



dr inż. Aleksander Poreda, dr inż. Piotr Antkiewicz
Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Anna Borla
Koło Naukowe Technologów Fermentacji i Mikrobiologów, przy KTFiMT

Wielokrotne użycie gęstwy drożdżowej – aspekty praktyczne

Gospodarka drożdżami w browarze w istotny sposób wpływa na jakość piwa i wydajność procesu. Utrzymanie wysokiej witalności komórek drożdżowych zarówno w procesie fermentacji jak i leżakowania piwa oraz podczas magazynowania to priorytet w dzisiejszym browarnictwie. W przeszłości rozważano oddzielnie kwestie zarządzania drożdżami dolnej i górnej fermentacji, z uwagi na różnice związane ze sposobem zbioru drożdży po zakończonej fermentacji. Obecnie, ze względu na dominującą popularność zamkniętych tanków cylindryczno-konicznych, mechanizm flokulacji i sposób odbioru drożdży, klasyczny podział na drożdże dolnej i górnej fermentacji przestał obowiązywać jako główne kryterium.

Z uwagi na specyfikę technologii browarniczej, będącej zarazem „nauką jak i sztuką”, istnieje duże zróżnicowanie parametrów technicznych procesu fermentacji w obrębie różnych browarów. Wśród najważniejszych wyszczególnia się zazwyczaj początkowe stężenie biomasy, temperaturę, ciśnienie, intensywność mieszania, poziom zawartości tlenu, kształt i geometrię tanku, poziom napełnienia naczynia brzezka, itp. Odpowiednie sterowanie wymienionymi parametrami pozwala na uzyskanie produktu o właściwym profilu smakowo-zapachowym, jak również kontrolowany zbiór drożdży, charakteryzujących się zarówno wysoką żywotnością jak i odpowiednim wiekiem.

Temperatura fermentacji

Jednym z najważniejszych parametrów kontrolowanych podczas procesu fermentacji jest temperatura. Określa ona zarówno szybkość rozmnażania drożdży,



ich żywotność, intensywność i wydajność fermentacji, profil organoleptyczny uzyskiwanego produktu, a także witalność każdej kolejnej generacji drożdży odbieranych z dna naczynia w poszczególnych porcjach.

Badania wpływu temperatury fermentacji w przedziale od 15 do 35°C, w stosunku do różnych szczepów drożdży potwierdzają, że niektóre z nich funkcjonują lepiej w wyższej temperaturze, inne w niższej. Maksymalna liczebność kultury drożdżowej jest zazwyczaj podobna niezależnie



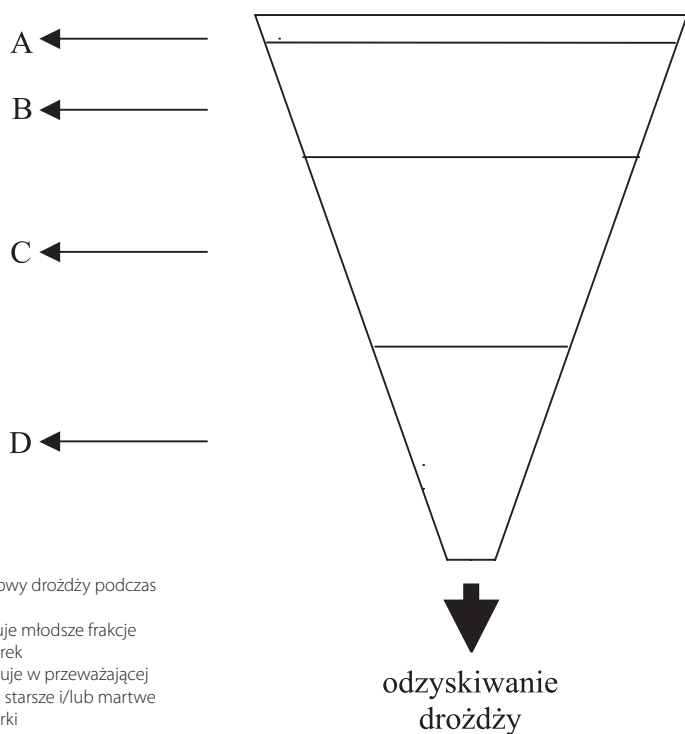
od temperatury, przy czym w niższej temperaturze osiągnięta jest z opóźnieniem i pozostaje stała przez dłuższy czas. Z kolei stosowanie temperatur wyższych może powodować obniżenie żywotności drożdży, szczególnie w temperaturach powyżej 30° C. W tych warunkach podwyższona temperatura działa synergistycznie z pozostałymi czynnikami stresowymi takimi jak: alkohol, ciśnienie hydrostatyczne, dwutlenek węgla, itp. Wraz z obniżaniem temperatury fermentacji, wzrasta wydajność etanolu, przy stosunkowo niskim stężeniu metabolitów wtórnych (ubocznych produktów fermentacji).

Autoliza i modyfikacje genetyczne – skutki dla jakości

Uwalnianie poautolitycznych substancji białkowych (np. enzymów proteolitycznych) z drożdży do środowiska wywiera szkodliwy wpływ na parametry jakościowe piwa, takie jak smak, barwa i jakość piany. Te negatywne zmiany powodowane są pośrednio przez rozpad protein czy polipeptydów z jednoczesnym uwolnieniem peptydów i aminokwasów. Wolne kwasy tłuszczowe uwolnione podczas autolizy również destabilizują pianę piwa i dodatkowo wywołują specyficzny posmak. W przypadku piw smakowych efekt autolizy drożdży nie jest postrzegany negatywnie - uwolnienie małych molekuł, takich jak aminokwasy czy nukleotydy może

być pomocna. Wprowadzenie tanków cylindryczno-konicznych, o określonym kącie nachylenia stożka (ok. 70°), umożliwia frakcjonowany odbiór gęstwy drożdżowej. Pozwala to usunąć drożdże autolizujące oraz uniknąć problemów związanych z uwalnianiem treści komórkowej do środowiska.

O wadze poruszanej tematyki związanej z gospodarką drożdżami, szczególnie w okresie tuż po zakończeniu fermentacji, niech świadczy fakt zainteresowania tym tematem na tegorocznym Światowym Kongresie Browarniczym 2008, który odbędzie się w sierpniu br., w Honolulu na Hawajach (*World Brewing Congress 2008*), któremu poświęcono jeden z modułów programowych. Wśród wielu referatów dotyczących tej tematyki, warto wspomnieć o pracy piwowarów z browaru Suntory w Kioto, którzy twierdzą, że nawet w przypadku zoptymalizowanych procedur odbioru i przechowywania drożdży, mogą zachodzić niepożądane zmiany w chromosomach komórek drożdży browarniczych, pod wpływem tlenu. Mogą powodować nieprawidłowy przebieg fermentacji objawiający się zmianami charakteru produktu gotowego. W wyniku tych obserwacji H. Kubota i współpracownicy zaproponowali nowy system, umożliwiający wykrywanie zmian w drożdżach i przewidywanie potencjalnych problemów w procesie produkcji. Proponowana mikromatryca, zawierająca wszystkie geny drożdży browarniczych, pozwala precyzyjnie wykryć zmiany w komórkach zmodyfikowanych genetycznie np., w wyniku natlenienia lub podwyższonej temperatury. Stworzona matryca jest tak zaprojektowana, aby wykrywać zmiany w tych regionach chromosomów, które są najbardziej podatne na zmiany pod wpływem technologicznych czynników stresogennych występujących w browarnictwie. Okresowe sprawdzanie jakości drożdży przy użyciu opisanej techniki pozwoliło znacznie poprawić gospodarkę drożdżami w browarze Suntory.



Rys. 1.
Gradient wiekowy drożdży podczas sedymentacji
A - ilustruje młodsze frakcje komórek
D - obrazuje w przeważającej części starsze i/lub martwe komórki
A, B i C - frakcje ponownie użyte do procesu fermentacji

wpływać pozytywnie na smak piwa. W browarach ryzyko ujawniania się wad poautolitycznych jest hamowane przez brak odpowiednich, szybkich metod testowych. Pomiar podstawowych parametrów gęstwy drożdżowej, takich jak żywotność czy liczebność jest bardzo ważny w przygotowaniu inokulatu, i w zależności od dostępnego zaplecza laboratoryjnego może być prowadzona na kilka sposobów. Jednak w przypadku ograniczeń technicznych czy czasowych, możliwość sterowania temperaturą i czasem odbioru drożdży może być bardzo

Odbiór i przechowywanie drożdży

Tradycyjnie wykorzystywano różne techniki odbioru drożdży z naczyń fermentacyjnych po zakończeniu procesu fermentacji. W przypadku drożdży fermentacji górnej czas zbioru drożdży miał zasadnicze znaczenie – zarówno pierwszy zbiór z osadem jak i ostatni odrzucono. Natomiast zbiór środkowy zatrzymywano w celu zaszczerpienia kolejnej porcji brzezki. Drożdże fermentacji dolnej, sedymentujące na dnie naczynia fermentacyjnego zbierano zazwyczaj nieselektywnie, w związku z czym zawierały one sporą porcję osadów zgromadzonych podczas fermentacji. Wprowadzenie tanków CKT i ich specyfika umożliwiają obecnie produkcję piwa zarówno przy użyciu drożdży górnej jak i dolnej fermentacji, oraz ich selektywny zbiór.

Badania morfologii drożdży wykazują, że wraz z wiekiem i krotnością ich podziałów następuje wzrost rozmiarów komórek (nawet o 150% oraz ich powierzchni od 41% do 92%) tych z ósmego podziału w stosunku do komórek młodych rozpoczynających pączkowanie. Dla drożdży browarniczych średnia „długość życia” w zależności od szczepu zamyka się w przedziale od 10 do 30 podziałów. Wielokrotność tych podziałów jest jednym z kryteriów ich przydatności do użycia w przemyśle.



W końcowym etapie procesu fermentacyjnego zawartość tanku jest chłodzona do 2-4 °C, co umożliwia sedymentację drożdży w stożku. Proces ten przebiega według zasady: na początku osadzają się komórki większe, później mniejsze, młodsze. W badaniach potwierdzono, że w niższych partiach stożka starsze komórki występują w większej ilości niż w wyższych jego regionach. Uwarstwienie może występować jako następstwo preferencyjnej sedymentacji populacji starszych komórek osiadających w pierwszej kolejności, z uwagi na ich większe rozmiary. Gradient wiekowy w obrębie stożka nabiera znaczenia, gdy rozpatrujemy mechanizmy umożliwiające usuwanie drożdży z naczynia.

Zazwyczaj drożdże są odbierane z tankofermentora w dwóch frakcjach. Pierwsza z nich składa się przede wszystkim z większych, starszych i martwych komórek wraz z osadem białkowym - całość zostaje odrzucona jako odpad (rys. 1 – D). Druga frakcja zawierająca komórki należące do średniej grupy wiekowej (B i C) zostaje przekazana do późniejszego użycia jako generacja do szczepienia w kolejnym cyklu fermentacyjnym. Istnieje alternatywna technika, która polega na usunięciu obecnych w stożku drożdży przed rozpoczęciem chłodzenia zawartości CKT, dzięki czemu część drożdży pozostaje zawieszona w fermentującej brzeczce. Ta procedura zwana jest „ciepłym” lub „wczesnym” obciążeniem (ang. *warm cropping*) i pozwala pozyskać większą proporcję komórek starszych, które mogą zostać wykorzystane do ponownego zaszczepienia. Prowadzona systematycznie w kolejnych rzutach fermentacyjnych pozwala na użycie specyficznej populacji drożdży o szczególnym, z góry założonym rozmiarze i wieku.

Przeciętnie kultura drożdży zawiera 50% komórek dziewiczych (z ang. *virgin cells*), 25% komórek pierwszej generacji, 12,5% komórek drugiej generacji itd. Z tego względu odpowiednio zaplanowany obciążenie może mieć wpływ na przebieg kolejnych fermentacji. Potencjalnie, skoro ekspresja genów zmienia się podczas życia komórki, to odpowiednia „równowaga wiekowa” może gwarantować uzyskanie gęstwy o optymalnych parametrach dla prowadzenia wydajnej fermentacji. Dlatego też szczepienie brzeczki w kolejnych cyklach fermentacyjnych powinno uwzględniać najwłaściwszą ekspresję genów gwarantującą równowagę wiekową stosowanych drożdży.

Użycie populacji bogatej w starsze komórki może wpłynąć na przebieg procesu fermentacji w różny sposób. Spadek żywotności połączony z powolniejszym podziałem może obniżyć rzeczywistą aktywność inokulatu i spowolnić wzrost kultury. Dodatkowo, w przypadku niektórych szczepów browarniczych starsze komórki macierzyste wykazują ograniczoną zdolność uwalniania (pączkujących) komórek potomnych. Komórki starsze charakteryzuje ziarnisty wygląd połączony z pojawieniem się zmarszczek na ich powierzchni. Porowatość powierzchni wzmacnia siłę adhezji, sprzyjając zjawisku flokulacji, odwrotnie niż w przypadku komórek młodych o gładkiej powierzchni. Dlatego też „przetrzywanie” komórek potomnych przez starsze komórki macierzyste, może prowadzić do przedwczesnej ich flokulacji, a tym samym niewystarczającego stopnia odfermentowania.

Warto również pamiętać, że zasadniczo czas wymagany do przejścia pełnego cyklu komórkowego jest stały, jednak pod koniec życia komórki (ostatnie 20%) czas podziału znacznie wzrasta, prawdopodobnie na skutek powolnego przejścia z fazy G1 do START. Z tego względu stosowanie inokulatu złożonego głównie z komórek starszych wiąże się z wydłużoną fazą *lag*. Jeżeli do szczepienia używamy głównie komórek młodych, to czas wymagany do osiągnięcia pierwszego ich podziału objawia się opóźnieniem aktywności fermentacyjnej. Komórki średnie rozpoczynają podział gwałtownie, skracając fazę *lag*. Reasumując, należy stwierdzić, że komórki – „matki” w wieku intensywnego pączkowania stanowią najbardziej odpowiednią frakcję użytego – inokulatu, gwarantującego szybki wzrost i wydajność przyrostu biomasy.

Gęstwa odebrana z tankofermentora powinna być odpowiednio przechowana do momentu ponownego jej użycia. Pomieszczenia działu propagacji i przechowywania drożdży muszą gwarantować utrzymanie czystości mikrobiologicznej dla wody i powietrza oraz odpowiednio niskiej temperatury ok. 0 °C). Drożdże najlepiej przechowuje się w piwie lub wodnym roztworze KH_2PO_4 o stężeniu 2%. W przypadku stosowania technologii HGB, należy pamiętać o wyższych niż zazwyczaj stężeniach etanolu, które może wpływać na spadek żywotności biomasy. Ważnym aspektem utrzymania żywotności drożdży jest minimalizowanie powierzchni kontaktu gęstwy z powietrzem i ograniczenie dostępności tlenu oraz maksymalne skracanie czasu od momentu odbioru drożdży do czasu ich ponownego zadania.

Podsumowanie

Gospodarka drożdżami to ważny i odpowiedzialny aspekt działalności technologicznej w browarze, który w istotny sposób decyduje o jakości piwa i wydajności procesu. Dlatego też priorytetowym zadaniem technologa jest utrzymanie wysokiej żywotności kultury drożdżowej oraz maksymalne skracanie czasu od momentu odbioru drożdży po zakończeniu fermentacji do czasu ich ponownego zadania.

Literatura

- Baker, M. G. & Smart, K. A. (1996). *Morphological changes associated with the cellular ageing of a brewing yeast strain*. J Am Soc Brew Chem 54, 121-126.
- Deans, K., Pinder, A., Catley, B. J. & Hodgson, J. a. (1997). *Effects of cone cropping and serial repitch on the distribution of cell ages in brewery yeast*. Proc Eur Brew Con 26, 469-476.
- George, E. (1996). *The influence of brewing yeast physiology on cell surface physical properties*. PhD thesis, Oxford Brookes University.
- Kennedy, B. K., Austriaco, N. R. & Guarente, L. (1994). *Daughter cells of Saccharomyces cerevisiae from old mothers display a reduced life span*. J Cell Biol 127, 1985-1993.
- Smart, K. A. (1999). Ageing in brewing yeast. Brew Guardian 128, 19-24.
- Kubota H., Nakao Y., Hatanaka H., Omura F., Takaoka S., Ito N., *The establishment of new yeast management system in our breweries*, World Brewing Congress 2008, O-7.
- Boulton C., *Managing large capacity cylindroconical fermentors, correlations between physical parameters, yeast dispersion, yeast metabolic activity, fermentation performance and beer quality*, World Brewing Congress 2008, O-41.