

Vplyv technologických faktorov na fermentačnú aktivitu pivovarských kvasiniek

GABRIELA ŠEPELOVÁ - MARIANA CVENGROŠCHOVÁ
- DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

SÚHRN. Kvasinky zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v procese výroby piva. Použitý druh ako aj zákvasná dávka kvasiniek ovplyvňujú nielen priebeh fermentácie, ale aj výsledné kvalitatívne a organoleptické vlastnosti hotového produktu. Počas samotného priebehu fermentácie je potrebné venovať dostatočnú pozornosť vonkajším faktorom, ako je teplota, tlak, pH, kyslík, rH a koncentrácia skvasiteľných sacharidov. Fermentácia vysokokoncentrovaných substrátov si vyžaduje zachovanie vitality kvasiniek bez negatívneho vplyvu na organoleptické vlastnosti piva. Článok prináša prehľad vonkajších faktorov ovplyvňujúcich kvasenie, ako aj faktorov ovplyvňujúcich kvasenie vysokokoncentrovaných mladín: osmotický tlak, etanol, dusíkaté látky a zložky fermentačného média.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: kvasinky; fermentácia; etanol; tolerancia

Pri kvasení mladiny, ktoré je dôležitou fázou výroby piva, majú prvoradý význam kvasinky, pretože ovplyvňujú chemické zloženie piva, jeho trvanlivosť a organoleptické vlastnosti. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patria v súčasnosti k najlepšie preštudovaným a v pivovarníckom priemysle najviac využívaným mikroorganizmom. V procese výroby piva zohrávajú významnú úlohu, pretože určujú priebeh fermentácie, a tým aj všetky typické organoleptické vlastnosti piva. Správanie kvasiniek závisí od vonkajších podmienok, kde akékoľvek vychýlenie od optimálnych podmienok spôsobuje zmeny v ich aktivite, ktoré sa prejavujú na priebehu celého procesu fermentácie.

Kvasinky sú jednobunkové mikroorganizmy. Ich taxonomické zadelenie je nadríša *Eukaryota*, ríša *Fungi*, trieda *Ascomycetes*, čeľaď *Saccharomycetaceae*, podčeľaď *Saccharomycoidae*. Podľa oficiálnej taxonómie sa jed-

Ing. Gabriela ŠEPELOVÁ, Ing. Mariana CVENGROŠCHOVÁ, Pivovar Šariš a. s., Pivovarská 9, 082 21 Veľký Šariš.

Ing. Daniela ŠMOGROVIČOVÁ, Phd., Katedra biochemickej technológie, Fakulta chemick-
ej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Ing. Gabriela ŠEPELOVÁ, e-mail: gsepelova@hotmail.com

noznačne neodlišujú kvasinky pivovarské od divokých. Preto existuje niekoľko používaných taxonomických variantov. Najvhodnejším označením pre druh spodných pivovarských kvasiniek je *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *uvarum carlsbergensis* a pre vrchné pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* [1]. Metabolizmus kvasiniek - látková výmena - je z pivovarského hľadiska hlavne premenou skvasiteľných cukrov na alkohol a oxid uhličitý za účasti mnohých enzýmov a koenzýmov. Metabolizmom kvasiniek s mnohými inými zložkami mladiny vzniká široké spektrum vedľajších produktov, ktoré ovplyvňujú charakter hotového piva. Metabolizmus kvasiniek je ovplyvnený zložením mladiny, vlastnosťami kvasiniek a podmienkami procesu. História pivovarskej výroby bola až do vynálezu chladenia v polovici 19. storočia výhradne spojená s kvasinkami vrchného kvasenia. V súčasnosti sa pri procese kvasenia používajú oba základné druhy a ich použitím sa vyrábajú odlišné typy pív. Kvasinky vrchného kvasenia slúžia na výrobu pív typu „ale“, „porter“, „stout“ a kvasinky spodného kvasenia pre pív plzenského typu.

Prvým krokom na dosiahnutie požadovanej kvality a zabezpečenie optimálneho priebehu výroby podľa technologického postupu kvasenia a dokvasovania je výber vhodného kmeňa kvasiniek. Pri overovaní nového kmeňa kvasiniek je potrebné niekoľkonásobné nasadenie, aby prebehla úplná adaptácia na podmienky pivovaru - zloženie pivovarskej mladiny, technické a technologické podmienky. Metódy používané na kontrolu vlastností kvasiniek sú zhrnuté v troch oblastiach:

1. viabilita, t. j. reprodukčné vlastnosti kvasinky,
2. vitalita, t. j. fyziologický stav kvasinky,
3. technologické vlastnosti.

Ku kontrole viability a vitality sa využívajú nasledujúce postupy:

- mikroskopické metódy kontrolujúce počet buniek (farbením), tvar a veľkosť vakuol,
- metabolické testy, ako sú napr. tvorba CO₂, spotreba O₂, acidifikačný test (reakcia po rozmiešaní v glukózovom roztoku) a pod.,
- zisťovanie zloženia buniek - obsah zásobných polysacharidov, ATP, NADH, intracelulárneho pH, pH biomasy, uvoľňovanie enzýmu (proteázy, esterázy), obsah lipidov, sterolov a nenasýtených mastných kyselín.

Pri určovaní technologických vlastností sa využívajú:

- modelové kvasné skúšky kontrolujúce rýchlosť kvasenia, sedimentácie, rozmnožovanie, senzorický profil piva,
- statická kontrola výrobného procesu.

Vhodný výber metód pre kontrolu vlastností kvasiniek je nutné doplniť o kontrolu kvality skvasovanej mladiny a o sledovanie kontaminácie [2]. Kvasinky sú schopné využívať jednoduché sacharidy (glukózu, fruktózu, manózu, galaktózu), disacharidy (sacharózu, maltózu) a niektoré trisacharidy (rafinózu, maltotriózu). Tieto uhlíkaté zdroje sú transportované do buniek kvasiniek. Transport jednoduchých sacharidov prebieha cez bunkovú stenu difúziou, sacharóza sa štiepi vo vnútri bunky na fruktózu a glukózu pomocou enzýmu invertáza. Maltóza a maltotrióza sa transportujú aktívnym transportom, ktorý vyžaduje určitú energiu. Také enzýmy, ktoré zabezpečujú štiepenie a transport týchto sacharidov sú konštitutívne, t. j. sú bunkou syntetizované iba v prípade potreby. Kvasničná bunka musí mať na tento účel vhodné suroviny. Pivovarské kvasenie je anaeróbny proces katalyzovaný komplexom enzýmov kvasničnej biomasy, ktorý prebieha podľa Embden-Meyerhofovej schémy [3].

Jednoduché sacharidy sa v bunke premenia na fruktózu-6-fosfát, ktorý vstupuje do metabolickej dráhy glykolýzy sacharidov [3]. Cieľom glykolýzy je získanie stavebných kameňov pre bunkovú syntézu a získanie energie. Energia sa získava v podobe adenosíntrifosfátu - ATP. Táto látka je chemickým, energetickým akumulátorom bunky. Energetický zisk z premeny jednej molekuly glukózy na alkohol pri kvasení je určený dvomi molekulami ATP. Pri ďalších reakciách dochádza k energetickým stratám, ktoré sa prejavujú rastom teploty kvasenej mladiny. Na udržanie konštantnej teploty kvasenia mladiny sa toto vzniknuté teplo musí odvádzať chladením. Pivovarsky najvýznamnejšia časť metabolizmu kvasiniek je premena pyruvátu na alkohol. Kvasenie prebieha za anaeróbnych podmienok. Rovnako dôležitý je aj vznik vedľajších produktov. Doteraz bolo identifikované veľké množstvo (stovky) vedľajších produktov metabolizmu kvasiniek, ktoré rôznym spôsobom ovplyvňujú zloženie a vlastnosti piva. Metabolizmus aminokyselín je prepojený s tvorbou vyšších alkoholov, diketónov a esterov. Ďalšími významnými vedľajšími produktami sú dimetylsulfid (DMS), mastné kyseliny a glycerol (glycerín). Kvasinky vrchného kvasenia produkujú viac vedľajších produktov pri procese kvasenia. Asi 80 % konečného obsahu sensoricky aktívnych látok sa vytvára práve pri procese kvasenia [2].

Pri procese kvasenia sa vytvára chuťový charakter piva, na ktorý majú vplyv nielen hlavné produkty kvasenia, ale aj obsah vyšších alkoholov, esterov, ketónov, aldehydov, zlúčenín síry atď. Priebeh fermentácie závisí od zloženia mladiny, druhu použitého kvasničného kmeňa, od určenia ich počiatočnej koncentrácie, posúdenia ich fyziologického stavu, teploty kvasenia, tlaku, objemu a tvaru nádob [4]. Výber vhodného kvasničného kmeňa a jeho aktivita závisia od podmienok prostredia, v ktorých prebehne fermentácia.

Aktívne bunky môžu rýchle prekvasovať substrát, asimilovať aminokyseliny, adsorbovať horké látky a ovplyvňovať spektrum tvorby prchavých látok v pive [5].

Jednou z najnovších inovácií v procese výroby piva je kvasenie vysoko-koncentrovaných mladín (označované „high gravity“ a „very high gravity“). Vysokokoncentrované mladiny sú neoptimálnym prostredím pre kvasinky. Ich reakcie a adaptačné mechanizmy na stresové podmienky nie sú doteraz objasnené. Predstavujú komplexný problém a zahŕňajú vplyv viacerých faktorov naraz. „High gravity“ (HG) fermentácia je v pivovarníctve definovaná ako skvasovanie mladín s koncentráciou 13–16 g rozpustných látok na 100 g mladiny a „very high gravity“ (VHG) fermentácia ako skvasovanie mladín s obsahom rozpustných látok nad 18 g na 100 g mladiny. Výroba piva touto technológiou „high gravity brewing“ je zameraná hlavne na zvýšenie hospodárnosti výroby a štandardnosti vyrábaného piva. Pri použití rovnakých technických zariadení dochádza k okamžitému zvýšeniu kapacity pivovaru, kde zjednodušenie výroby piva má za dôsledok výrazné zvýšenie ziskov a zníženie výrobných strát, ako aj elimináciu negatívnych výrobných efektov. Zároveň je umožnená rýchla odozva na meniace sa požiadavky trhu, ako aj účelné zabezpečenie širokého sortimentu výrobkov a špeciálnych požiadaviek spotrebiteľov. Hlavný zisk predstavuje úspora energie vo varni, pretože na výrobu rovnakého množstva piva sa uvarí menej várok. Úspora kapacity spilky, pivnice, cylindrickokónického tanku (CKT), pri filtrácii znamená výrazne nižšiu investičnú nákladovosť na ďalšie priestorové vybavenie. HG a VHG technológie podporujú značnú úsporu vody a zvyšujú produktivitu zariadenia, a tým dochádza k redukcii fermentácie a ceny na liter vyrobeného alkoholu [6, 7]. Je nutné si uvedomiť, že pív vyrobené z vysokokoncentrovaných mladín majú iné vlastnosti - rovnako aj mladiny, z ktorých sa vyrábajú. Zahusťovaním a rekonštitúciou mladín sa v 10 % svetlých sladových mladinách a v pivách z nich vyrobených znížil o 10–30 % obsah dusíkatých látok, chmelových horkých látok a polyfenolov, zatiaľ čo pH hodnota sa zvýšila. Farba a ostatné analytické parametre, ktoré označujú zmeny v chemickom zložení mladín, sa vplyvom následných reakcií pri teplote 65 °C nezmenili a nebol ovplyvnený ani vzhľad a organoleptické vlastnosti pív [8].

Vlastnosti HG a VHG mladín, ale aj pív z nich vyrobených, závisia od spôsobu prípravy mladín. Pri výrobe piva VHG technológiou sa musí zachovať približne rovnaká doba kvasenia a dokvasovania ako pri výrobe piva o koncentracie, na ktorú sa upravujú výsledné produkty. Čas potrebný na fermentáciu sa však so zvýšením extraktu zvyšuje [9]. Zvýšené zákvasné dávky kvasiniek, zvýšené zákvasné a maximálne teploty hlavného kvasenia, dosiahnutie maximálneho obsahu rozpustného kyslíka sa vo všeobecnosti

spájajú so zmenami obsahu prchavých látok a organoleptických vlastností piva. Pri silnejšom vzdušnení vzniká v pive viac diacetylu, znižuje sa výťažok etanolu [7]. Zvýšenie teploty fermentácie vedie k neúplným fermentáciám a so zvyšovaním teploty sa znižuje etanoltolerancia. Tento problém je ešte výraznejší pri fermentáciách so zvýšeným obsahom sacharidov v mladinách [9]. Vo HG a VHG mladinách sú kvasinky vystavené stresovým podmienkam - vysokej koncentrácii sacharidov, zvýšenej koncentrácii naprodukovateľného etanolu, nedostatočnému prísunu živín (ako sú rozpustný kyslík a asimilovateľný dusík), zvýšenej viskozite prostredia, zvýšenej koncentrácii rozpusteného CO₂. Podmienky pre rast a metabolizmus kvasiniek sú menej priaznivé - nastáva zníženie rastovej schopnosti, zvýšenie straty viability buniek až smrť. Dochádza k zmenám koncentrácie zásobných látok vo vnútrobunkovom prostredí kvasiniek. Ovplyvnené sú aj fermentačné vlastnosti, ako sú rýchlosti produkcie etanolu, spotreby substrátu a rýchlosť tvorby vedľajších produktov.

Vplyv vonkajších faktorov na výsledok kvasenia

Na výsledok kvasenia má vplyv množstvo vonkajších faktorov, od ktorých závisí nielen rýchlosť kvasenia, ale aj vznik rôznych vedľajších produktov, kde ich kvalitatívne, ako aj kvantitatívne zastúpenie má vplyv na organoleptické vlastnosti piva. V praxi sa vedie pivo tak, aby hotové pivo malo dobrú chuť a penivosť, bolo dostatočne nasýtené oxidom uhličitým a uspokojivo prekvasené. Stupeň prekvasenia má prvoradý vplyv pri hlavnom kvasení a dokvasovaní. Na konci hlavného kvasenia musí v mladom pive zostať pre dokvasovanie toľko skvasiteľného extraktu, aby hradiaci pretlak dosiahol požadované hodnoty nutné k vyhovujúcemu nasýteniu piva oxidom uhličitým. Pri splnení tejto požiadavky sa zdanlivý stupeň prekvasenia hotového produktu musí približovať dosiahnuteľnému prekvaseniu natoľko, aby vystavené pivo malo dobrú biologickú trvanlivosť.

Hlavné faktory, od ktorých závisí výsledok fermentácie sú:

- pivovarské kvasinky,
- zákvasná dávka kvasiniek,
- koncentrácia skvasiteľných sacharidov,
- teplota,
- tlak,
- pH,
- kyslík a rH.

Pivovarské kvasinky

Zvolenie správneho kmeňa (typu) pivovarských kvasiniek, vyhovujúceho daným výrobným podmienkam, je dôležitým predpokladom pre dobrú výrobu. Vyhovujúci kmeň pri normálnom priebehu fermentácie umožní dosiahnuť požadovaný stupeň prekvasenia, dobré zakvasenie a vyhovuje aj chuťovo. Základným predpokladom pri optimalizácii kvasenia v CKT okrem kvasnej schopnosti a mikrobiálnej čistoty kvasiniek je aj dobrý fyziologický stav a enzýmová aktivita diacetylreduktázy, ktorá zabezpečí odbúravanie pri kvasení vzniknutého diacetylu na minimálnu hodnotu [10].

Nový typ pivovarských kvasiniek je možné v praxi posúdiť v druhej generácii, v niektorých prípadoch až v tretej generácii. Vtedy sa aklimatizujú a spoľahlivo sa prejavujú ich adaptačné vlastnosti. Dlhodobá štúdia zaoberajúca sa pozorovaním vlastností produkčných pivovarských kvasiniek zistila, že väčšina vlastností sa prakticky nemení, avšak flokulácia je veľmi premenlivá. V následných generáciách kvasiniek sa skôr zhoršuje [11, 12]. Túto vlastnosť sa autori tejto štúdie pokúsili úspešne vysvetliť pomocou genetických zmien kvasiniek. Je ale dôležité, aby k flokulácii kvasiniek nedochádzalo predčasne, pretože sa tým znižuje prístupnosť povrchu kvasničných buniek, zhoršuje sa kvasná schopnosť, a tým aj prekvasenie a ďalšia metabolická a enzýmová činnosť kvasiniek [10]. Technické kultúry pivovarských kvasiniek sa vo výrobe používajú šesťkrát, len ojedinele viac ako desaťkrát. Dôvod ich maximálneho použitia je v tom, že kvasinky sa v novom prostredí vždy postupne menia a strácajú pôvodný charakter. Prejavom začiatkovej degenerácie kvasiniek je pokles kvasnej mohutnosti a strata charakteristickej vône. A nesmie sa zabudnúť na skutočnosť, že kvasinky sa vo výrobných priestoroch aj kontaminujú.

Zber a úschova pivovarských kvasiniek musí prebiehať pri podmienkach, ktoré nezapríčinia ich náhodnú kontamináciu. Študovali sa rôzne postupy konzervovania a skladovania pivovarských kvasiniek, ako aj vplyv na ich vitalitu a následnú kvalitu piva [13]. Štúdie týchto autorov ukazujú, že neexistuje súvislosť medzi dobou prežitia po konzervovaní a vitalitou kvasiniek počas kvasenia. Existujú však nepriaznivé podmienky, ktoré negatívne ovplyvňujú činnosť kvasiniek a označujú sa ako stresové faktory [14]. PRATT-MARSHALL [15] podrobne diskutuje o problémoch, ktoré majú vplyv na životnosť pivovarských kvasiniek. V štúdiu sa poukazuje na to, že vysoká koncentrácia mladiny ovplyvňuje morfológiu kvasničnej bunky, pôsobí na bunkovú stenu a spôsobuje zmenšenie bunky.

Základná dávka kvasiniek

V mladinách rovnakej stupňovitosti je rýchlosť fermentácie za rovnakých podmienok a pri dobrom rozptýlení kvasiniek úmerná množstvu kvasiniek

použitých na zakvasenie. Z tohto údaju, v minulosti niekoľkokrát overeného, sa vyvodzuje, že každá kvasničná bunka sa správa ako samostatný katalyzátor kvasenia. V súvislosti s touto skutočnosťou je celkový výkon kvasiniek v kultúre úmerný počtu buniek. V tradičných podmienkach kvasenia v menších objemoch sa bežne dávkuje 0,5 l hustých kvasníc na 1 hl mladiny, čo je asi $15 \cdot 10^6$ buniek v ml. Pre CKT je nutné zabezpečiť vyššie dávkovanie, podľa počtu buniek v priemere $20 \cdot 10^6$ až $22 \cdot 10^6$ buniek na 1 ml [10]. Vyššia dávka kvasiniek čiastočne potlačuje tvorbu vedľajších metabolitov, zaručuje vyššiu redukciu karbonylu, neovplyvňuje však výťažok kvasiniek.

Rozmnožovanie kvasiniek nezávisí od množstva kvasiniek použitých pri zakvasení. Prebieha tak, aby za daných podmienok bol v objemovej jednotke čo najväčší počet buniek. Pri zakvasovaní malým množstvom kvasiniek je rozmnožovanie silnejšie, pri zakvasovaní väčším množstvom kvasiniek je rozmnožovanie slabšie, avšak po ukončení kvasenia je výťažok kvasiniek v oboch prípadoch približne rovnaký. Obmädzené rozmnožovanie kvasiniek znižuje spotrebu živín na tvorbu novej bunkovej hmoty, takže vzrastá výťažok hlavných produktov fermentácie, t. j. etanolu a oxidu uhličitého.

Koncentrácia skvasiteľných sacharidov

Sacharidy, ako hlavná živina kvasiniek, ktoré tvoria asi 90 % extraktu mladiny, boli známe už na prelome 18. a 19. storočia. Závislosť poradia skvasiteľnosti sacharidov od vlastností kvasného kmeňa uviedol GRIFFIN [16]. Koncentrácia skvasiteľných sacharidov v mladine má v istých prípadoch vplyv na rýchlosť fermentácie, ako aj na rozmnožovanie kvasiniek. Z praxe je známe, že mladiny s 11% až 12% extraktom skvasujú kvasinky lepšie ako mladiny HG alebo mladiny s nižšou koncentráciou extraktu.

Nadmerne vysoká koncentrácia glukózy v mladine môže nastať pri výrobe mladiny náhradou sladú pomocou sacharózy, kde pri rýchlom rozkvasení dôjde k zastaveniu kvasného procesu [10]. Do určitej miery sa môže podobný problém prejavovať pri dlhodobom napúšťaní CKT mladinou so stálym prísunom glukózy a fruktózy pri diferencovanom dávkovaní kvasiniek. Doba života kvasiniek je ovplyvnená zložením média. MASKELL a kol. [17] študovali vzťah medzi replikatívnou dobou života, zložením sacharidov v mladine a špecifickou rýchlosťou rastu u kmeňov kvasiniek spodného kvasenia. Nenašla sa závislosť medzi replikatívnou dobou života a špecifickou rýchlosťou v laboratórnom médiu alebo v mladine. Rozmnožovanie kvasiniek pri kvasení mladín stredných koncentrácií je zhruba úmerné stupňovitosti mladiny a zároveň obsahu dusíka v mladine. V mladinách s obsahom extraktu 14,5 % sa rozmnožovanie kvasiniek so sacharizáciou mladiny už nezvyšuje, ale ustáli sa na konštantnej výške. V mladinách s nižšou koncentráciou

extraktu rozmnožovanie kvasiniek neklesá úmerne so stupňovitostou, ale je rýchlejšie. Prídavkom sacharózy sa výťažok kvasiniek zvyšuje. Tento jav sa odôvodňuje vysokým obsahom asimilovateľného dusíka v mladine, ktorého prebytok zostáva v pive, takže rozmnožovanie kvasiniek je obmedzované iba nedostatkom sacharidov.

Štúdiom problematiky skvasovania mladín skvasiteľnými sacharidmi, ako sú maltóza, maltotrióza a glukóza, v porovnaní s ďalšími surovinami a surogátmi sa zaoberal WILLE a kol. [18]. Experimenty sa robili v štvrtprevádzkových meradlách, v objeme 60 l. Surogáty, ako kukuričné vločky alebo rôzne typy glukózových sirupov nahrádzali až 30 % sypania sladú. Pokiaľ sacharidové profily použitého surogátu boli podobné, bola podobná aj kinetika kvasného procesu. Ak sa použilo vysoké percento glukózového sirupu, došlo ku katabolickej represii. Tento jav sa ale neprejavil pri aplikácii maltózového sirupu.

Teplota

Teplota má veľký vplyv na celkový priebeh a výsledok kvasenia, ako aj na rozmnožovanie kvasiniek. Už zo starších pozorovaní vyplýva, že pri studenom vedení kvasenia narastá rýchlosť kvasenia zvyšovaním teploty viac ako zvyšovaním teploty pri teplom vedení fermentácie. Optimálna teplota kvasenia nie je rovnaká u kvasiniek rôznych kmeňov [10]. U spodných kvasiniek sa pohybuje okolo 25 °C; až doteraz sa takéto vysoké teploty pri technologických postupoch nevyužívali. To isté platí aj o maximálnej teplote, pri ktorej kvasničná kultúra ešte kvasí. Pri teplotách blízkych bodu mrazu je rýchlosť kvasenia nepatrná, avšak ešte stále preukázateľná. Kvasenie sa úplne zastavuje až pri zmrznutí média.

Pri pivovarskom spodnom kvasení vyhovujú technologicky iba teploty v pomerne úzkom intervale medzi 5–12 °C. Rýchlosť fermentácie má byť taká, aby úbytok extraktu za 24 hodín neprekročil 1,5 % hmot. V praxi sa reguluje vhodne zvolenou zákvasnou teplotou a chladením, ktoré má byť plynulé. Teplota nemá klesať rýchlejšie než 1 °C za 24 hodín, aby sa kvasenie neprerušilo [19]. Regulácia teploty je v praxi najúčinnějšíou pomôckou, ktorou je možné v určitých medziach ľubovoľne meniť rýchlosť kvasenia, ako aj rozmnožovania kvasiniek [20]. Pri nízkych teplotách prebieha kvasenie voľnejšie, kvasinky sa rozmnožujú pomalšie a často je aj výťažok kvasničnej hmoty nižší. Pri teplejšom vedení kvasenia je rozmnožovanie rýchlejšie a aj výťažok kvasničnej hmoty je vyšší. Teplota má súčasne vplyv na veľkosť kvasničných buniek. Pri teplejšom vedení kvasenia sú bunky kvasiniek o niečo menšie následkom rýchlejšieho rozmnožovania a dorastania, pri studenom vedení kvasenia bunky kvasiniek bývajú väčšie.

Tlak

Tlak sa v technologickom postupe uplatňuje prevažne nepriamo, hromadením CO₂. CO₂ tlmí proces fermentácie. Pri bežných teplotách sa kvasenie zastaví, až keď vzniknutý CO₂ dosiahne pretlak 0,3 až 0,4 KPa. V prevádzkových podmienkach sa však pracuje s tlakmi sotva presahujúcich 100 KPa. Vplyvom vyššieho tlaku a súčasne vplyvom menšieho prevzdušnenia mladiny je výťažok kvasničnej hmoty nižší. CO₂ rozpustený v pive pri dokvasovaní, ako aj ďalšie vplyvy postupne utlmujú kvasenie, ktoré však celkom neustane, až pokiaľ neskončí technologický proces fermentácie. Potrebný hradiaci pretlak závisí od teploty. Kvasenie pri zvýšenom tlaku inhibuje rast kvasiniek. Kvasenie pri aplikácii vyšších teplôt je vhodné, ale len do hodnoty tlaku 0,1 MPa. Pri vyššom tlaku sa znižuje absorpcia aminokyselín kvasinkami. Pri tlaku vyššom ako 0,2 MPa dochádza k značnému hromadeniu diacetylu [10].

Zvýšenie maximálnej teploty fermentácie z 8 °C na 13 °C až 14 °C spolu s použitím vyššieho tlaku (120 až 180 MPa) má za následok skrátenie procesu hlavného kvasenia. Zatiaľ čo vyššia teplota proces fermentácie urýchľuje, kombinácia teploty a tlaku reguluje produkciu aromatických zlúčenín [21]. Jedným z hlavných parametrov ovplyvňujúcich produkciu prchavých látok je rozpustný oxid uhličitý. Koncentrácia CO₂ závisí od teploty a tlaku. Pri posudzovaní chuti a vône piva je možné označiť tieto látky, ako aj ich skupiny, za negatívny prínos fermentácie. Práve tlak má podľa KOROVINA a kol. [22] veľký vplyv na tvorbu aromatických zložiek piva.

pH

Hodnota pH je jedným z najdôležitejších parametrov pre riadenie procesu výroby piva [23, 24]. Aj keď sa zdá byť na prvý pohľad veľmi jednoduché stanovenie pH mladín, ako aj rozkvasenej mladiny, je nutné, aby sládkovia vedeli trochu viac o pozadí merania pH. MANGER [24] podrobne rozpracoval správny postup merania hodnoty pH, ako aj problémy súvisiace s pH. Pri normálnych prevádzkových podmienkach má pH kvasiacej mladiny pomerne malý vplyv na rýchlosť celej fermentácie, ako aj na rozmnožovanie kvasiniek, pokiaľ sa neprekročí hraničná hodnota. Pri pivovarskej fermentácii sa pH pohybuje medzi 4,2 až 5,6. pH mladiny pred zakvasením je 5,3 až 5,6 a u hotového produktu 4,2 až 4,6. Pri kvasení pH klesá veľmi rýchlo vplyvom vznikajúceho CO₂. Už druhý deň po zakvasení klesne hodnota pH na hodnotu okolo 4,4 a tá sa už v ďalšom procese mení len nepatrne.

Kyslík a rH

Proces fermentácie je proces anaeróbny, prebieha bez kyslíka. Naproti tomu je kyslík nevyhnutný pri rozmnožovaní kvasiniek. Je stavebným prvkom pre biosyntézu základných membránových lipidov kvasničnej bunky. Zodpovedajúci prísun kyslíka je nevyhnutný pre rast kvasiniek, priebeh kvasenia a chuť hotového piva [25]. V pivovarskej praxi sa oddávna dávkuje kyslík do schladenej mladiny. Kyslík rozpustený v mladine kvasinky spotrebujú veľmi rýchlo už v počiatočnom štádiu kvasenia, takže po dvoch dňoch je fermentovaná mladina takmer bez kyslíka. Spotrebu kyslíka a rýchlosť jeho absorpcie v priebehu rozmnoženia kvasiniek rozoberá ANNEMÜLLER a MANGER [26]. Experimenty ukázali, že je možné upraviť intenzitu vzdušenia na nižšie hodnoty v porovnaní s koncentráciami, ktoré udáva literatúra. Pre štandardné fermentácie vo veľkoobjemových nádobách je možné zvýšiť alebo stabilizovať rast kvasiniek miernym „sekundárnym“ vzdušnením asi 5 až 10 hodín po naplnení kvasnej nádoby.

Pivovarské kvasinky sú schopné rozmnožovať sa aj bez prístupu kyslíka pri anaeróbnych podmienkach, ale ak sa má trvale zachovať ich schopnosť rozmnožovania, je určité množstvo kyslíka po určitej dobe nevyhnutné. Tento poznatok nám potvrdzuje správnosť technologického procesu dávkovania kyslíka do uvarenej mladiny pri chladení a zakvasovaní mladiny. Ale naopak, príliš vysoký obsah kyslíka má nepriaznivý vplyv na vlastnosti hotového produktu. Súčasne s okysličovaním sa pri fermentácii mení aj rH faktor. Schladená mladina pred zakvasením má obvykle rH 20 a viac. Táto hodnota je priaznivá pre rozmnožovanie kvasiniek a pri samotnom procese kvasenia postupne klesá až na rH 10 až rH 11 u mladého piva. Pri rH nižšom ako 15 sa pivovarské kvasinky nerozmnožujú. Je preto dôležité chrániť pivo pri rôznych manipuláciách v ležiackej pivnici, ako aj pri stáčaní pred ďalšou oxidáciou. U pív nedostatočne nasýtených oxidom uhličitým je oxidácia vždy silnejšia. Kyslík poškodzuje chuť aj stabilizáciu piva. Oxidované pivo je nepríjemne horké, vo fľašiach vzniká predčasne proteínový zákal a po pasteurizácii vznikajú nebiologické zákaly [27, 28].

Faktory ovplyvňujúce kvasenie vysokokoncentrovaných substrátov

Kvasinky sú počas kvasenia vysokokoncentrovaných mladín vystavené rôznym stresovým podmienkam. Literatúra je nejednotná v názore, ktorý z týchto stresových faktorov je najškodlivejší pre kvasinky počas fermentácie v takýchto mladinách. Niektorí autori označujú ako hlavnú príčinu pomalej

a nedokončenej fermentácie toxicitu etanolu, iní zasa nedostatok živín alebo neoptimálny prídavok živín (ako sú O_2 a asimilovateľný dusík). Ďalším stresovým faktorom môže byť zvýšený osmotický tlak na bunky kvasiniek spôsobený vysokou koncentráciou sacharidov v mladine. V skutočnosti všetky tieto hypotézy sú navzájom prepojené a dôležité pre udržanie fermentačnej aktivity kvasiniek. Pivovarské kvasinky sú schopné tolerovať iba 7–9 % obj. etanolu v prostredí, čo je množstvo obvykle produkované pri fermentáciach 16–20 % mladín. Vyššie koncentrácie etanolu a lepšia fermentačná aktivita sa dajú dosiahnuť prídavkom živín, ktorý musí byť optimálny [29, 30].

Vplyv osmotického tlaku

Kvasinky sú chemoheterotrofné organizmy, ktoré potrebujú uhlík a dusík najčastejšie vo forme organických zlúčenín. Najprístupnejší je im uhlík vo forme sacharidov, ktoré využívajú oxidačným, ako aj anoxidačným spôsobom v procese kvasenia. HG a VHГ mladiny sú zároveň mladiny s vysokým obsahom sacharidov obsahujúce až 85 % týchto látok. Zvýšenie koncentrácie substrátu vedie k zvýšenej metabolickej aktivite kvasiniek, avšak pri veľmi vysokých koncentráciách sa zvyšuje účinok osmotického tlaku na bunky, výsledkom čoho je zníženie rýchlosti rastu kvasiniek a ich fermentačnej aktivity [31]. Prostredie musí mať dostatočnú vlhkosť, aspoň 30 % pre kvasinkovité formy a 20 % pre hýfovité formy mikroorganizmov. Až 85 % vody v bunke kvasiniek je vo viazanej forme. Viazaná voda zabezpečuje potrebné napučiavacie účinky bunky pre jej funkčné štruktúry. Voľná voda tvorí v bunke predovšetkým transportný prostriedok pri látkovej premene, sprostredkováva rozdelenie medziproduktov látkového metabolizmu a odvádza nadbytočné teplo [32].

Vysoký osmotický tlak znižuje aktivitu vody prostredia kvasiniek, a tak spôsobuje dehydratáciu bunky s následnou plazmolýzou. Ak sa aktivita vody okolitého prostredia odchyľuje od optimálnych podmienok, ktoré sú špecifické pre každý druh, mikroorganizmy zvýšia svoju energetickú spotrebu, aby udržali termodynamickú rovnováhu - konštantný bunkový objem a turgorový tlak [33]. Objem bunky vystavenej osmotickému tlaku je najprv modifikovaný pasívne - pomocou vody alebo iného osmolytu, v druhej fáze sa zapája aktívny mechanizmus, ktorý umožní bunke obnoviť jej pôvodný objem [34]. Na všetky tieto procesy vyžaduje bunka energiu a tak poklesne jej rastová schopnosť [35]. Inhibícia rýchlosti rastu kvasiniek sa začína prejavovať od koncentrácie glukózy 50 g.l^{-1} a inhibícia jej fermentačnej rýchlosti od koncentrácie 150 g.l^{-1} glukózy [36]. Maximálna koncentrácia substrátu, ktorú sú schopné kvasinky ešte úplne sfermentovať sa líši v závislosti od substrátu, podmienok jeho dávkovania, použitého kmeňa kvasiniek, teploty vedenia fer-

mentácie a prídavku rôznych aditív. NAGODAWITHANA [37] uvádza, že pri koncentrácii sacharidov 180 g.l^{-1} sú fermentácie pomalé a často zostávajú neukončené, dochádza k vysokej strate viability až smrti buniek, pretože vysoký osmotický tlak a viskozita bránia kvasinkám asimilovať substrát. THOMAS a INGLEDEW [38] píšú o úplnej a ukončenej fermentácii aj pri koncentraciách rozpustných látok v médiu 390 g.l^{-1} v prítomnosti dostatočného množstva živín pre rast a rozmnožovanie buniek. Úplná inhibícia fermentácie substrátom nastáva pri koncentrácii glukózy vyššej ako 400 g.l^{-1} , a v závislosti od obsahu prítomného etanolu už aj pri omnoho nižších koncentraciách, pretože existuje synergický efekt medzi vysokou koncentraciou glukózy a etanolu. Veľmi dôležité je posudzovať aj to, aký druh sacharidu sa v médiu nachádza. Napríklad substrátová inhibícia fermentácie rovnakou koncentraciou glukózy (180 g.mol^{-1}) je vyššia ako pri sacharóze (342 g.mol^{-1}), osmotický tlak glukózy je 1,73-krát vyšší [39, 40]. Pivovarnícka mladina obsahuje rôzne sacharidy rôznej koncentrácie. V závislosti od spôsobu jej prípravy sa obsah jednotlivých sacharidov mení, a tak mladiny s rovnakým extraktom môžu pôsobiť na bunky kvasiniek rôznym osmotickým tlakom. Pravdepodobne preto sa líšia aj poznatky jednotlivých autorov o tom, pri ktorej koncentrácii mladiny začína inhibícia rýchlosti rastu a fermentačnej aktivity.

Zvyšovaním osmotického tlaku v mladine úpravou koncentrácie sacharidov z koncentrácie 10 % na 20 % (20% mladina vyrobená sladovaním jačmeňa nariadená na nižšie koncentrácie) sa zistilo, že nebol poškodený rast buniek ani ich fermentačná aktivita, práve naopak, zvýšená koncentrácia sacharidov mierne stimulovala rýchlosť rastu a zvýšila produkciu etanolu. So zvyšovaním koncentrácie extraktu nebola poškodená ani viabilita buniek [31]. V pokuse uskutočnenom s 28% mladinou (12% mladina upravovaná prídavkom glukózového sirupu alebo maltózy na 28% mladinu) v atmosfére dusíka sa proces fermentácie zastavil už po 6 dňoch, obsah nesfermentovaných rozpustných látok bol 18,6 %. Pri fermentácii mladiny bez atmosféry dusíka sa proces kvasenia ukončil po 11 dňoch a obsah nesfermentovaných rozpustných látok bol 8,5 %, čo predstavuje 69,6% prekvasenie. Je to hodnota bežne dosahovaná pri fermentáciách s vysokým obsahom surogácie [41]. Maximálna dosiahnutá koncentrácia etanolu bola 11,2 % obj. a ani pri takejto vysokej koncentrácii sacharidov sa nepozorovala výrazná strata viability buniek kvasiniek. V obidvoch pokusoch nebola fermentácia úplne dokončená preto, že kmeň kvasiniek nemetabolizoval dextríny prítomné v mladine [31].

Vplyv etanolu

Etanol je unikátnym produktom metabolizmu, pretože sa fyziologicky produkuje v koncentrácii, pri ktorej dochádza k denaturácii proteínov

a k následnej smrti buniek [40]. Prvým miestom pôsobenia etanolu je cytoplazmatická membrána buniek, ako aj membrány iných bunkových organel. Interakciou membrány s etanolom dochádza k zmene štruktúry membrány a tým aj k zmene permeability [42]. Keďže etanol a lipidy cytoplazmatickej membrány sú amfipatické molekuly, je isté, že spolu priamo interagujú počas fermentácie, výsledkom čoho sú fyziologické zmeny v cytoplazmatickej membráne [40]. Etanol interaguje s membránou vstúpením do jej hydrofóbného priestoru, zvyšuje polaritu tejto časti, oslabuje hydrofóbne interakcie a hydrofóbnú bariéru voľnou výmenou polárnych molekúl, poškodzuje umiestnenie proteínov v membráne, pričom môže dochádzať až k vytvoreniu dier [43]. Etanol tak zapríčiňuje únik esenciálnych kofaktorov a koenzýmov nevyhnutných pre aktivitu enzýmov glykolýzy. Strata látok nevyhnutných pre aktivitu bunky vedie k jej oslabeniu alebo smrti. Ďalším prejavom jeho inhibičného účinku je denaturácia rôznych proteínov a enzýmov glykolýzy, vyvolanie protónového toku, urýchľovanie pasívneho toku protónov do bunky, zvýšenie termálnej smrti a „petit“ mutácií, inhibícia transportu glukózy, maltózy a dusíka [40].

Z doterajších poznatkov vyplýva, že prítomnosť etanolu v membráne spôsobuje oslabenie hydrofóbných interakcií medzi acylmi mastných kyselín, čo spôsobuje nežiaduce zvýšenie fluidity membrány a zníženie jej integrity [44-47]. Negatívny vplyv etanolu na bunky sa môže pozorovať znížením rastovej rýchlosti, stratou viability a znížením rýchlosti tvorby etanolu, čiže fermentačnej schopnosti, pričom prvé dva parametre sú citlivejšie na účinok etanolu. Úplná inhibícia rastu a úplná strata viability nastávajú už pri 12 % obj. etanolu, zatiaľ čo fermentačná aktivita je pozorovateľná pri niektorých kmeňoch kvasiniek ešte aj pri 30 % obj. etanolu [40, 42]. Maximálna koncentrácia etanolu, pri ktorej je kvasinka ešte schopná produkovať etanol, nie je daná len genetickou výbavou kvasinky, ale je vo veľkej miere ovplyvnená prítomnosťou živín a protektívnych látok v médiu, parametrami okoliťého prostredia, spôsobom pridávania substrátu a inými technologickými parametrami fermentácie [40, 48, 42]. Pri štúdiu etanoltolerance buniek je vážnym problémom fakt, že neexistuje všeobecne uznávaná definícia etanoltolerance alebo technika jej merania. V literatúre boli opísané techniky založené na meraní pomeru rýchlosti fermentácie bez prítomnosti etanolu a pri vysokej koncentrácii etanolu, metódy stanovenia výťažku etanolu, kritickej koncentrácie etanolu v kvasnom prostredí, spôsoby merania zmeny extracelulárneho pH a kalorimetrického stanovenia kvasného prostredia [49]. Medzi jednotlivými kmeňmi kvasiniek sa metódou merania rýchlosti rastu a straty viability zistili veľké rozdiely v etanoltolerancii. Tieto metódy však okrem etanoltolerance mohli odrážať aj rozdiely v nárokoch kvasiniek

na živiny a rozdiely v podmienkach fermentácie. Najčastejšie používanou metódou stanovovania etanoltolerance je meranie inhibície rastu buniek v prítomnosti exogénne pridaného etanolu [42]. Stanovenie etanoltolerance na základe prídavku exogénneho etanolu do prostredia nevystihuje úplne toleranciu voči etanolu počas fermentácie, pretože vplyv exogénneho a endogénneho etanolu na bunku kvasinky nie je totožný, ale výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť. Metóda merania inhibície fermentačnej schopnosti je najlepším indexom etanoltolerance, pretože táto charakteristika nie je ovplyvnená vyživovacími faktormi bunky alebo fázou rastu kultúry [48, 50]. Doteraz sa predpokladalo, že skvasovanie VHG mladín s koncentráciou extraktu vyššou ako 16 % nie je možné, pretože pivovarnícke kvasinky tolerujú iba 7–8 % obj. etanolu. Zistilo sa, že pivovarnícke kvasinky sú rovnako tolerantné k vysokým koncentráciám etanolu ako liehovarnícke a vinárske kmene - nevyžadujú genetické manipulácie a zlepšovanie kmeňa na to, aby tolerovali 14–16 % etanolu. Použitím vyššej zákvasnej dávky alebo prídavkom živín sa dosiahla koncentrácia etanolu tolerovaná pivovarníckymi kvasinkami až 16 % obj. [41]. Najvyššie koncentrácie tolerovaného etanolu sa dosiahli prídavkom ergosterolu a kvasničného autolýzátu do vysokokonzentrovanej mladiny [41]. Vyššia počiatočná koncentrácia buniek umožnila rýchlejšiu produkciu etanolu počas počiatočnej fázy fermentácie, naprodukovaný etanol vyvolal permeabilizáciu buniek, čím došlo k uvoľneniu živín počas fermentácie, a tak sa zvýšila tolerancia ešte fermentujúcich buniek k etanolu [51]. Nedostatočná etanoltolerance pravdepodobne nie je limitujúcim faktorom fermentácií VHG mladín, pretože so zvyšovaním koncentrácie extraktu mladiny z 10 % na 20 % sa rýchlosť produkcie etanolu zvyšovala [31]. Ak sa fermentácie VHG mladín neukončili, bolo to pre nedostatok živín, pretože po prídavku týchto živín fermentácia opäť pokračovala.

Prehľad surovín používaných pre výrobu etanolu, ako aj ich súčasné využívanie, nové perspektívne spôsoby ich použitia a problémy vyskytujúce sa pri spracovaní jednotlivých surovín a ich možné riešenie sa konkrétne diskutujú v článku autorov BAFRNCOVÁ, ŠMOGROVIČOVÁ a PATKOVÁ [52]. O niektorých nových technológiách fermentačnej výroby etanolu, ako sú simultánna sacharifikácia a fermentácia škrobu, VHG fermentácia, fermentácia imobilizovanými kvasinkami, kontinuálna fermentácia s recyklom buniek, vákuová fermentácia a extraktívna fermentácia bližšie diskutujú BAFRNCOVÁ a ŠMOGROVIČOVÁ [53].

Vplyv dusíkatých látok

Kvasinky sú chemoheterotrofné organizmy, ktoré potrebujú okrem uhlíka aj dusík a vitamíny na zabezpečenie rastu a rozmnožovania buniek.

Dusík zohráva dôležitú úlohu aj pri rýchlosti produkcie etanolu. Jeho prídavok v množstve vyššom ako je odporúčaná koncentrácia vedie k omnoho vyššej rýchlosti fermentácie a k vyššiemu výťažku biomasy [53]. Zdroj dusíka môže byť anorganický (rôzne amónne soli) alebo organický (voľné aminokyseliny, kvasničný extrakt, zvyšky biomasy kvasiniek alebo mycélia, zvyšky proteínov a ich hydrolyzátov, ako sú albumínový alebo kazeínový hydrolyzát, ďalej kukuričný výluh, peptón alebo sladina). Pozitívny vplyv prídavku dusíkatého zdroja na priebeh etanolovej fermentácie opísali vo svojich prácach viacerí autori [38, 54-57]. Pri vysokokoncentrovaných fermentáciách obsahujú médiá (mladina a iné substráty) nedostatočné množstvo voľného aminodusíka (FAN). V mladinách normálnej hustoty musí byť množstvo FAN 140–150 mg.l⁻¹. V mladinách vyššej hustoty je odporúčaná koncentrácia vyššia [53] a závisí od použitých fermentačných podmienok [58]. Vysokokoncentrované mladiny však obsahujú len 120 mg/l FAN, čo je koncentrácia príliš nízka na dosiahnutie maximálnej rýchlosti využitia sacharidov a produkciu etanolu. Na zvýšenie hladiny asimilovateľného dusíka je vhodné obohatiť substrát o dusíkaté živiny. Môžu sa pridávať vo forme voľných aminokyselín, kvasničného extraktu alebo autolyzátu odpadových pivovarníckych kvasiniek obsahujúceho zmes aminokyselín, proteínov a ich hydrolyzátov, alebo ako anorganický zdroj vo forme močoviny a amónnych solí. Pri VHG fermentáciách by použitie proteináz mohlo eliminovať potrebu prídavku asimilovateľného dusíka [59]. Prídavok dusíka pôsobí stimulačne, ak sa pridá pred fermentáciou, ale tak isto stimulačne pôsobí, aj keď sa pridá po zastavení fermentácie, kedy spôsobí rýchle opätovné začatie fermentácie. Toto naznačuje, že ukončenie fermentácie nie je spôsobené toxicitou etanolu alebo osmotickým tlakom, ale pravdepodobne nedostatkom živín. So správnym prídavkom živín sú pivovarnícke kvasinky schopné produkovať až 16 % obj. etanolu počas doby potrebnej na fermentáciu piva bez zjavnej straty viability [41]. Prídavok kvasničného extraktu, kazeínového hydrolyzátu, alebo jednotlivých aminokyselín (ako napríklad kyselina glutámová [38], arginín, asparagín [60]) stimuluje rast kvasiniek a redukuje čas fermentácie. Fermentáciou 24% mladiny sa utilizovalo približne 16 % extraktu, čo predstavuje teoreticky množstvo etanolu 8,5.10⁻² g.ml⁻¹. Maximálne dosiahnuté množstvo etanolu v mladine s prídavkom kvasničného extraktu bolo 8,4.10⁻² g.ml⁻¹, čo predstavuje až 98–99 % teoretickej hodnoty (bežne je to 93–95 %). V mladine bez prídavku sa dosiahlo maximálne 5,5.10⁻² g.ml⁻¹, čo je iba 64–65 % z teoretickej hodnoty. Nízky výťažok bol pravdepodobne spôsobený nevhodným prostredím VHG mladín [53]. Ešte väčší stimulačný efekt ako kvasničný autolyzát mal na priebeh VHG fermentácie prídavok kvasničného autolyzátu v kombinácii s lipidom. V tomto

prípade sa dosiahlo omnoho rýchlejšie prekvasenie a vyššia výťažnosť biomasy ako pri prídavku samotného lipidu alebo samotného kvasničného autolyzátu [41]. Prídavok 0,8 % kvasničného extraktu, 24 mg.l⁻¹ ergosterolu a 0,24 % obj. Tween 80 k vysokokoncentrovanej mladine spôsobil produkciu viac ako 14 % obj. alkoholu pri 14 °C počas 5 dní. Mladina bez akéhokoľvek prídavku sa fermentovala až 2 týždne.

Ekonomicky najvýhodnejšie by bolo použitie autolyzátu odpadových pivovarníckych kvasníc ako zdroja exogénneho FAN [59]. Použitím autolyzátu pivovarníckych kvasníc sa koncentrácia dusíka zvýšila asi na 700 mg.l⁻¹ (14,4 % z celkového objemu), významne sa zrýchlila utilizácia sacharidov a produkcia etanolu, ale kvasinky si neudržali vysokú viabilitu [58]. Niektoré formy dusíka nie sú kvasinkami využívané pre rast a rozmnožovanie a aj napriek tomu ich prídavok stimuluje VHG fermentáciu. Takto sa správajú napríklad prolín a arginín. Prolín v anaeróbných podmienkach a pri represii nemôže slúžiť ako zdroj dusíka, avšak kvasinky ho potrebujú ako ochrannú látku v bunke pred osmotickým stresom počas fermentácií vysokokoncentrovaných médií [60]. Prídavok arginínu má taktiež dôležitú úlohu v podpore fermentácie s vysokou koncentráciou sacharidov. Pravdepodobne slúži ako prekursor niektorých základných aminokyselín, ktoré kvasinky ľahko využívajú a uhlík z týchto zlúčenín sa v bunke použije proti vysokému koncentračnému gradientu [60]. Nie všetky aminokyseliny majú rovnaký účinok na podporu rastu kvasiniek. Napríklad glycín a lyzín kvasinky ľahko využívajú, ale pôsobia inhibične na rast, rozmnožovanie a fermentáciu. Účinnosť aminokyselín ako zdroja dusíka by sa mohla spájať so schopnosťou kvasinky využívať uhlíkatú kostru danej aminokyseliny [38]. Tento poznatok poukazuje na to, že existujú kvalitatívne rozdiely medzi aminokyselinami s ohľadom na ich schopnosť slúžiť ako zdroj dusíka pre rast kvasiniek [38]. Tí istí autori [56] však neskôr zistili, že zložky komplexného média, ako sú glycín a glycínbetaín, taktiež znižujú účinok osmotického stresu na rast a viabilitu buniek. Z anorganických zdrojov sa sledoval vplyv síranu amónneho na priebeh VHG fermentácií. Jeho prídavok taktiež redukoval rýchlosť fermentácie [60].

Vplyv zložiek fermentačného média

Na pôsobenie kvasiniek počas fermentácie a na ich fyziologický stav vo veľkej miere vplyva aj prítomnosť kyslíka, solí, vitamínov, kovov a rôznych iných látok. Kvasenie mladiny prebieha v anaeróbných podmienkach, takže všetku energiu potrebnú pre rast a syntetické pochody získavajú kvasinky výlučne glykolýzou. Aj napriek tomu je potrebné určité množstvo kyslíka na začiatku fermentácie na zabezpečenie rastu a rozmnožovania buniek

[61]. Tlak O_2 vo fermentačnom médiu sa zvykne udržiavať v rozsahu 6–13 Pa, čo zodpovedá koncentráciám $0,8 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ až $1,6 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹ [62]. So zvyšovaním stupňovitosti mladiny sa množstvo rozpusteného kyslíka v mladinách znižuje. Dostupnosť kyslíka je teda limitujúcim rastovým faktorom vo VHG fermentáciach mladiny. Význam kyslíka pri kvasení piva je spojený predovšetkým so syntézou sterolov a nenasýtených mastných kyselín kvasinkami. Tieto lipidy sú životne dôležité štrukturálne zložky kvasničnej membrány, od ich zloženia a obsahu závisí aktivita pohybu živín a metabolitov z bunky do živného prostredia a naopak. Molekulárny kyslík je nevyhnutný pre premenu biologického prekursora skvalénu na ergosterol, jeden zo základných sterolov v kvasinkách [63]. Prídavok ergosterolu a kyseliny olejovej môže nahradiť nároky rastúcich kvasiniek na kyslík a zvýšiť ich etanoltoleranciu. Prídavok 0,8 % kvasničného extraktu, 24 mg.l⁻¹ ergosterolu a 0,24 % obj. Tween 80 k vysokokonzentrovanej mladine spôsobil produkciu viac ako 14 % obj. alkoholu pri 14 °C počas 5 dní. Mladina bez akéhokoľvek prídavku sa fermentovala až 2 týždne [41, 63]. Kvasinky vo vysokokonzentrovaných mladinách zakvasované väčšou dávkou využívajú kyslík pre syntézu lipidov efektívnejšie a majú lepšiu fermentačnú schopnosť a viabilitu [41]. Na druhej strane zvýšená koncentrácia sterolov a mastných kyselín v prostredí má nepriaznivý dopad na organoleptickú kvalitu hotového piva [29].

Pre činnosť kvasiniek sú dôležité aj niektoré vitamíny, pretože tvoria súčasť niektorých enzýmov, podporujú rast buniek a umožňujú látkovú výmenu. K najdôležitejším patria vitamíny skupiny B, predovšetkým biotín, kyselina pantoténová, provitamín D₂ ergosterol, mezo-inozitol, kyselina nikotínová. Tieto vitamíny bývajú väčšinou vo VHG mladinách zastúpené nedostatočne, a tak prispievajú k neukončeniu fermentácie. Počas ich rapidného nedostatku sa rast buniek zastaví, avšak bunky zostávajú rastovo potenciálne (v zmysle špecifickej rastovej rýchlosti a faktoru rozmnožovania) a po ich opätovnom pridaní fermentácia mladiny pokračuje [64].

Nepriaznivý vplyv na správanie kvasiniek, pravdepodobne spôsobený vysokou koncentráciou etanolu, zvýšeným osmotickým tlakom a nedostatkom živín pri kvasení VHG mladín môže byť znížený prídavkom takých zložiek, ako sú katióny horčíka a vápnika. Obidva kovy sú normálne prítomné v mladine vo forme solí, a zohrávajú dôležitú úlohu pri raste kvasiniek a pri fermentácii. Sú nevyhnutné pri regulácii pH mladiny, flokulácii kvasiniek, stimulácii bunkového delenia a aktivite enzýmov glykolytickej dráhy [65]. Ich prídavok v optimálnej koncentrácii je veľmi dôležitý na udržanie viability a zlepšenie fermentačnej aktivity kvasiniek [66, 67], pretože vysoká koncentrácia solí v substráte je škodlivá pre rast buniek a produkciu etanolu [67, 68]. Prítomnosť optimálnej koncentrácie vápnika znižuje inhibičný

vplyv etanolu na rast a fermentáciu buniek. Vápnik udržiava permeabilitu membrány ochraňujúc náboj fosfolipidov membrány a reguláciu interakcií lipid - proteín, a tým znižuje rozsah etanolom stimulovaného uvoľnenia vnútro-bunkových zložiek [68. 69]. Veľmi účinná zložka spôsobujúca zvýšenie fermentačnej aktivity kvasiniek je horčík, pretože je potrebným kofaktorom nukleotidov enzýmov glykolytickej dráhy (hexokinázy, fosfofruktokinázy, fosfoglycerátkinázy, enolázy a pyruvátkinázy) a syntézy mastných kyselín. Chráni bunku pred stresom vyvolaným etanolom, teplotou alebo osmotickým tlakom [30, 67–70]. Prídavok Mg^{2+} a Ca^{2+} solí v optimálnej koncentrácii k VHG mladinám prispel k zlepšeniu fermentačných parametrov kvasiniek [71], predovšetkým k zníženiu percenta nesfermentovaných sacharidov.

Z iných faktorov, ktoré ovplyvňujú rast buniek a rýchlosť produkcie etanolu môžeme spomenúť jednosmerný a striedavý elektrický prúd [72], ktorý sa prejaví aj na produkcii vyšších alkoholov, esterov a organických kyselín.

Záver

Cieľom kvasenia piva je riadená premena sacharidov na alkohol a CO_2 a súčasne vytváranie vhodných organoleptických vlastností piva. Pri procese kvasenia sa vytvára chuťový charakter piva, ktorý je ovplyvňovaný nielen hlavnými produktami kvasenia, ale aj obsahom vyšších alkoholov, esterov, ketónov, aldehydov, zlúčenín síry atď. Priebeh fermentácie závisí od zloženia mladiny, druhu použitého kvasničného kmeňa, určenia ich počiatkovej koncentrácie, posúdenia ich fyziologického stavu, teploty kvasenia, tlaku, objemu a tvaru nádob. Sú to len náhodne vymenované a ani nie zďaleka všetky podmienky, ktoré vplývajú na charakteristiku chuti a vône hotového piva.

Výber vhodného kvasničného kmeňa a jeho aktivita veľmi závisia od podmienok prostredia, v ktorých prebieha fermentácia. Aktívne bunky môžu rýchle prekvasovať substrát, asimilovať aminokyseliny, adsorbovať horké látky a ovplyvňovať spektrum tvorby prchavých látok v pive. Od schopnosti kvasiniek, rýchlosti odpovede a prispôsobenia sa na niekoľko stresov súčasne závisí úspešná HG alebo VHG fermentácia. Prvoradou úlohou je, aby si kvasinky zachovali svoju vitalitu, definovanú ako schopnosť kvasiniek zniesť rôzne stresy a uskutočniť fermentáciu. Kvasinky musia byť schopné vydržať tento stres bez negatívneho vplyvu na organoleptické vlastnosti hotového produktu - piva.

Literatúra

1. BENDO VÁ, O. - KAHLER, M.: Pivovarské kvasinky. Praha : SNTL, 1981. 272 s.
2. KOSAŘ, K. - PROCHÁDZKA, S.: Technologie výroby sladu - piva. Praha : SPSPT, 2000. 399 s.
3. FERENČÍK, M. - ŠKÁRKA, B. - NOVÁK, M. - TURECKÝ, L.: Biochémia. Bratislava : Slovak Academic Press, 2000. 924 s.
4. SLAUGHTER, J. C. - NOMURA, T.: Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 1992, s. 64-67.
5. ŠA VEL, J.: Stresové faktory kvasníc. *Kvasný průmysl*, 44, 1998, s. 5-7.
6. THOMAS, K. C. - HYNES, S. H. - INGLEDEW, W. M.: Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry*, 4, 1996, s. 321-333.
7. ŠA VEL, J.: Použití HGB k úpravám koncentrace piva. *Kvasný průmysl*, 38, 1992, s. 329-331.
8. MOŠTEK, J. - DYR, J. - RADA, E.: Některé poznatky z problematiky zahušťování a rekonstituce mladin. *Kvasný průmysl*, 14, 1968, s. 217-220.
9. JONES, A. M. - INGLEDEW, W. M.: Fuel alcohol production: optimisation of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1994, s. 1048-1051.
10. BASAŘOVÁ, G.: Vývoj teorie kvašení a dokvašování piva. *Kvasný průmysl*, 48, 2002, s. 61-65.
11. SATO, M. - WATARI, J. - SHINOTSUKA, K.: Genetic instability in flocculation of bottom - fermenting yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59, 2001, s. 130-134.
12. NISHIHARA, H. - MIYKAE, K. - KAGEYAMA, Y.: Distinctly different characteristics of flocculation in yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 108, 2002, s. 187-192.
13. WACKERBAUER, K. - BECKMANN, M.: Die Konservierung von Brauereihefen. Teil 2: Der Einfluss der Konservierung auf Hefevitalität und Bierqualität. *Brauwelt*, 142, 2002, s. 1099-1100, 1102, 1104-1107.
14. STEENBERG, J. - GUBIŠ, J. - MELICHAROVÁ, E. - ŠIMEK, V.: Dynamický sběr kvasnic z CKT a jejich asimilace před zakvašováním - kvasničné hospodárství Gambrinus. *Kvasný průmysl*, 49, 2003, s. 30-34.
15. PRATT - MARSHALL, P.: High gravity brewing - an inducer of yeast stress. *Brewers Guardian*, 31/131, 2002, s. 22-25.
16. GRIFFIN, S. R.: Fast and slow fermentation of brewer's wort by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 76, 1970, s. 41-45.
17. MASKELL, D. L.: Impact of carbohydrate composition of media on lager yeast replicative lifespan. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59, 2001, s. 111-116.
18. WILLE, M. - PETERSEN, F. - DUFALT, A.: Influence of the carbohydrate composition of various glucose syrups on the fermentation of worts. *Cerevisiae*, 27, 2002, s. 94-98.
19. LHOTSKÝ, A.: Pivovarská enzymologie. Praha : SNTL, Bratislava : ALFA, 1971. 336 s.
20. BOUX, M. - LEVEAU, J.-Y.: Rapid assessment of yeast viability and vitality during alcoholic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107, 2001, s. 217-225.
21. LAUNDAUD, S. - LATRILLE, E. - CORRIEU, G.: Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107, 2001, s. 107-117.
22. KOROVINA, J. U. - JERMOLAJEVA, G. A. - ČERNOBROVKIN, M. G.: Vlijanije davlenija na obrazovanie v pive aromaticeskich komponentov. *Pivo i napitki*, 4, 2000, s. 18-19.
23. BAMFORTH, CH. W.: pH in brewing: an overview. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americans*, 38, 2000, s. 1-9.

24. MANGER, H.-J.: Die Messung des pH - Wertes - ein Überblick. (Teil 1) und (Teil 2). Brauerei Forum, 17, 2002, s. 79-81, s. 108-110.
25. VANDENBUSSCHE, J. - MOJDL, L.: Kontrola oxidace v moderním pivovaru (II. část). Kvasný průmysl, 47, 2001, s. 128-131.
26. ANNEMÜLLER, G. - MANGER, J. H.: Aeration in fresh yeast propagation - too much of a good thing. Brauwelt International, 19, 2001, s. 106-110.
27. O'ROURKE, T.: Colloidal stabilisation of beer. Brewer International, 2, 2002, s. 23-25.
28. URBAN, A.: Frische von Bier - Verbesserung der Geschmacksstabilität. Mitteilungen Österreichisches Getränke Institut, 56, 2002, s. 48-51.
29. MAJARA, M. - O'CONNOR-COX, E. S. C. - AXCELL, B. C.: Trehalose - an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54, 1996, s. 149-154.
30. MAJARA, M. - O'CONNOR-COX, E. S. C. - AXCELL, B. C.: Trehalose - a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54, 1996, s. 221-227.
31. D'AMORE, T. - PANCHAL, C. J. - STEWART, G. G.: The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. Journal of the Institute of Brewing, 93, 1987, s. 472-476.
32. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Bratislava : Alfa, 1990. 320 s.
33. FERNET, M. D. - MELVIN, B. - GUSTIN, M. C. - SHANKS, J.: ¹³C-NMR studies of glucose metabolism in osmolarity mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 16, 1994, s. 207-215.
34. MARTÍNEZ DE MARANON, L. - GERVAIS, P. - MOLIN, P.: Determination of cell's water membrane permeability: unexpected high osmotic permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Bioengineering, 56, 1997, s. 62-70.
35. GERVAIS, P. - MARECHAL, P. S. - MOLIN, P.: Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1992, s. 1435-1439.
36. D'AMORE, T. - STEWART, G. G.: Ethanol tolerance of yeast. Enzyme and Microbial Technology, 9, 1987, s. 322-330.
37. NAGODAWITHANA, T. W.: Yeast: their role in modified cereal fermentations. Advances in Cereal Science and Technology, 6, 1986, s. 103-104.
38. THOMAS, K. C. - INGLEDEW, W. M.: Fuel alcohol production: Effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. Applied and Environmental Microbiology, 56, 1990, s. 2046-2050.
39. LEGMANN, R. - MARGALITH, P. L.: Ethanol formation by hybrid yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, 23, 1986, s. 198-202.
40. CASEY, G. - INGLEDEW, W. M.: Ethanol tolerance in yeast. Critical Reviews in Microbiology, 13, 1986, s. 219-280.
41. CASEY, G. - MAGNUS, C. A - INGLEDEW, W. M.: High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. Biotechnology Letters, 5, 1983, s. 429-434.
42. D'AMORE, T. - PANCHAL, CH. J. - RUSSEL, I. - STEWART, G. G.: A study of ethanol tolerance in yeast. Critical Reviews in Biotechnology, 9, 1990, s. 287-304.
43. ROSA, M. F. - SÁ-CORREIA, I.: In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1990, s. 830-835.
44. ŠAJBIDOR, J. - GREGO, J.: Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. FEMS Microbiology Letters, 93, 1992, s. 13-16.

45. LLOYD, D. - MORRELL, S. - CARLSEN, H. N. - DEGN, H. - JAMES, P. E. - ROWLANDS, C. C.: Effect of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, 1993, s. 825-833.
46. ALEXANDRE, H. - BERLOT, J. P. - CHARPENTIER, C.: Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnology Techniques*, 8, 1994, s. 295-300.
47. SWAN, T. - WATSON, K.: Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 1997, s. 70-77.
48. KALMOKOFF, M. L. - INGLEDEW, W. M.: Evaluation of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43, 1985, s. 189-196.
49. ANTOCE, O. A. - ANTOCE, B. - TAKAHASHI, K. - POMOHACI, N. - NAMOLOSANU, I.: A calorimetric method applied to the study of yeast growth-inhibition by alcohols and organic acids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 1997, s. 413-422.
50. CIESAROVÁ, Z. - ŠMOGROVIČOVÁ, D.: Štúdium etanoltolerance kvasiniek. *Chemické listy*, 90, 1996, s. 365-370.
51. SALGUEIRO, S. P. - SÁ-CORREIA, I. - NOVAIS, J. M.: Ethanol induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1988, s. 903-909.
52. BAFRNCOVÁ, P. - ŠMOGROVIČOVÁ, D. - PÁTKOVÁ, J.: Suroviny na fermentačnú výrobu etanolu. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 39, 2000, s. 1-10.
53. BAFRNCOVÁ, P. - ŠMOGROVIČOVÁ, D.: Inovačné trendy pri výrobe etanolu. *Chemické listy*, 93, 1999, s. 512-517.
54. SHIN, C. S. - SONG, J. Y. - RYU, H. O. - WANG, S. S.: Enhancing effect of albumin hydrolysate on ethanol production employing *Saccharomyces sake*. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 1998, s. 450-453.
55. JONES, A. M. - INGLEDEW, W. M.: Fuel alcohol production: Assessment of selected commercial proteases for very high gravity wheat mash fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 1994, s. 683-687.
56. THOMAS, K. C. - HYNES, S. H. - INGLEDEW, W. M.: Effects of particulate materials and osmoprotectants on very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1994, s. 1519-1524.
57. WANG, S. - THOMAS, K. C. - INGLEDEW, W. M. - SOSULSKI, K. - SOSULSKI, F. W.: Production of fuel ethanol from rye and triticale by very-high-gravity (VHG) fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69, 1998, s. 157-175.
58. JONES, A. M. - INGLEDEW, W. M.: Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochemistry*, 29, 1994, s. 483-488.
59. JONES, A. M. - INGLEDEW, W. M.: Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolysate. *Bioresource Technology*, 50, 1994, s. 97-101.
60. THOMAS, K. C. - HYNES, S. H. - INGLEDEW, W. M.: Excretion of proline by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of arginine-supplemented high gravity mash. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 1993, s. 93-98.
61. GUÉNETTE, M. E. - DUVNJAK, Z.: Effect of oleic acid on the production of ethanol and fructose from glucose/fructose mixtures in an immobilized cell reactor. *Acta Biotechnologica*, 15, 1995, s. 381-386.

62. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Yeast and yeast-like microorganism. 1. vyd. New York : VHC Publishers, 1990. 530 s.
63. GINOVA-STOJANOVA, T. - JANEVA V.: Syntéza ergosterolu a aktivita pivovarských kvasinek. Kvasný průmysl, 31, 1985, s. 201-204.
64. WINTER, J. F. - LORET, M. O. - URIBELARREA, J. L.: Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Current Microbiology, 18, 1989, s. 247-252.
65. WACKERBAUER, K. - FITZNER, M.: Stress factors of yeast, improvement of viability and fermentation capacity of brewers yeast. Monatsschrift für Brauwissenschaft, 31, 1997, s. 92.
66. AKRIDA-DEMERTZI, K. - KOUTINAS, A. A.: Optimisation of sucrose ethanol fermentation for K, Na, Ca and Cu metal contents. Applied Biochemistry and Biotechnology, 30, 1981, s. 1-7.
67. CIESAROVÁ, Z. - ŠMOGROVIČOVÁ, D. - DÖMÉNY, Z.: Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. Folia Microbiology, 41, 1996, s. 485-488.
68. NABAIS, R. C. - SÁ-CORREIA, L. - VIEGAS, C. A. - NOVAIS, J. M.: Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. Applied and Environmental Microbiology, 54, 1988, s. 2439-2446.
69. WALKER, G. G.: Magnesium as a stress protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 56, 1998, s. 109-113.
70. WALKER, G. M.: The role of magnesium in biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology, 14, 1994, s. 311-354.
71. REES, E. M. R. - STEWART, G. G.: The effects of some divalent ions on yeast fermentation performance in high gravity worts. Monatsschrift für Brauwissenschaft, 31, 1997, s. 93.
72. NAKANISHI, K. - TOKUDA, H. - SOGA, T. - YOSHINAGA, T. - TAKEDA, M.: Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells. Journal of Fermentation and Bioengineering, 85, 1998, s. 250-253.

Do redakcie došlo 17.10.2003.

Influence of technological factors on fermentative activity of brewery yeasts

ŠEPELOVÁ, G. - CVENGROŠCHOVÁ, M. - ŠMOGROVIČOVÁ, D.:
Bull. potrav. Výsk., 42, 2003, p. 183-204.

SUMMARY. Yeasts play a very important role in the process of beer production. Used yeast strain as well as the yeast dosage for fermentation have an influence not only on the correct fermentation, but also on qualitative and organoleptic properties of the finished product. During the course of fermentation, it is necessary to pay sufficient attention to external factors such as temperature, pressure, pH, oxygen, rH and concentration of fermentable saccharides. High gravity fermentation requires to preserve yeast vitality without a negative influence on organoleptic properties of beer. The article reviews external factors having an influence on the fermentation as well as factors having an influence on high gravity fermentation: osmotic pressure, ethanol, nitrogenous substances and fermentable medium components.

KEYWORDS: yeast; fermentation; ethanol; tolerance