

Dr inż. Marek ZDANIEWICZ¹
Dr inż. Karolina KUREK²
Mgr inż. Justyna KARACZKOWSKA¹
Mgr inż. Aneta PATER¹
Dr hab. inż. Aleksander POREDA¹

¹Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej

²Katedra Inżynierii Sanitarnej i Gospodarki Wodnej

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

WPŁYW INTENSYWNOŚCI MIESZANIA BRZECZKI SŁODOWEJ NA PRZEBIEG PROCESU FERMENTACJI ORAZ PARAMETRY BRZECZKI I PIWA®

The influence of mixing intensity of brewing wort on fermentation
performance and parameters of wort and beer®

Słowa kluczowe: piwo, mieszanie, brzeczka, fermentacja.

Zastosowanie wymuszonego mieszania podczas fermentacji brzeczki słodowej jest jednym z potencjalnych sposobów skrócenia czasu produkcji piwa. W pracy zaprezentowanej w artykule porównano wpływ intensywności mieszania brzeczki podczas jej fermentacji, wyrażony częstotliwością obrotów mieszadła, na przebieg procesu i wyróżniki jakościowe brzeczki i młodego piwa. Na podstawie analizy uzyskanych wyników wykazano, że mieszanie brzeczki mieszadłem o prędkości obrotowej 1000 rpm skraca czas fermentacji o ok. 72 godziny w stosunku do próby kontrolnej (bez mieszania), natomiast mieszanie o prędkości 50 rpm skraca czas o ok. 48 godzin. Wykazano również, że stosowanie mieszania nie wpływa na końcowe stężenia takich wyróżników piwa jak: alkohol etylowy i ekstrakt. W brzeczce poddanej mieszaniu z prędkością 1000 rpm stwierdzono zwiększenie liczebności komórek drożdży w czasie fermentacji, skrócenie czasu fazy logarytmicznego wzrostu komórek drożdży oraz wystąpienie nadmiernego zmętnienia piwa młodego. Natomiast w brzeczce poddanej mieszaniu z prędkością 50 rpm wykazano ponad 3-krotnie mniejsze stężenie trehalozy, będącej wskaźnikiem warunków stresowych komórki, w odniesieniu do próby mieszanej 1000 rpm oraz kontrolnej.

Key words: beer, mixing, wort, fermentation.

The use of mechanical mixing during brewing fermentation is one of the potential ways to reduce time of beer production. The paper presents a comparison of the effect of two mixing speeds (50 and 1000 rpm) on the fermentation performance and quality of wort and green beer. Based on the obtained results it was shown that agitation with a stirrer at a rotational speed of 1000 rpm shortens the fermentation time by approximately 72 hours compared to the control (without stirring), while mixing at 50 rpm reduces the time by about 48 hours. It has also been shown that the use of mechanical mixing does not affect the final concentrations of ethanol and extract. In the 1000 rpm mixed trial we observed: the increase in yeast cell count during fermentation, the shortening of the lag phase of the cell growth, and the occurrence of excessive haze in green beer. No excessive haze was observed in the sample 50 rpm, and more than 3-fold lower concentration of trehalose was shown (trehalose is an indicator of stress conditions) compared to 1000 rpm and reference trial.

WSTĘP

Duża sezonowość produkcji piwowarskiej oraz różnorodność asortymentu często wymuszają na właścicielach browarów konieczność rozbudowy istniejących zakładów. W przypadku braku takiej możliwości (względy finansowe, powierzchniowe itp.) korzystnym rozwiązaniem wydaje się być zwiększenie mocy produkcyjnej na drodze intensyfikacji poszczególnych procesów. Intensyfikacja fermentacji brzeczki jest kluczowym działaniem podnoszącym/większającym wydajność browarów. Skrócenie tego etapu,

pozwała na zwiększenie całkowitej mocy produkcyjnej, bez konieczności rozbudowy istniejącego zakładu.

Pierwotnie tradycyjną fermentację przeprowadzano bez stosowania mieszania mechanicznego. Sądzone, że odpowiednia cyrkulacja fermentującego medium zapewniona była przez CO₂ wydzielane przez drożdże [5]. Istniało przekonanie, iż naturalne mieszanie jest wystarczające do wydanego przebiegu procesu. Obawiano się jednocześnie, że wprowadzenie mieszania mechanicznego może powodować uszkodzenia komórek drożdży. Najnowsze doniesienia

naukowe pozwalają jednak odrzucić przytoczone tezy. Między innymi badania Nienowa i in. [14] wskazują, że zastosowanie mieszania podczas propagacji drożdży (warunki aerobowe) nie wpłynęło negatywnie na jakość biomasy. W przypadku implementacji systemów mieszania w warunkach anaerobowych (fermentacja brzezki), istnieje potencjalna możliwość skrócenia czasu fermentacji o ok. 25%, bez istotnego wpływu na skład chemiczny piwa [5, 7].

Charakterystyka oznaczanych wyróżników

W technologii produkcji piwa określane są pewne parametry świadczące o poprawnie przebiegającym procesie, kinetyce procesu oraz wpływające na końcową jakość piwa. Należą do nich m.in.:

Ekstrakt pozorny

W gotowym piwie występuje tylko ta część ekstraktu, która nie została wykorzystana przez drożdże podczas fermentacji. Należy jednak mieć na uwadze, że w fermentującej brzezce oraz piwie występują także związki, o ciężarze właściwym niższym od jedności, które znacząco zaniżają wartość areometrycznego pomiaru ekstraktu [2]. Pomimo tej niedogodności ekstrakt pozorny jest parametrem najczęściej oznaczanym podczas fermentacji piwowskiej. Dzięki stosunkowo szybkiemu i prostemu pomiarowi możliwe jest porównanie szybkości fermentacji, wskazanie czasu rozpoczęcia oraz zakończenia procesu, jak również wystąpienia pewnych nieprawidłowości, np. nagłego zatrzymania fermentacji (*ang. stuck fermentation*).

Etanol

Etanol jest najważniejszym ilościowo alkoholem występującym w piwie. Odpowiednie szczepy drożdży piwowskich wytwarzają przeciętnie od 3-6% obj. alkoholu. W zależności od rodzaju piwa zawartość ta może jednak ulegać zmianom. Ilość alkoholu etylowego w piwie zależy od użytego szczepu drożdży, oraz od warunków wpływających na wzrost i prawidłowe funkcjonowanie komórek [10].

Wartość pH

Wartość pH piwa ma istotny wpływ na ostateczną jakość produktu. Zaletą piw o bardziej kwaśnym odczynie jest niska podatność na infekcje bakteryjne. Zbyt niska wartość pH, poniżej 4,1 może jednak przyczynić się do powstawania kwaśnego smaku piwa. Obniżanie wartości pH, w kolejnych dniach fermentacji, jest wynikiem procesów zachodzących głównie za pośrednictwem drożdży [13]. Do wspomnianych przemian można zaliczyć: reakcje deaminacji - prowadzące do powstania kwasów, zużywanie rozpuszczonych w brzezce nastawnej fosforanów, a także pobieranie jonów amonowych i wodorowych a następnie uwalnianie ich do piwa [12].

Zmętnienie

W piwie można wyróżnić dwa rodzaje zmętnień: biologiczne i niebiologiczne [10]. Zmętnienia biologiczne powstają na skutek skażenia młodego piwa bakteriami lub drożdżami dzikimi. Piwo takie staje się kwaśne i jest zazwyczaj nieakceptowane z punktu widzenia konsumenta, natomiast zmętnienia niebiologiczne najczęściej są wynikiem interakcji zachodzących między białkami i polifenolami [8, 3, 21, 22].

Liczebność komórek drożdży

Proces mieszania, podczas hodowli drożdży zwiększa aktywność ich metabolizmu. Z badań przeprowadzonych przez Boswella i in. [5] wynika, że istotnym parametrem mieszania jest dobór jego intensywności. Udowodniono, że moc mieszania (liczona na jednostkę objętości) w zakresie ok. 4016 W/m³ nie wpływa stresująco na drożdże, sprzyja natomiast procesowi namnażania komórek, a także skraca czas fermentacji o ok. 25% [5]. Odpowiednio dobrane mieszanie zapewnia komórkom drożdży stały dostęp do substratów oraz utrzymuje je w zawieszeniu w całej objętości mieszaniny [15, 17].

Żywotność komórek drożdży

Według Boswella i in., [5] żywotność komórek zależy od szybkości zastosowanego mieszania. Z przeprowadzonych badań wynikało, iż po zakończeniu procesu fermentacji ilość martwych komórek wynosiła ok. 6%, natomiast w wyniku zwiększenia intensywności mieszania w tym samym czasie ilość martwych komórek wzrastała do 17%. Prawdopodobnie większa liczba martwych komórek drożdży była wynikiem hamującego działania etanolu i szybszego wyczerpywania substratów, dlatego bardzo ważny jest dobór odpowiedniej prędkości mieszania.

Zawartość trehalozy w drożdżach

Trehaloza, jako dwucukier zapasowy akumulowana jest przez drożdże w wyniku ich niewłaściwego, powolnego wzrostu [24] oraz działania warunków stresowych [23]. Dwucukier ten chroni komórki drożdży przed stresem, który może być spowodowany szokiem cieplnym, osmotycznym, toksycznym działaniem etanolu czy też ograniczoną dostępnością wody. W warunkach stresowych koncentracja trehalozy w komórkach drożdży może wzrosnąć nawet do 35% s.m. [25]. Na zdolność do akumulacji trehalozy poza warunkami hodowli mają także wpływ: szczep, gatunek, stadium wzrostu drożdży [20] oraz stężenia jonów metali [19]. Przeprowadzone badania wskazują na istnienie wielu różnic w syntetyzowaniu trehalozy przez ten sam szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od warunków hodowli.

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań dotyczących określenia wpływu mechanicznego mieszania brzezki słodowej podczas jej fermentacji na przebieg procesu, wybrane wyróżniki jakościowe brzezki i piwa oraz biomase drożdżową.

MATERIAŁ I METODY

Material biologiczny stanowiły drożdże suszone (liofilizowane) dolnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae*, szczep W-34/70. Przed inokulacją biomasy przeprowadzono jej rehydratację w wodzie o temp. 20°C zgodnie z zaleceniem producenta drożdży.

Brzezke słodową wytworzono zgodnie z analityką EBC [1] (*ang. congress wort*). Do jej przygotowania użyto zmielony sód (młynek laboratoryjny WZ-1). Do 50 g sόδu dodano 200 cm³ wody destylowanej o temperaturze 45°C. Proces zacierania przeprowadzono w aparacie zacierającym metodą kongresową. Po zakończeniu procesu kubki z zacierem schłodzono do temperatury 20°C, dopełniono wodą destylowaną

do masy 450 g i przesączono. Otrzymany przesącz poddano sterylizacji (121°C, 15-20 min.) w celu wytrącenia osadów, które następnie oddzielono na filtrze. Brzeczki standaryzowano, przy użyciu sterylnej wody destylowanej, do uzyskania stężenia 10°B_{lg}.

Inokulacja brzeczki słodowej

Do 230 cm³ brzeczki dodawano 5 cm³ gęstwy drożdżowej w celu uzyskania początkowego stężenia biomasy 1 g na 1 dm³.

Fermentacja brzeczki

Przeprowadzono szereg doświadczeń, podczas których fermentowano brzeczkę piwną z zastosowaniem mieszania mechanicznego. Próbę referencyjną stanowiła brzeczka fermentowana bez mieszania. Do mieszania brzeczki w czasie fermentacji używano mieszadeł magnetycznych firmy Electromagnetic Stirrer ES24 o wymiarach 80/40 mm (dł/śr). Mieszadła umieszczano w kolbach stożkowych o objętości 500 cm³ wypełnionych 235 cm³ medium fermentacyjnym i wprawiano w ruch z prędkością obrotową 50 rpm i 1000 rpm (zapewniając mieszanie całej zawartości kolby). Fermentację prowadzono w szafie termostatycznej Q-Cell 240 w temperaturze 14°C w warunkach beztlenowych (korki z rurkami fermentacyjnymi wypełnionymi gliceryną). Dla każdego wariantu wykonano trzy powtórzenia. Proces uznawano za zakończony w momencie uzyskania dobowych ubytków masy poniżej 0,20 g/dm³ fermentującej brzeczki oraz braku istotnych zmian ekstraktu pozornego.

Metody analityczne

Analizę ekstraktu pozornego przeprowadzono metodą areometryczną. Oznaczenie zawartości etanolu wykonano zgodnie z Polską Normą [18]. Do pomiaru zmętnienia odwirowanych piw (wirówka laboratoryjna: MPW-350R; 4000 rpm/10 min. oraz 5000 rpm/10 i 15 min.) wykorzystano urządzenie Eutech Instruments Turbidimeter TN-100. Pomiar liczebności komórek drożdży przeprowadzono z zastosowaniem komory Thoma natomiast do określenia żywotności komórek wykorzystano metodę mikroskopową z błękitem metylenowym przy powiększeniu 400 razy – mikroskop Nikon E100. Zawartość trehalozy oznaczano metodą antronową,

która polegała na odwodnieniu glukozy i przeprowadzeniu jej w barwny związek (5-hydroksyfurfural) przez ogrzewanie ze stężonym kwasem siarkowym. Oznaczenie cukru przeprowadzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 620$ nm.

W tabeli 1 przedstawiono oznaczane parametry z podziałem na wyróżniki fizyko-chemiczne oraz mikrobiologiczne. Na rysunkach (rys. od 1 do 10) zobrazowane zostały uzyskane wartości, umożliwiające porównanie najważniejszych etapów procesu (fermentacja: od 0 do 6 doby oraz wyróżniki jakościowe w 0;3;6 dobie procesu).

Analiza statystyczna

Określono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, a istotność wpływu czynników zmiennych na oznaczane parametry stwierdzono na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Analiza szybkości fermentacji

Istotną cechą, oczekiwaną od drożdży piwowskich, jest ich zdolność do szybkiego przekształcenia składników ekstraktu w etanol i dwutlenek węgla. Jednym ze sposobów przedstawienia przebiegu fermentacji jest porównanie dobowych ubytków masy medium fermentacyjnego (od momentu inokulacji brzeczek do uzyskania dobowego ubytku poniżej 0,2 g/dm³). Na rysunku 1 przedstawiono przebieg fermentacji z zastosowaniem dwóch intensywności mieszania (50 i 1000 rpm) w odniesieniu do próby kontrolnej (bez mieszania). Zaobserwowano, że już w pierwszej dobie fermentacja z wymuszonym mieszaniem brzeczki przebiegała szybciej niż w próbie kontrolnej. Największe wartości konwersji składników brzeczki odnotowano w drugiej dobie w próbach, które poddawano mieszaniu (ok. 2% całkowitej masy medium fermentacyjnego/dobę – rys.1). W próbie kontrolnej zmiany te zachodziły znacznie wolniej, w sposób liniowy. Zaistniałą sytuację można dokładniej przedstawić podając intensywność procesu, jako ubytek masy medium fermentacyjnego w przeliczeniu na ilość g/dm³ fermentującej brzeczki (rys.2). W drugiej dobie w próbie o intensywności mieszania

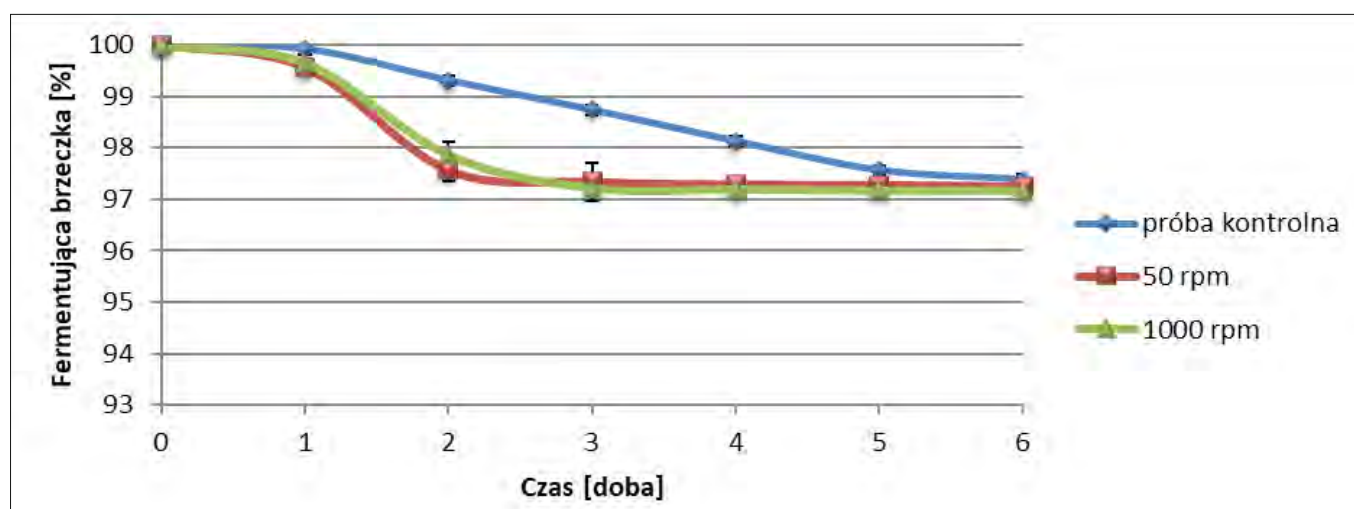
Tabela 1. Przeprowadzone analizy ze wskazaniem etapu procesu

Table 1. Performed analyses with indication of process stag

Wyróżniki	Oznaczany parametr	Etap pomiaru (doba fermentacji)		
		0 rpm 9 doba = młode piwo	50 rpm 7 doba = młode piwo	1000 rpm 6 doba = młode piwo
Fizyko-chemiczne	Ubytek masy brzeczek	0-9	0-7	0-6
	Ekstrakt pozorny	0; 3; 6; 9	0; 3; 6; 7	0; 3; 6
	Etanol	6; 9	6; 7	6
	pH	0; 3; 6	0; 3; 6	0; 3; 6
	Zmętnienie	6	7	9
Mikrobiologiczne	Liczebność komórek	0-6		
	Żywotność komórek	0-6		
	Trehaloza	0; 3; 6		

50 rpm odnotowano ubytek masy medium fermentacyjnego rzędu 21,67 g/dm³/dobę natomiast w próbie, która mieszana była z prędkością obrotową mieszadła 1000 rpm odnotowano ubytek wielkości 18,61 g/dm³/dobę. W kolejnych dobach mierzone ubytki masy były mniejsze, co może sugerować duży stopień wykorzystania łatwo dostępnych substratów zawartych w brzeczkach mieszanych. Interesującym jest, że w próbie kontrolnej, od drugiej do piątej doby, proces przebiegał ze stałą szybkością, ok. 6 g/dm³/dobę. Próby, w których zastosowano mieszanie, najszybciej fermentowały w pierwszych trzech dobach. Prawdopodobnie związane to było z ujednoczeniem układu na skutek mieszania (wyeliminowaniem heterogeniczności) już od samego początku procesu fermentacji. Wielokrotnie zwiększona prędkość obrotowa mieszadeł z 50 rpm do 1000 rpm dopiero w trzeciej dobie procesu korzystnie wpłynęła na szybkość fermentacji, w porównaniu do mieszania z prędkością obrotową 50 rpm. Po-

czątkowo w tej próbie proces przebiegał szybciej. Mając jednak na uwadze całościowy czas trwania fermentacji (do momentu uzyskania ubytków dobowych poniżej 0,2 g/dm³) zauważono, że mieszanie brzeczek podczas fermentacji z prędkością 50 rpm umożliwiło skrócenie tego procesu z 9 do 7 dób, natomiast w przypadku próby mieszanej z prędkością 1000 rpm proces uległ skróceniu z 9 do 6 dób (rys. 3). Przedstawione wyniki są zgodne z wynikami Boswella i współautorów [5], którzy również uzyskali redukcję czasu na poziomie ok. 70 godzin. Podobne wyniki dla badań przemysłowych (dla technologii wielkoziarnikowej) otrzymał Boulton i in. [6], którzy czas fermentacji zredukowali o ok. 30 godzin. Autorzy zajmujący się tym zagadnieniem [5, 7] podają, że jednym z powodów skrócenia czasu fermentacji z jednoczesnym mieszaniem, jest przeciwdziałanie przedwczesnej sedymentacji drożdży.

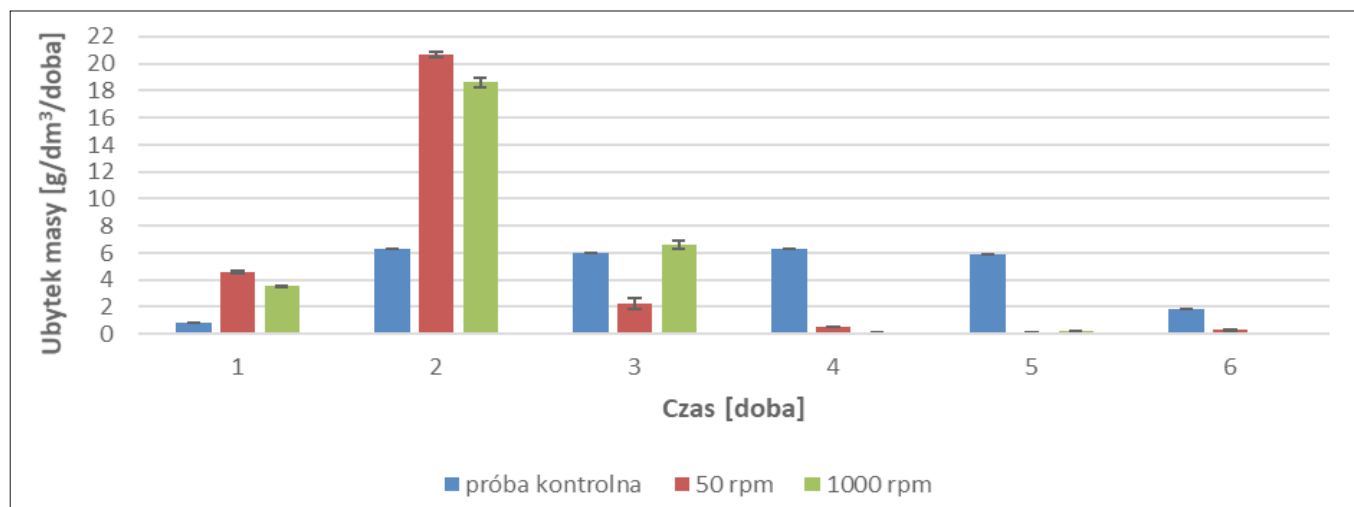


Rys. 1. Procentowa zmiana masy brzeczek w kolejnych dobach fermentacji (p<0,05).

Fig. 1. The weight change (%) during the fermentation trials (p<0,05, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 2. Dobowy ubytek masy medium fermentacyjnego w kolejnych dobach fermentacji (p<0,05).

Fig. 2. The daily weight loss (g/dm³) during the fermentation trials (p<0,05, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 3. Czas trwania procesu fermentacji brzezki słodowej ($p < 0,05$, grupy homogenne oznaczono tymi samymi literami).

Fig. 3. The wort fermentation time ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study

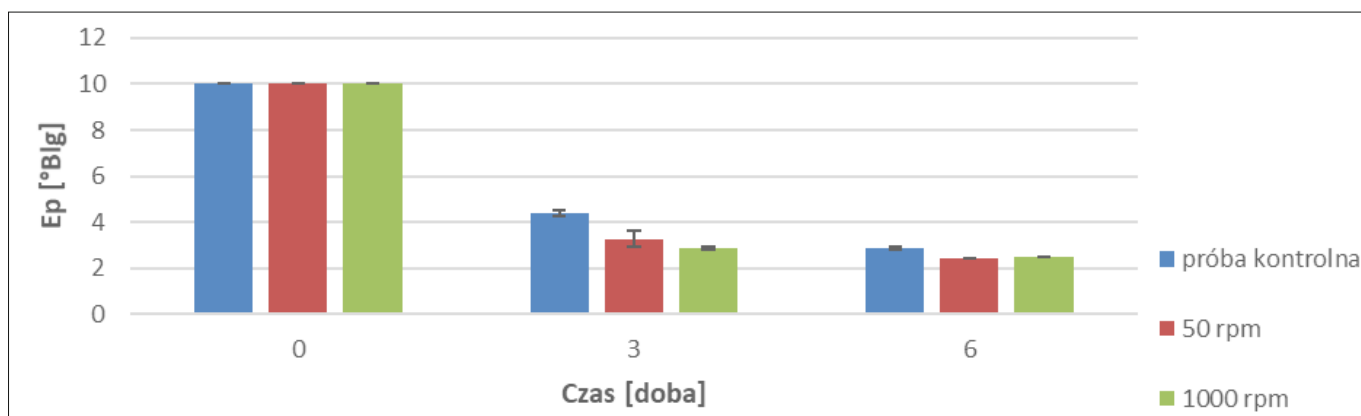
Analiza zawartości ekstraktu pozornego

Na rysunku 4 przedstawiono uzyskane wartości ekstraktu w wybranych dobach procesu (0; 3; 6) (dla przyjętych w programie badań warunków fermentacji brzezki). Zauważono, że mieszanie mechaniczne w trakcie fermentacji przyczyniło się do znacznego obniżenia wartości ekstraktu pozornego, w porównaniu do próby kontrolnej. Trzeciego dnia fermentacji przy szybkości mieszania 50 rpm wartość ekstraktu kształtowała się na poziomie $3,25^{\circ}\text{B}lg$, natomiast przy mieszaniu z prędkością 1000 rpm – $2,85^{\circ}\text{B}lg$. Wartości te były niższe od wartości ekstraktu pozornego uzyskanych w próbie, której nie mieszano podczas fermentacji ($4,4^{\circ}\text{B}lg$). Szóstego dnia fermentacji wartość ekstraktu pozornego w próbie kontrolnej zmniejszyła się do $2,85^{\circ}\text{B}lg$ natomiast w brzezkach poddawanych mieszaniu mechanicznemu obserwowano stabilizację wartości ekstraktu na poziomie ok $2,50^{\circ}\text{B}lg$. Ostatecznie zawartość ekstraktu w próbie poddawanej mieszaniu z prędkością obrotową mieszadła 50 rpm wynosiła $2,40^{\circ}\text{B}lg$, a w próbie o prędkości mieszania 1000 rpm – $2,50^{\circ}\text{B}lg$. Wartości ekstraktu w piwie młodym prób mieszanych (50 rpm – doba 7, 1000 rpm – doba 6) nie różniły się między sobą w sposób istotny statystycznie.

Należy jednak podkreślić fakt, że wprowadzenie mieszania mechanicznego w sposób istotny statystycznie wpłynęło na zmiany ekstraktu pozornego w trakcie procesu fermentacji, co jest zbieżne z wynikami uzyskanymi podczas pomiaru dobowych ubytków medium fermentacyjnego (rys. 1 i 2). Ponadto, oznaczany parametr pozwolił wnioskować o zakończeniu procesu w przypadku próby mieszanej (1000 rpm) – doba 6. Podobne wyniki uzyskał Nordisk i in., [16]. Autorzy wykazali wpływ mieszania na stężenie ekstraktu pozornego piwa. Uzyskane wyniki tłumaczyli lepszym wykorzystaniem składników ekstraktu przez drożdże podczas mieszania i tym samym sugerowali możliwość zmniejszenia ilości słołu do produkcji tego samego piwa (poprawa wydajności surowcowej za sprawą mieszania).

Analiza zawartości etanolu

Na rysunku 5 przedstawiono stężenie alkoholu etylowego, uzyskane szóstego dnia fermentacji w zależności od zastosowanego mieszania. Najwyższe stężenie etanolu w fermentującej brzezce zaobserwowano w próbach z zastosowaniem mieszania o najwyższych obrotach mieszadła (1000 rpm). Wartość ta kształtowała się na poziomie $5,39\%$ obj.

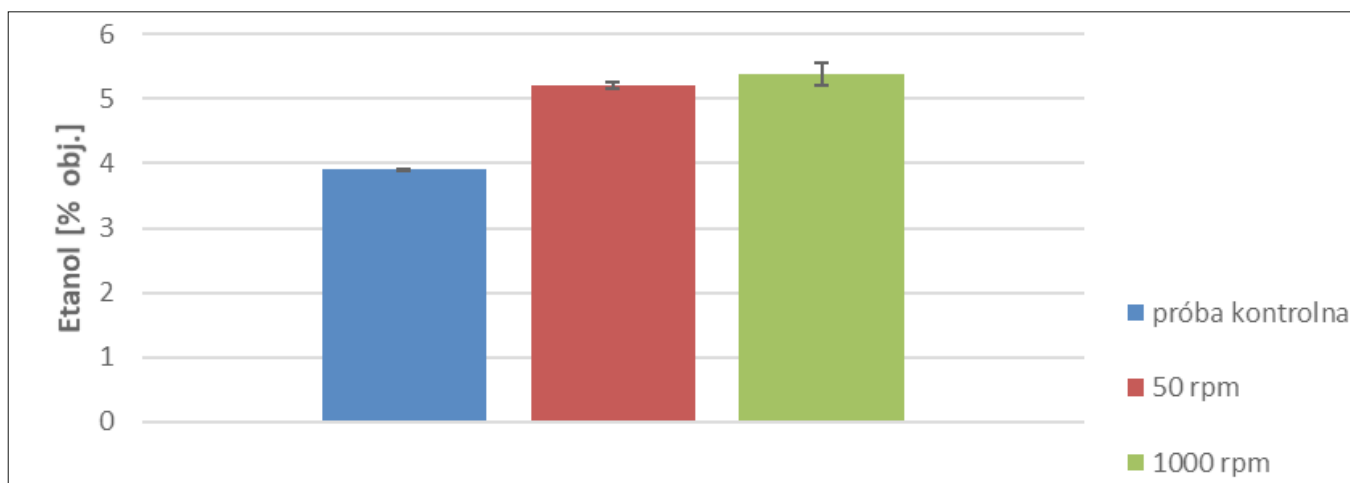


Rys. 4. Zmiany ekstraktu pozornego brzezki słodowej w kolejnych etapach fermentacji ($p < 0,05$, grupy homogenne oznaczono tymi samymi literami).

Fig. 4. The apparent extract on the 0, 3rd and 6th day of fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 5. Stężenie alkoholu etylowego w 6 dobie fermentacji brzezki słodowej ($p < 0,05$, grupy homogenne oznaczone tymi samymi literami).

Fig. 5. The ethanol content on the 6th day of fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Wyższa zawartość tego związku w stosunku do próby kontrolnej wynikała z szybszego przebiegu fermentacji (rys. 1 i 2), a tym samym skuteczniejszego wykorzystania składników odżywczych zawartych w brzezce.

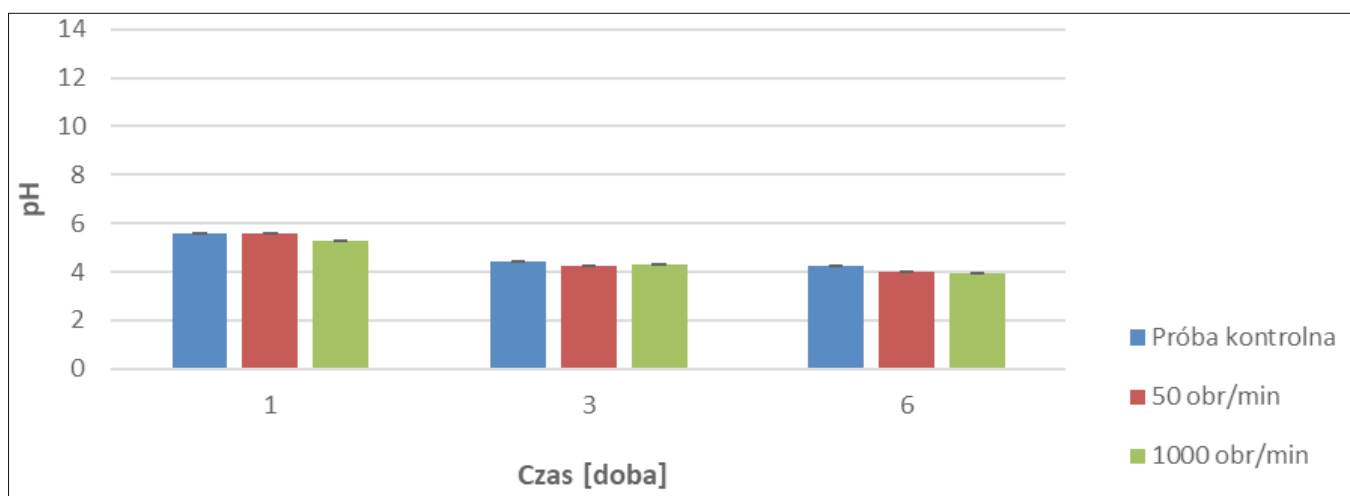
Najniższe stężenie alkoholu etylowego odnotowano w próbie kontrolnej. Szóstego dnia fermentacji zawartość etanolu w tej próbie wynosiła 3,91% obj. Brak mieszania w tej próbie mógł skutkować sedymentacją komórek drożdżowych na dnie kolby. Miały więc one utrudniony dostęp do składników ekstraktu, co spowolniło proces. Należy podkreślić, że po całkowitym zakończeniu procesu (dziesiątego dnia fermentacji) zawartość etanolu w piwie uzyskanym z próby kontrolnej wzrosła do poziomu 5,33% obj. i nie różniła się w sposób istotny statystycznie od wartości prób mieszanych (50 i 1000 rpm). Przeprowadzona analiza wykazała ponadto, że biosynteza etanolu odpowiadała szybszemu

wykorzystaniu składników ekstraktu (rys. 4). Można stwierdzić, że ekstrakt był zużywany głównie na tworzenie alkoholu, a nie na przyrost biomasy drożdży.

Uzyskane wyniki, podobnie jak badania przeprowadzone przez Boswell'a i in., [5] mogą sugerować, iż mieszanie brzezki w trakcie fermentacji przyspiesza wytwarzanie etanolu. Nie wpływa ono jednak na wartość stężenia końcowego tego związku w piwie.

Analiza wartości pH

Na podstawie uzyskanych wyników zmian wartości pH (rys. 6) można wykazać, że pH brzezki słodowej w trakcie jej fermentacji w próbie kontrolnej obniżyło się z 5,61 do 4,2. W próbach które poddawano mieszaniu wartość ta wyniosła odpowiednio: dla mieszania z prędkością 50 rpm – 3,99, a dla mieszania z prędkością 1000 rpm była równa

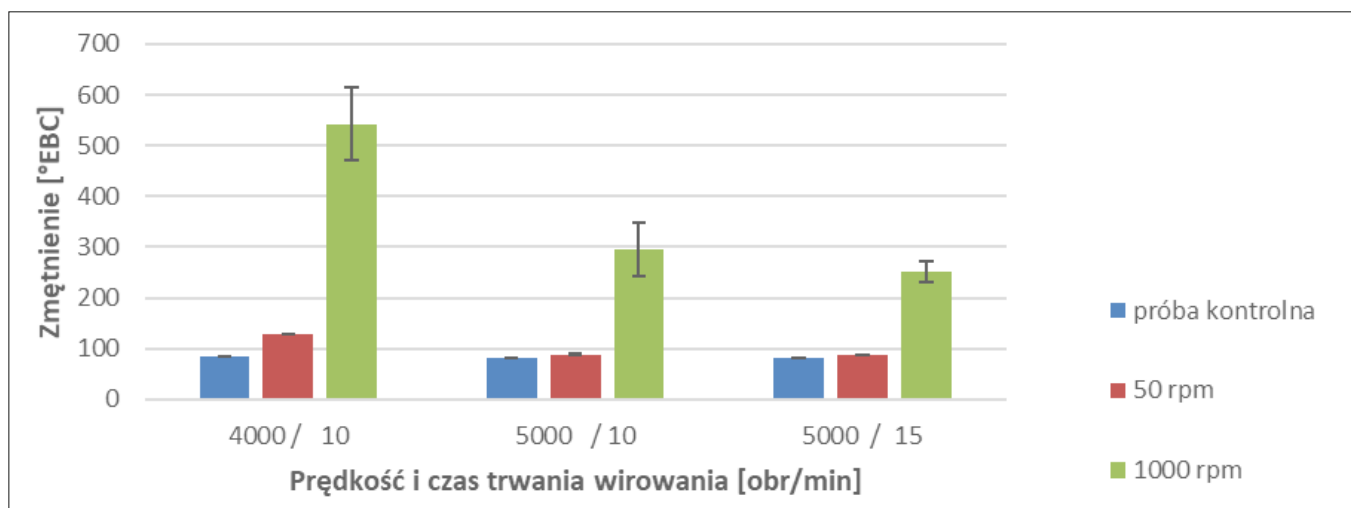


Rys. 6. Zmiany wartości pH brzezki słodowej w kolejnych etapach fermentacji ($p < 0,05$, grupy homogenne oznaczone tymi samymi literami).

Fig. 6. The pH value on the 0, 3rd and 6th day of fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 7. Zmętnienie piwa młodego w zależności od stosowanych warunków wirowania (oddzielanie cząstek tworzących zmętnienie) ($p < 0,05$, grupy homogenne oznaczono tymi samymi literami).

Fig. 7. The haze in green beer after clarification with the different centrifugation conditions ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study

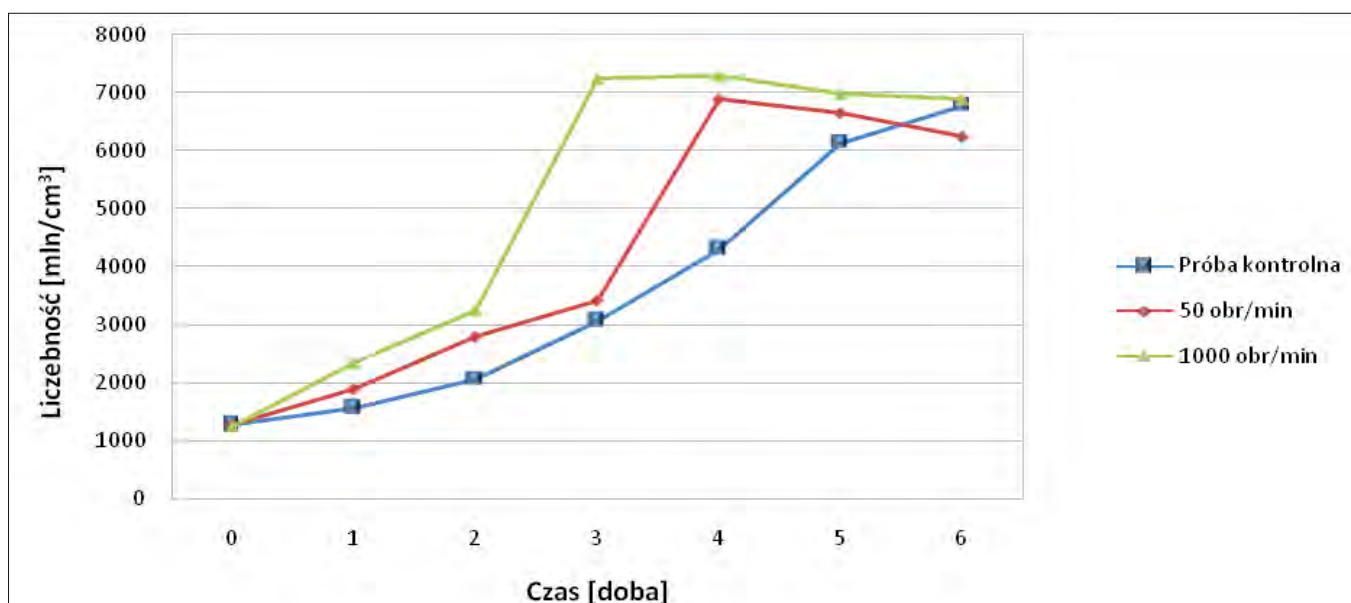
3,93. Wykazano jednak, że różnice pH pomiędzy próbkami poddawanymi mieszaniu nie były istotne statystycznie.

Uzyskane zmiany wartości pH w kolejnych etapach fermentacji, w zależności od zastosowanego mieszania, są porównywalne do wyników otrzymanych przez Boswell'a i in. [5]. Udowodnili oni, że stosowanie mieszania wpływa w niewielkim stopniu na obniżenie wartości pH podczas trwania procesu fermentacji brzezki.

Analiza zmętnienia

Uzyskane wyniki zmętnienia piw, w zależności od stosowanych warunków fermentacji oraz wirowania, przedstawiono na rysunku 7. Najwyższe zmętnienie wynoszące

543°EBC zaobserwowano w próbie, która podczas fermentacji była mieszana z częstością obrotową mieszadła 1000 rpm. W celu sprawdzenia czy związki wywołujące zmętnienie piwa mogą zostać całkowicie odwirowane, przeprowadzono kolejne próby zwiększania intensywności i czasu wirowania. Na podstawie uzyskanych rezultatów (rys. 7) można wykażać, że w próbie kontrolnej oraz mieszanej z intensywnością 50 rpm, zwiększanie czasu oraz szybkości wirowania, nie wpłynęło w sposób istotny statystycznie, na wartość mierzzonego parametru. W przypadku próby mieszanej z szybkością 1000 rpm zauważono istotne obniżenie zmętnienia po zwiększeniu szybkości wirowania (z 4000 do 5000 rpm), jednak wydłużanie czasu wirowania (z 10 do 15 min.) nie przyniosło

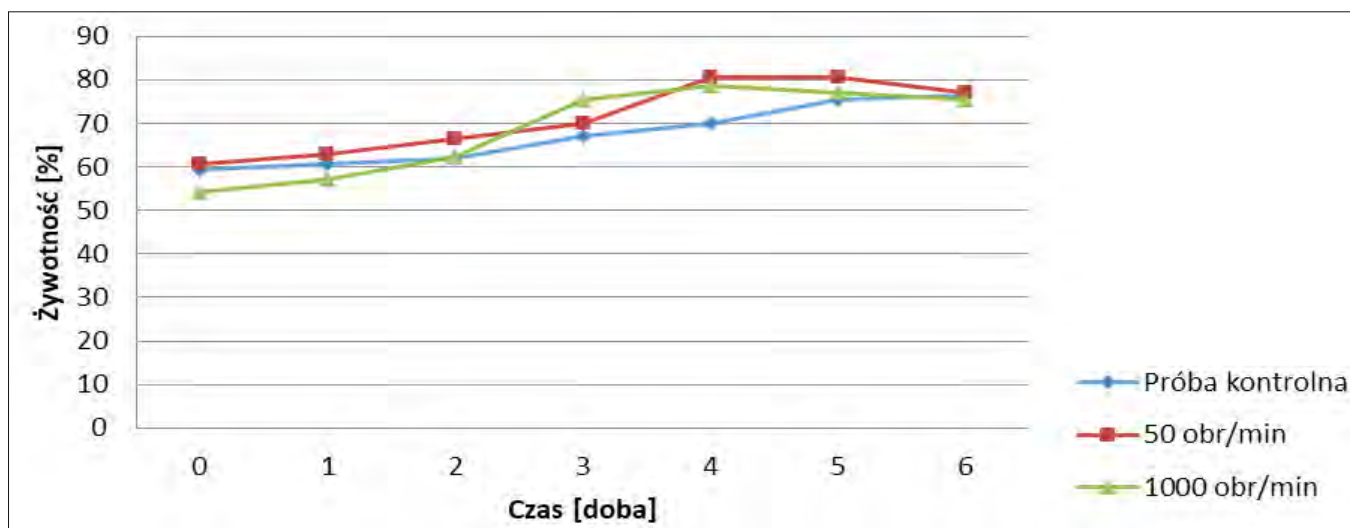


Rys. 8. Zmiana liczebności komórek drożdży w kolejnych dobach fermentacji brzezki ($p < 0,05$).

Fig. 8. Yeast cells count during the fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 9. Zmiana żywotności komórek drożdży w kolejnych dobach fermentacji brzezki ($p < 0,05$).

Fig. 9. Yeast cells viability during the fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study

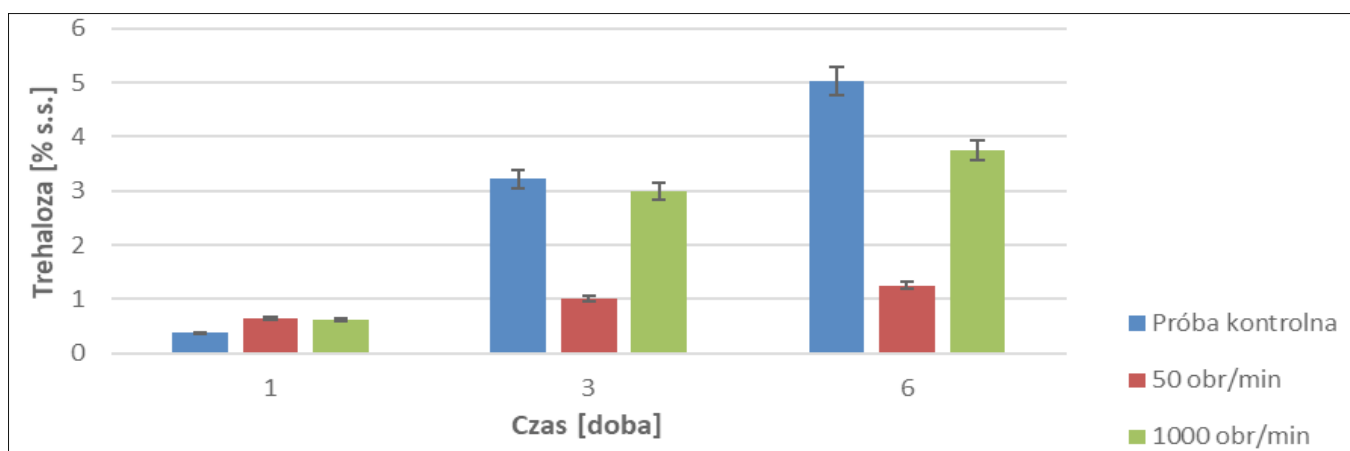
istotnego efektu. W piwie (próba 1000 rpm) pozostało zmętnienie na poziomie przekraczającym 200°EBC . Dowodzi to, że mieszanie 1000 rpm było zbyt intensywne i mogło doprowadzić do uszkodzenia komórek drożdżowych i przedostania się do brzezki związków z ich wnętrza takich jak: mannan, glukan, różnych enzymów (inwertaza i melibioza – enzymy ściany komórkowej) oraz protein. Uważa się, że niższe pH (uzyskane w próbach poddawanych mieszaniu – rys. 6), potencjalnie może przyspieszać powstawanie zmętnień koloidalnych i korzystnie wpływać na późniejsze procesy klarowania, ale też ogranicza namnażanie szczepów bakterii kwasu mlekowego w przypadku praktykowania biologicznego zakwaszania brzezki [9, 11].

Analiza liczebności komórek drożdży

Na rysunku 8 przedstawiono liczebność komórek drożdży w czasie fermentacji brzezki poddawanych mieszaniu

z różną prędkością obrotową mieszadeł. Faza logarytmicznego wzrostu komórek jest najważniejszym odcinkiem całego procesu fermentacji. W próbach poddawanych mieszaniu wystąpiła ona między drugim a czwartym dniem fermentacji. W przypadku próby kontrolnej można przyjąć, że wzrost liczebności drożdży przez cały czas fermentacji miał charakter liniowy. Szybszy przyrost komórek drożdży w próbach poddawanych mieszaniu świadczy o dogodniejszych warunkach panujących w brzezce, a przede wszystkim o łatwiejszym i jednolitym dostępie do źródeł węgla i innych składników potrzebnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju komórek.

W próbach, w których stosowano mieszanie, w piątym i szóstym dniu fermentacji nastąpił spadek liczebności komórek. Mogło to być wynikiem negatywnego wpływu alkoholu etylowego i CO_2 , które hamują przemiany materii u drożdży. W próbie kontrolnej w tych dniach fermentacji liczebność komórek nadal wzrastała.



Rys. 10. Zmiany zawartości trehalozy w komórkach drożdży w kolejnych etapach fermentacji ($p < 0,05$, grupy homogene oznaczono tymi samymi literami).

Fig. 10. The trehalose content in yeast cells on the 0, 3rd and 6th day of fermentation trials ($p < 0,05$, the same letter indicates statistically insignificant differences).

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Parametrem wpływającym na liczebność komórek drożdży jest dobór odpowiedniej prędkości obrotowej mieszadła podczas mieszania brzeczek w czasie ich fermentacji. Wykazano, iż zwiększenie intensywności mieszania poprzez zwiększenie prędkości obrotowej mieszadeł skutkuje przyspieszeniem fazy logarytmicznego wzrostu drożdży, a tym samym przyspieszeniem procesu fermentacji. Zaobserwowano również, iż wraz ze wzrostem szybkości mieszania następuje niewielki wzrost liczebności komórek drożdży w medium fermentacyjnym.

Analiza żywotności komórek drożdży

Na rysunku 9 przedstawiono żywotność komórek drożdży podczas fermentacji brzeczek. W analizowanych próbach była ona początkowo niska. Wg Bolat i in. [4] niska żywotność drożdży liofilizowanych jest konsekwencją warunków zarówno ich suszenia podczas produkcji, jak i sposobu przeprowadzania późniejszego uwadniania. Zdarza się, że żywotność po rehydratacji wynosi tylko niewiele ponad 40% [4]. Z wyników dotyczących analizy wynika, iż w próbach poddawanych mieszaniu żywotność w czasie trwania procesu fermentacji była wyższa (56 do 80%) niż w próbie kontrolnej (60-76%). Niższa żywotność komórek drożdży w próbach, w których nie stosowano mieszania może wskazywać, że zastosowanie mieszania brzeczeki podczas jej fermentacji przyczynia się do polepszenia warunków wzrostu i rozwoju drożdży. Początkowa żywotność komórek w próbie, którą poddawano mieszaniu z prędkością 1000 rpm była niższa niż w pozostałych próbach. Intensywność mieszania nie wpłynęła istotnie na żywotność komórek drożdży podczas procesu fermentacji, co może świadczyć, iż w próbach poddawanych mieszaniu warunki wzrostu były zbliżone.

Analiza zawartości trehalozy w drożdżach

Na rysunku 10 przedstawiono stężenie trehalozy w komórkach drożdży w pierwszym, trzecim i szóstym dniu fermentacji. Pierwszego dnia fermentacji poziom trehalozy w drożdżach w próbach, w których stosowano mieszanie kształtował się na poziomie ok. 0,6% s.s. W próbie kontrolnej był on nieco niższy i wynosił 0,3% s.s. Trzeciego dnia najwyższe stężenie trehalozy zaobserwowano w próbie kontrolnej (bez mieszania) ok. 3,2% s.s. Najniższy jej poziom ok. 1,3% s.s. zanotowano natomiast w próbie gdzie stosowano mieszanie o prędkości obrotowej mieszadła 50 rpm. Niższa akumulacja trehalozy w próbkach poddanych mieszaniu (1,3% i 2,9% s.s.) świadczyć może o stałej dostępności składników odżywczych dla drożdży. Wynika to z ujednorodnienia medium fermentacyjnego, na skutek mieszania oraz szybkiego przystosowywania się drożdży do panujących warunków. Potwierdzają to wyniki przeprowadzonych analiz żywotności i liczebności drożdży w tych próbkach (rys. 8 i 9). Szóstego dnia fermentacji podobnie jak trzeciego, najwyższą koncentrację trehalozy zaobserwowano w drożdżach z próby kontrolnej ok. 5%, a najniższą dla próby z mieszaniem 50 rpm (1,3% s.s.).

Wrzaz z upływem czasu trwania procesu fermentacji ilość trehalozy w komórkach drożdży wzrastała, co mogło być spowodowane powstającym etanolem oraz wyczerpywaniem się łatwo przyswajalnych składników.

WNIOSKI

1. Mieszanie fermentującej brzeczeki słodowej z intensywnością 1000 rpm umożliwia skrócenie czasu fermentacji o ok. 72 godziny, natomiast mieszanie 50 rpm skraca proces o ok. 48 godzin w odniesieniu do próby bez mieszania.
2. Zastosowanie mechanicznego mieszania brzeczek słodowych w czasie fermentacji nie powoduje zmian w końcowym stężeniu alkoholu oraz ekstraktu pozornego, natomiast przyczynia się do podwyższenia żywotności komórek drożdży podczas procesu fermentacji.
3. Mieszanie (1000 rpm) powoduje zwiększenie liczebności komórek drożdży w fermentującej brzeczeki, skrócenie czasu fazy logarytmicznego wzrostu komórek oraz wystąpienie nadmiernego zmętnienia piwa młodego.
4. Mieszanie o intensywności 1000 rpm wpływa istotnie na zmętnienie piwa młodego – daje wartości tego parametru ponad 4-krotnie wyższe niż w przypadku mieszania mniej intensywnego (50 rpm) i prób kontrolnych.
5. Intensywność biosyntezy trehalozy jest najniższa (ponad 3-krotnie) w przypadku stosowania mieszania 50 rpm, w porównaniu do prób mieszanych 1000 rpm oraz kontrolnych.

LITERATURA

- [1] **ANALYTICA EBC.** European Brewing Convention, Fachverlag Hans Carl, Nurnberg **2010**.
- [2] **ANNEMÜLLER G., H. J. MANGER, P. LIETZ.** **2008.** Die Hefe in der Brauerei. VLB, Berlin.
- [3] **ASANO K, K. SHINAGAWA, N. HASHIMOTO.** **1982.** „Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation”. J Am Soc Brew Chem. 40(4):147–154.
- [4] **BOLAT I.C., M. TURTOI, M.C. WALSH.** **2009.** „Influence of yeast drying process on different lager brewing strains viability”. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 15(3):370-377.
- [5] **BOSWELL C. D., A. W. NIENOW, C. J. HEWITT.** **2002.** „Studies on the effect of mechanical agitation on the performance of brewing fermentations: fermentation rate, yeast physiology, and development of flavor compounds”. J. Am. Soc. Brew. Chem. 60(3):101-106.
- [6] **BOULTON C. A.** **2007.** Sink or swim? Brew. Distiller Int. 3:71–75.
- [7] **BOULTON C. A.** **2010.** „An investigation into the distribution of viable yeast mass and temperature variation in cylindro conical vessels during fermentation”. Scandinavian Brewer's Review 67(1):16–22.
- [8] **BRIGGS D. E., C. A. BOULTON, P.A. BROOKES, R. STEVENS.** **2004.** Brewing Science and Practice, CRC Press, New York.
- [9] **DECLERCK J.** **1957.** A textbook of brewing. Chapman and Hall Ltd., London.
- [10] **DRAGONE G., D. P. SILVA, J. BATISTA DE ALMEIDA E SILVA, URGEL DE ALMEIDA LIMA.** **2003.** „Improvement of the ethanol productivity in high

- gravity brewing at pilot plant scale". *Biotechnology Letters* 25:1171–1174.
- [11] **KANEDA H., M. TAKASHIO, T. TAMAKI, T. OSAWA. 1997.** „Influence of pH on flavour staling during beer storage". *Journal of the Institute of Brewing* 103:21–23.
- [12] **KUNZE W. 1999.** *Technologia piwa i siodu*. Warszawa: Wydanie: PIWOCHMIEL Spółka z.o.o.
- [13] **MOCHABA F. M., P.A.TORLINE, W. VUNDLA, G. HULSE, B.C. AXCELL B. 1999.** „Slurry pH as an indicator of yeast autolysis". *Proceedings of the Scientific and Technical Convention Institute of Brewing Africa Section* 7:205–207.
- [14] **NIENOW A. W., G. MCLEOD, C. J. HEWITT. 2010.** „Studies supporting the use of mechanical mixing in large scale beer fermentations". *Biotechnology letters* 32(5):623–633.
- [15] **NIENOW A.W. 1997.** The mixer as a reactor—liquid/solid systems. In: Harnby N, Edwards MF, Nienow AW (eds) *Mixing in the process industries*, 2nd edn (paperback revision), Chapter 17. Butterworth Heinemann, London: 94–411.
- [16] **NORDISK M., C.A. BOULTON, A. NIENOW. 2011.** „Scale-down/scale-up studies leading to improved commercial beer fermentation". *Biotechnol J.* 6(8):911–25
- [17] **OKABE M., M., KATOH, F. FURUGOORI F, M. YOSHIDA, S. MITSUI. 1992.** „Growth and fermentation characteristics of bottom brewer's yeast under mechanical stirring". *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73:148–152.
- [18] **POLSKA NORMA PN-A-79093-2:2000.** Piwo - Metody badań - Oznaczanie zawartości alkoholu, ekstraktu rzeczywistego i ekstraktu brzoeczki podstawowej metodą destylacyjną oraz metodą refraktometryczną.
- [19] **POREDA A., T. TUSZYŃSKI. 2007.** „Influence of magnesium and zinc ions on trehalose synthesis and fermentation activity in brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*". *Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 14, 2:197–207.
- [20] **SAVOVA I., T. DONEV, Z. SHOLEVA. 1997-1998.** „An investigation of the trehalose accumulation dynamics by yeasts from genus *saccharomyces*". *Journal of Culture Collections* 2:40–43.
- [21] **SIEBERT K. J, N. V TROUKHANOVA, P. Y. LYNN. 1996.** „Nature of polyphenol-protein interactions". *J Agric Food Chem.* 44(1):80–85.
- [22] **SIEBERT K. J. 1999.** „Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis". *J Agric Food Chem.* 47(2):353–362.
- [23] **SILLEB H.H.W., J. W. G. PAALMAN, E. G. SCHURE, S. Q. B. OLSTHOORN, A. J. VERKLEIJ, J. BOONSTRA, C. T. VERRIPS. 1999.** „Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Bacteriology* 181(2):396–400.
- [24] **THEVELEIN J. M. 1984.** „Regulation of trehalose mobilization in fungi". *Microbiol Rev.* 48(1):42–59.
- [25] **WIEMKEN A. J. 1990.** „Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate". *A.W. Leeuwenhoek* 58(3):209–217.