

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 NASTAWNYCH NA PRZYROST BIOMASY W PIWIE PRODUKOWANYM W TECHNOLOGII WIELKOZBIORNIKOWEJ®

The influence of yeast pitching rate on the growth of biomass in beer produced on an industrial scale®

Słowa kluczowe: brzeczka piwna, tankofermentor, dawka drożdży, biomasa drożdży.

W artykule przedstawiono wyniki badań wpływu dawki drożdży nastawnych na przyrost biomasy w piwie produkowanym w technologii wielkozbiornikowej. Brzeczki napowietrzano sterylnym powietrzem w ilości 10 mg na dm³. Temperatura fermentacji i dojrzewania była taka sama dla wszystkich badanych procesów. Badanym parametrem była zmienna dawka drożdży nastawnych: 5, 7 oraz 9 mln komórek na cm³ brzeczki. Pozostałe parametry procesu fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w jednakowych warunkach technologicznych.

Badania wykazały, że zróżnicowana początkowa dawka drożdży nastawnych ma istotny wpływ na przyrost biomasy drożdży w procesie fermentacji. Wraz ze zwiększaniem początkowej dawki drożdży zmniejszała się ilość nowopowstałych komórek drożdży. Z kolei mniejsze dawki wprowadzanych drożdży nastawnych zapewniają uzyskanie większej ilości nowych komórek drożdżowych do kolejnych procesów fermentacji.

Key words: wort, tankfermentor, yeast pitching rate, yeast biomass.

The article presents the results of the influence of different yeast pitching rate on biomass growth in beer produced on an industrial scale. Worts were aerated with sterile air in an amount of 10 mg per dm³. Fermentation and maturation temperatures were the same for all processes tested. The examined parameter was a variable dose of yeast: 5, 7 and 9 million cells per cm³ wort. Other parameters of the beer fermentation and maturation process in tank fermenters were carried out under the same technological conditions.

Studies have shown that a varied initial dose of yeast has a significant impact on the growth of yeast biomass in the fermentation process. As the initial yeast dose increased, the number of newly formed yeast cells decreased. In turn, lower doses of yeast ensure obtaining more new yeast cells for subsequent fermentation processes.

WPROWADZENIE

Piwo według klasycznej technologii otrzymywane jest z wody i siodu jęczmiennego z dodatkiem chmielu przy udziale drożdży. Przez setki lat zmieniały się techniki jego produkcji, a w konsekwencji skład chemiczny i cechy sensoryczne.

Drożdże fermentacji dolnej przystosowane są do niższych temperatur (5–15°C), a pod koniec procesu łatwiej sedymentują w dolnej strefie fermentora. Brzeczka zarówno fermentuje, jak i leżakuje w niskich temperaturach, co powoduje dłuższy proces dojrzewania i wyższą trwałość piwa [1].

W piwach górnej fermentacji występują zwykle większe ilości składników lotnych piwa i CO₂, które mają istotny wpływ na cechy sensoryczne napoju [15]. Zdecydowana większość piw polskich i niemieckich warzonych jest przy udziale drożdży dolnej fermentacji, które podzielić można na kłaczkujące i pyliste. Pierwsze z nich mają większą zdolność do sedymentacji (flokulacji). Z kolei drugie, fermentują intensywniej i powodują szybsze zakończenie procesu, umożliwiając uzyskanie wysokiego stopnia odfermentowania [2,6].

Liczne badania zwracają uwagę na istotny wpływ początkowych dawek drożdży na przebieg procesu fermentacji a następnie leżakowania i ostateczne oddziaływanie na końcowe walory smakowo-zapachowe piwa. Pod koniec procesu fermentacji, drożdże zaczynają opadać na dno naczynia fermentacyjnego. Zjawisko to nazywa się procesem flokulacji.

Flokulacja jest procesem odwracalnym i zależnym od obecności jonów wapnia w fermentującej brzeczce i dojrzewającym piwie. Zjawisko polega na łączeniu się komórek w wyniku czego powstają tzw. kłaczkki, które sedymentują na dno tankofermentora [4,10,11]. Flokulacja stanowi ważny aspekt w browarnictwie i była już przedmiotem wielu badań [3,5,7,12,13], które pozwoliły lepiej poznać omawiane zjawisko. Utworzone po flokulacji konglomeraty komórek znacznie łatwiej sedymentują, a proces ten jest uwarunkowany m.in. ich stopniem odżywiania, napowietrzaniem i składem chemicznym brzeczki [2]. Stwierdzono, że rozpoczęcie flokulacji pojawia się zwykle w momencie wystąpienia warunków głodowych i/lub stresowych. Można uznać, że w końcowym etapie fermentacji występują już czynniki stresowe,

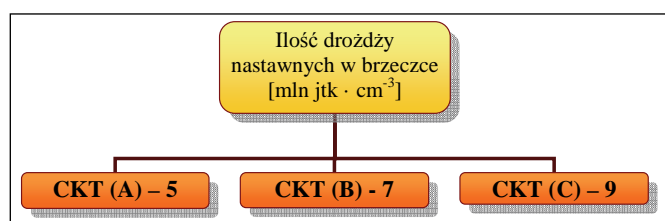
które przyspieszają osadzanie drożdży. Szybkie oddzielenie biomasy po zakończeniu fermentacji warunkuje odpowiednią kondycję komórek drożdży oraz zapewnia płynne przejście do etapu dojrzewania piwa.

Celem artykułu jest prezentacja wyników wpływu zróżnicowanej dawki drożdży nastawnych w procesie fermentacji brzezki piwowarskiej przeprowadzonej w warunkach przemysłowych na przyrost biomasy drożdży.

MATERIAŁY I METODY

Opis badań

Przedmiotem badań był równoległy proces przemysłowej produkcji piwa w trzech tankofermentorach (CKT), 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 CKT i kontynuowano codziennie, o tej samej porze. Do fermentacji użyto drożdży *Saccharomyces carlsbergensis*, które były zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż). Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych. Do tankofermentorów dodawano trzy różne dawki drożdży (rys. 1).



Rys. 1. Dawka drożdży nastawnych.

Fig. 1. The yeast pitching rate.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Analityka

Pomiar objętości odebranej biomasy uzyskano z odczytu przepływomierzy umieszczonych w linii odbioru drożdży z poszczególnych tankofermentorów. Rejestracja objętości była przeprowadzana w sposób automatyczny za pomocą automatycznego programu produkcyjnego.

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.

Pomiary biomasy drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie oraz zawartości komórek martwych wykonano również za pomocą NucleoCounter'a

System ten identyfikuje i liczy pojedyncze komórki, które mają zabarwione DNA. Mikroskop fluorescencyjny wbudowany w układ diagnostyczny składa się z diod emitujących światło, filtrów, soczewek i kamery CCD. Do specjalnej kasetki pobiera się odpowiednio przygotowaną (rozcieńczoną) próbę, która przechodząc przez system kanalików, miesza się

z barwnikiem (jodkiem propidyny) koloryzującym jądra komórek. W okienku pomiarowym próbka zostaje poddana działaniu zielonego światła i w efekcie jodek propidyny połączony z zabarwionym DNA zaczyna emitować czerwone światło fluorescencyjne, które jest identyfikowane przez zaawansowane oprogramowanie do analizy zdjęć. 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

Zastosowanie zróżnicowanej dawki drożdży nastawnych pozwoliło określić wpływ początkowej liczby komórek w brzezce piwnej na przebieg procesu fermentacji oraz śledzenie zmian wybranych parametrów fizykochemicznych piwa.

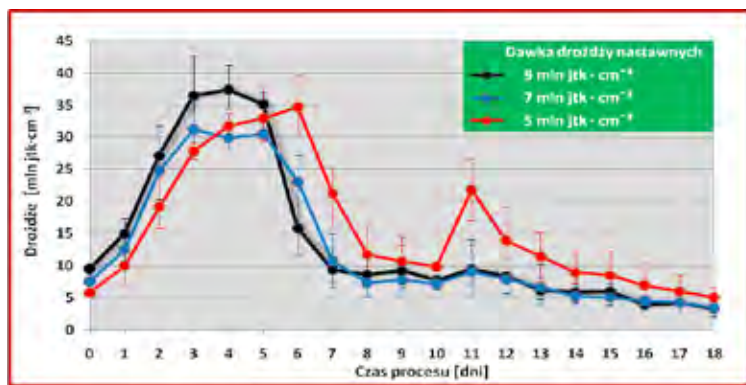
Drożdże wprowadzano do pierwszej warki brzezki, którą napełniano tankofermentor. W badaniu wykorzystano czystą kulturę *Saccharomyces carlsbergensis* (Weihestephan, Niemcy). Rysunek 2 przedstawia ilościowe zmiany komórek drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie, w zależności od początkowej ich zawartości. Brzezki z różną dawką drożdży nastawnych charakteryzowały się odpowiednio odmienną ilością zawieszonych komórek podczas przebiegu procesu w tankofermentorze.

Brzezki z największą ilością komórek charakteryzowały się szybszym przyrostem biomasy, osiągając w czwartym dniu koncentrację 37 mln jtk w cm^3 brzezki.

Na podstawie szybkości ubytku ekstraktu można stwierdzić, że faza intensywnego wzrostu drożdży i odfermentowania, w przypadku największej ich dawki zużytej do inokulacji, trwała około trzy dni. W ciągu pierwszych trzech dni fermentacji nastąpił wysoki przyrost biomasy (od 3 do 5 razy), zmniejszający się wraz ze wzrostem dawki drożdży nastawnych.

Po pięciu dobach rozpoczęła się stosunkowo szybka ich flokulacja. Kłaczowanie, bez względu na dawkę drożdży, rozpoczynało się po osiągnięciu około 55 % odfermentowania pozornego (rys. 3).

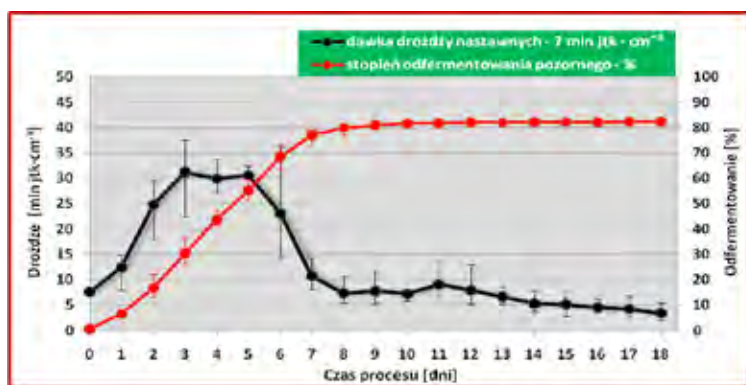
Po okresie intensywnego wzrostu (faza logarytmiczna) i wyczerpania rozpuszczonego w brzezce tlenu, rozpoczęła się stosunkowo krótka faza stacjonarna, a następnie przyspieszona flokulacja. W przypadku mniejszej dawki drożdży (7 mln jtk \cdot cm^{-3}) proces fermentacji wydłużył się o około 24 h, pomimo wysokiego tempa przyrostu biomasy. Koncentracja komórek w trzecim dniu wynosiła 32 mln jtk na cm^3 fermentującej brzezki. W tankofermentorach inokulowanych 5 mln komórek na cm^3 brzezki tempo rozmnażania komórek i przyrostu biomasy było wolniejsze, a kłaczowanie rozpoczynało się później o około dwa dni.



Rys. 2. Liczba komórek drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie, w zależności od dawki drożdży nastawnych.

Fig. 2. Number of yeast cells in the fermenting wort and maturing beer, depending on the yeast pitching rate.

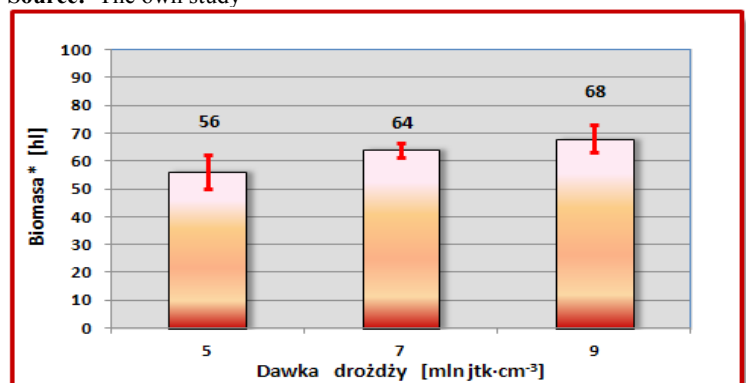
Źródło: Badania własne
Source: The own study



Rys. 3. Liczba komórek drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie, w zależności od stopnia odfermentowania.

Fig. 3. Number of yeast cells in the fermenting wort and maturing beer, depending on degree of apparent attenuation.

Źródło: Badania własne
Source: The own study



Rys. 4. Objętość zebranej gęstwy drożdżowej w zależności od dawki drożdży nastawnych.

Fig. 4. The volume of harvested yeast slurry depending on the yeast pitching rate.

(* gęstwa drożdżowa w przeliczeniu na koncentrację komórek: 10^9 mln jtk·cm⁻³)
Wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach wykazują różnice według testu Duncana ($p < 0,05$)

Źródło: Badania własne
Source: The own study

Mniejsza dawka drożdży nastawnych ($5 \text{ mln jtk} \cdot \text{cm}^{-3}$) powodowała wolniejszą ich sedymentację i wydłużenie czasu wstępnego klarowania młodego piwa.

Stosunkowo duże oscylacje wyników procesu, szczególnie podczas końcowej fazy fermentacji i sedymentacji drożdży, są prawdopodobnie efektem zróżnicowanej kinetyki ich flokulacji, w zależności od początkowej dawki użytej do inokulacji i innych czynników technologicznych.

Odpompowanie biomasy z tankofermentorów nastąpiło pomiędzy dziesiątym i dwunastym dniem procesu, w zależności od szybkości fermentacji i stopnia odfermentowania. Obniżenie ekstraktu pozornego do około $3^\circ \text{B}lg$ oraz dobowe jego spadki poniżej $0,1^\circ \text{B}lg$, wskazywały na zakończenie fermentacji głównej. W ostatnim dniu procesu oddzielano pozostałe drożdże i osady pofermentacyjne, kierowano piwo do filtracji i końcowej stabilizacji.

Biomasę oddzielano z tankofermentorów w dziesiątym dniu procesu, dokładnie po czterech dniach od rozpoczęcia dojrzewania. Objętość zebranej gęstwy drożdży po fermentacji oraz procentowy przyrost biomasy w przeliczeniu na ustaloną koncentrację komórek obrazują rysunki 4 i 5.

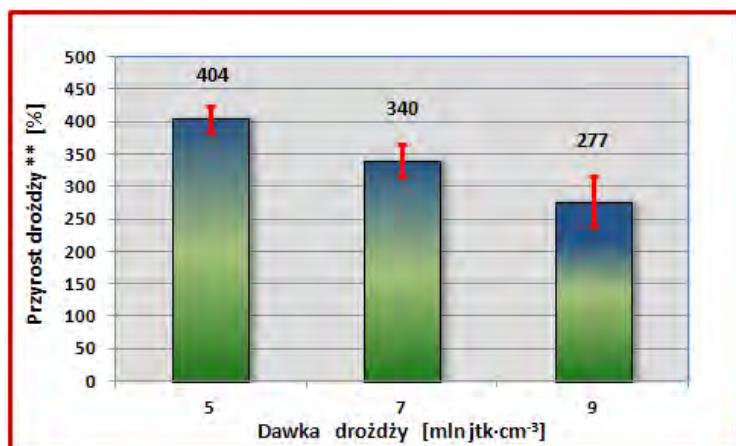
Analiza wpływu początkowej dawki drożdży nastawnych na namnożenie nowych komórek w skali przemysłowej wykazała, że zwiększanie dawki inokulum powoduje istotnie mniejszy przyrost biomasy. W przypadku mniejszej dawki drożdży (5 mln jtk w cm^3 brzezki nastawnej) uzyskano przyrost biomasy w ilości 400 %, natomiast wyższa dawka inokulum (9 mln jtk w cm^3) spowodowała wzrost biomasy o około 280 %.

Dotychczasowe prace wykonane w skali laboratoryjnej wykazały podobną tendencję zmian ilości biomasy, w odniesieniu do początkowej jej koncentracji [8,9,14].

Zmniejszenie ilości paczkujących drożdży jest wynikiem mniejszej dostępności substancji odżywczych i tlenu. Nasze doświadczenia wskazują także, że biomasa odprowadzona okresowo z tankofermentorów charakteryzuje się wyższą żywotnością w następnych pasażach fermentacyjnych (krotność użycia biomasy).

WNIOSKI

1. Stwierdzono istotny wpływ początkowej dawki drożdży nastawnych na przyrost biomasy drożdży podczas procesu fermentacji. Większe dawki drożdży powodują mniejsze namnożenie nowej, świeżej biomasy drożdży.
2. Badania wykazały, że proces flokulacji drożdży rozpoczyna się po odfermentowaniu około 55% ekstraktu.
3. Mniejsze dawki drożdży przyczyniają się do uzyskania większej ilości młodej populacji komórek drożdżowych wykorzystywanej do kolejnych nastawów fermentacyjnych.



Rys. 5. Procentowy przyrost gęstwy drożdżowej w zależności od dawki drożdży nastawnych.

Fig. 5. Percentage increase of yeast slurry depending on the yeast pitching rate.

(** stosunek ilości biomasy po przeprowadzeniu fermentacji do ilości drożdży zarodowych w przeliczeniu na koncentrację biomasy – 10^9 mln jtk·cm⁻³)

Wartości średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach wykazują różnice według testu Duncana ($p < 0,05$)

Źródło: Badania własne

Source: The own study

LITERATURA

- [1] ANNEMULLER G., H.J. MANGER. 2009. Gärung und Reifung des Bieres, VLB Berlin.
- [2] ANNEMULLER G., H.J. MANGER, P. LIETZ. 2005. Die Hefe in der Brauerei, VLB Berlin.
- [3] BAUER F., P. GOVENDER, M. BESTER. 2010. "Yeast flocculation and its biotechnological relevance". Applied and Environmental Microbiology 88: 31–39.
- [4] BONIEWSKA-BERNACKA E. 2007. "Flocculation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Chemia i Inżynieria Ekologiczna 14: 25–31.
- [5] DENGIS P., P. NEILISSEN, P. ROUXHET. 1995. "Mechanism of yeast flocculation: comparison of top – and bottom fermenting strains". Applied and Environmental Microbiology 61: 718–728.
- [6] DYLIKOWSKI W. 1993. Browarnictwo. Warszawa: Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne.
- [7] MULDER S., L. GHEQUIRE, P. VERBELEN, K. VERSTREPEN, F. DELVAUX. 2010. "Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains". Applied and Environmental Microbiology 88: 1321–1331.
- [8] 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.
- [9] PICKERELL A., A. HWANG, B. AXCELL. 1991. "Impact of yeast – handling procedures on beer flavour development during fermentation". The Journal of the American Society of Brewing Chemists 49: 87–92.

LITERATURA

- [1] ANNEMULLER G., H.J. MANGER. 2009. Gärung und Reifung des Bieres, VLB Berlin.
- [2] ANNEMULLER G., H.J. MANGER, P. LIETZ. 2005. Die Hefe in der Brauerei, VLB Berlin.
- [3] BAUER F., P. GOVENDER, M. BESTER. 2010. "Yeast flocculation and its biotechnological relevance". Applied and Environmental Microbiology 88: 31–39.
- [4] BONIEWSKA-BERNACKA E. 2007. "Flocculation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Chemia i Inżynieria Ekologiczna 14: 25–31.
- [5] DENGIS P., P. NEILISSEN, P. ROUXHET. 1995. "Mechanism of yeast flocculation: comparison of top – and bottom fermenting strains". Applied and Environmental Microbiology 61: 718–728.
- [6] DYLIKOWSKI W. 1993. Browarnictwo. Warszawa: Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne.
- [7] MULDER S., L. GHEQUIRE, P. VERBELEN, K. VERSTREPEN, F. DELVAUX. 2010. "Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains". Applied and Environmental Microbiology 88: 1321–1331.
- [8] 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.
- [9] PICKERELL A., A. HWANG, B. AXCELL. 1991. "Impact of yeast – handling procedures on beer flavour development during fermentation". The Journal of the American Society of Brewing Chemists 49: 87–92.

- [10] **POREDAA., A. GOJNICZEK, P. ANTKIEWICZ. 2009.** „Flokulacja drożdży”. *Agro Przemysł*: 2: 27–30.
- [11] **STRATFORD M. 1992.** “Yeast flocculation: a new perspective”. *Advances in Microbial Physiology* 33: 1–71.
- [12] **SOARES E., J. SEYNAEVE. 2000.** “Induction of flocculation of brewer’s yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by changing the calcium concentration and pH of culture medium”. *Biotechnology Letters* 22: 1827–1832.
- [13] **TOUHAMI A., B. HOFFMANN, A. VASELLA, F. DENIS, Y. DUFRENE. 2003.** “Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin – carbohydrate interactions”. *Microbiology* 149: 2873–2878.
- [14] **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 Microbial and Cell Physiology* 82: 155–167.
- [15] **VOGEL W. 2008.** *Piwo warzone w domu*. Warszawa: Multico, Oficyna Wydawnicza.

- [10] **POREDA A., A. GOJNICZEK, P. ANTKIEWICZ. 2009.** „Flokulacja drożdży”. *Agro Przemysł*: 2: 27–30.
- [11] **STRATFORD M. 1992.** “Yeast flocculation: a new perspective”. *Advances in Microbial Physiology* 33: 1–71.
- [12] **SOARES E., J. SEYNAEVE. 2000.** “Induction of flocculation of brewer’s yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by changing the calcium concentration and pH of culture medium”. *Biotechnology Letters* 22: 1827–1832.
- [13] **TOUHAMI A., B. HOFFMANN, A. VASELLA, F. DENIS, Y. DUFRENE. 2003.** “Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin – carbohydrate interactions”. *Microbiology* 149: 2873–2878.
- [14] **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 Microbial and Cell Physiology* 82: 155–167.
- [15] **VOGEL W. 2008.** *Piwo warzone w domu*. Warszawa: Multico, Oficyna Wydawnicza.