové součásti, které zasahují do kultivačního prostředí fermentoru, byly vyrobeny z nerezové oceli stejného složení. Nedodrží-li se toto, vznikají elektrické články, které podporují korozi i nepříznivě ovlivňují stav kultury ve fermentoru. Závadné součásti lze dočasně pokrýt ochrannou vrstvou chemicky a teplotně odolného izolačního prostředku, např. teflonu, nebo vypalovacího silikonového laku. Další možnost je, že vyrobíme danou součástku z umělé hmoty, která odolává přehřáté vodní páře, ale i chemikáliím (Nečas a kol., 1986).

3.12.2.2 Filtrace

Filtr účinkuje dvojím způsobem. Za prvé, přímo zachytí částičky jako mechanická překážka difúzními mechanismy a setrvačnými silami, za druhé, elektrostatickými silami závislými na náboji částic a vláken. Účinnost filtru je především ovlivnitelná velikostí filtrovaných částic, povrchovou rychlostí vzduchu a tloušťkou filtrační vrstvy (Nečas a kol., 1986).

Vzduch, který odchází z fermentoru, musí být také asepticky zabezpečen. Je to kvůli ochraně kultury před zpětnou infekcí zvenčí a okolím fermentoru před znečištěním. Odpadní vzduch probublává dezinfekčním roztokem v promývače. U zvláštních nebo nějakým způsobem nebezpečných kultivací je vzduch odváděn chladičem, který je situován na horním víku a z něho kondenzát stéká nazpět do kultury. Poté se vzduch vede přes filtr, který je dimenzován obdobně jako filtr vstupní, a který je navíc setrvalé vyhříván na teplotu od 100 do 350 °C. Teplotu i délku filtru určuje expozice potřebná k asanaci unášeného aerosolu vegetativních buněk nebo spor (Nečas a kol., 1986).

3.12.2.3 Odběr vzorků

Do vík fermentoru jsou upevňována zařízení, která slouží k odběru vzorků. Tok vzorku zařízením musí být alespoň jednou přerušen. Zamezí se tak zpětnému infikování kultury. Nejčastěji jsou vzorky odebírány pod spodním víkem, kde po uvolnění tláčky nebo solenoidového ventilu vytéká vzorek samospádem. Při odběru horním víkem je používáno přetlaku nebo nasávání. Odběrové zařízení má být konstruováno tak, že se odebraný vzorek nedá vrátit zpět do kultury. Výtokový konec vzorkovače musí být vždy opatřen přesahujícím krytem kvůli ochraně. Vzorek je odebírán do kalibrovaných zkumavek nebo nádobek, které jsou většinou upevněny na vzorkovači (Nečas a kol., 1986).

3.12.2.4 Sterilizace fermentoru

Nejlepší způsob je sterilovat kultivační zařízení prázdné v autoklávu 1h při teplotě 110 – 120 °C. Z nouze je možné sterilizovat i chemickými prostředky, např. kyselinou peroctovou, formaldehydem, nebo etylenoxidem. Každé z těchto činidel vyžaduje specifickou složitou technologii použití, díky které nezůstanou ve fermentoru stopy sterilantu (Nečas a kol., 1986).

Někdy je živné médium z určitých důvodů připravováno přímo ve fermentoru a vše se společně sterilizuje v autoklávu. V běžné praxi je však vhodnější, aby bylo médium sterilizováno odděleně za příslušných optimálních podmínek a přepuštěno asepticky do sterilního fermentoru až poté (Nečas a kol., 1986).

Než začneme s kultivací, měla by být provedena zkouška sterility. Buď se před naočkováním ponechá fermentor naplněný médiem například přes noc v provozu, nebo se odebere vzorek a kultivuje se na specifických, nebo selektivních živných médiích (Nečas a kol., 1986).

Přídavná zařízení jako dávkovače, čerpadla, některá čidla a elektrody se sterilizují samostatně a za aseptických podmínek se připojují k fermentoru dodatečně (Nečas a kol., 1986).

3.12.3 LAMBDA

Laboratorní přístroje Lambda vyvíjí inovativní, vysoce kvalitní laboratorní přístroje s vynikajícím poměrem ceny a výkonu: laboratorní fermentory, bioreaktory pro buněčné kultury, peristaltické pumpy, stříkačky a čerpadla, sběrače frakcí, práškové dávkování,

řadiče velkokapacitních průtoků plynu a fermentační softwary pro biotechnologie, mikrobiologie, potravinářský a zemědělský výzkum (Lambda instruments, online).

3.12.3.1 MINIFOR

Minifor byl vyvinut pro potřebu vybudování malých laboratorních fermentačních svazků od 0,035 do 6 l. Odborníci vytvořili fermentor, který je snadno použitelný a se schopností měřit a kontrolovat všechny důležité parametry biologické kultury. Fermentor zabírá minimální prostor, ale zároveň má dobrou dostupnost do všech částí (Lambda instruments, online).

Hlavním rysem Minifor je, že veškerá elektronika, napájecí, IR topení, vzduchový ventil, hmotnostní průtokoměr, kabely a hadice jsou umístěny v jedné základně, která slouží jako podpora pro kvasné nádoby a veškeré další potřebné vybavení. Platforma uspořádání základní jednotky činí všechny části fermentoru jasně viditelnými a snadno přístupnými ze všech stran navzdory základním rozměrům, které jsou pouze 22 x 40 cm (cca. A4 list papíru) (Fermenternet, online).

Až pět 250 ml lahvíček v magnetických držácích může být umístěno do fermentační nádoby a 4 čerpadla mohou být situována do nastavitelných držáků namontovaných na tyče v zadní části základny. Zásuvky jsou umístěny na zadní straně základní jednotky, čímž se odstraní kabely z pracovního prostoru (Lambda instruments, online).

Obrázky přístroje Minifor jsou uloženy v příloze.

3.13 Charakteristiky kultivačních metod

Na schématu v příloze je znázorněno dělení kultivačních metod podle provedené kultivace. Tvoří plynulý přechod od kultivací jednorázových ke kultivacím nepřetržitým. Ostatní metody jsou v podstatě jen jejich kombinací. Povrchové kultivační metody řadíme mezi metody heterogenní, submerzní metody mohou být jak homogenní, tak heterogenní, a podle toho, zda růst probíhá volně v tekutém médiu nebo na nosičích vložených do fermentačních tanků, a rovněž tak mohou být uvedeny i dialyzované kultury. Přitom poslední dvě metody mohou probíhat za částečného vracení kultivovaných buněk, obvykle po jejich oddělení od použitého substrátu. Dále je popsána kultivace submerzní homogenní, poněvadž je nejdůležitější a nejvíce se u kvasinek používá (Nečas a kol., 1986).

3.13.1 Druhy kultivací

3.13.1.1 Jednorázová kultivace

Pod názvem *jednorázové* kultivace se rozumí kultivace, kdy celý objem sterilního živného roztoku v daném počátečním složení byl zaočkován určitým množstvím kvasinek a za konstantních podmínek (tedy teploty, pH, vzdušnosti a podobně) pak probíhá kultivace do té doby, než implikací vyčerpání živin nebo nahromaděním toxických metabolitů ustává množení i samotný růst. Tato kultivace má svoji typickou kinetiku růstu s různými fázemi. Je důležité mít na paměti, že v jednorázovém systému není živné prostředí konstantní, a to ani během log fáze, kdy je konstantní rychlost růstu. Následkem toho probíhá v buňkách řada změn, buňka se přestavuje jak enzymaticky, cytologicky, tak i složením makromolekul (Nečas a kol., 1986).

Obsah fermentoru není potřeba inokulovat pokaždé čerstvou násadou. Po skončení jednorázové kultivace se obsah vypustí na zpracování a ve fermentoru zůstane pouze malé množství objemu podílu sloužící jako inokulum. Objem se navýší čerstvým médiem na původní hodnotu v jednom kroku. Způsob lze mnohokrát opakovat za dodržení aseptických podmínek (Nečas a kol., 1986).

3.13.1.2 Semikontinuální kultivace

Jiným způsobem je, že se odpustí jen malé množství a nahradí se čerstvým médiem. Oproti předcházejícímu způsobu je frekvence výměny daleko rychlejší a nazývá se *semikontinuální způsob*. Semikontinuální systémy můžeme chápat jako přechodnou formaci mezi jednorázovými a kontinuálními systémy. Jsou - li zkracovány intervaly mezi dávkami čerstvého média a odebráním kultury, budeme se více blížit podmínkám plně kontinuálním (Fencel, 1964).

3.13.1.3 Kultivace za doplňování kultury živným médiem

Další základní kultivační metoda je *kultivace přítoková*. Při tomto způsobu se na začátku kultivace vpraví do kultivační nádoby inokulum v takovém množství, které odpovídá žádané době kultivace při zvolené růstové rychlosti. Médium může přitékat exponenciálně, lineárně nebo jiným způsobem dle typu procesu. Pokud médium přitéká lineárně, narůstání sušiny je konstantní, ale specifická rychlost růstu kvasinek poklesne (Edwards a kol., 1975).

Také se nabízí možnost vložit hned zpočátku do fermentoru podíl populace, často koncentrované, v určitém fyziologickém stavu. Cílem přidávání čerstvého média je časově prodloužit určitou etapu vývoje kultury, která je optimální pro produkci určité složky. Protože objem ve fermentoru je konečný, kultura nemůže růst do nekonečna, přesto, určitou fázi metabolického pole lze udržovat ve stabilizovaném žádaném stavu a tím zlepšovat produktivitu systému (Nečas a kol., 1986).

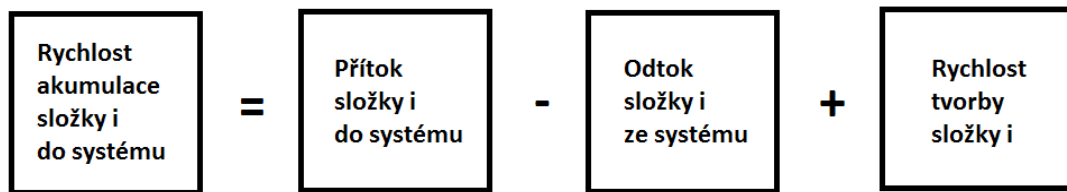
3.13.1.4 Kultivace nepřetržitě průtokové, kontinuální

Při kontinuálních kultivacích se do reaktoru přivádí čerstvé sterilní médium a to buď plynule, nebo po dávkách a současně je také médium z reaktoru odváděno. Kultivace má začátek jako vsádková (nejlépe je, když je inokulum v exponenciální fázi růstu). V případě recyklace biomasy je však vrácena část v médiu zkoncentrované biomasy ze separační jednotky (odstředivka, usazovák, popřípadě membránový modul) zpět do reaktoru. Přítok musí pokaždé odpovídat růstovým možnostem mikrobiální kultury. Dalším pravidlem je, aby odtékající médium splňovalo určité podmínky, např. aby z něj byl téměř zcela vyčerpán substrát. Předností této kultivační metody je možnost pracovat za určitých růstových podmínek mikroorganismu, lze také značně potlačit neproduktivní časy fermentace (čištění reaktoru, časté naplňování a vyprazdňování vsádkového reaktoru) a dosáhnout tak vysokou produktivitu systému. Naproti tomu nevýhodou těchto systémů je nutnost udržovat všechna zařízení spojená s reaktorem (přívod vzduchu, médií) v naprosté čistotě, což je spojeno s vysokými energetickými náklady na sterilaci. Kromě toho mikroorganismy často mění svůj metabolismus, pokud je proces uskutečňován za neměnných podmínek. Z těchto důvodů v průmyslovém měřítku není kontinuální proces moc využíván. Mluvím především o potravinářských a farmaceutických výrobcích. Naopak v technologii odpadních vod se kontinuální procesy využívají běžně, dokonce s převahou (Kadlec a kol., 2012).

Kontinuální proces lze realizovat v jednom, dvou a více reaktorech navzájem propojených (kaskáda reaktorů). Kontinuální jednostupňová kultivace není vhodná pro procesy, kde tvorba produktu probíhá mimo růstovou fázi. Předností vícestupňových kontinuálních systémů je především to, že můžeme do každého reaktoru přivádět různé živiny a pracovat tedy za rozdílných podmínek (Kadlec a kol., 2012).

Pro správné pochopení chování kontinuálního bioreaktoru s ideálním mícháním je třeba si vždy uvědomovat následující zásady:

- První reaktor kontinuálního systému, který je bez recyklace mikroorganismů, se vyznačuje tím, že je jednorázově zaočkován mikroorganismem, který se nejprve kultivuje diskontinuálně a poté co dosáhne vhodného fyziologického stavu (obvykle na konci exponenciální fáze) se zahájí kontinuální přítok živin. Ostatní členy kaskády reaktorů se postupně inokulují mikroorganismy z předchozího stupně.
- Přítok živného média má závislost na růstové rychlosti mikroorganismů, překročí - li se jejich růstové schopnosti, nastane jejich vyplavení.
- V reaktoru dochází během kultivace k diferenciaci mikrobiální populace, což lze vysvětlit tak, že se zde tvoří populace o rozdílném stáří.
- V jednostupňovém systému je možno pracovat pouze za takových podmínek, které odpovídají exponenciální fázi růstu mikroorganismů (Kadlec a kol., 2012).



Obr. 8: Schéma obecné bilance kontinuálního reaktoru (zdroj: Kadlec a kol., 2012)

V kontinuální kultuře je růst řízen limitujícím faktorem chemické nebo fyzikální povahy. Na zdůraznění toho, o jaký faktor jde, se používá názvů chemostat, pH-stat a podobně. V případě, že se udržuje konstantní koncentrace buněk v oblasti vysokých růstových rychlostí pomocí optického měřiče zákalu ovládacího dávkovače, nazývá se tato modifikace turbistat (Munson, 1970).

3.13.2 Modifikace kultivací

Kromě těchto základních metod kultivace se používá několik modifikací. Lze měnit fyziologický stav inokula, kultury v exponenciální fázi růstu, nebo ovlivňovat kulturu rychlými změnami ve složení média. Metody, jež tuto funkci plní se nazývají: *shift-down a shift up, balancovaný růst a synchronizace* (Nečas a kol., 1986).

3.13.2.1 Shift – down a shift up

Prvním pojmem se rozumí náhlé přenesení množící se populace do chudého nebo deficitního média. Druhý pojem představuje náhlé obohacení chudého média komplexními živinami tak, že růstová rychlost prudce stoupne. Rozmnožující se populace kvasinek v novém chemickém složení půdy mění parametry fyziologické aktivity buněk (Nečas a kol., 1986).

3.13.2.2 Balancovaný (vyvážený) růst

Tímto růstem si můžeme představit takový typ rozmnožování, kdy všechny nutné živiny média jsou v rovnováze s buňkami rostoucími konstantními rychlostmi. Tohoto typu růstu lze dosáhnout např. tak, že z rostoucí populace ve fázi exponenciální odebíráme v intervalech odpovídajících jedné generační době polovinu objemu kultury a nahrazujeme polovinou objemu čerstvého média (Nečas a kol., 1986).

3.13.2.3 Synchronizovaný růst

Pomocí speciální půdy a speciální metody růstu nebo centrifugační izolační metodou připravíme buňky, které jsou pouze v G1 fázi cyklu svého růstu. Tyto buňky při růstu kopírují všechny fáze růstu v růstovém cyklu buněk (Nečas a kol., 1986).

3.14 Kontrolní metody růstu

Ke sledování růstu existují dvě skupiny metod: metody přímé a metody nepřímé. Při většině měření růstu se užívají metody přímé, buď dle počtu buněk, nebo stanovením vlhké, popřípadě suché hmotnosti kvasinek. V prvním případě se běžně používá elektronický počítáč buněk nebo počítání živých buněk na plotnách sladiny, která je zpevněná agarem. Mezi nepřímé metody řadíme stanovení některých buněčných složek, např. bílkovin, dusíku, fosforu, RNA apod. (Nečas a kol., 1986)

3.14.1 Růstové křivky

Za předpokladu, že mikroorganismy jsou kultivovány v médiích, které obsahují všechny potřebné živiny, že kultivační podmínky jdou udržovány na hodnotách blízkých optimálním (pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku aj.) a médium není odebíráno ani přidáváno, pak růst mikrobiálních buněk vykazuje sigmoidní průběh (S křivka). Tato křivka je nazývána růstová. Růstová křivka je znázorněna na obrázku. Na úplné růstové křivce lze vymezit následující fáze.:

A. Lag (adaptační) fáze. Tato fáze probíhá většinou při zahájení kultivace (po zaočkování) a její délka se odvíjí od množství a fyziologického stavu inokula. U většiny

průmyslových procesů je tato fáze nežádoucí. Mikroorganismus při ní neroste, pouze se adaptuje na nové podmínky.

B. Fáze zrychleného růstu. Obvykle je spojována s následující, exponenciální fází. Rychlost množení buněk je však menší.

C. Fáze exponenciálního růstu. Základním předpokladem exponenciální fáze je dostatek živin, kdy proces kultivace není ještě limitován ani jednou z nich. Tato fáze je pro průmyslové aplikace nejdůležitější, pokud se jedná o tvorbu primárních metabolitů (např. kyselina mléčná, etanol). Na konci této fáze je rychlost růstu buněk ve své maximální hodnotě. V exponenciální fázi, kdy je postupně snižována koncentrace substrátu, který je přeměňován jednak na buněčnou biomasu, produkt a další část substrátu se prodýchá, se setkáme i s dalším důležitým jevem, a to vlivem limitujícího substrátu. Limitující substrát nemusí být vždy zdroj uhlíku nebo energie, ale může se jednat o jakoukoliv sloučeninu (organického nebo anorganického původu), která ovlivňuje růst. Limitace vybranou sloučeninou představuje v kultivačních technikách důležitý prostředek k ovlivnění produkce významných látek. Limitace je tedy závislá na koncentraci látky, která ovlivňuje růst.

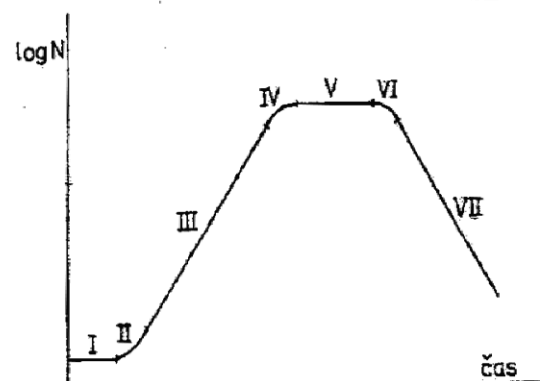
D. Fáze zpomaleného růstu. S postupným vyčerpáním živin a hromaděním inhibičních metabolických produktů ztrácejí mikroorganismy postupně schopnost udržovat vysokou měrnou rychlost růstu, které dosáhli v exponenciální fázi. Kultura přechází do fáze zpomaleného růstu.

E. Stacionární fáze. Jedná se o oblast křivky, kdy je rychlost růstu mikroorganismů nulová. Tato fáze má však mimořádný význam při tvorbě sekundárních metabolitů.

F. Fáze odumírání mikroorganismů. Pro fermentační procesy není tento úsek vítaným, neboť dochází k lyzi mikrobiálních buněk a tím i ke ztrátě buněčného materiálu v odpadní vodě. Proto je důležitým krokem na konci fermentace poměrně rychle oddělit buňky od média (Kadlec a kol. 2012).

Obr. 9: Růstová křivka

(zdroj: Kadlec a kol., 2012)



Obr. 26.3 Růstová křivka – fáze vývoje vsádkové kultury
Fáze: I – lag (adaptační) fáze, II – fáze zrychlení růstu, III – fáze exponenciální,
IV – fáze zpomalení růstu, V – fáze stacionární, VI a VII – fáze úhynu mikroorganismů,
N je počet mikroorganismů v jednotce objemu.

Na obrázku v příloze jsou dále znázorněny kvasné a sedimentační růstové křivky pěti různých produkčních kmenů pivovarských kvasinek.

3.15 Návrh experimentu pro minipivovary

Důležitým krokem v propagaci kvasnic je převedení laboratorní fáze do provozní fáze a zajistit tedy množství kvasnic, které je dostačující pro výrobu v minipivovaru. K tomuto účelu slouží právě propagační stanice. Stanici lze popsat jako kaskádu 3 i více reaktorů o zvětšujícím se objemu. Poměr mezi objemy reaktorů je odvíjen od používaných mikroorganismů. V případě kvasinek se jedná o poměr 1:5 (Kadlec a kol., 2012).

V potravinářské oblasti, především pro výrobu alkoholických nápojů, se setkáváme s poměrně jednoduchými konstrukcemi těchto reaktorů, neboť jde o anaerobní procesy, kde je fermentační médium mícháno vznikajícím oxidem uhličitým (Kadlec a kol., 2012)

Z hlediska použití bioreaktorů pro určité typy mikroorganismů a jejich požadavky (například na přísun kyslíku aj.) je vhodné rozdělení reaktorů na reaktory s mechanickým mícháním, reaktory s hydraulickým mícháním, reaktory s pneumatickým mícháním, reaktory náplňové a nakonec různé další typy (Kadlec a kol, 2012).

Reaktory s mechanickým mícháním

Jedná se o velmi používané typy reaktorů a to z toho důvodu, že většina průmyslových fermentací je aerobních a úkolem mechanického míchadla je plnit jak homogenizační, tak i dispergační funkci (Kadlec a kol, 2012).

Reaktory s pneumatickým mícháním

V této skupině je důležité zmínit reaktory používané v moderních pivovarech, tzv. *CK tanky* (cylindrokónické reaktory, obrázek v příloze). Jsou plněny mladinou, která se míchá vznikajícím oxidem uhličitým. Kvasinky se odtahují ve spodní kónické části, kde je teplota velice nízká. Důležitou roli zde má teplotní gradient mezi horní a spodní částí (obvykle dvě teplotní sekce). Tanky musí být dobře tepelně izolovány (Kadlec a kol, 2012).

Reaktory nesmí postrádat nezbytnou měřicí a regulační techniku. V současné době jsou naměřené údaje snímány, vyhodnocovány a v moderních závodech ukládány do znalostní databáze k dalšímu využití. Některá média jsou před použitím ve fermentoru zbavována pevných částic pomocí filtrace nebo odstředování na kalových odstředivkách. K separaci jednobuněčných mikroorganismů se využívají odstředivky (v případě kvasinek jde o talířové odstředivky, bakterie se vzhledem k menší velikosti hůře separují a potřebují větší odstředivé zrychlení) (Kadlec a kol., 2012).

Kromě sterilace kapalného média, pomocných látek (odpěňovací prostředky, jiné živiny) je nutno sterilovat, resp. zbavit mikrobiálních zárodků i vzduch. K tomu slouží hlavně mikrofiltry. Stejně tak i fermentační plyny, které opouštějí reaktor by měly být opatřeny sadou mikrofiltrů (Kadlec a kol., 2012).

Pro propagaci v minipivovarech by přicházel tedy v úvahu jako vhodné řešení propagační tančík, neboli propagátor, který by byl vyroben z nerezové oceli a měl objem 30 litrů. Jednalo by se o nádobu s víkem, kde by se teplota kvašení udržovala v rozmezí 12 – 16 °C, zakvašovací poměr by byl asi 1:10. Před vlastním zaočkováním čisté kultury či přečerpání zbytku bílých kroužků z předchozí propagace je nutné mladinu sterilizovat. Sterilizace by probíhala v jedné z nádob, která by k tomu byla určena, tedy ve sterilizátoru. Měla by stejnou výbavu jako propagátor, ale měla by v kónusu duplikátor pro ohřev parou. Mladina by byla odebírána před chlazením mladiny (teplota cca 85 °C), byla by načerpána do sterilizátoru, přehřáta na 95 – 100 °C a na této teplotě by se udržovala po dobu 1 - 1,5 hodiny. Poté by probíhalo chlazení celého obsahu propagátoru na zákvasnou teplotu (obvykle 10 °C). Po dosažení této teploty by bylo provedeno zaočkování čisté kultury, popřípadě přečerpání části bílých kroužků z minulé propagace. Směs mladiny s kroužky 21 je nutno vzdušnit a míchat. Toto je řešeno různými technickými způsoby (aerační kruh, speciální míchadlo, provzdušňovací svíčka, mimotělní oběh se vzdušením aj.) Ve spodní části by byla tedy zavedena hadice a na ní by byl napojen vzduchovací kámen nebo had – tam by byl přiváděn sterilní vzduch v určitých časových intervalech. Vzdušnění je pro kvasinky potřeba pro jejich množení. Po zakvašení sterilní mladiny uvnitř tanku by měl být přidán ještě silikonový (nebo potravinářský) olej jako odpěňovací přípravek, neboť jak už bylo řečeno, mladina je silně pěnicí kapalina a pokud je provzdušňována, mohl by nastat problém. Po dosažení stádia bílých kroužků je obsah možné přečerpat do spilky nebo CKT k dalšímu zpracování a v propagátoru ponechat až 20 % kroužků k dalšímu použití

při propagaci kvasnic tak, aby mohl být celý proces opakován. Namnoženou kulturu z tančičku lze použít dál pro další propagační krok o objemu 100 - 200 l.

Celá propagační stanice bude tedy složena z několika prvků, a to sterilizátoru mladiny, vlastního propagátoru, potrubního spojení, provzdušnění mladiny a čerpadla, elektrovýbavy, ovládání a regulace parametrů, nosného rámu a CIP stanice, která slouží k sanitaci veškerého příslušenství (ceskemini pivovary, online). K filtraci je možné použít mikrobiální filtr nebo kartuš s vatou na výduchu. Sanitaci je možné řešit za pomoci persterilu nebo peroxidu vodíku.

Kvasnice vyprodukované během kvašení se podle potřeby po ošetření skladují, či se přímo používají k zakvášení dalších várek, přebytečný podíl se zpracuje a využije mimo pivovarskou výrobu. Sebrané kvasnice (asi 8% sušiny) se zbaví zachyceného piva sedimentací, odstředěním, lisováním nebo pomocí dekantéru a přebytečné se prodávají jako důležitý zdroj živin i růstových faktorů (Kunstr a kol., 2003).

Kvasnice se také suší ve válcových nebo sprejových sušárnách a používají jako přídavek do potravin i krmivových směsí. Během skladování se mění zastoupení jednotlivých důležitých látek a trvanlivost těchto kvasnic lze prodloužit přídavkem vhodných konzervačních látek nebo zahříváním (Ingledew a kol., 1982).

Podmínkou skladování do doby dalšího nasazení je zajistit minimální fyziologické změny skladovaných kvasnic, zachovat jejich dobrou vitalitu a viabilitu (Basařová, 2010).

Sledováním cytologických a biochemických vlastností kvasnic v kvasničném tanku se potvrdila silná závislost jejich kvality na druhu a geometrii kvasničného tanku a míchání. Kvasnice sklizené přímo z kvasných tanků vykazovaly silnější flokulační vlastnosti než kvasnice sklizené z propagačních stanic. Kvalita várečných kvasnic se zhoršovala během jejich sklizně a skladování (Cahill a kol., 2003).

Při sklizni kvasnic získaných kvašením mladin s vyšší koncentrací (HGB - mladin) je způsob úschovy kvasnic zvláště důležitým, neboť kvasnice jsou náchylnější ke kontaminaci, poškození a mutacím (Cholerton, 2003).

3.16 Analýza finálních kvasnic aneb hodnocení droždí

3.16.1 Fyzikálně chemické vlastnosti droždí

Mezi fyzikálně chemické vlastnosti droždí řadíme vůni, barvu, vzhled, rozplývavost, elektrickou vodivost a konzistenci droždí (Rychtera a kol., 1986).

3.16.1.1 Vůně

Vůně droždí se stanovuje u čerstvého rozkrojeného hranolku lisovaného droždí. Má být typicky drožďová s případnou vůní po ethylacetátu. Vůně po esterech není na závadu, svědčí o silnějším větrání a obvykle se vyznačuje i dobrou trvanlivostí. Vůně po alkoholu bývá nepříznivým znakem kvůli nižší trvanlivosti. Nepříznivé jsou i pachy po mastných kyselinách, amoniaku, pach po odpěňovacím tuku, či sirovodíku (Rose a Harrison, 1993).

3.16.1.2 Barva

Barva má být stálá a světlá. Tmavá barva je znakem špatného fyziologického stavu způsobeného např. poruchami ve výrobě. Zhoršení fyziologického stavu a tím i barvy a dalších jiných faktorů může způsobit např. nesprávné dávkování živin, vyšší hodnota pH, nebo přítomnost kontaminujících mikroorganismů (Rose a Harrison, 1993).

3.16.1.3 Vzhled

Vzhled droždí se zkoumá při rozlomení hranolku droždí na dvě části, kdy se pozoruje lom a konzistence droždí. Pružné droždí nezanechává žádnou nebo jen slabou stopu po stlačení postranní strany hranolku prstem. Lom droždí má být rovný, hladký, nebo podlouhle oblý (Rychtera a kol., 1986).

3.16.1.4 Chut'

Dobré čerstvé droždí nemá zvláštní charakteristickou chuť. Špatně vyprané droždí má často nakyslou a nahořklou chuť, podobně i droždí kontaminované. Hnilobnou chuť má droždí již na počátku autolyzačního pochodu. Palčivá chuť bývá často způsobována oxidem uhličitým (Rose a Harrison, 1993).

3.16.1.5 Rozplývavost

Rozplývavost droždí se testuje při chuťové zkoušce. Požadavkem je dobrá rozplývavost na jazyku bez tvorby hrudek, či krupiček (Rychtera a kol., 1986).

3.16.1.6 Elektrická vodivost

Vylučováním elektrolytů do prostředí se projevuje u kvasinek narušení buněčné stěny nebo plasmatické membrány, a to hlavně účinkem autolýzy. Tento jev se dá dobře hodnotit měřením elektrické vodivosti v suspenzi droždí s vodou. Měření se musí provádět za standartních podmínek (Rose a Harrison, 1993).

3.16.1.7 Konzistence

Konzistence lisovaného droždí závisí na mnoha faktorech, např. na obsahu mimobuněčné vody. Tuto vlastnost lze měřit např. vizkozimetrem na standartně připravené suspenzi kvasinek. Pro stanovení veličin spojených částečně s konzistencí lisovaného droždí lze použít např. některých penetračních zkoušek, kterými se hodnotí doba průniku standardizovaného předmětu (např. kužele) do materiálu (Rose a Harrison, 1993).

3.16.2 Chemický rozbor droždí

Při chemickém rozboru lisovaného droždí zjišťujeme především obsah sušiny, popela, celkového dusíku, arsenu, těžkých kovů, dále se provádí např. stanovení fosforu, jiných kationtů, popř. aniontů, ergosterolu, nukleových kyselin, lipidů, glykogenu a vitamínů (Rychtera a kol., 1986).

3.16.3 Biochemické zkoušky

Pro hodnocení aktivity pekařského droždí je důležité časté sledování některých dílčích enzymových aktivit, které mají vztah k technologické aktivitě kvasinek. Jedná se o stanovení aktivity α - glukosidasy, resp. maltasy, aktivity maltosového transportního systému, aktivity β - frukosidasy, aktivity jednotlivých enzymů EMP cyklu, resp. celkové aktivity vyjádřené například rychlostí tvorby CO₂. Rychlost tvorby CO₂ je tzv. mohutnost kynutí v těstě (Rose a Harrison, 1993).

3.16.4 Zkoušky jakosti z hlediska pekárenského

3.16.4.1 Stanovení mohutnosti kynutí v těstě

Mohutnost kynutí je vyjadřována dobou, za kterou těsto za přesně stanovených podmínek dosáhne určitého objemu. Doba kynutí je definována v minutách a počátek měření je počítán od doby přidání kvasinek. Čas potřebný k prvnímu dosažení daného objemu se nazývá tzv. první doba kynutí. Po vypuzení CO₂ z těsta jsou stejným

způsobem měřeny další doby kynutí. První doba kynutí by měla překročit 90 minut (Rose a Harrison, 1993).

3.16.4.2 Kvasivost droždí v těstě

Při této metodě je stanovován buď objem vzniklého CO₂ za konstantního tlaku, popřípadě tlak CO₂ za stejného objemu. Těsto připravované za tímto účelem je méně viskózní než v případě pro stanovení mohutnosti kynutí. Je to z toho důvodu, aby došlo k uvolnění CO₂ do prostoru mimo těsto. Pro pekárenské účely je tato zkouška podstatnější, než stanovení mohutnosti kynutí, neboť nepřímo zahrnuje i proteolytické vlastnosti kvasinek (Reed a Pepler, 1973).

3.16.4.3 Trvanlivost droždí

Patří mezi důležité vlastnosti určující i skladovatelnost droždí. Jedná se o dobu, po kterou droždí vydrží v dobrém stavu, bez známek zkázy (zmazovatění, ztekutění). Lisované droždí lze dlouho uchovávat v dobře větraných místnostech při teplotě 0 - 10 °C. Stanovení trvanlivosti je prováděno v malém hranolku droždí, který je zabalen do papíru a vložen na Petriho misku. Trvanlivost je poté odečítána při změknutí droždí. Přítomná kontaminace značně snižuje trvanlivost droždí (Rychtera a kol., 1986).

3.16.4.4 Mikrobiologické zkoušky

Na pekařském droždí nesmí být přítomné plísně ani jejich kolonie. Počet kontaminujících kvasinek je hodnocen při nevyhovujících výsledcích zkoušky mohutnosti kynutí v těstě. Droždí a výrobky z něj musí být prosté patogenních, podmíněně patogenních mikroorganismů a mikrobiálních toxinů. Při běžné laboratorní kontrole je důležité zastoupení mrtvých buněk, hodnocení mikrobiologického vzhledu buněk, kontaminace a aglutinace na užití methylenové modři (Rychtera a kol., 1986).

4. ZÁVĚR

Při zpracování mé práce jsem zjistila, že za pivem jak ho známe, vede poměrně dlouhá cesta, na které mají pivovarské kvasinky právě prvořadý význam. Bez nich by nám tento nápoj nechutnal tak, jak chutná a problematika propagace kvasnic je tedy velice aktuální.

Stejně tak jako vše, se procesy v této fázi výroby neustále zdokonalovaly a zdokonalují a od více složitých postupů se přechází k méně náročným ať už z hlediska obsluhy personálu, financí, popřípadě výtěžku celého procesu. V dnešní době existuje mnoho způsobů jak tuto problematiku řešit. Všechny mají své klady, ale i zápory. Je tedy pouze na sládcích, jaký postup zvolí.

Řešení otázky problematiky propagace kvasnic v minipivovarech, které je nyní aplikováno ve většině z nich, a to v podobě odkupu kvasnic od velkých pivovarů, není nejlepším. Stálo by za to osamostatnit se a získat nezávislost. Navíc by bylo možné řídit veškerou produkci kvasnic dle aktuálních potřeb a byla by vyloučena primární možnost kontaminace. V dnešní době je k dispozici řada vybavení i pro minipivovary, včetně komplexních malých přístrojů v podobě laboratorních fermentorů, které kontrolují celý proces bez dohledu odborného personálu. V takovém případě se ale musí minipivovar rozhodnout, zda se mu taková investice po finanční stránce vyplatí, neboť nejnovější technika bývá zatím finančně poměrně náročná. Dle mého názoru je možnost poradit si trochu jinak a drahé vybavení nahradit součástkami a propagační stanicí sestrojenou dle svých potřeb. Poté by se tento krok minipivovarům do budoucna určitě vyplatil a stálo by za to se touto otázkou zabývat a přesvědčit minipivovary k rozhodnutí investice do vlastní propagační výbavy. Další výhodou v tomto postupu do budoucna vidím, i když jsem ve své práci tuto možnost neřešila, že by bylo možné nějakým způsobem vštípit danému kmeni kvasinek novou vlastnost, popřípadě ho fortifikovat o nějaké zajímavé sensorické látky v jeho genomu s možností přenosu na další populace při propagaci a následně i obohacení piva o tyto sensoricky zajímavé látky, například typické pro konkrétní pivo z daného minipivovaru. Výroba v minipivovarech by se tedy značně odlišovala, popřípadě by se mohlo jednat o jeden z přesvědčujících faktorů, proč právě začít s vlastní propagací kvasnic. Myslím, že jsou propagační stanice pro minipivovary do budoucna možností zajímavého výtěžku a určitě by stálo za to, nalézt finančně přijatelné řešení a začít s jejich výrobou pro minipivovary.

5. SEZNAM LITERATURY

- ANDERSEN A., 1994: *Yeast propagation plant - development in relationship to history, process and construction.*(online) Tech.Q.Master Brew.Assoc.Am.,s. 54-57. [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://tq.mbaa.com/abstracts/1994/tq94ab12.htm>
- ANDERSEN A., 1998: *How brewers yeast has been and is handled and treated.*Tech.Q.Master.Brew.Assoc.Am., 35(1), s.1-3. ISSN 0010-5441
- ANDREASEN A. A., STIER T. J. B., 1954: *Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae.* J. Cell.Comp.Physiol. s. 271-281, ISSN 0012-4729
- BASAŘOVÁ G., 2010: *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva.* Praha: Vydavatelství VŠCHT, 863 s., ISBN 978-80-7080-734-7
- BASAŘOVÁ G., ČEPIČKA J., 1985: *Sladařství a pivovarství.* Skriptum VŠCHT Praha: SNTL, 256 s., ISBN 05-025-85
- BASAŘOVÁ G., HLAVÁČEK I., 1999: *České pivo.* 2. vydání. NUGA: Pacov, 231 s., ISBN 80-85903-08-3
- BENDOVIÁ O., KAHLER M., 1981: *Pivovarské kvasinky.* Praha: SNTL, 272 s., ISBN 04-243-92
- BLASOVIČ B., RUPČIČ M., MESARIČ M. a MARIČ V., 2005: *Lipid analysis of the plasmamembrane and mitochondria of brewers yeast.* Folia Microbiol., 50(1): 24-30, ISSN 0015-5632
- BRIGGS D. E., BOULTON CH. A., BROOKER P. A. a STEVENS R., 2004: *Brewing-science and practice.* Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, ISBN 0-8493-2547-1
- BRYANT J., 1970: *Anti- foam agents.* In: *Methods in mikrobiology.* 2. vydání, London-NY, Academia Press, ISBN 0-12-521513-4
- CAHILL G., WALSH P. K., DONNELLY D., 2003: *A study of the variation in temperature, solids concentration and yeast viability in agitated stored yeast.* Eur.Brew.Conv.:Proc.29th Congress, Dublin, příspěvek 42, 454-469, ISBN 90-70143-22-4
- Culture Collection of Yeasts.* Culture Collection of Yeasts [online]. Chemický ústav - Slovenská akadémia vied, 2013 [cit. 2016-01-06]. Dostupné z: <http://ccy.sk/index.php/13-ccy/1-zbierka-kultur-kvasiniek>

- DEANS K., PINDER A., CATLEY B. J. a HODGSON J. A., 1997: *Effects of conecropping and serial re-pitch on the distribution of cell ages in brewery yeast*. Eur.Brew.Conv.:26th Proc.Rur.Brew.Conv., Maastricht, příspěvek 56, 469-476, 771 s., ISBN 0-19-963690-7
- DICKINSON J. R., 2008: *Filament formation in Saccharomyces cerevisiae- a review*. Folia Microbiol., 53(1), 3-14, ISSN 0015-5632
- Doc. Ing. PELIKÁN M., CSc., prof. Ing. DUDÁŠ F., DrSc. a Ing. MÍŠA D., 2002: *Technologie kvasného průmyslu*. Brno, Mendelova univerzita v Brně, ISBN 80-7157-578-X
- EDGERTON J. A., 2001: *A primer of yeast propagation technique and procedures*. Tech.Q.Master Brew.Assoc.Am., 38(3), s. 167-175, ISSN 0010-5441
- EDWARDS V. H., GOTTSALK M.J., NOOJIN A.Y., TUTHILL L.B. a TANNAHILL A.L., 1975: *Extended culture: The growth of Candida utilis at controlled acetate concentrations*. Biotechnol.Bioeng. 12, s. 975-999, ISSN 1097-0290
- FENCL Z., 1964: *Matematická teorie homogenních kontinuálních kultivací mikroorganismů*, In: Kontinuální kultivace mikroorganismů. I. Málek a kol. NČSAV, s. 53-116, ISBN 80-12145-19-5
- FLEET G. H., 2006: *The commercial and community signifance of yeast in food and beverage production*. Berlin: Springer, s. 1-12, ISBN 9783540283980
- GHUL C., WACKERBAUER K. a KANG S. A., 2007: *Influence of aeration during propagation pitching yeast on fermentation and beer flavour*. J.Microbiol.Biotechnol., 17(2), s. 297-304, ISSN 1017-7825
- HARAPES: *Naše produkty*. HARAPES [online]. 2015 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.harapes.cz/page/default/16>
- HOLLEROVÁ I., KOHOUTOVÁ P., 1999: *Pivovarský kalendář 1999, kap. Sbíрка pivovarských kvasinek*. Praha -VÚPS a.s., ISBN 0-14-511934-6
- CHLÁDEK L., 2007: *Pivovarství*. Praha: Grada, 207 s., ISBN 978-80-247-1616-9
- CHOLERTON M., 2003: *Yeast management under high-gravity brewing condition*. Tech.Q.Master Brew.Assoc.Am., 40(3), s. 181-185, ISSN 0010-5441
- INGLEDEW W. M., CASEY G. P., 1982: *The use and understanding of media used in brewing mycology I. Media for wild yeast*. Brew. Dig., 57(3), s. 18-22, ISSN 0014-3684
- JACOB M., 2005: *Hefevitalität .Erfolgsschlüssel für gleichbleibende Bierqualität*. Brau Industrie, 90(5), s. 14-17, ISSN 0015-4365
- JANDEROVÁ B., BENDO VÁ O., 1999: *Úvod do mikrobiologie kvasinek*. Praha-Karolinum, 108 s., ISBN 80-7184-990-1

KADLEC a kol., 2012 : *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výrob.* VŠCHT Praha, ISBN 978-80-7418-086-6

KAUFMANN B., HOPULELE D., 2006: *Single vessel pure yeast propagation in practise.* Brauwelt. Int., 24(2), s. 96-97, ISSN 0015-4365

KOCIÁNOVÁ L., 2007: *Sledování vlastností kvasinek v průběhu kvašení piva.* Brno. Diplomová práce (nepubl., dep. Knihovna VUT v Brně). Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

KOHOUTOVÁ P., HOLLEROVÁ I., 1997: *Sbírka pivovarských kvasinek VÚPS.* Kvasný průmysl, 43(1), s. 8-9, ISSN 0023-5830

KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S., 2000: *Technologie výroby sladu a piva.* VÚPS, a. s., Praha, 440 s., ISBN 80-902658-6-3.

LEHMANN J., BACK W., 1997: *Practical realization of yeast assimilation.* Brew. Beverage Ind. Intern., (3), s. 139- 142, ISSN 0017-8254

KURZ T., MIELEITNER J., BECKER T. a DELGADO A., 2002: *A model based simulation of brewing yeast propagation.* J. Inst. Brew., 108(2), s. 248-255, ISSN 2050-0416

Lambda Laboratory Instruments. Lambda [online]. [cit. 2016-02-28]. Dostupné z: <http://www.lambda-instruments.com/>

MLEJNKOVÁ H., CHLOUPEK J., 2014: *Hygienické zabezpečení pitné a napájecí vody- návody k praktickým cvičením.*, Brno, Skriptum Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ISBN 978-80-7305-755-8

MUNSON J. R., 1970: *Turbistats. In: Methods in microbiology.* 2. vydání, London-NY, Academic press, ISBN 0-12-521513-4

NEČAS O., STREIBLOVÁ E. a ONDREJŠ V., 1986: *Kvasinky ve výzkumu a praxi.* Academia - nakladatelství Československé akademie věd, 241s.

NEDERVELDE VAN L., DEBOURGH A., 2005: *Esters, diacetyl and dimethylsulfide concentrations related to fermentation pH ?.* Cerevisia, 30(4), 236-246, ISSN 1373-7163

NOVÁK J., BASAŘOVÁ G., TEIXEIRA J. A. a VICENTE A. A., 2007: *Monitoring of brewing yeast propagation under aerobic and anaerobic conditions employing flow cytometry.* J. Inst. Brew., 113(3), s. 249-255, ISSN 2050-0416

NOVÁK J., 2006: *Studium změn kvasinky Saccharomyces cerevisiae v pivovarském procesu průtokovou cytometrií.* Doktorská disertační práce (nepubl., dep. knihovna VŠCHT v Praze). VŠCHT Praha, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biotechnologie. Vedoucí práce prof. Ing. Gabriela Basařová, DrSc.

OPSTAELE VAN F., DE ROUCK G., DE RIDDER M., AELBRECHT C., DE COOMAN L. a AERTS G., 2006: *Potential impact of yeast strain selection on the flavon stability of beer*. *Cerevisia*, 31(2), 70-77, ISSN 1373-7163

Propagační stanice. Ceskeminipivovary.cz [online]. 2012 [cit. 2016-01-14]. Dostupné z: <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/studeny-blok/propagacni-stanice/>

Propagační stanice. DESTILA [online]. 2016 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://www.destila.cz/propagacni-stanice>

QUAIN D. E., 2006: *Active dry yeast - on the rise?* *Brew.Guardian*, 135(10), s. 31-35, ISSN 0014-4736

QUAIN D. E., 1995: *Yeast supply – the challenge of zero defects*. *Eur.Brew.Conv: Proc. 25th Congress, Brussels*, příspěvek 36, s. 309-317, Oxford-Irl Press, 763 s., ISBN 0-19-963614-1

REED G., PEPLER HENRY J., 1973: *Yeast technology*. Westport, Connecticut: The Avi Publishing Company, INC., 378 s., ISBN 0-87055-136-1

ROSE ANTHONY H., HARRISON STEWART J., 1993: *The yeasts: Yeast technology*. 2. vydání. London: Academic Press, INC., 620 s., ISBN 0-12-5964-15-3

RYCHTERA M., UHER J. a PÁČA J., 1986: *Lihovarství, droždářství a vinařství 1 a 2. část*. Praha: SNTL, 398 s., IČ 440-33749

STEENBERG J., GUBIŠ J., MELICHAROVÁ E. a ŠIMEK V., 2003: *Dynamický sběr kvasnic z CKT a jejich asimilace před zakvašováním - kvasničné hospodářství Gambrinus*. *Kvasný prům.*, 49(2), s. 30-34, ISSN 0023-5830

STEWART G. G., 1999: *Fermentation intensification – the challenge*. EBC Monograph 28. EBC Symposium yeast physiology - a new area of opportunity. *Nutrifield*, s. 97-114, ISBN 3-418-00774-0

ŠAVEL J., 1993: *Vázková analýza kvašení v malých nádobkách*. *Kvasný průmysl*, 39(8), s. 226-228, ISSN 0023-5830

ŠAVEL J., PROKOPOVÁ M., 1994b: *Vliv geometrie laboratorních kvasných nádobek na průběh kvašení*. *Kvasný průmysl*, 40(7), s. 198-202, ISSN 0023-5830

ŠAVEL J., 1971a: *Některé poznámky k testování kvasničných kmenů*. *Kvasný průmysl*, 7(10), s. 217-223, ISSN 0023-5830

ŠIHÁNKOVÁ L., 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání. Praha: Academia, 364 s., ISBN 80-200-1024-6

Technické parametry cylindrokónických tanků BREWORX: Vyráběný sortiment cylindrokónických tanků. Ceskeminipivovary.cz [online]. 2012 [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: <http://www.ceskeminipivovary.cz/nabidka/vyroba/komponenty-pivovaru/studeny-blok/cylindrokonicke-kvasne-tanky/ckt-breworx-parametry/>

THIELE F., BACK W., 2007: *Assimilation technology as a basis for optimum yeast management*. Brauwelt Int., 25(2), s. 86-89, ISSN 0014-9546

THOMPSON J., 2011: *Vaříme pivo – jak si uvařit pivo, připravit cider a víno*. Nakladatelství Svojtka a Co., s.r.o., ISBN 978-80-256-0931-6

TOSCH W., GEIGER E., STRETZ D., ROBSON G. D. a DRUCKER D. B., 2005: *Polar lipids of brewers yeast*. J.Inst.Brew., 111(2), s. 82-85, ISSN 2050-0416

VOLKMAN J.K., 2003: *Sterols in microorganisms*. Appl.Microbiol.Biotechnol., 60(5), s. 495-506, ISSN 0013-5863

WACKERBAUER K., BECKMANN M., 1999: *Verschiedene Konservierungsmethoden für Hefen auf dem Prüfstand*. Monatsschr.Brauwiss., 52(11/12), s. 184-191, ISSN 0012-5237

WALKER G. M., 1998: *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 350 s., ISBN 04-719-6446-8

WALSH R. M., MARTIN P. A., 1977: *Growth of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces uvarum in a temperature gradient incubator*. J.Inst.Brew.83(3), s. 169-172, ISSN 2050-0416

WILLIAM M., 1968: *Yeast technology*. J. Inst. Brewing, 74(3), s. 52-65, ISSN 2050-0416

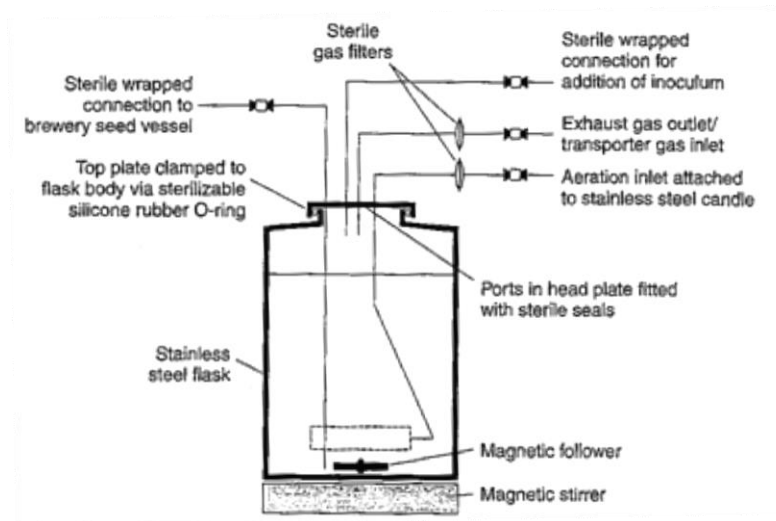
6. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Optimální teploty růstu spodních a svrchních kvasinek (zdroj: Walsh a Martin, 1977)</i>	13
Obr. 2: <i>Schematický nákres kvasničné buňky (zdroj: Šilhánková, 2002)</i>	16
Obr. 3: <i>Schéma jednoduchého propagačního tanku (zdroj: Basařová, 2010)</i>	19
Obr. 4: <i>Typizace kvasnic</i>	33
Obr. 5: <i>Katalog Culture collection yeasts – SAVBA</i>	34
Obr. 6: <i>Křížový roztěr (zdroj: Mlejnková a Chloupek, online)</i>	34
Obr. 7: <i>Schematický nákres možnosti propagace (zdroj: Kociánová, 2007)</i>	36
Obr. 8: <i>Schéma obecné bilance kontinuálního reaktoru (zdroj: Kadlec a kol., 2012)</i>	44
Obr. 9: <i>Růstová křivka</i>	46
Obr. 10: <i>Zařízení vhodné pro převádění konečné fáze laboratorního množení (zdroj: Briggs a kol., 2004)</i>	60
Obr. 11: <i>Zařízení pro pomnožování kvasnic s možností aerace a se zásobním tankem na sterilní mladinu, firemní materiály Essau-Hueber (zdroj: Basařová, 2010)</i>	60
Obr. 12: <i>Lambda Minifor</i>	60
Obr. 13: <i>Dělení kultivačních metod podle prováděné kultivace</i>	61
Obr. 14: <i>Návrh propagační stanice pro minipivovary</i>	61
Obr. 15: <i>CK tanky (zdroj: ceskeminiipivovary, online)</i>	61
Obr. 16: <i>Kvasné (a) a sedimentační (b) růstové křivky pěti různých produkčních kmenů pivovarských kvasinek (zdroj: Šavel, 1971a)</i>	62

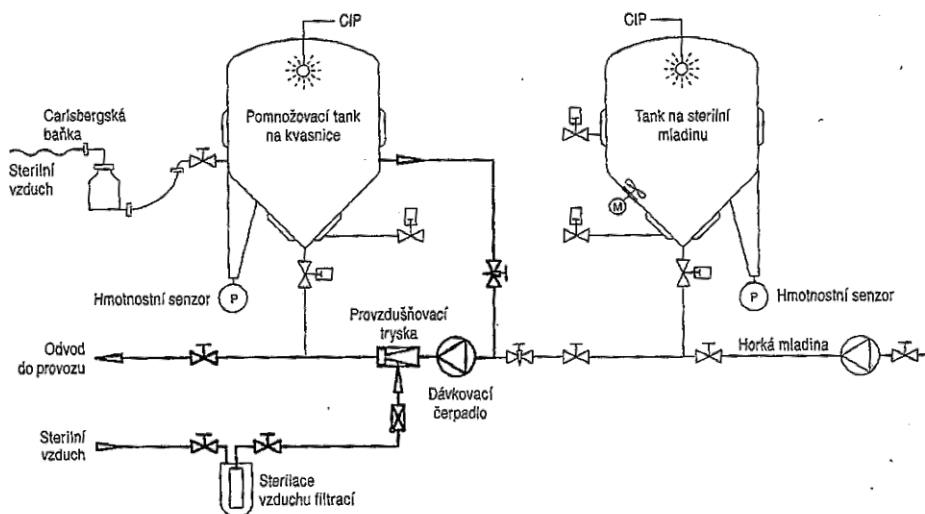
7. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: <i>Taxonomie pivovarských kvasinek (zdroj: Basařová, 2010)</i>	12
Tab. 2: <i>Skupiny významných látek v kvasničné buňce (zdroj: Basařová, 2010)</i>	18

8. PŘÍLOHY



Obr. 10: Zařízení vhodné pro převádění konečné fáze laboratorního množení (zdroj: Briggs a kol., 2004).

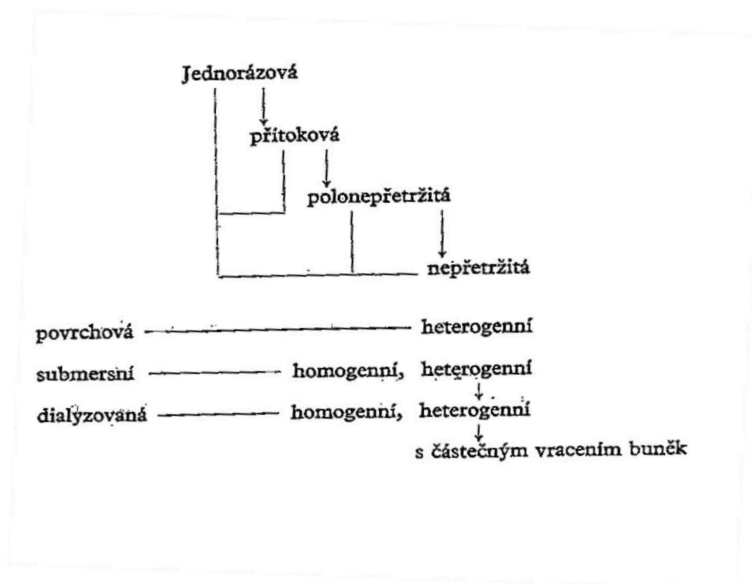


Obr. 11: Zařízení pro pomnožování kvasnic s možností aerace a se zásobním tankem na sterilní mladinu, firemní materiály Essau-Hueber (zdroj: Basařová, 2010)

Obr. 12: Lambda Minifor

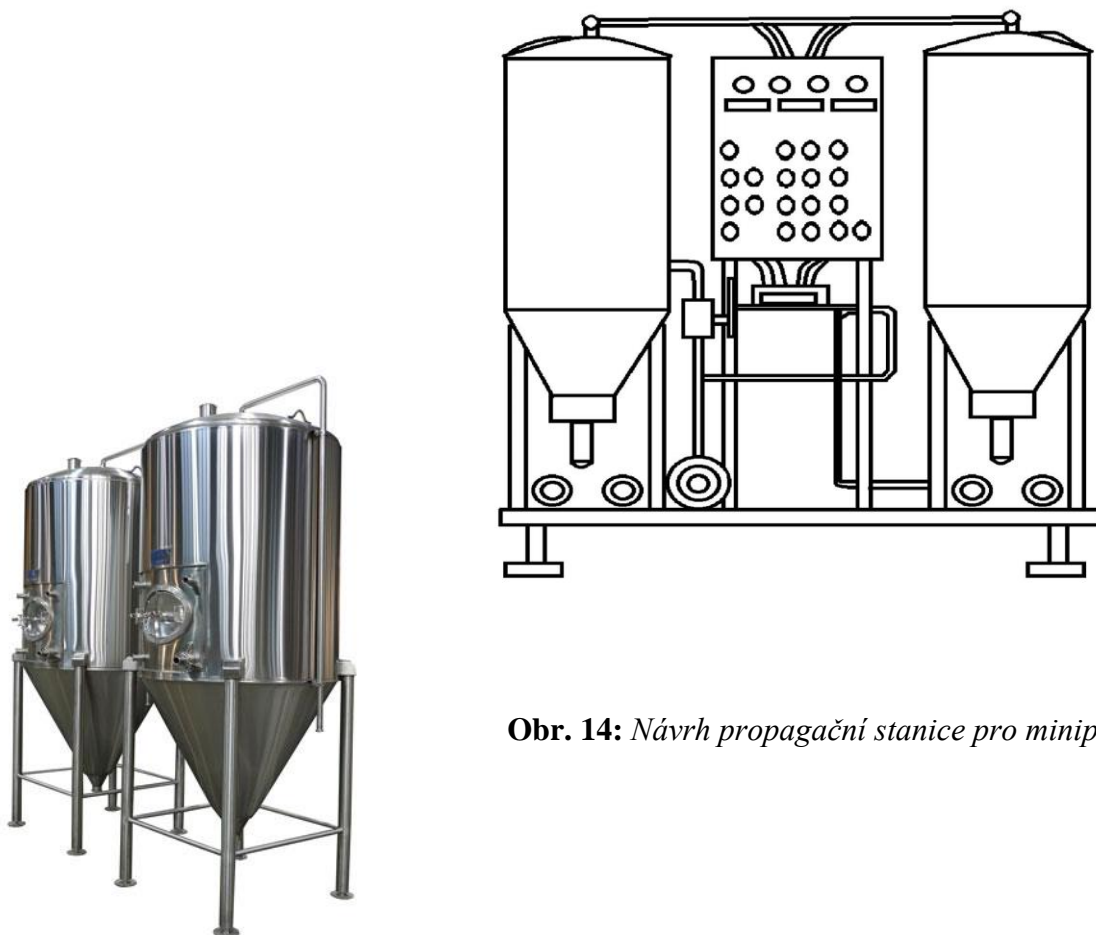
(zdroj : <http://www.fermenter.net/>)





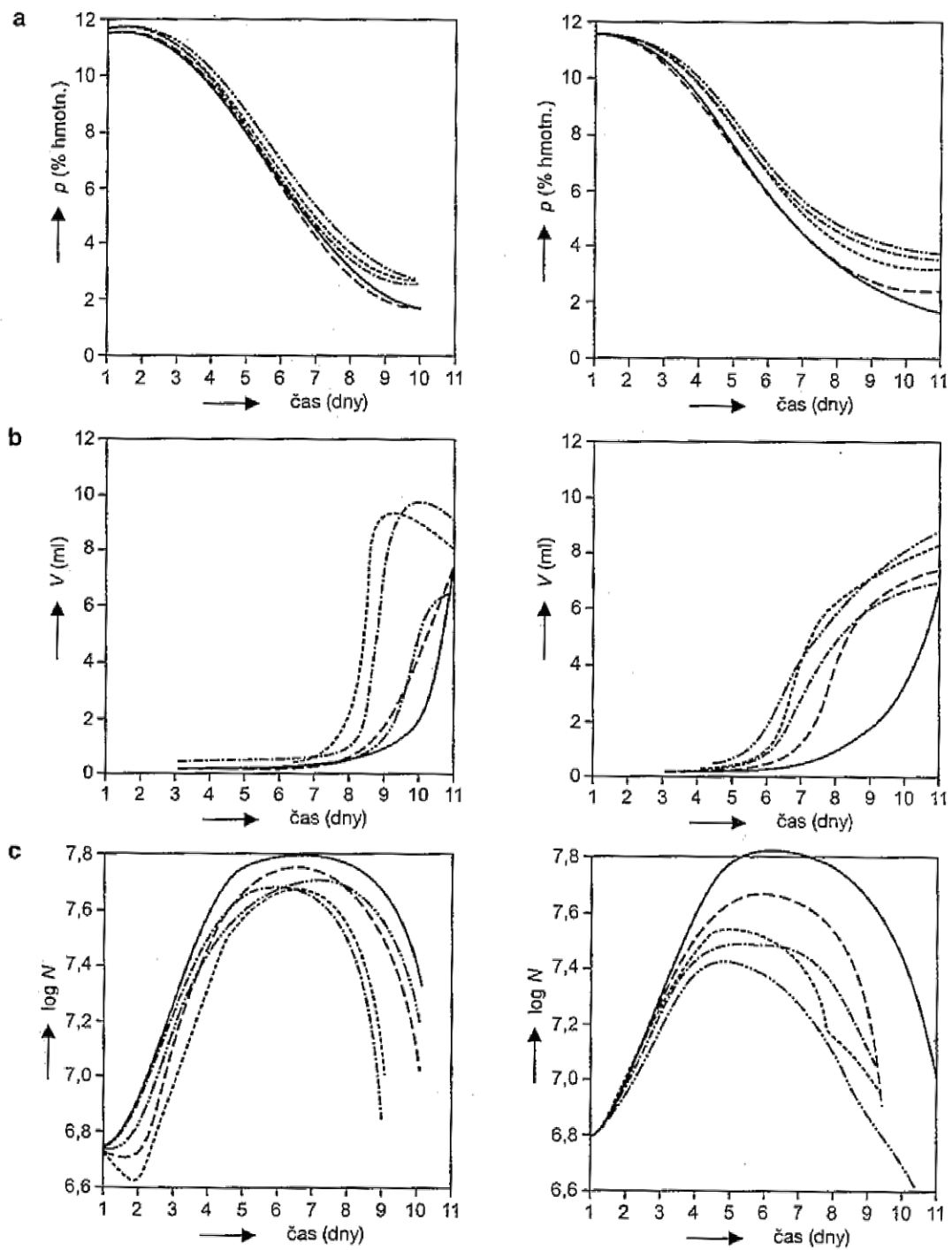
Obr. 13: Dělení kultivačních metod podle prováděné kultivace

(zdroj: Nečas, Streiblová a Vondřejš, 1986)



Obr. 14: Návrh propagační stanice pro minipivovary

Obr. 15: CK tanky (zdroj: ceskeminipivovary, online)



Obr. 16: Kvasné (a) a sedimentační (b) růstové křivky pěti různých produkčních kmenů pivovarských kvasinek (zdroj: Šavel, 1971a)