

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

WPŁYW DAWKI DROŻDŻY NA ZAWARTOŚĆ SIARCZKU DIMETYLU (DMS) W PIWIE PRODUKOWANYM W TECHNOLOGII WIELKOZBIORNIKOWEJ®

The influence of yeast pitching rate on the content of dimethyl sulfide (DMS) in beer produced on an industrial scale®

Słowa kluczowe: brzeczka piwna, dawka drożdży, siarczek dimetylu (DMS).

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań dotyczących wpływu dawki drożdży na zawartość siarczku dimetylu w piwie produkowanym w technologii wielkozbiornikowej. Doświadczenia wykonano w warunkach przemysłowych – fermentacja i dojrzewanie w tankofermentorach o pojemności 3800 hl. Do brzeczki dodawano drożdże zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż) w ilości od 5 do 9 mln komórek na cm^3 . Brzeczkę napowietrzano sterylnym powietrzem w ilości 10 mg na dm^3 . Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w wymienionych tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych. Doświadczenia wykazały, że zróżnicowana dawka drożdży ma istotny wpływ na zawartość siarczku dimetylu w piwie. Wraz z obniżaniem dawki drożdży zmniejszała się zawartość badanego komponentu piwa. Mniejsza koncentracja siarczku dimetylu wpływa korzystnie na właściwości sensoryczne produkowanego piwa.

Key words: wort, yeast pitching rate, dimethyl sulfide (DMS).

The aim of the article is show of results the influence of yeast pitching rate on the content of dimethyl sulfide (DMS) in beer produced on an industrial scale. The study was performed in industrial conditions – fermentation and maturation in cylindro-conical fermentation tanks with capacity of 3800 hl. Yeast for pitching was collected after secondary fermentation (third passage), in quantity from 5 to 9 mln cells per mL. The worts were aerated sterile air in quantity 10 mg O_2/L . 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 dimethyl sulfide in beer. With decreasing of yeast pitching rate, the concentration of DMS decreased. The less content of dimethyl sulfide has a positive effect on the quality of beer.

WPROWADZENIE

Związki siarkowe powstające podczas fermentacji brzeczki piwnej są jedną z ważniejszych grup związków, które w sposób istotny oddziałują na cechy sensoryczne piwa i jego stabilność smakową. Przyjmuje się, że związki siarkowe, podobnie jak i inne komponenty lotne piwa (diketony wycinalne, wyższe alkohole), mają ujemny wpływ na właściwości sensoryczne z uwagi na niski próg ich wyczuwalności [5, 7].

Podstawowym źródłem związków siarki w piwie są surowce piwowarskie. W czasie fermentacji i dojrzewania drożdże wytwarzają je jako produkty swoich przemian metabolicznych, niekiedy występowanie związków siarkowych może być rezultatem autolizy komórek drożdżowych lub infekcji wywołanej mikroflorą szkodliwą dla piwa [6].

W czasie fermentacji głównej, drożdże piwowarskie pobierając z brzeczki część S-metylometioniny (SMM) przekształcają ją do metioniny i wykorzystują jako potencjalne źródło siarki niezbędnej do przebiegu procesów życiowych zachodzących w komórce.

Ponadto w procesie fermentacji i leżakowania piwa, drożdże przekształcają dimetylosulfotlenek (DMSO) do dimetylosiarczku (DMS) przy udziale wytwarzanego przez nie enzymu reduktazy dimetylosulfotlenku. Przemiana zależy od wielu czynników, m.in. szczepu drożdży, temperatury fermentacji i pH brzeczki. Pewne ilości DMS i SO_2 są usuwane z fermentującej brzeczki wraz z wydzielającym się dwutlenkiem węgla [1, 2, 8].

Zawartość SO_2 w piwie zależy od składu brzeczki, m.in. zawartości aminokwasów, przede wszystkim metioniny i cysteiny, a także treoniny i izoleucyny, rodzaju węglowodanów, stężenia lipidów, ekstraktu brzeczki, zawartości tlenu a zwłaszcza szczepu drożdży. Wraz ze wzrostem stężenia tlenu w brzeczce nastawnej, zwiększa się ilość biomasy komórkowej, natomiast zmniejsza się tworzenie SO_2 podczas fermentacji [3, 9].

Z kolei podczas leżakowania, zawartość siarczku dimetylu nieznacznie wzrasta. W efekcie stężenie tego komponentu w gotowym piwie może przekraczać próg wyczuwalności sensorycznej, który określa się na poziomie $50 \mu g \cdot dm^{-3}$ [1, 5].

„Siarczek dimetylu (DMS) już przy niskich stężeniach wpływa niekorzystnie na cechy sensoryczne piwa, wywołując zapach gotowanych warzyw. Podobnie jak i inne związki siarki wprowadza do napoju obcą nutę zapachową, określaną jako warzywna lub kukurydziana” [5].

Końcowe stężenie DMS w piwie może wahać się w granicach od 14 do nawet 140 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [5].

MATERIAŁY I METODY

Opis badań

Przedmiotem zaprezentowanych w artykule badań był równoległy proces przemysłowej produkcji piwa w trzech tankofermentorach, z których pobierano próby przez 18 dni całego cyklu produkcyjnego. Brzeczki HG (High Gravity, 15,5°P) 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^3 . Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w wymienionych tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych.

Analityka

Analizy ilościowe i jakościowe siarczku dimetylu (DMS) wykonano z użyciem chromatografu gazowego GC 8000 Fisons Instruments (Ipswich, Anglia) z detektorem płomienio-jonizacyjnym (FID).

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

Parametry pracy chromatografu gazowego (GC)

Temperaturę programową 45°C zadano na 10 min, następnie jej wzrost z szybkością 5°C·min⁻¹ do 120°C, utrzymywano przez 8 min i obniżano do temp. 45°C z szybkością 15°C·min⁻¹. Temperatura strefy nastrzyku (dozownik) – 140°C, gaz nośny – hel o ciśnieniu 65 kPa, przepływ wynosił 4-6 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$.

Nastrzyk próbek za pomocą autosamplera HS-800, temperatura wygrzewania próbek – 40°C w czasie 40 minut, objętość nastrzyku (bez podziału – splitless) – 0,75 cm^3 , temperatura strzykawki autosamplera – 60°C. Stężenia ilościowe były kalkulowane według programu komputerowego na podstawie wyliczonych powierzchni pików.

Do rozdzielania służyła kolumna kapilarna DB-WAX (l = 60 m; d = 0,53 mm; f = 1 μm) z wypełnieniem wysokopolarnym (glikol polietylenowy – sieciowany).

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. Wykonano również analizę skupień oraz głównych składowych (PCA) przy użyciu programu statystycznego Statistica wersja 12 (StatSoft Polska, Kraków).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Ilość siarczku dimetylu w piwie kojarzona jest głównie z jakością słodu używanego do produkcji brzeczki oraz przemianą jego prekursora w trakcie operacji technologicznych na warzelnii.

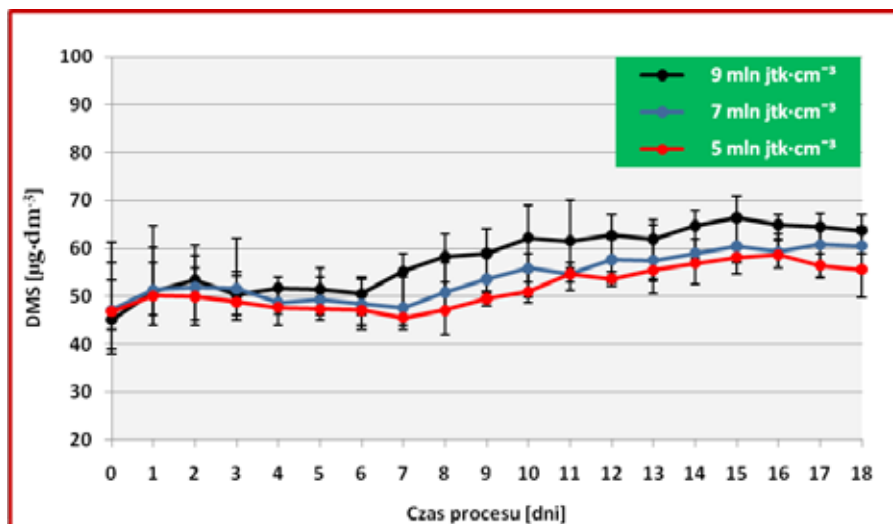
Siarczek obecny w piwie pochodzi z S-metylometoniny (SMM), której głównym prekursorem w słodzie jest aminokwas metionina oraz dimetylosulfotlenek siarczku (DMSO), jako utleniona forma DMS. Podczas suszenia słodu, w wyniku termodegradacji, a następnie w trakcie zacierania i filtracji zacieru oraz gotowania brzeczki, S-metylometonina przechodzi w utlenioną formę DMS czyli DMSO. Niewielką ilość SMM można również stwierdzić podczas fermentacji brzeczki. Dalszym przemianom związki siarki ulegają podczas gotowania brzeczki na warzelnii. W końcowym etapie, forma utleniona (DMSO) zostaje zredukowana (reduktazy drożdży) podczas fermentacji i dojrzewania do DMS.

W przeprowadzonych doświadczeniach, po napełnieniu tankofermentorów zawartość analizowanego związku we wszystkich zbiornikach wynosiła średnio 45-47 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Przez pierwsze dwa dni procesu, nastąpił wzrost stężenia do wartości powyżej 50 μg , a w kolejnym okresie zawartość DMS ulegała stopniowemu obniżaniu do 6 lub 7 doby, odpowiednio dla dawki drożdży 9 oraz 7 i 5 mln komórek w cm^3 . W kolejnych dobach (7-15) następował sukcesywny, powolny wzrost stężenia DMS. Najwyższa zastosowana dawka drożdży (9 mln komórek w cm^3) spowodowała zwiększenie koncentracji siarczku do około 64 μg (rys. 1). Stosunkowo szybki przyrost badanego związku rozpoczął się po odfermentowaniu brzeczki. Przemiany sulfotlenku dimetylu (DMSO) do DMS zależą głównie od żywotności komórek drożdży i współzależnej aktywności reduktaz. Próby inokulowane mniejszą ilością komórek odznaczały się istotnie większą ich żywotnością (97,5 %) w końcowej fazie procesu i tym samym zdolnością do redukcji prekursora DMS.

Z analizy statystycznej wynika, że zastosowanie dawki drożdży w ilości 5 i 7 mln komórek w cm^3 nie miało wpływu na średnią zawartość siarczku dimetylu w procesie fermentacji, która kształtowała się na poziomie 48 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Wzrost DMS o około 12 % do zawartości 54 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, uzyskano po wprowadzeniu wyższej dawki drożdży.

Różnice w kinetyce zmian zawartości DMS pomiędzy badanymi próbami są zobrazowane w tabeli 1, która przedstawia procentową zmianę siarczku dimetylu, w pierwszych ośmiu dniach procesu. Zebrane dane wskazują na istotne statystycznie różnice w odniesieniu do zawieszonych komórek drożdży w młodym piwie, szczególnie w początkowej i końcowej fazie fermentacji.

Uzyskane wyniki przedstawione na rys. 1 wskazują, że dawka drożdży ma istotny wpływ na koncentrację DMS w piwie. Wzrost dawki drożdży z 7 do 9 mln komórek w 1 cm^3 spowodował końcowe podwyższenie zawartości niekorzystnego DMS o około 10 %.

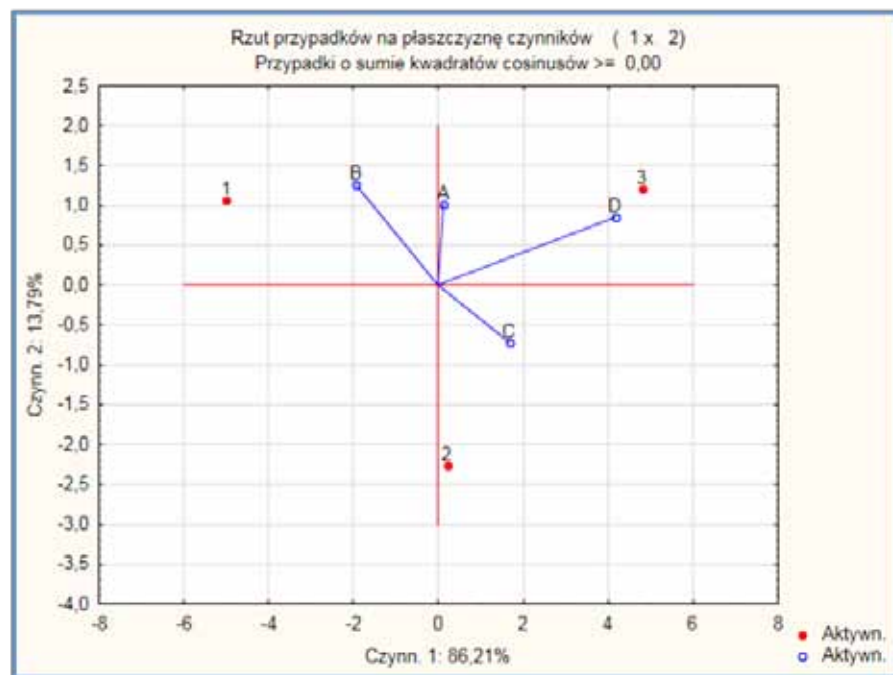


Rys. 1. Kształtowanie się zawartości siarczku dimetylu (DMS) w fermentującej brzeczce i dojrzewającym piwie, w zależności od dawki drożdży.

Fig. 1. The course of DMS content in fermenting wort and lagering beer, depending on yeast pitching rate.

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 2. Dwuwymiarowy wykres czynników głównych dla zawartości siarczku dimetylu i liczności drożdży w procesie fermentacji i dojrzewania piwa, w zależności od dawki drożdży.

Średnia liczebność drożdży w procesie: A – fermentacji, B – dojrzewania; średnia zawartość siarczku dimetylu w procesie: C – fermentacji, D – dojrzewania. Dawka drożdży [mln kom./ml]: 1 - 5, 2 - 7, 3 - 9.

Fig. 2. Two-dimensional graph of the main factors for the content of dimethyl sulfide and the number of yeast in the fermentation and maturation of beer, depending on the yeast pitching rate.

The average number of yeast: A - fermentation B - maturation; the average content of dimethyl sulfide in the process: C - fermentation, D - maturation. Yeast pitching rate [mln cells/ml]: 1 - 5, 2 - 7, 3 - 9.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Verbelen i in. [9] wykazały, że wraz ze wzrostem dawki drożdży w przedziale od 10 do 120 mln komórek drożdży w 1 cm³, zawartość DMS zmniejszała się z ilości 31 do 25 µg·dm⁻³.

Większa ilość komórek w fermentującej brzeczce oznacza także zwiększoną asymilację związków siarkowych, w tym i DMS. Zdaniem Hougha i in. [4] biomasa drożdży może zawierać od 0,2 do 0,9 % komponentów siarkowych w suchej masie.

W dalszych badaniach należałoby wyjaśnić czy siła enzymatyczna komórek jest wystarczająca do redukcji DMSO, w końcowej fazie dojrzewania, czy też warunki środowiskowe w tankofermentorach (ciśnienie hydrostatyczne, CO₂, etanol) oraz wyższa zawartość ekstraktu (technologie HGB) nie hamują tego procesu.

W przeprowadzonych doświadczeniach, w ostatnim dniu fermentacji liczebność zawieszonych komórek drożdży kształtowała się od 22,9 do 23,2 mln komórek w 1 cm³ fermentującej brzeczki. Określono również liczebność drożdży w leżakującym piwie w ilości od 10,4 do 6,2 mln komórek w 1 cm³ piwa.

Rysunek 2 jest podsumowaniem analizy głównych składowych (PCA) dla zawartości siarczku dimetylu i liczebności drożdży w procesie fermentacji i dojrzewania piwa, w zależności od dawki drożdży. Wektory zmiennych nie są zorientowane w tym samym kierunku co świadczy o ujemnym skorelowaniu zmiennych.

Najbardziej podobnymi profilami reakcji w przekroju wszystkich zmiennych charakteryzują się procesy, w których zastosowano początkowe dawki 7 i 9 mln komórek drożdży w 1 cm³ brzeczki. Z kolei mniejszą zależnością względem analizowanych cech odznaczał się proces prowadzony z udziałem 5 mln komórek drożdży.

Korelacja występuje głównie między zmiennymi A i B oraz C – w próbach charakteryzujących się większą liczbą komórek drożdży w procesie fermentacji i dojrzewania stwierdzano mniejsze ilości DMS.

Wykonane badania dowodzą, że początkowa dawka drożdży ma istotny wpływ na kinetykę zmian zawartości siarczku dimetylu w piwie.

Wykorzystując analizę skupień (metoda Warda), pogrupowano doświadczenia realizowane z różnymi dawkami drożdży (rys. 3), w zależności od końcowego stężenia DMS w piwie.

Analiza danych wykazała, że pierwszą grupę stanowią próby, w których zastosowano początkową dawkę drożdży w ilości 7 i 9 mln komórek w 1 cm³ brzeczki. Brzeczki fermentowane z mniejszą dawką drożdży (5 mln kom./cm³) charakteryzowały się mniejszą, bardziej korzystną zawartością siarczku dimetylu w piwie.

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ wielkości zastosowanej dawki drożdży do brzeczki w skali wielkoziornikowej na zawartość siarczku dimetylu (DMS) w piwie. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem dawki drożdży istotnie zwiększa się koncentracja badanego komponentu, co niekorzystnie wpływa na właściwości sensoryczne piwa.
2. Analiza uzyskanych wyników badań pozwala stwierdzić, że na koncentrację DMS wpływa pośredni ma także liczebność komórek drożdży w fermentującej brzeczce i leżakującym piwie. Brzeczki z wyższą początkową dawką drożdży charakteryzowały się mniejszym przyrostem liczby komórek drożdży i w konsekwencji mniejszą zawartością DMS w piwie.

LITERATURA

[1] **ANNES B., C. BAMFORTH. 1982.** „Dimethyl Sulphide – a review“. *Journal of the Institute of Brewing* 88: 244-252.

[2] **BACAE., K. BARANOWSKI. 2000.** „Związki siarkowe w brzeczce i piwie. Część 1”. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny* 2: 22-23.

[3] **BREWER J., M. FENTON. 1980.** “The formation of sulphur dioxide during fermentation”. *Process Convention of the Institute of Brewing (Australia&New Zeland)*: 155-164.

[4] **HOUGH J., D. BRIGGS, R. STEVENS, T. YOUNG. 1982.** *Malting and brewing science* 2nd edition volume, Aspen.

[5] **KUCHARCZYK K., C. PUCHALSKI. 2016.** “Wpływ temperatury fermentacji na zawartość siarczku dimetylu (DMS) w piwie produkowanym w technologii wielkoziornikowej”. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego* 1: 36 – 39.

[6] **SALAMON A., K. BARANOWSKI, E. BACA, D. MICHAŁOWSKA, D. ZIELIŃSKA, A.KAPKA. 2011.** „Ocena zawartości wybranych związków siarki w piwie w zależności od jakości słoðu i obróbki cieplnej brzeczki”. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 566: 193 - 204

Tabela 1. Zmiany zawartości DMS w trakcie fermentacji, w stosunku do jego początkowego stężenia [%]

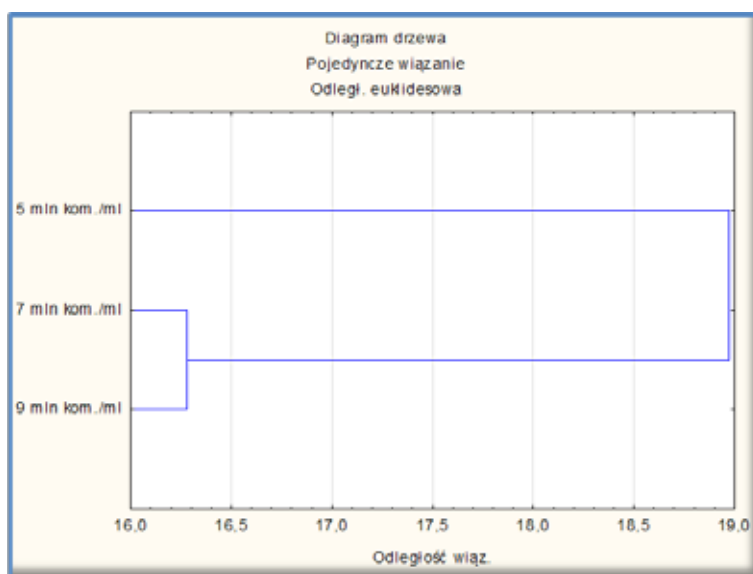
Table 1. The changes of DMS content during fermentation in relation to its initial concentration [%]

Wyszczególnienie	Doba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dawka drożdży [mln jtk/ml]								
5	5 b (±1)	3 (±2)	2 b (±0,5)	-2 (±0,5)	-1 (±0)	-2 (±0,3)	-5 (±0,1)	-3 (±0,1)
7	7 a (±0)	5 (±1)	4 a (±0,8)	-1 (±0,1)	0 (±0,1)	-2 (±0,3)	-5 (±0,7)	1 (±0,2)
9	10 b (±2)	13 (±1,5)	7 a (±0,9)	8 (±2)	8 (±1)	5 (±0,5)	13 (±3,0)	20 (±0,3)
ANOVA	ns	p=0,02	ns	ns	ns	ns	p=0,01	p=0,01

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



Rys. 3. Diagram podobieństwa analizowanych dawek drożdży w zależności od zawartości siarczku dimetylu.

Fig. 3. Diagram similarity analyzed yeast pitching rate depending on the content of dimethyl sulfide.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

[7] **VANDERHAEGEN B., H. NECEN, H. VERACHER, G. DERDELINCKX. 2007.** “The chemistry of beer aging – a critical review”. *Food Chemistry* 95: 357 – 381.

[8] **VAN DEN EYNDE E. 1991.** „The DMS story from malt and beer”. *Cerevisiae Biotechnology* 4: 4549.

[9] **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.