

Dr inż. Krzysztof KUCHARCZYK
 Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
 Dr hab. inż. Czesław PUCHALSKI prof. UR
 Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski w Rzeszowie

WPŁYW TEMPERATURY FERMENTACJI NA ZAWARTOŚĆ SIARCZKU DIMETYLU (DMS) W PIWIE PRODUKOWANYM W TECHNOLOGII WIELKOZBIORNIKOWEJ®

The influence of fermentation temperature on the content of dimethyl sulfide (DMS) in beer produced on an industrial scale®

Słowa kluczowe: brzeczka piwna, temperatura fermentacji, siarczek dimetylu (DMS).

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań dotyczących wpływu temperatury fermentacji 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 tej samej ilości do każdego tankofermentora. Brzeczkę napowietrzano sterylnym powietrzem w ilości 10 mg na dm³. Procesy fermentacji głównej przebiegały w trzech badanych temperaturach: 8,5; 10 i 11,5°C. Proces dojrzewania piwa w wymienionych tankofermentorach prowadzono w tych samych warunkach technologicznych. Doświadczenia wykazały, że zróżnicowana temperatura fermentacji ma istotny wpływ na zawartość siarczku dimetylu w piwie. Wraz ze wzrostem temperatury fermentacji zmniejszała się zawartość badanego komponentu piwa. Mniejsza koncentracja siarczku dimetylu wpływa korzystnie na właściwości sensoryczne produkowanego piwa.

Key words: wort, fermentation temperature, dimethyl sulfide (DMS).

The aim of the article is show of results the influence of wort fermentation temperature 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). The worts were aerated sterile air in quantity 10 mg O₂/L. The temperature of fermentation process was fixed (in the range) from 8,5 to 11,5°C. The experiments showed that varied temperature of fermentation wort had a significant impact on the content of dimethyl sulfide in beer. With increasing of fermentation temperature, the concentration of DMS decreased. The less content of dimethyl sulfide has a positive effect on the quality of beer.

WPROWADZENIE

Jedną z ważniejszych grup związków powstających podczas fermentacji brzeczki piwnej są związki siarkowe, które w sposób istotny oddziałują na cechy sensoryczne piwa i jego stabilność smakową. Ogólnie przyjmuje się, że związki siarkowe, podobnie jak i inne komponenty lotne piwa (diketony wicynalne, wyższe alkohole), mają ujemny wpływ na właściwości sensoryczne z uwagi na niski próg ich wyczuwalności [10].

W przemianach metabolicznych przy udziale drożdży i bakterii powstają lotne połączenia siarki, takie jak SO₂, H₂S, merkaptany, merkaptyle i disiarczki. Już w bardzo małych ilościach wywierają one wyraźnie negatywny wpływ na smak i zapach napoju [4].

Po przekroczeniu progu wyczuwalności sensorycznej, związki te nadają produktowi nieczysty smak młodego piwa. Pogorszenie zapachu i smaku może być wynikiem infekcji

brzeczki termofilnymi bakteriami, które również wytwarzają te połączenia jako produkty uboczne metabolizmu [6].

Siarczyny są produktami pośrednimi asymilacji siarczanów. Dalsze procesy ich redukcji prowadzą do biosyntezy aminokwasów siarkowych – cysteiny i metioniny. Przemiany te są kontrolowane genetycznie. Istotną rolę odgrywa układ sterowania zwrotnego przez wymienione metabolity [8].

Początkowa ilość siarczynów w brzeczce chmielonej jest bardzo mała, ponieważ podczas jej gotowania większość SO₂ utlenia się do siarczanów. Obecne w piwie siarczyny wytwarzane są głównie przez drożdże w procesie fermentacji głównej lub we wczesnej fazie dojrzewania piwa.

Podczas fermentacji część SO₂ usuwana jest z gazami fermentacyjnymi. Zawartość SO₂ w piwie zależy od składu brzeczki m.in. ilości aminokwasów, przede wszystkim metioniny i cysteiny, a także treoniny i izoleucyny, rodzaju węglowodanów, zawartości tlenu, stężenia lipidów, ilości

ekstraktu, a zwłaszcza szczepu drożdży. Wraz ze wzrostem tlenu w brzeczce nastawnej zwiększa się ilość biomasy komórkowej, natomiast zmniejsza się tworzenie SO_2 podczas fermentacji [3].

Wyższe stężenie lipidów w brzeczce nastawnej prowadzi do bardzo wyraźnej redukcji poziomu SO_2 w młodym piwie. Lipidy rzutują na asymilację aminokwasów, a te z kolei mają wpływ na wydzielanie SO_2 do środowiska. Im mniejsza zawartość lipidów w brzeczce, tym większe wydzielanie siarczynów. W początkowej fazie fermentacji biosynteza siarczynów jest prawie zerowa, a rozpoczyna się po logarytmicznej fazie wzrostu drożdży i wyczerpaniu się metioniny w środowisku [2].

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.

Jego ilość może wahać się w piwie w szerokich granicach od 14 do nawet $140 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Prekursorem DMS'u jest siarczek metylometioniny zawarty w słodzie najczęściej w ilości od 1 do $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Zmniejszenie ilości DMS następuje głównie w trakcie gotowania brzeczki w kotle warzelnym. W wyższych temperaturach fermentacji DMS zostaje także częściowo usunięty z dwutlenkiem węgla [4, 9].

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 $50 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [1].

MATERIAŁY I METODY

Opis badań

Przedmiotem badań był równoległy proces przemysłowej produkcji piwa w trzech tankofermentorach (ZKT), z których pobierano próby przez 18 dni całego cyklu produkcyjnego. Brzeczki HG (High Gravity, $15,5^\circ\text{P}$) 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 drożdże *Saccharomyces carlsbergensis* zebrane po drugiej fermentacji (trzeci pasaż). Wszystkie brzeczki były napowietrzane z tą samą intensywnością – $10 \text{ mg } \text{O}_2 / \text{dm}^3$. Procesy fermentacji głównej przebiegały w ZKT (A, B i C) w trzech badanych temperaturach: 8,5; 10 i $11,5^\circ\text{C}$. Proces 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 z detektorem płomieniowo-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)

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

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

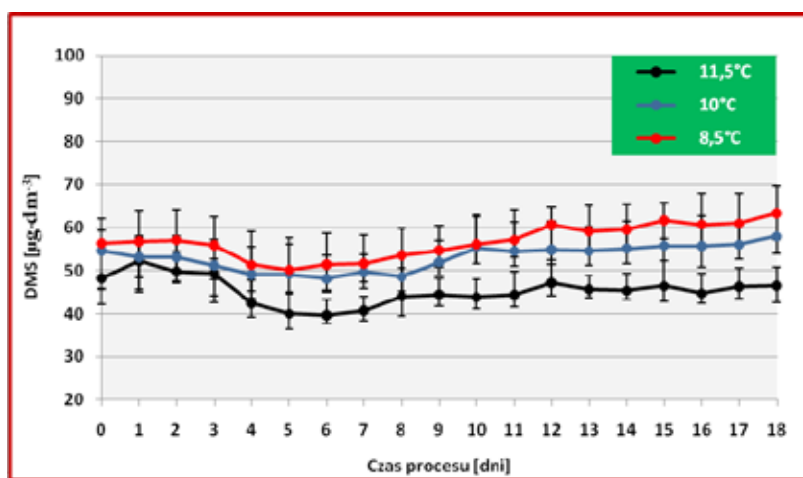
Do rozdziału służyła kolumna kapilarna DB-WAX ($l = 60 \text{ m}$; $d = 0,53 \text{ mm}$; $f = 1 \mu\text{m}$) z wypełnieniem wysokopolarnym (glikol polietylenowy – sieciowany).

Analiza statystyczna

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 10 (StatSoft Polska, Kraków).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Wpływ temperatury fermentacji na kształtowanie się DMS podczas procesu przedstawia rys. 1. W brzeczce nastawnej zawartość DMS zawierała się w przedziale między 48 a $55 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Przez pierwsze trzy dni fermentacji występowało zmienne stężenie badanego związku dla każdej z anali-



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

Fig. 1. The course of DMS content in fermenting wort and lagering beer, depending on temperature of fermentation.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

zowanych temperatur. Od trzeciej, aż do siódmej doby nastąpiło obniżanie się jego koncentracji o około 20%, w odniesieniu do zawartości w brzeczce.

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

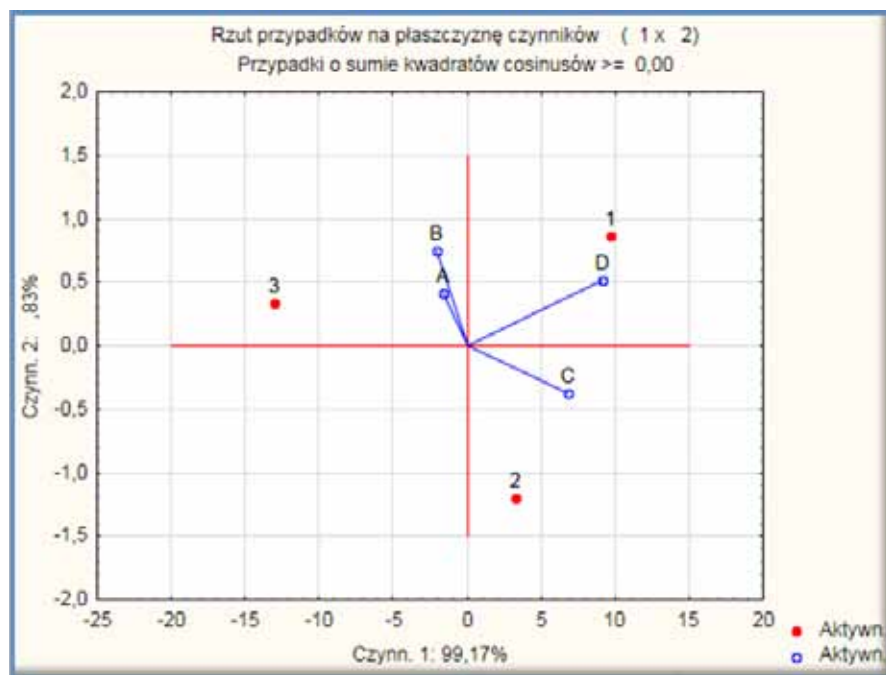
Table 1. The changes of DMS content during fermentation in relation to its initial concentration [%]

Wyszczególnienie	Doba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura fermentacji [°C]								
8,5	5 b (±1)	5 (±2)	1 b (±0,5)	-14 (±2)	-17 (±0)	-14 (±2)	-14 (±0,1)	-13 (±0,1)
10	-4 a (±0)	-10 (±1)	-6 a (±0,5)	-14 (±1)	-17 (±0,4)	-19 (±1)	-22 (±1)	-24 (±0,2)
11,5	4 b (±1)	-2 (±0,5)	-7 a (±1)	-30 (±3)	-28 (±1)	-35 (±0,5)	-33 (±3,5)	-27 (±0,2)
ANOVA	p=0,022	ns	p=0,024	ns	ns	ns	ns	ns

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

Średnia liczebność drożdży w procesie: A – fermentacji, B – dojrzewania; średnia zawartość siarczku dimetylu w procesie: C – fermentacji, D – dojrzewania.

Temperatura fermentacji: 1 – 8,5°C, 2 – 10°C, 3 – 11,5°C.

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 fermentation temperature.

The average number of yeast: A – fermentation B – maturation; the average content of dimethyl sulfide in the process: C – fermentation, D – maturation. Fermentation temperature: 1 – 8.5°C, 2 – 10°C, 3 – 11.5°C.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Po siódmym dniu procesu stwierdzano trwały trend przyrostu DMS, za wyjątkiem prób fermentowanych w temperaturze 11,5°C. Próby fermentowane w niższej temperaturze (8,5 i 10°C) charakteryzowały się niewielkim, bardzo powolnym wzrostem zawartości oznaczanego komponentu od 8 dnia procesu (od 53-56 do 58-65 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$).

W doświadczeniach wykazano stopniowy, ale niewielki wzrost stężenia siarczku dimetylu od rozpoczęcia procesu dojrzewania piwa (6-8 dzień). W fazie burzliwej fermentacji stężenie badanego składnika było stabilne lub obniżało się w stosunku do początkowej ilości oznaczonej w brzeczce po napełnieniu tanko-fermentora.

Różnice w kinetyce zmian zawartości DMS pomiędzy badanymi próbkami 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 fazie fermentacji.

Uzyskane wyniki przedstawione na rys. 1 i w tabeli 1 dowodzą, że temperatura fermentacji ma istotny wpływ na koncentrację DMS w piwie. Wzrost temperatury z 10°C do 11,5°C spowodował końcowe obniżenie zawartości niekorzystnego DMS o około 20%. Średnia zawartość tego związku przez cały okres trwania procesu w temperaturze 10°C wynosiła 51 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, a dla temperatury 11,5°C – 43 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Anness i Bamforth [1] pozwoliły stwierdzić, że wraz ze wzrostem temperatury następuje mniej intensywna redukcja dimetylosulfotlenku (DMSO) do DMS. Wykazano więc, że aktywność zawartej w drożdżach reduktazy DMSO maleje ze wzrostem temperatury. Podobne wyniki uzyskał w badaniach laboratoryjnych Lee [7].

Zwiększona temperatura fermentacji, przyczynia się do obniżania zawartości DMS również ze względu na zwiększony przyrost biomasy. Większa ilość komórek w fermentującej brzeczce oznacza także zwiększoną asymilację związków siarkowych, w tym i DMS. Zdaniem Hougha i in. [5] biomasa drożdży może zawierać od 0,2 do 0,9% komponentów siarkowych w suchej masie.

W przeprowadzonych doświadczeniach (skala przemysłowa) określono średnią liczebność zawieszonych drożdży:

23,2; 23,3 i 26,2 mln komórek w 1 ml fermentującej brzezki oraz: 6,5; 6,2 i 10,2 mln komórek w 1 ml leżakującego piwa, odpowiednio dla procesów prowadzonych w temperaturze: 8,5; 10 i 11,5°C.

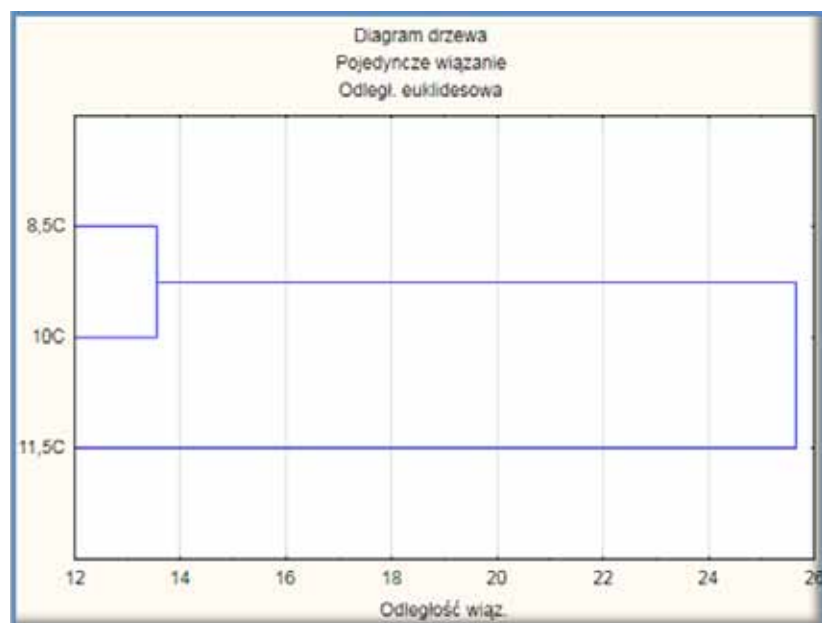
Rysunek 2 przedstawia podsumowanie wyników z analizy głównych składowych (PCA) dla zawartości siarczku dimetylu i liczebności drożdży w procesie fermentacji i dojrzewania piwa, w zależności od temperatury fermentacji. Wektory zmiennych nie są zorientowane w tym samym kierunku co świadczy o ujemnym skorelowaniu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

Najbardziej podobnymi profilami reakcji w przekroju wszystkich zmiennych charakteryzują się procesy, w których występowała temperatura fermentacji 8,5 i 10,0°C. Z kolei mniejszą zależność względem analizowanych cech odznaczał się proces prowadzony w temperaturze 11,5°C. Korelacja występuje głównie między zmiennymi A i B oraz C – w próbach charakteryzujących się większymi przyrostami drożdży w procesie fermentacji i dojrzewania stwierdzano mniejsze ilości DMS.

Wykonane badania dowodzą, że temperatura fermentacji ma istotny wpływ na kinetykę zmian zawartości siarczku dimetylu w piwie.

Wykorzystując analizę skupień (metoda Warda), pogrupowano doświadczenia realizowane w różnych temperaturach (rys. 3), w zależności od końcowego stężenia DMS w piwie.

Aglomeracja danych wykazała, że pierwszą grupę stanowią dopełniane tankofermentory, w których proces fermentacji przebiegał w 8,5 i 10°C. Piwo powstałe z brzezki fermentowanych w 11,5°C charakteryzowało się mniejszą, bardziej korzystną zawartością siarczku dimetylu.



Rys. 3. Diagram podobieństwa analizowanych temperatur fermentacji w zależności od zawartości siarczku dimetylu.

Fig. 3. Diagram similarity analyzed fermentation temperatures depending on the content of dimethyl sulfide.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

WNIOSKI

1. Wykazano istotny wpływ temperatury fermentacji brzezki w skali wielkoziornikowej na zawartość siarczku dimetylu (DMS) w piwie. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury fermentacji zmniejsza się koncentracja badanego komponentu, co korzystnie wpływa na właściwości sensoryczne produkowanego piwa.
2. Stwierdzono, że na kształtowanie się koncentracji DMS wpływ pośredni ma także liczebność komórek drożdży w fermentującej brzezce i leżakującym piwie. Brzezki fermentowane w wyższej temperaturze charakteryzowały się zwiększonym przyrostem liczby komórek drożdży.

LITERATURA

- [1] ANNESS B., C. BAMFORTH. 1982. „Dimethyl Sulphide – a review“. *Journal of the Institute of Brewing* 88: 244-252.
- [2] BACA E., K. BARANOWSKI. 2000. „Związki siarkowe w brzezce 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 Zealand)*: 155-164.
- [4] HANKE S., V. DITZ, M. HERRMANN, W. BACK, M. KROTTENHALER. 2012. „Influence on off flavours of fermentation by-products and linalool (part 2)”. *Brauwelt* 152: 922-925.
- [5] HOUGH J., D. BRIGGS, R. STEVENS, T. YOUNG. 1982. *Malting and brewing science 2nd edition volume*, Aspen.
- [6] KUNZE W. 1999. *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin.
- [7] LEE M., 2000. „Fermentation intensification– part IV: The effect of increasing fermentation temperature on yeast performance and flavor production”. *BRI Quarterly* 3: 5-12.
- [8] SALEK A., 2009. *Drożdże browarnicze a produkty uboczne fermentacji: związki siarkowe*. Wydawnictwo XIV Szkoły Technologii Fermentacji, Ciechocinek: 128-144.
- [9] WACKERBAUER K., U. BALZER, M. OHKOCHI. 1989. „The formation of DMS during fermentation”. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft* 42: 272-276.
- [10] VANDERHAEGEN B., H. NECEN, H. VERACHTER, G. DERDELINCKX. 2007. „The chemistry of beer aging – a critical review”. *Food Chemistry* 95: 357 – 381.