

Dr inż. Krzysztof KUCHARCZYK  
Prof. dr hab. inż. Tadeusz TUSZYŃSKI  
Krakowska Wyższa Szkoła Promocji Zdrowia w Krakowie  
Prof. dr hab. inż. Krzysztof ŻYŁA  
Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

## WPŁYW DAWKI DROŻDŻY NA ZAWARTOŚĆ AMINOKWASÓW (FAN) W PIWIE PRODUKOWANYM W TECHNOLOGII WIELKOZBIORNIKOWEJ®

The influence of yeast pitching rate on the content of free amino nitrogens (FAN) in beer produced on an industrial scale®

**Słowa kluczowe:** brzeczka piwna, dawka drożdży, wolne aminokwasy (FAN).

W artykule przedstawiono wyniki badań wpływu dawki drożdży na zawartość wolnych aminokwasów w piwie produkowanym w technologii wielkozbiornikowej. Doświadczenia wykonano w warunkach przemysłowych – fermentacja i dojrzewanie w tankofermentorach. Do brzeczki dodawano drożdże zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż) w ilości od 5 do 9 mln komórek na  $\text{cm}^3$ . Brzeczki napowietrzano sterylnym powietrzem w ilości 10 mg na  $\text{dm}^3$ . Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w jednakowych warunkach technologicznych. Wykazano, że zróżnicowana dawka drożdży ma istotny wpływ na przyswajalność, a tym samym zawartość aminokwasów w piwie. Wraz ze zwiększaniem dawki drożdży zmniejszała się zawartość wolnych aminokwasów. Większa przyswajalność aminokwasów z fermentującej brzeczki wpływa korzystnie na właściwości sensoryczne produkowanego piwa, przechowywanego w dłuższym okresie czasu, ze względu na opóźnianie procesów starzenia napoju.

**Key words:** wort, yeast pitching rate, free amino acids (FAN). The article shows of results the influence of yeast pitching rate on the content of free amino acids (FAN) in beer produced on an industrial scale. The study was performed in industrial conditions – fermentation and maturation in cylindro-conical fermentation tanks. Yeast for pitching was collected after secondary fermentation (third passage), in quantity from 5 to 9 mln cells per  $\text{cm}^3$ . The worts were aerated sterile air in quantity 10 mg  $\text{O}_2/\text{dm}^3$ . The processes of fermentation and maturity was fixed in this same technological conditions.

The experiments showed that varied yeast pitching rate had a significant impact on the content of free amino acids in beer. With increasing of yeast pitching rate, the concentration of FAN decreased. The less content of FAN has a positive effect on the quality of beer.

Higher absorption of amino acids from the fermenting wort by yeast has a positive effect on the sensory properties of the produced beer, stored over a longer period of time, due to delaying the aging process of the beverage.

### WPROWADZENIE

Brzeczka piwna zawiera cukry fermentujące (fruktozę, sacharozę, maltozę, maltotriozę) i niefermentujące (dekstryny), a także związki azotowe (aminokwasy, peptydy, proteiny), witaminy oraz śladowe ilości jonów metali i substancji mineralnych. Kompozycja brzeczki istotnie wpływa na końcową jakość piwa.

Związki azotowe stanowią 3-5 % ekstraktu brzeczki, w tym około 30% to aminokwasy, około 20% wysokocząsteczkowe białka i około 40% polipeptydy. Pozostałą ilość stanowią inne komponenty azotowe. W piwie gotowym zawartość aminokwasów wynosi około 100 mg na  $\text{dm}^3$  [2].

Właściwa ilość wolnych aminokwasów w brzeczce jest niezbędna do budowy komórek drożdży i wpływa korzystnie na właściwy przebieg procesu fermentacji [7] oraz zapewnia

pożądane cechy organoleptyczne napoju [4]. Również stabilność koloidalna piwa i właściwości sensoryczne wynikają m.in. ze współzależności pomiędzy proteinami, polifenolami i aminokwasami.

W brzeczce piwnej można wyróżnić około 19 zasadniczych aminokwasów, które są przyswajane przez komórki drożdży z różną intensywnością (tab. 1).

W przypadku stosowania wyłącznie słodu nie występuje deficyt niskocząsteczkowych białek. Znaczny udział surowców niesłodowanych wymaga natomiast stosowania enzymatycznej suplementacji proteazą, która zwiększa ilość wolnych aminokwasów [9]. Wskazane jest, aby zawartość wolnych aminokwasów po procesie fermentacji, w piwie gotowym, była jak najniższa. Pożądany jest więc wysoki wskaźnik ich wykorzystania przez drożdże podczas fermentacji.

**Tabela 1. Główne aminokwasy brzezki i ich przyswajalność przez drożdże****Table 1. The main amino acids of wort and their absorption by yeast**

Tempo przyswajania			
szybkie	średnie	wolne	nie przyswajane
Kwas glutaminowy	Walina	Glicyna	Prolina
Kwas asparaginowy	Metionina	Fenylalanina	
Asparagina, Glutamina	Leucyna	Tyrozyna	
Seryna, Treonina,	Izoleucyna	Tryptofan	
Lizyna, Arginina	Histydyna	Alanina	

Źródło: Rusell I. 1997 [12]

Source: Rusell I. 1997 [12]

Oprócz aminokwasów, w piwie występują niskocząsteczkowe frakcje białek, takie jak: mono-peptydy, dipeptydy i tripeptydy. Komórki drożdżowe nie przyswajają bezpośrednio związków białkowych dłuższych niż potrójne peptydy, dlatego wydzielają egzogenne enzymy proteolityczne do brzezki. Rozłożone białka są następnie asymilowane przez drożdże. Zawartość peptydów obniża się podczas pierwszej doby fermentacji [14].

W gotowym piwie następuje częściowy rozkład aminokwasów do aldehydów, m. in. według reakcji Streckera [15], które negatywnie wpływają na jakość napoju. Niska zawartość wolnych aminokwasów spowalnia procesy starzenia i jest ważnym wyróżnikiem stabilności piwa [5].

Wszystkie przemiany w brzezce podczas fermentacji i dojrzewania kształtują końcowy skład chemiczny i cechy sensoryczne piwa. Wysoki poziom higieny produkcji (sterylnosc) sprawia, że można kontrolować zachodzące reakcje biochemiczne i wpływać na profil smakowo – zapachowy oraz wartość odżywczą napoju. Z punktu widzenia żywieniowego, główną jego wartość odżywczą stanowią składniki ekstraktu, które występują najczęściej jako koloidy i są dobrze przyswajalne przez organizm ludzki [11].

Celem artykułu jest prezentacja uzyskanych wyników badań dotyczących wpływu dawki drożdży na zawartość wolnych aminokwasów w piwie produkowanym w technologii wielko zbiornikowej, co ma bezpośrednie przełożenie na przebieg procesów starzenia się piwa.

## MATERIAŁY I METODY

### Opis badań

Przedmiotem badań był równoległy proces przemysłowej produkcji piwa w trzech tanko fermentorach (ZKT), z których pobierano próby przez 18 dni cyklu produkcyjnego. Brzezki HG (High Gravity, 15,5% wag. ekstraktu) były przygotowane z tej samej partii słodu w identycznych warunkach technologicznych. Pobieranie prób rozpoczęto po napełnieniu ZKT i kontynuowano codziennie, o tej samej porze. Do fermentacji użyto drożdży *Saccharomyces carlsbergensis*, które były zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż), w ilości od 5 do 9 mln komórek na cm<sup>3</sup>. Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych.

### Analityka

Zawartość FAN oznaczano w brzezce i w piwie wykorzystując metodę ninhidrynową we wzorcowym roztworze glicyny.

Liczebność komórek drożdży podczas fermentacji brzezki i dojrzewania piwa oznaczano przy użyciu Nucleocounter'a YC-100 (Chemometec, Dania). System ten identyfikuje i liczy komórki, które mają wybarwione DNA jodkiem propidyny.

### Oznaczanie wolnych aminokwasów (FAN)

#### w brzezce i piwie [8]

Na początku analizy przygotowano próbę wzorcową glicyny. Pobierano 1 cm<sup>3</sup> podstawowego roztworu glicyny do kolbki miarowej o poj. 100 cm<sup>3</sup> i uzupełniano wodą destylowaną. Następnie przygotowano próby badane pobierając 1 cm<sup>3</sup> brzezki lub 2 cm<sup>3</sup> piwa do kolbki miarowej o poj. 100 cm<sup>3</sup> i uzupełniano wodą destylowaną.

Do oddzielnych probówek z korkiem pobierano po 2 cm<sup>3</sup> wzorcowego roztworu glicyny, 2 cm<sup>3</sup> z próbki głównej (brzezki lub piwa) oraz 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej – próba ślepa.

Do wszystkich prób wprowadzano 1 cm<sup>3</sup> ninhidryny i utrzymywano w stanie wrzenia przez 16 minut, po czym schładzano do 20°C i dodawano po 5 cm<sup>3</sup> jodanu potasu. Roztwory dokładnie mieszano i po 15 minutach mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm, stosując jako próbę odniesienia wodę destylowaną.

Zawartość FAN (mg·dm<sup>-3</sup>) wyliczano ze wzoru:

$$FAN = (A_p - A_s) \cdot 2 \cdot d / A_w \quad (1)$$

Gdzie:  $A_p$  – absorbancja próbki (brzezki lub piwa),

$A_s$  – absorbancja próbki ślepej,

$A_w$  – absorbancja próbki wzorcowej,

2 – ilość wolnego azotu aminowego (mg·dm<sup>-3</sup>) we wzorcowym roztworze glicyny,

d – współczynnik rozcieńczenia próbki (100 dla brzezki, 50 dla piwa).

### Pomiar biomasy drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie za pomocą NucleoCounter'a YC-100 firmy Chemometec

Przy użyciu NucleoCounter'a YC-100 (Chemometec, Dania), określano ogólną ilość drożdży a także zawartość martwych komórek podczas fermentacji i dojrzewania piwa oraz w gęstwie drożdżowej.

System ten identyfikuje i liczy pojedyncze komórki, które mają zabarwione DNA. Mikroskop fluorescencyjny wbudowany w urządzenie składa się z diod emitujących światło, emisyjnych i wzbudzających filtrów, optyki (soczewek) i kamery CCD. Do specjalnej kasetki pobiera się odpowiednio przygotowaną (rozcieńczoną) próbę, która przechodząc przez system kanalików, miesza się z barwnikiem koloryzującym jądra komórek (jodkiem propidyny, którego odpowiednią ilość zawiera każda kasetka). W okienku pomiarowym próbka zostaje poddana działaniu zielonego światła. W efekcie jodek propidyny połączony z zabarwionym DNA zaczyna emitować czerwone światło fluorescencyjne. Urządzenie NucleoCounter jest wyposażone w zaawansowane oprogramowanie do analizy zdjęć. Analizuje ono nagrane zdjęcie i liczy ilość

jąder na obrazie. Koncentracja komórek w próbce jest następnie wyświetlona na ekranie urządzenia.

### Analiza statystyczna

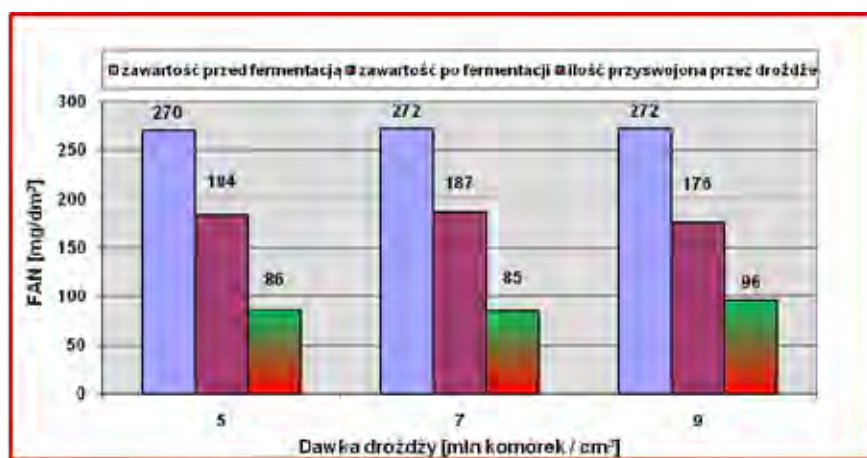
Uzyskane wyniki prezentowane w pracy są średnimi z trzech niezależnych powtórzeń, z określeniem odchylenia standardowego. Dane analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), celem ustalenia istotności badanych parametrów. Statystycznie istotne różnice pomiędzy średnimi weryfikowano z wykorzystaniem testu Duncan'a, przy użyciu programu statystycznego Statistica wersja 12 (StatSoft Polska, Kraków).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Szczególną uwagę zwrócono na zawartość FAN w brzezce nastawnej przed fermentacją oraz po całkowitym jej odfermentowaniu, w trakcie leżakowania. Różnicę w zawartości aminokwasów określano mianem ich redukcji poprzez asymilację przez drożdże do budowy własnych komórek, biotransformację, tworzenie fuzli oraz inne przemiany metaboliczne.

Piwo jasne pełne wytwarzane ze stężonej brzezki (HGB) o zawartości 15,5°Blg, powinno zawierać maksymalnie około 120 mg aminokwasów w  $\text{dm}^3$  odfermentowanego piwa [6]. Na podstawie badań można stwierdzić, że większa dawka drożdży miała istotny wpływ na zmniejszenie zawartości niskocząsteczkowych aminokwasów, których ilość była oznaczana na początku i końcu procesu (rys. 1).

Dawka drożdży nastawnych generalnie oddziałuje na ilość aminokwasów pozostałych w piwie. Najniższe początkowe koncentracje drożdży w brzezce (5 i 7 mln  $\text{jtk} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) skutkowało obniżeniem FAN o około 85 mg na  $\text{dm}^3$ . Z kolei zwiększenie stężenia początkowej biomasy drożdży w brzezce do 9 mln komórek w  $1 \text{ cm}^3$  skutkowało wzrostem zużycia aminokwasów do 96 mg w  $\text{dm}^3$ . Wykonane doświadczenia wykazały, że wraz ze wzrostem dawki drożdży nastawnych, następuje korzystne obniżanie zawartości niskocząsteczkowych aminokwasów w piwie.



Rys. 1. Zmniejszenie zawartości FAN w procesie fermentacji, w zależności od dawki drożdży nastawnych.

Fig. 1. Decreasing FAN content in fermenting wort, depending on yeast pitching rate.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Wyższy stopień wykorzystania aminokwasów na skutek większej dawki drożdży nastawnych wynika z dynamiki przyrostu biomasy drożdży (rys. 2).

Daleko posunięty rozkład białek w procesie zacierania sło-du, prowadzący do powstania dużej ilości aminokwasów, jest niepożądany ze względu na uzyskiwanie „pustego w smaku” piwa. Nadmierna zawartość FAN wpływa również na niekorzystne reakcje (rozkład aminokwasów wg reakcji Streckera) prowadzące do przyspieszonego procesu „starzenia” na skutek powstawania liniowych aldehydów (np. 2-nonenal), będących wyróżnikami niskiej stabilności organoleptycznej przechowywanego piwa.

Zastosowanie wyższych dawek inokulum drożdży miało istotny wpływ na zwiększenie wykorzystania FAN o około 12 %.

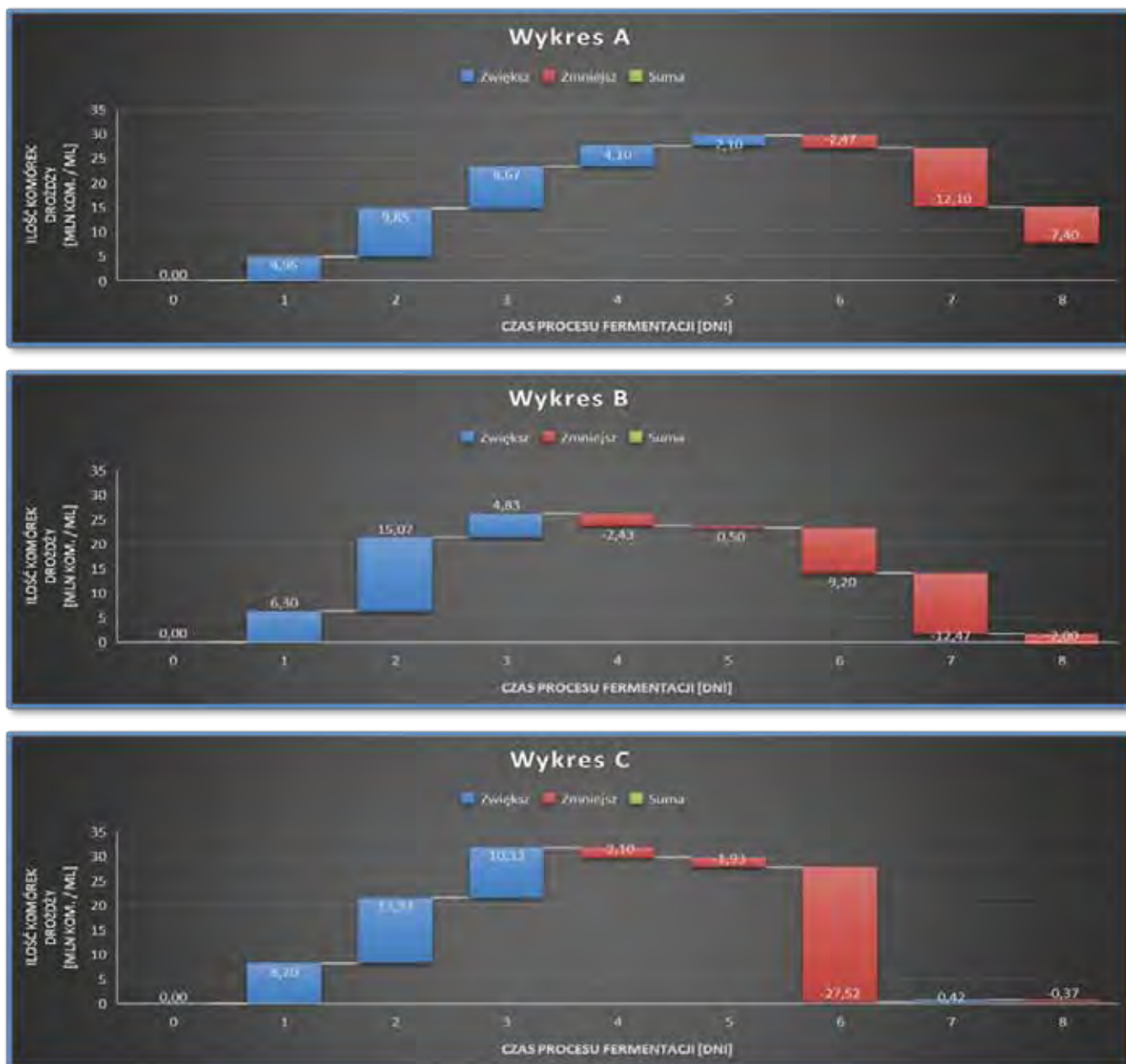
Różnice w kinetyce zmian liczebności komórek drożdży pomiędzy badanymi próbami są zobrazowane w tabeli 2, która przedstawia procentową zmianę liczebności zawieszonych drożdży w fermentującej brzezce w pierwszych ośmiu dniach procesu, w stosunku do początkowej dawki drożdży. Zebrane dane wskazują na istotne statystycznie różnice w odniesieniu do zawieszonych komórek drożdży w fermentującej brzezce od 2 do 8 dnia procesu.

Verbelen i in. [16] wykazali istotne zróżnicowanie wpływu dawki drożdży nastawnych na zużycie aminokwasów w trakcie fermentacji. W doświadczeniu zastosowali czterokrotne zwiększenie dawki drożdży nastawnych uzyskując odpowiednio zmniejszoną zawartość FAN o około 20 %. Spostrzeżenia te po części podzielili Rouck i in. [13], stosując do zafermentowania czysto słodowej brzezki, pojedynczą i podwójną dawkę drożdży, w rezultacie uzyskali zmniejszenie zawartości FAN (o około 60 %). Takie rozbieżności są prawdopodobnie wynikiem różnej zawartości ekstraktu brzezki podstawowej i stopnia jej początkowego napowietrzania oraz odmiennych dawek drożdży użytych do fermentacji.

Badania przeprowadzone przez Edelena i in. [1], Gibsona i in. [3] oraz Nguyena i Viet Man [10] wskazują na odmienną charakterystykę zmian zawartości FAN. Autorzy wskazują, że dalsze zwiększanie dawki inokulum powoduje odwrócenie

tendencji zmian i obserwuje się mniejsze wykorzystanie niskocząsteczkowych związków azotowych. Może to wynikać z proporcjonalnie dużo niższego namnożenia świeżych komórek.

W kontekście dotychczasowych prac należy zauważyć, że warunki w jakich przeprowadzano badania w tej pracy były istotnie różne od doświadczeń innych autorów. Inna była skala prób, stężenie ekstraktu w brzezce podstawowej oraz inna rasa drożdży stosowanych do fermentacji. Czynniki te mogły mieć wpływ zarówno na uwolnienie aminokwasów, jak i ich wykorzystanie przez komórki drożdży w warunkach podwyższonego ciśnienia hydrostatycznego w tankofermentorach, wynikającego z dużej warstwy brzezki ( $h = 15 \text{ m}$ ) oraz ciśnienia osmotycznego (brzezki stężone – HGB).



Rys. 2. Kształtowanie się dynamiki zmian liczebności zawieszonych drożdży w fermentującej brzeczce w zależności od dawki drożdży [mln kom./cm³]; Wykres A – 5, Wykres B – 7, Wykres C – 9.

Fig. 2. The course of the dynamics of changes in the number of suspended yeast in the fermenting wort, depending on yeast pitching rate [mln cells./cm³]; Wykres A – 5, Wykres B – 7, Wykres C – 9.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Tabela 2. Zmiany liczebności komórek drożdży w trakcie fermentacji, w stosunku do ich początkowej liczby [%]

Table 2. The changes of count yeast cells during fermentation in relation to its initial concentration [%]

Wyszczególnienie	Doba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dawka drożdży [mln jtk/cm3]								
5	4,9 (±2,8)	14,8 a (±2)	23,5 a (±0,65)	27,6 b (±1,2)	29,7 b (±3,2)	27,2 c (±1,8)	15,1 b (±4,1)	7,7 b (±0,9)
7	6,3 (±1,4)	21,4 b (±2,7)	26,2 b (±0,9)	23,8 a (±0,75)	23,3 a (±0,75)	14,1 b (±0,3)	1,6 a (±0,2)	-0,4 a (±0,1)
9	8,2 (±0,1)	21,6 b (±1,4)	31,9 c (±1,9)	29,8 b (±2,4)	27,9 a (±0,2)	0,4 a (±0,1)	0,8 a (±0,2)	0,4 a (±0,1)
ANOVA	ns	p=0,046	p=0,001	p=0,011	p=0,014	0,001	p=0,038	p=0,019

Wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach wykazują różnice według testu Duncana (p<0,05); ns – nieistotne statystycznie

Źródło: Badania własne

Source: The own study

## WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ dawki drożdży w brzeczce, w skali wielkoziarnikowej, na redukcję zawartości FAN w piwie. Wraz ze wzrostem ich dawki istotnie zwiększa się asymilacja aminokwasów przez komórki drożdży.
2. Niższa zawartość FAN w wyniku zwiększonej przyswajalności przez drożdże niskocząsteczkowych białek może pozytywnie wpływać na opóźnienie procesów starzenia piwa.

## LITERATURA

- [1] **EDELEN C., J. MILER, H. PATINO. 1996.** "Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality". *Technical Quarterly The Master Brewers Association of Americas* 1: 30-32.
- [2] **FERREIRAI, L. GUIDO. 2018.** „Impact of wort amino acids on beer flavour: a review”. *Fermentation* 4: 1-13.
- [3] **GIBSON B., C. BOULTON, C. BOX, N. GRAHAM, S. LAWRENCE, R. LIFORTH, K. SMART. 2009.** "Amino acid uptake and yeast gene transcription during industrial brewery fermentation". *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 3: 157-165.
- [4] **GORINSTEIN S., M. ZEMSER, F. VARGAS-ALBORES, J. OCHO, O. PREDES-LOPES, CH. SCHELER, J. SALNIKOW, O. MARTIN-BELLOSO, S. TRAKHTENBERG. 1999.** "Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data". *Food Chemistry* 67: 71-78.
- [5] **GUIDO L., A. CURTO, P. BOIVIN, N. BENISMAIL, C. GONCALVES, A. BARROS. 2007.** "Predicting the organoleptic stability of beer from chemical data using multivariate analysis". *European Food Research and Technology* 226: 57-62.
- [6] **KUNZE W. 1999.** *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin.
- [7] **LEKKAS C., G. STEWART, A. HILL, I. TAIDI, J. HODGSON. 2005.** "The importance of free amino nitrogen in wort and beer". *Technical Quarterly The Master Brewers Association of Americas* 2: 113-116.
- [8] **LIE S. 1973.** "The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen". *Journal of the Institute of Brewing* 79: 37-41.
- [9] **MARCZAK J., B. MARCZEWSKI, M. LESIECKI. 2009.** „Po co piwu enzymy?” *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny* 2: 10-12.
- [10] **NGUYEN T., L. VIET MAN. 2012.** "Using high pitching rate for improvement of yeast fermentation performance in high gravity brewing". *International Food Research Journal* 16: 547-554.
- [11] **PREDY V. 2009.** *Beer In health and disease prevention*. Department of Nutrition and Dietetics, King's College London.
- [12] **RUSSELL I. 1997.** "The nutritional requirements of yeast". *Brewers Guardian* 126: 34-38.
- [13] **ROUCK G., F. OPSTAELE, J. CLIPPELEER, S. POIZ, J. COCK, G. AERTS. 2010.** "Innovations in industrial beer production and yeast FAN assimilation performance". *Wydawnictwo XV Szkoły Technologii Fermentacji*: 191-202.
- [14] **STEWART G., C. LEKKAS, C. HILL, B. TAIDI, J. HODGSON. 2005.** Wort oligopeptides: The formation and utilisation during fermentation. *The Institute of Brewing and Distilling* 10: 98-101.
- [15] **VANDERHAEGEN B., H. NECEN, H. VERACHER, G. DERDELINCKX. 2007.** "The chemistry of beer aging – a critical review". *Food Chemistry* 95: 357-381.
- [16] **VERBELEN P., T. DEKONINCK, S. SAERENS, S. MULDER, J. THEVELEIN, F. DELVAUX. 2009.** "Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour". *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 155-167.