

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 CZASU NAPEŁNIANIA TANKOFERMENTORA NA PRZYROST BIOMASY DROŹDŹY W PIWIE PRODUKOWANYM W TECHNOLOGII WIELKOZBIORNIKOWEJ®

The influence of filling time of cylindro-conical tank on the growth of yeast biomass in beer produced on an industrial scale®

Słowa kluczowe: brzeczka piwna, tankofermentor, czas napełniania, biomasa drożdży.

W artykule przedstawiono wyniki badań wpływu zmiennego czasu napełniania tankofermentorów na przyrost biomasy drożdży w piwie produkowanym w technologii wielkozbiornikowej. Do brzeczki dodawano drożdże zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż) w ilości 7 mln komórek na cm^3 . Brzeczki napowietrzano sterylnym powietrzem w ilości 10 mg na dm^3 . Badanym parametrem był zmienny czas napełniania trzech tankofermentorów: 4,5 oraz 9 i 13,5 godziny.

Pozostałe parametry procesu fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w jednakowych warunkach technologicznych.

Wykazano, że zróżnicowany czas napełniania fermentorów ma istotny wpływ na przyrost biomasy drożdży w procesie fermentacji. Wraz ze zwiększaniem czasu napełniania tankofermentorów zwiększała się ilość nowopowstałych komórek drożdży. Większa ilość świeżej biomasy zapewnia lepszą dostępność drożdży do kolejnych procesów fermentacji.

Key words: wort, tankfermentor, filling time, yeast biomass.

The article shows results of the influence of different fermentors filling time on the yeast biomass development in beer produced on an industrial scale. Yeast for pitching was collected after secondary fermentation (third passage), in quantity 7 mln cells per cm^3 . The worts were aerated with sterile air at 10 mg O_2/dm^3 . The processes of fermentation and maturation was performed under the same technological conditions. The parameter studied was the filling time of three tankofermentors: 4.5, 9 and 13.5 hours.

The remaining parameters of the fermentation and maturation of beer in the fermentors were kept constant.

It was shown that the different time of filling had a significant impact on the growth of yeast biomass during fermentation. With increase in the time of fermentor filling the number of newly formed yeast cells increased. A larger amount of fresh biomass ensured better availability of yeast for subsequent fermentation processes.

WPROWADZENIE

Browary obecnie produkują piwo z wykorzystaniem zaawansowanej technologii w połączeniu z tradycyjnymi recepturami wytwarzania złocistego trunku. Warzonych jest wiele różnych rodzajów i stylów piwa na całym świecie. Podczas produkcji piwa, dominują przemiany biochemiczne związane z zacieraniem słodu, gotowaniem brzeczki, fermentacją, dojrzewaniem i procesem filtracji połączonym ze stabilizacją piwa. W czasie fermentacji drożdże wykorzystują dostępny w brzeczce ekstrakt do wytwarzania alkoholu etylowego i dwutlenku węgla oraz ubocznych produktów fermentacji. Udowodniono, że ze 100 g fermentujących cukrów około 6-7 g zużywane jest na przyrost biomasy drożdży [1].

Drożdże mają zasadniczy wpływ na jakość piwa. Produkują nie tylko etanol i dwutlenek węgla, ale i inne związki (wyższe alkohole, kwasy organiczne, estry, aldehydy, ketony,

związki siarki), które stanowią kluczową rolę w profilu sensorycznym napoju [6].

Komórki drożdży charakteryzują się szybkim wzrostem, dobrą zdolnością do produkcji etanolu i stosunkowo wysoką tolerancją na stresy środowiskowe [7].

Początkowe parametry procesu fermentacji mają istotny wpływ na szybkie zafermentowanie i prawidłowy przebieg całego procesu, dlatego zwraca się uwagę na dawkę drożdży, temperaturę nastawną, właściwy poziom napowietrzania sterylnym powietrzem oraz sposób napełniania fermentora. Po przeprowadzonej fermentacji, biomasa drożdży jest odprowadzona z tankofermentora i przechowywana w tankach drożdżowych z przeznaczeniem do kolejnego użycia [5].

Oddzielone po fermentacji drożdże są używane przez browary kilka razy (zwykle od 3 do 5). Odprowadzona po kolejnej fermentacji biomasa jest drugim (po wysłodzinach)

głównym produktem ubocznym powstającym podczas wytwarzania piwa. Odpadowa biomasa drożdży charakteryzuje się wysoką zawartością białka, soli mineralnych i witamin z grupy B, i używana jest głównie jako pasza dla zwierząt [2].

W warunkach przemysłowych metoda wydłużonego dostarczania tlenu celem optymalizacji fermentacji jest powszechnie stosowana w metodzie „multi-filling”, to znaczy kiedy pojemność tankofermentora przekracza objętość jednego wybicia brzezki. W takich warunkach duże zbiorniki fermentacyjne powinny być napełniane w sposób stopniowy kilkoma warkami. Napełnianie tankofermentora odbywa się wtedy kolejnymi warkami, zwykle po dostarczeniu pierwszej partii brzezki z drożdżami. Kolejna warka jest kierowana do innego fermentora i dopiero następne brzezki są kierowane do pierwszego zbiornika. Procedura ta pozwala osiągnąć do wolny czas całkowitego napełnienia tankofermentora.

Zmienny czas napełniania fermentora wpływa na czas namnażania drożdży, kinetykę fermentacji oraz profil organoleptyczny gotowego piwa [3].

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), w ilości 7 mln komórek na cm^3 brzezki. Procesy fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych.

Tankofermentory napełniano w trzech różnych przedziałach czasowych, stosownie do ustalonej przerwy w ich dopełnieniach po pierwszej warce (rys. 1).



Rys. 1. Sposób napełniania tankofermentorów.

Fig. 1. The way of filling of cylindro-conical tanks.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Napełnianie, a szczególnie dopełnianie tankofermentora brzezka z warzelnicy było różnicowane czasem trwania tego procesu. Pojemność CKT pozwalała na napełnienie maksymalnie trzema warkami. Brzezka pompowana z warzelnicy co 1,5 godziny. Tankofermentor A napełniano ciągle (bez przerwy) trzema warkami brzezki w ciągu 4,5 godziny. W drugiej wersji (tankofermentor B) po przepompowaniu pierwszej warki zastosowano przerwę 4,5 h, a następnie dopełniono tank dwoma warkami. Łączny czas napełniania fermentora wyniósł 9 godzin. W ostatnim przypadku (tankofermentor C),

po transferze pierwszej brzezki, pozostałe dwie warki dopełniono po 9 godzinach, co przyczyniło się do uzyskania całkowitego czasu 13,5 h.

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 programu produkcyjnego OTAS.

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.

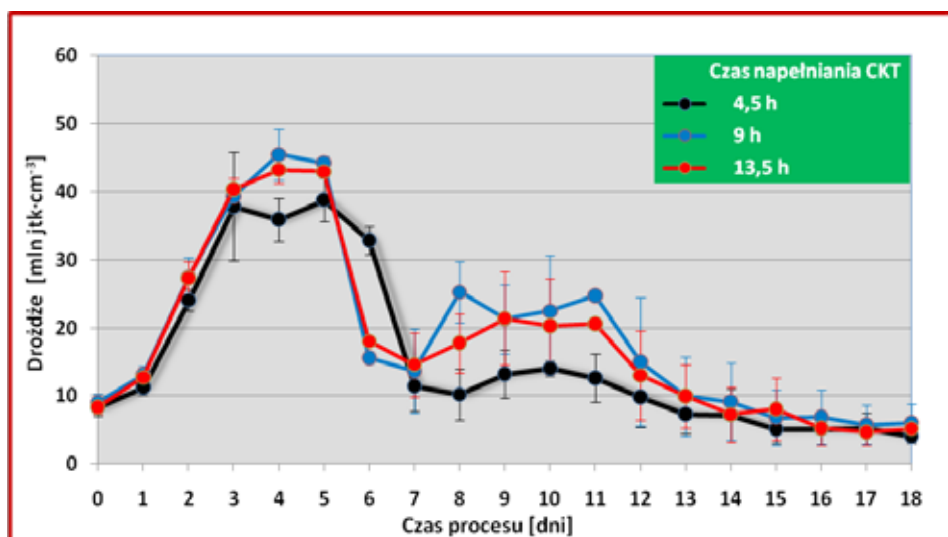
System ten identyfikuje i liczy pojedyncze komórki, które mają zabarwione DNA. Mikroskop fluoroscencyjny wbudowany w układ diagnostyczny składa się z diod emitujących światło, filtrów, soczewek i kamery CCD. Do specjalnej kasetki pobiera się odpowiednio przygotowaną (rozcieńczoną) próbę, która przechodząc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

Na rys. 2 zobrazowano zmiany liczebności komórek, w zależności od sposobu napełniania tankofermentorów. Wszystkie pomiary dotyczyły prób o początkowej liczbie 7 mln jtk· cm^{-3} . Do trzeciej doby fermentacji następował sukcesywny wzrost liczby komórek, średnio do 40 mln jtk w cm^3 . Największe namnożenie biomasy (45 i 42 mln jtk· cm^{-3}) stwierdzano w tankofermentorach dopełnianych warkami z zastosowaniem przerw. W piątym dniu procesu następowała już powolna sedymentacja drożdży w nastawach, w których oznaczano największy przyrost biomasy (CKT napełniane przez 9 i 13,5 h). W trzeciej próbie (czas napełniania 4,5 h) maksymalna liczba komórek zawieszonych kształtowała się w granicach od 33 do 38 mln w 1 cm^3 , a intensywny proces ich osiadania na dno zbiornika rozpoczął się w 6 dobie. W siódmej dobie flokulacja drożdży dobiegła końca, a oznaczana ich liczba w piwie wynosiła od 12 do 15 mln jtk· cm^{-3} . Przez kolejne dni koncentracja komórek w analizowanych

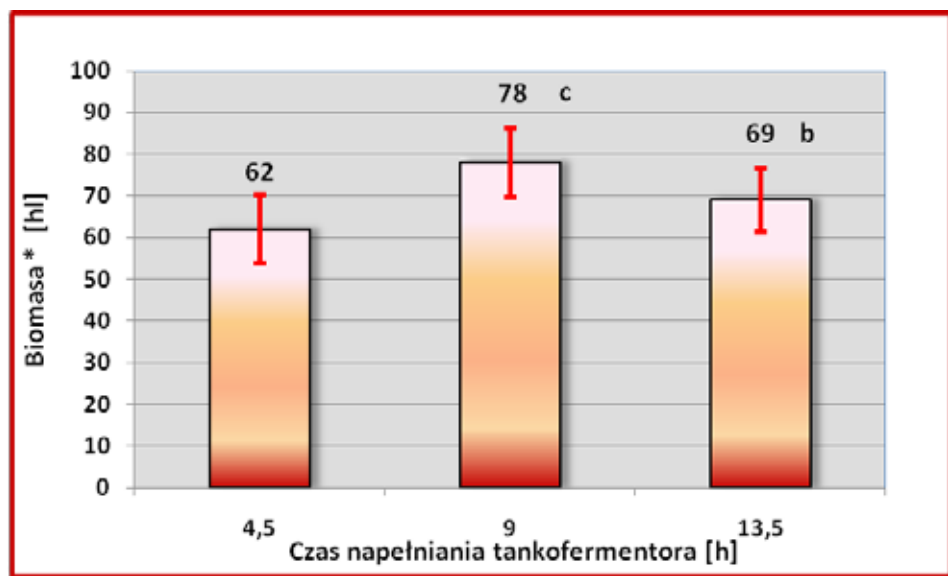


Rys. 2. Liczba komórek drożdży w fermentującej brzezce i dojrzewającym piwie, w zależności od czasu napełniania tanko fermentorów.

Fig. 2. Number of yeast cells in the fermenting wort and maturing beer, depending on the filling time of cylindro-conical tanks.

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 3. Objętość zebranej gęstwy drożdżowej w zależności od czasu napełniania tankofermentorów.

Fig. 3. The volume of harvested yeast slurry depending on the filling time of cylindro-conical tanks.

(* gęstość drożdżowa w przeliczeniu na koncentrację komórek: 10⁹ 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

próbach ponownie wzrastała, na skutek formowania się wysokiej warstwy gęstwy w stożku, aż do momentu odbioru drożdży w 10 i 12 dniu procesu.

Na podstawie liczby komórek odprowadzanych z tankofermentora do tanków drożdżowych, określano objętościowy przyrost biomasy (rys. 3), a następnie, po uwzględnieniu koncentracji, procentowy ich przyrost (rys. 4).

Z rysunku 4 wynika, że największe namnożenie drożdży (420%) następowało w fermentorze napełnianym przez 9 godzin. Z kolei w tankofermentorach, które były napełniane w sposób ciągły kolejnymi warkami brzezki, przyrost biomasy wynosił około 310%. Zauważalna jest również różnica w ilości biomasy pomiędzy próbami dopełnianymi przez 9 i 13,5 h. W fermentorze, który był dopełniany w czasie 9 h, powstało o 15 % więcej biomasy. Uzupełnianie prób napowietrzoną warką brzezki po przerwie (4,5 h) stwarzało korzystniejsze warunki do namnażania biomasy. Po zebraniu drożdży, pozostałe komórki w dojrzewającym piwie sedymentowały w sposób ciągły, aż do zakończenia procesu. Intensywne osiadanie komórek, w fermentorach napełnianych przez 9 i 13,5 h następowało pomiędzy 11 i 12 dobą procesu. W tym czasie rozpoczęto schładzanie zbiorników z 15 do -0,7°C (temperatura leżakowania). W ostatnim dniu procesu zarejestrowano podobne ilości komórek we wszystkich tankofermentorach (około 5 mln jtk·cm⁻³).

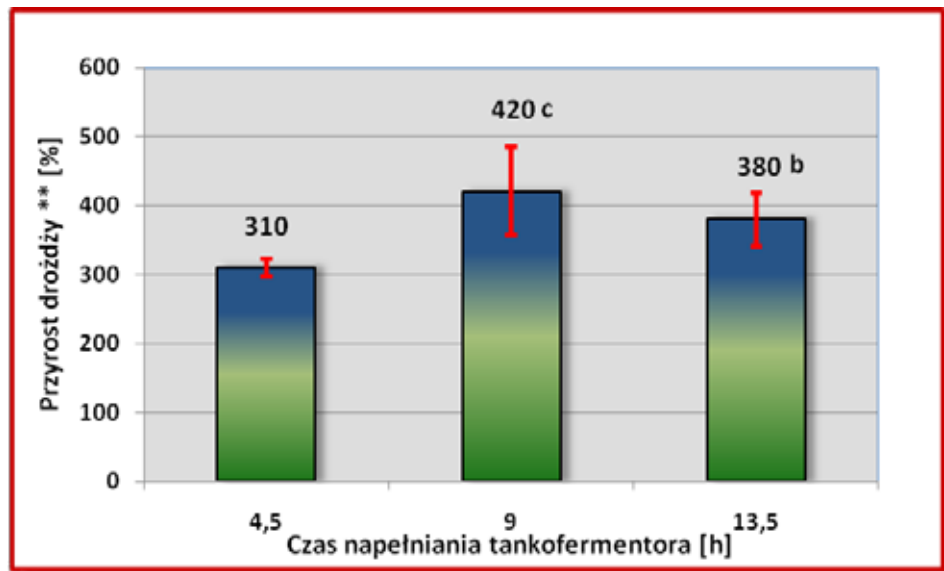
Wyniki doświadczeń wskazują, że dopełnianie fermentora po kilkugodzinnej przerwie (9 i 13,5 h) istotnie zwiększyło przyrost biomasy komórek z około 310 %, w przypadku standardowego napełniania bez stosowania przerwy, do około 420 %. Szybkość zużycia tlenu w brzezce przez drożdże pozwala wybrać optymalną metodę napełniania tankofermentora. Podobne wnioski z przeprowadzonych badań uzyskali Jones i in. [3] oraz Lodolo i Cantrel [4], w wyniku dodatkowego dostarczenia tlenu wraz z kolejnymi porcjami brzezki, uzyskali o ok. 30% większy przyrost biomasy.

Yokoyama i Ingledew [8] uzupełnili tankofermentor brzezka po 10-14 godzinach od momentu wprowadzenia pierwszej warki i wykazali stymulujący wpływ na rozmnażanie drożdży. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że doprowadzenie świeżej porcji napowietrzonej brzezki w warunkach przemysłowych po ponad 4-godzinnej przerwie, jest właściwym rozwiązaniem. W dopełnianej partii brzezki następowała szybka adaptacja i intensywne namnażanie komórek, w efekcie czego osiąga

się wysokie tempo fermentacji oraz odbudowę ekstraktu w całej objętości tankofermentora. W takiej sytuacji inokulacja pierwszej partii (warki) brzezki kierowanej do tankofermentora może być istotnie zmniejszona.

WNIOSKI

1. Wykazano istotny wpływ czasu napełniania tankofermentorów kolejnymi warkami brzezki na przyrost biomasy drożdży podczas procesu fermentacji. Wraz z wydłużeniem czasu napełniania następowało istotne zwiększenie liczby młodych komórek drożdży o wysokim potencjale fermentacyjnym.
2. Zwiększony przyrost aktywnej biomasy drożdży przyczynia się do poprawy kinetyki i efektywności fermentacji w kolejnych pasażach tej biomasy.



Rys. 4. Procentowy przyrost gęstwy drożdżowej w zależności od czasu napełniania tankofermentorów.

Fig. 4. Percentage increase of yeast slurry depending on the filling time of cylindrical tanks.

(** 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] FERREIRA I., O. PINHO, E. VIEIRA, J. TAVARELA. 2010. "Brewers's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications". Trends in Food Science and Technology 21: 77–84.
- [3] JONES H., A. MARGARITAS, R. STEWART. 2007. "The combined effect of oxygen supply strategy, inoculum size and temperature profile on Very-High-Gravity beer fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*". Journal of the Institute of Brewing 113: 168–184.
- [4] LODOLO E., I. CANTRELL. 2005. "Oxygen – friend and foe of yeast metabolism". The Institute of Brewing and Distilling 10: 42–51.
- [5] LODOLO E., J. KOCK, B. AXCELL, M. BROOKS. 2008. "The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing". FEMS Yeast Research 8: 1018–1036.
- [6] PINHO O., I. FERREIRA, L. SANTOS. 2006. "Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction". Journal of Chromatography 1121: 145–153.
- [7] PISKUR J., R. LANGKJAER. 2004. "Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics". Molecular Microbiology 53: 381–389.
- [8] YOKOYAMA A., W. INGLEDEW. 1997. "The effect of filling procedures on multi-fill fermentations". Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas 34: 320–327.