



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2013 – 2014

## Potentieel van brouwersgisten voor fermentatie onder industriële omstandigheden

**Maarten Bossaert**

Promotor: Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot

Tutor: Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van  
Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie





Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2013 – 2014

## Potentieel van brouwersgisten voor fermentatie onder industriële omstandigheden

**Maarten Bossaert**

Promotor: Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot

Tutor: Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van  
Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

## **Auteursrechtelijke bescherming**

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de scriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promoter give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis”.

6 juni 2014

Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot

Maarten Bossaert

## Woord vooraf

Een woord van dank is zeker op zijn plaats voor die mensen die ervoor gezorgd hebben dat ik tot in de masteropleiding geraakt ben. Daarbij denk ik vooral aan mijn ouders, die mij al die jaren gesteund hebben en mij vrij gelaten hebben om iets te doen waarbij ik me goed bij voelde. Ook An Vierstraete wil ik graag bedanken, die dankzij haar professionele begeleiding mijn studies weer op het juiste spoor gezet heeft.

In het kader van de masterproef zelf zijn er ook een aantal personen die zeker moeten worden bedankt. Eerst en vooral wil ik Prof. dr. sc. Anita Van Landschoot bedanken voor het aandragen van het onderwerp, het was de perfecte kans om op een wetenschappelijke manier bezig te zijn met één van mijn grootste passies. Daarnaast wil ik haar ook danken voor de hulp tijdens de masterproef en het nakijken van mijn werk.

De heer Pieter Maes wil ik ook graag bedanken voor de mogelijkheid om deze masterproef te koppelen aan een reëel vraagstuk uit de industrie. Hij leverde niet enkel de centrale onderzoeksvraag, maar voorzag mij ook op geregelde tijdstippen van het nodige onderzoeksmateriaal.

Verder wil ik dr. sc. Veerle Maervoet en mevrouw Dana Vanderputten bedanken voor de vele tips tijdens het praktisch werk en de verwerking van de resultaten. Een speciale dank gaat uit naar mevrouw Sylvie Vandoorne die mij met raad en daad bijgestaan heeft tijdens al het praktisch werk en mij met de vele toestellen heeft leren werken. Zonder haar hulp zou het praktisch werk een stuk meer tijd gekost hebben.

Als laatste wil ik ook mijn medestudenten Jolien, Liesbeth en Hellen bedanken voor de vele leuke momenten die bijgedragen hebben tot de sfeer in het labo.

## **Abstract**

Gist speelt een centrale rol in het brouwproces en het introduceren van een nieuwe gist heeft dan ook een grote impact op het uiteindelijke product. Het is net die grote impact die het belangrijk maakt om bij het selecteren van een nieuwe giststam rekening te houden met de huidige maar ook de toekomstige eisen die aan een gist zullen worden gesteld.

Het verhogen van de fermentatietemperatuur en het brouwen met high gravity wort zijn twee manieren om het brouwproces efficiënter te maken zonder grote investeringen en zullen in de toekomst steeds meer worden toegepast. Na een initiële screening op microliterschaal werden een aantal potentiële gisten geselecteerd om op laboschaal te onderzoeken hoe deze gisten zich gedroegen wanneer ze onderworpen werden aan verhoogde temperaturen en een verhoogd stamwortgehalte. De resultaten van deze experimenten werden gebruikt om enkele geschikte giststammen te selecteren om vervolgens op literschaal een verdere selectie te maken. De geselecteerde gist werd dan nog op hectoliterschaal getest alvorens geïmplementeerd te worden in het industriële brouwproces.

Uit het onderzoek bleek dat niet elke giststam even geschikt is voor de toekomstige brouwomstandigheden. De geteste droge gisten toonden gedurende dit onderzoek veel potentieel en het is dan ook een droge gist die als beste keus naar voor kwam in dit onderzoek.

Kernwoorden: High gravity, gist, fermentatie, droge gist

## **Abstract**

Yeast is a key-element in the brewing process and introducing a new strain of yeast therefore has a great influence on the overall product. When selecting a new yeast strain it is thus of the utmost importance to take into account both present and future demands concerning yeast.

Raising the fermentation temperature and brewing with high gravity wort both allow for a more efficient brewing process. Those techniques require only little investment, making them increasingly popular for the future. After an initial screening on microlitre scale, a number of possible yeast strains were selected for further research in the laboratory, where their effect of increased temperatures and a higher level of gravity was analysed. The results of this experiment then served to choose the yeast strains for further selection on litre scale.

Ultimately, the final yeast species was tested once more on hectolitre scale before implementing it in the industrial brewing process.

According to this research, not every yeast strain is equally suitable for future brewing conditions. Furthermore, the dried yeast species that were tested revealed a lot of potential, allowing one of them to be selected as the best one in this research.

Keywords: High gravity, yeast, dried yeast, fermentation

# Inhoudsopgave

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Inhoudsopgave.....                                          | 1  |
| Lijst met afkortingen .....                                 | 5  |
| Lijst met afbeeldingen en tabellen .....                    | 6  |
| Figuren .....                                               | 6  |
| Tabellen.....                                               | 8  |
| Inleiding.....                                              | 9  |
| Literatuurstudie.....                                       | 10 |
| 1.  Brouwersgist .....                                      | 10 |
| 1.1.  De voortplanting .....                                | 10 |
| 1.2.  Voedingsvereisten.....                                | 11 |
| 1.3.  Stadia van de gistaangroei .....                      | 12 |
| 1.4.  Suikertransport.....                                  | 12 |
| 1.5.  Suikermetabolisme in gist.....                        | 14 |
| 1.5.1.  De centrale metabolische pathway <sup>7</sup> ..... | 14 |
| 1.5.2.  Aeroob metabolisme <sup>7</sup> .....               | 16 |
| 1.5.3.  Anaeroob metabolisme <sup>5, 7</sup> .....          | 16 |
| 1.6.  Gistflocculatie <sup>8, 9</sup> .....                 | 17 |
| 1.6.1.  Fysische achtergrond .....                          | 18 |
| 1.6.2.  Genetische achtergrond .....                        | 18 |
| 1.6.3.  Fysiologische achtergrond.....                      | 19 |
| 2.  Het brouwproces .....                                   | 19 |
| 2.1.  Grondstoffen .....                                    | 19 |
| 2.2.  Processen in de brouwzaal .....                       | 21 |
| 2.3.  Fermentatie en afwerking <sup>5</sup> .....           | 23 |
| 3.  Gist in de bierproductie.....                           | 23 |
| 3.1.  Fermentatie .....                                     | 23 |
| 3.1.1.  Organische zuren en vetzuren <sup>5</sup> .....     | 24 |
| 3.1.2.  Carbonylverbindingen <sup>5</sup> .....             | 24 |
| 3.1.3.  Hogere alcoholen <sup>5</sup> .....                 | 25 |
| 3.1.4.  Esters <sup>5, 11</sup> .....                       | 26 |
| 3.1.5.  Zwavelhoudende componenten .....                    | 27 |

|        |                                                              |    |
|--------|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.   | Lagering .....                                               | 27 |
| 3.3.   | Hergisting op fles .....                                     | 29 |
| 3.4.   | Stressfactoren voor gist tijdens de productie van bier ..... | 30 |
| 3.4.1. | Ethanol <sup>4</sup> .....                                   | 30 |
| 3.4.2. | Osmotische stress <sup>4</sup> .....                         | 31 |
| 3.4.3. | Zuurstof <sup>14, 4</sup> .....                              | 32 |
| 3.4.4. | Temperatuur <sup>4</sup> .....                               | 33 |
| 3.4.5. | pH <sup>4</sup> .....                                        | 34 |
| 3.4.6. | Schaarste aan nutriënten <sup>4</sup> .....                  | 34 |
| 3.4.7. | Anaerobe shift <sup>4</sup> .....                            | 34 |
| 3.5.   | Brouwen met high gravity wort .....                          | 35 |
|        | Materiaal en methode .....                                   | 36 |
| 1.     | Gisten .....                                                 | 36 |
| 1.1.   | Giststammen .....                                            | 36 |
| 1.2.   | Vorbereiden inoculum .....                                   | 36 |
| 2.     | Opvolgen van een fermentatie .....                           | 37 |
| 2.1.   | Telling levende gistcellen door uitplating .....             | 37 |
| 2.2.   | Gisttelling telkamer Thoma .....                             | 38 |
| 2.3.   | Gisttelling Cellometer .....                                 | 38 |
| 2.4.   | Beer analyser Anton Paar .....                               | 38 |
| 2.4.1. | Principe .....                                               | 38 |
| 2.4.2. | Analyses .....                                               | 40 |
| 2.5.   | HPAEC – PAD (Dionex IC-3000) .....                           | 40 |
| 2.5.1. | Principe .....                                               | 40 |
| 2.5.2. | Standaarden en eluens .....                                  | 42 |
| 2.5.3. | Analyses .....                                               | 43 |
| 2.6.   | Fermentatieprofiel opstellen .....                           | 43 |
| 3.     | Kwaliteitsonderzoek wort en bier .....                       | 43 |
| 3.1.   | Opstellen suikerprofiel .....                                | 43 |
| 3.2.   | FAN-gehalte .....                                            | 44 |
| 3.2.1. | Reagentia .....                                              | 44 |
| 3.2.2. | Procedure wort .....                                         | 44 |
| 3.2.3. | Procedure bier .....                                         | 45 |



|        |                                                                          |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.   | Kleur .....                                                              | 45 |
| 3.4.   | Bitterheid.....                                                          | 45 |
| 3.4.1. | Reagentia.....                                                           | 45 |
| 3.4.2. | Procedure .....                                                          | 45 |
| 3.5.   | Totaal stikstofgehalte .....                                             | 45 |
| 3.5.1. | Principe .....                                                           | 45 |
| 3.5.2. | Protocol.....                                                            | 46 |
| 4.     | Fermentatie op laboschaal .....                                          | 46 |
| 4.1.   | Materiaal .....                                                          | 46 |
| 4.2.   | Werkwijze bij experimenten bij verschillende temperaturen.....           | 47 |
| 4.3.   | Werkwijze experimenten met verschillende stamwortgehaltenes .....        | 47 |
| 5.     | Fermentatie op literschaal .....                                         | 47 |
| 5.1.   | Materiaal .....                                                          | 47 |
| 5.2.   | Experiment op literschaal .....                                          | 48 |
| 6.     | Fermentatie in piloot installatie .....                                  | 48 |
|        | Resultaten en bespreking.....                                            | 49 |
| 1.     | Effect van temperatuur op de fermentatie.....                            | 49 |
| 1.1.   | Kwaliteitsonderzoek gebruikte wort .....                                 | 49 |
| 1.2.   | Het verloop van de fermentatie.....                                      | 50 |
| 1.3.   | Kenmerken van het groenbier .....                                        | 53 |
| 1.4.   | Viabiliteit van de gist na de fermentatie .....                          | 54 |
| 2.     | Effect van stamwortgehalte op de fermentatie op 50 ml schaal .....       | 55 |
| 2.1.   | Kwaliteitsonderzoek gebruikte wort .....                                 | 55 |
| 2.2.   | Het verloop van de fermentatie.....                                      | 55 |
| 2.3.   | Kenmerken van het groenbier .....                                        | 58 |
| 2.4.   | Viabiliteit van de gist na de fermentatie .....                          | 59 |
| 3.     | Effect van stamwortgehalte op de fermentatie op literschaal .....        | 60 |
| 3.1.   | Kwaliteitsonderzoek wort.....                                            | 60 |
| 3.2.   | Het verloop van de fermentatie.....                                      | 61 |
| 3.3.   | Kenmerken van het groenbier .....                                        | 64 |
| 3.4.   | Kenmerken van het bier na lageren.....                                   | 65 |
| 4.     | Effect van het verhogen van het fermentatievolume op de fermentatie..... | 66 |
| 4.1.   | Kwaliteitsonderzoek wort.....                                            | 66 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 4.2. Fermentatieprofiel ..... | 67 |
| Finale bespreking .....       | 68 |
| Algemeen besluit.....         | 74 |
| Referenties.....              | 76 |

## Lijst met afkortingen

°P: g opgeloste stof per 100 g wort

4VG: 4-vinyl guaiacol

ADH: alcohol dehydrogenase coderend gen

ATP/GTP: adenosine trifosfaat/guanine trifosfaat

cAMP: cyclisch adenosine monofosfaat

CCT: cilinderconische tank

CoA: co-enzyme A

DMS: dimethyl sulfide

EBC: maat voor de kleur van bier en de afkorting van European Brewery convention

EBU: European bitter unit

FADH: flavine adenine dinucleotide

FAN: free amino nitrogen of vrij aminostikstof

FLO: genen: genen die coderen voor flocculatie eiwitten

GSR: general stress response

HOG: high osmolarity glycerol

$K_m$ : substraat concentratie die nodig is om de helft van de maximale snelheid te bereiken

NAD(P)H: Nicotinamide adenine dinucleotide(fosfaat)

NIR: nabije infrarood

PDC: pyruvaat decarboxylase coderend gen

PDH: pyruvaat dehydrogenase coderend gen

ROS: reactive oxygen species

SOP: standard operating procedure

SUC genen: familie van genen die coderen voor invertase

TCD: thermische conductiviteits detector

VDK: vicinale diketonen

## Lijst met afbeeldingen en tabellen

### Figuren

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 1: Overzicht van de seksuele en de asexuele voortplanting bij <i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                | 10 |
| Figuur 2: Opname en verbruik van de fermenteerbare suikers (glucose, fructose, sucrose, maltose en maltotriose) van een wort met stamwortgehalte van 10 °P (= 10 suiker per 100 g) door een boven fermenterende gist bij 18 °C <sup>5</sup> .....                                                                                                           | 13 |
| Figuur 3: De drie mogelijke pathways voor de omzetting van pyruvaat in de gistcel <sup>7</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 15 |
| Figuur 4: Schema van de verschillende mechanismen die de redox balans onderhouden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Legende: Nde: NADH dehydrogenase; Gpd: oplosbaar glycerol 3-fosfaat dehydrogenase; Adh: alcoholdehydrogenase ; Gut: membraangebonden glycerol 3-fosfaat dehydrogenase ; cox: cytochroom c oxidase; bc1: bc1 complex <sup>7</sup> ..... | 16 |
| Figuur 5: Enkele belangrijke esters die bijdragen aan de smaak van het bier met hun concentratiegebied in bier, smaakdrempel en smaakbeschrijving <sup>11</sup> .....                                                                                                                                                                                       | 26 |
| Figuur 6: De meest voorkomende reacties voor de vorming van esters tijdens de fermentatie <sup>5</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                | 26 |
| Figuur 7: Overzicht van alle stressfactoren die gist ondervindt tijdens een industrieel brouwproces <sup>4</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                      | 30 |
| Figuur 8: Absorptiespectrum van ethanol in water <sup>19</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 40 |
| Figuur 9: Het golfvormig potentiaal aangelegd over de gouden elektrode <sup>20</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 41 |
| Figuur 10: Kleurreactie tussen aminozuren en ninhydrine .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 44 |
| Figuur 11: Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                                           | 50 |
| Figuur 12: Fermentatieprofiel van gist 2 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                                           | 51 |
| Figuur 13: Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                                           | 51 |
| Figuur 14: Fermentatieprofiel van gist 4 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                                           | 52 |
| Figuur 15: De viabiliteit na de fermentaties bij drie temperaturen (18, 25 en 30 °C), bepaald via uitplaten .....                                                                                                                                                                                                                                           | 54 |
| Figuur 16: De viabiliteit na de fermentaties bij drie temperaturen (18, 35 en 30 °C), bepaald met methyleenblauwkleuring .....                                                                                                                                                                                                                              | 54 |
| Figuur 17: Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                        | 56 |
| Figuur 18: : Fermentatieprofiel van gist 2 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                      | 56 |
| Figuur 19: Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....                                                                                                                                                        | 57 |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figuur 20: Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort ..... | 57 |
| Figuur 21: Viabiliteit na de fermentaties bij drie stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P), bepaald via uitplaten.....                                                                     | 59 |
| Figuur 22: Viabiliteit na de fermentaties bij drie stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P), bepaald met methyleenblauwkleuring .....                                                       | 59 |
| Figuur 23: Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....    | 61 |
| Figuur 24: Fermentatieprofiel van gist 4 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....    | 62 |
| Figuur 25: Fermentatieprofiel van gist 5 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort .....    | 62 |
| Figuur 26: De concentratie van maltotriose in functie van de tijd bij fermentatie van wort met stamwort 15,64 °P en de gisten 3,4 en 5. ....                                                         | 63 |
| Figuur 27: De concentraties van de vergistbare suikers (g/l) en alcohol (vol%) in functies van de tijd voor de fermentatie op hectoliterschaal met gist 5. ....                                      | 67 |
| Figuur 28: Decarboxylatie van ferulinezuur tot 4-vinylguaiacol <sup>28</sup> .....                                                                                                                   | 72 |

## Tabellen

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 1: Classificatie van de stikstofbronnen op volgorde van opname door de gist <sup>5</sup> .....                                                                                                                                                                             | 11 |
| Tabel 2: De meest voorkomende organische zuren en hun concentratierange in bier <sup>5</sup> .....                                                                                                                                                                               | 24 |
| Tabel 3: Overzicht van de kenmerken van de wort die gebruikt werd voor de studie van het effect van temperatuur op het fermentatieverloop.....                                                                                                                                   | 49 |
| Tabel 4: De resultaten van de gisting (in cellen/ml) na 13 dagen fermenteren bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) .....                                                                                                                                         | 52 |
| Tabel 5: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Er in °P), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en de % gevormde alcohol ten opzichte van verbruikte suiker .....                     | 53 |
| Tabel 6: Overzicht van de kenmerken van de wort (BRN 681) die gebruikt werd voor de studie van het effect van stamwortgehalte op het fermentatieverloop van 4 gisten.....                                                                                                        | 55 |
| Tabel 7: Het aantal cellen per ml, bepaald op het einde van de fermentatie .....                                                                                                                                                                                                 | 58 |
| Tabel 8: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en % gevormde alcohol ten opzichte van verbruikte suiker .....                        | 58 |
| Tabel 9: Overzicht van de kenmerken van de wort (1L) die gebruikt werd voor de studie van het effect van stamwortgehalte op het fermentatieverloop.....                                                                                                                          | 60 |
| Tabel 10: Glucoseconcentraties tijdens de eerste twee dagen van het experiment .....                                                                                                                                                                                             | 63 |
| Tabel 11: : Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p) en werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) .....                                                                            | 64 |
| Tabel 12: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier van het extra experiment met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en het oorspronkelijke stamwortgehalte (Extract in °P)..... | 64 |
| Tabel 13: Resultaten van de analyse van het bekomen bier na lageren met alcoholgehalte, schijnbaar extract, bitterheid en FAN.....                                                                                                                                               | 65 |
| Tabel 14: De concentratie van maltose en maltotriose gemeten na twee weken lageren .....                                                                                                                                                                                         | 66 |
| Tabel 15: Resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de wort die gebruikt werd voor de experimenten op hectoliterschaal .....                                                                                                                                                    | 66 |

## Inleiding

Gist speelt een centrale rol in het brouwproces en het introduceren van een nieuwe gist heeft dan ook een grote impact op het uiteindelijke product. Het is daarom belangrijk om bij het screenen naar een nieuwe gist rekening te houden met de huidige en toekomstige eisen waaraan die gist zal moeten voldoen.

Het verhogen van de fermentatietemperatuur en het brouwen met high gravity wordt zijn twee technieken die toelaten om het rendement in de brouwerij te verbeteren zonder grote investeringen te moeten doen. Het implementeren van deze technieken heeft ook een aantal nadelen zoals de verhoogde stress waaraan de gisten worden blootgesteld. Niet elke gist gaat op dezelfde manier om met deze stressvolle omstandigheden en het is voor de brouwer van groot belang dat zijn biergist er zo goed mogelijk kan mee omgaan om problemen tijdens de fermentatie te voorkomen. Gedurende dit onderzoek werd het potentieel van een aantal giststammen onderzocht voor de fermentatie onder industriële omstandigheden. De geselecteerde biergisten zijn stammen die bij de huidige industriële omstandigheden succesvol fermentaties uitvoeren dus werd er eerder gefocust op wat er in de toekomst zal veranderen. Zo werd er gekeken naar het effect van een verhoogde temperatuur en een verhoogd stamwortgehalte op de fermentatie.

De literatuurstudie gaat eerst dieper in op de biologie en het metabolisme van de gist om daarna een kort overzicht te geven van het gehele brouwproces om dit onderzoek beter te kunnen plaatsen. De stappen van het brouwproces die belangrijk zijn voor het gevoerde onderzoek zijn extra toegelicht. De informatie over de gebruikte toestellen en technieken komt aan bod in de sectie Materiaal en Methoden.

Voor aan deze masterproef begonnen werd, vond een initiële screening plaats op microschaal om een aantal potentieel interessante industriële giststammen te selecteren. De eerste fase van het onderzoek bestond erin om op laboschaal te onderzoeken hoe deze giststammen omgingen met de stress als gevolg van een hoge temperatuur, een hoog stamwortgehalte en een hoge alcoholconcentratie. Tijdens deze fase lag de focus vooral op het fermenterend vermogen en de invloed van de opgelegde omstandigheden op de viabiliteit van de gist. Na deze fase volgde een eerste evaluatie waarbij twee industriële giststammen meegenomen werden naar de volgende fase. De experimenten op literschaal lieten vervolgens toe om naast het fermenterend vermogen ook de kwaliteit van het verkregen bier na lagering te beoordelen. De laatste fase bestond uit het opschalen naar een industrieel niveau.

## Literatuurstudie

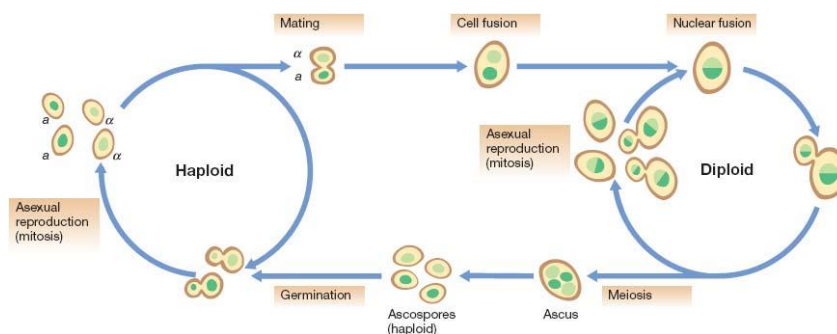
### 1. Brouwersgist

Drie *Saccharomyces* species zijn belangrijk bij de fermentatie voor de productie van bier. De hoge of boven fermenterende gisten behoren tot *Saccharomyces cerevisiae* en de lage of onder fermenterende gisten zijn te verdelen over twee *Saccharomyces* species: *pastorianus* en *bayanus* (gebruiksnaam *carlbergensis*). De voortplanting en de belangrijkste biochemie van deze gisten worden verder besproken.

#### 1.1. De voortplanting

De meeste gisten planten zich asexueel voort door middel van knopvorming. Bij sommige gisten is dit door binaire deling (bv. bij *Schizosaccharomyces pombe*). De gist die gebruikt wordt tijdens de productie van bier zal zich enkel asexueel kunnen voortplanten door knopvorming. Bij knopvorming ontstaat een uitstulping op cel die uitgroeit tot een nieuwe gistcel, die zich uiteindelijk afsplitsen van de oude cel. De nieuwe cel laat op de oude cel een litteken (bud scar) achter en heeft zelf ook een litteken (birth scar). Het aantal littekens is een indicator voor de ouderdom van een gistcel. Het resultaat is een oude en een nieuwe cel, beide van dezelfde ploëdie.<sup>1</sup>

Diploïde *Saccharomyces cerevisiae* heeft nog een alternatief voor de asexuele voortplanting (Figuur 1) namelijk de seksuele voortplanting via mating, het samensmelten van twee haploïde gistcellen. Deze manier van voortplanting gebeurt vooral wanneer de gist in een omgeving zit met weinig nutriënten.<sup>1</sup>



Figuur 1: Overzicht van de seksuele en de asexuele voortplanting bij *S. cerevisiae*<sup>1</sup>

De resulterende gistcel, een zygote, kan opnieuw delen, maar kan ook ascosporen vormen. *Saccharomyces* kan voorkomen als twee verschillende types haploïde cellen namelijk type a en type α, ook wel mating types genoemd. Het samensmelten van twee haploïde cellen is enkel mogelijk als beide cellen van een verschillend matingtype zijn. Bij sommige stammen kunnen de haploïde gistcellen niet wisselen van mating type terwijl andere stammen dat wel kunnen. De wissel gebeurt door het actieve mating gen te vervangen door één van de andere twee onderdrukte genen. Op de MAT locus wordt eerst het actieve mating gen verwijderd en vervolgens wordt het gen vervangen door een kopie van een nabij gelegen silent mastergen van het andere type.<sup>1</sup>



## 1.2. Voedingsvereisten

De belangrijkste voedingsvereiste voor gisten is, net zoals bij elk levend organisme, een koolstofbron, aangezien 50% van de droge stof van de cellen uit koolstof bestaat.<sup>2</sup>

De meeste giststammen gebruiken glucose als voornaamste bron van koolstof. Sommige hogere suikers worden door enzymen in de giststam omgezet. Dit gebeurt enkel als er geen glucose aanwezig is in de omgeving, omdat glucose optreedt als repressor voor de genen die coderen voor de betrokken enzymen (bv maltase voor de afbraak van maltose in twee glucosemoleculen). De suikers worden als gevolg van dit mechanisme in een heel specifieke volgorde opgenomen. De suikers worden dus niet enkel gebruikt als koolstofbron voor de groei maar ook als energiebron.<sup>2</sup>

Onder anaerobe condities wordt slechts 10% van de koolstof in het substraat omgezet in celmassa via de glycolyse, maar onder aerobe condities kan dit echter oplopen tot 55%. De suiker dient in het eerste geval ook als bron van zuurstofatomen voor de gist.<sup>2</sup>

Stikstof staat in voor ongeveer 10% van het gewicht aan droge stof van de gistcel. Het kan in verschillende vormen opgenomen worden en het wordt vooral gebruikt door het organisme om eiwitten op te bouwen. De belangrijkste *Saccharomyces* gisten kunnen N<sub>2</sub> niet fixeren en kunnen geen eiwitten gebruiken als stikstofbron. Brouwersgist kan volgende stikstof bevattende moleculen gebruiken om aan zijn noden te voldoen: stikstof onder de vorm van ammoniumzouten, ammoniak als overdrachtsvorm, aminozuren en korte peptiden. Peptiden die langer zijn dan vijf aminozuren en eiwitten kunnen niet gebruikt worden. Ook de opname van de verschillende stikstofbronnen gebeurt in een heel specifieke volgorde. Aminozuren van groep A worden het eerst en het snelst opgenomen. Aminozuren van groep B worden trager opgenomen en aminozuren van groep C worden pas opgenomen wanneer de aminozuren van groep A en B zijn opgenomen. Het stikstof onder de vorm van ammonium wordt gelijktijdig met de aminozuren van groep C opgenomen. Proline wordt niet opgenomen door de giststam onder fermentatiecondities. Wanneer er echter een tekort dreigt aan stikstof zal de gist overschakelen naar een aspecifieke opname van stikstof of de opname van de verschillende stikstofbronnen in een willekeurige volgorde. Zelfs de opname van proline als stikstofbron behoort dan tot de mogelijkheden.<sup>3, 4</sup>

**Tabel 1: Classificatie van de stikstofbronnen op volgorde van opname door de gist<sup>5</sup>**

| Class A    | Class B    | Class C       | Class D |
|------------|------------|---------------|---------|
| Arginine   | Histidine  | Alanine       | Proline |
| Asparagine | Isoleucine | Ammonia       |         |
| Aspartate  | Leucine    | Glycine       |         |
| Glutamate  | Methionine | Phenylalanine |         |
| Glutamine  | Valine     | Tryptophan    |         |
| Lysine     |            | Tyrosine      |         |
| Serine     |            |               |         |
| Threonine  |            |               |         |

Naast voorgaande componenten zijn er nog een aantal organische componenten die nodig zijn in kleine hoeveelheden zoals vitaminen, purines, pyrimidines en vetzuren. De vitaminen worden gebruikt als bouwstenen of als cofactoren. Biotine is de belangrijkste vitamine voor gisten. De purines en pyrimidines worden gebruikt voor de synthese van DNA en RNA in de celkern en de vetzuren zijn nodig bij de synthese van de verschillende vetten in de gist.

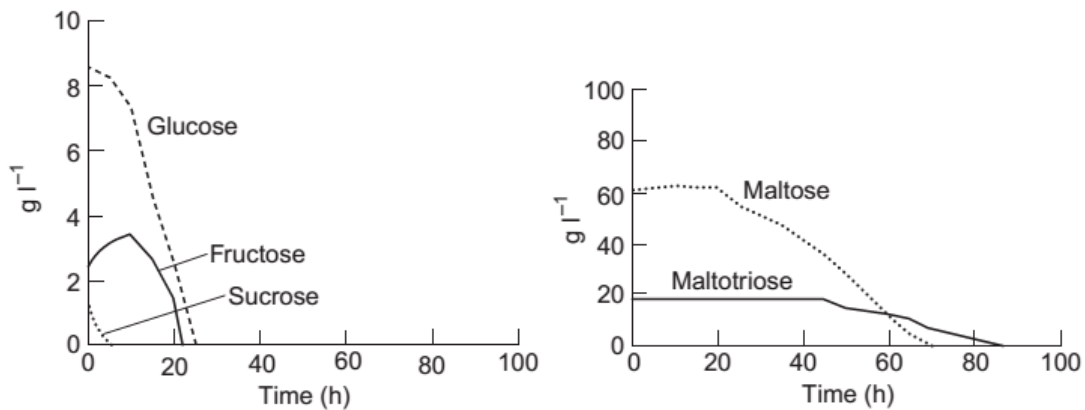
### **1.3. Stadia van de gistaangroei**

Gist heeft in theorie een exponentiële groeicurve, maar in de praktijk kan die exponentiële groei niet oneindig doorgaan. In een batch cultuur, zoals tijdens de propagatie, krijgen we een aangepaste groeicurve met vier fasen: de lag fase, de exponentiële fase, de stationaire fase en de afstervingsfase. Vooral de exponentiële fase en de stationaire fase zijn belangrijk voor de brouwer. De exponentiële fase is vooral van belang tijdens de propagatie terwijl de stationaire fase vooral van belang is tijdens de eigenlijke fermentatie<sup>1</sup>.

De lag fase is als de tijd die de gistcultuur nodig heeft om zich aan te passen aan de nieuwe omstandigheden. De duur van deze fase is dus sterk afhankelijk van de voorgeschiedenis van de cultuur en van de omgeving waarin de nieuwe cultuur terechtkomt. Na de lag fase is er de exponentiële fase, waarbij er aangroei is van celmassa. De duur van de exponentiële groei is in de praktijk gelimiteerd en dit door twee fenomenen. Ten eerste zullen de essentiële voedingsstoffen aanwezig in het medium uitgeput raken en ten tweede zullen de geproduceerde afvalstoffen de groei van nieuwe gistcellen inhiberen. De gistcellen komen vervolgens in de stationaire fase. Er is wel nog celdeling maar geen toename in aantal gistcellen door het evenwicht tussen aangroei en het afsterven van cellen. Door uitputting van de aanwezige voedingscomponenten en door de aanwezigheid van toxische afbraakproducten kan de gistcultuur beginnen afsterven. In de afstervingsfase neemt de celmassa af omdat er meer cellen afsterven dan er bijkomen.

### **1.4. Suikertransport**

Het is belangrijk om te weten op welke manier de verschillende suikers door de gistcellen worden opgenomen. De monosachariden kunnen de cel binnendringen door het semipermeabel membraan via passieve diffusie, maar het suikertransport zal toch gebeuren aan de hand van actieve transporters tegen de concentratiegradiënt in. De controle op het suikertransport is een complex en sterk gereguleerd proces en de suikers worden dan ook in een vaste volgorde opgenomen vanuit de wort (zie Figuur 2).<sup>5</sup>



**Figuur 2: Opname en verbruik van de fermenteerbare suikers (glucose, fructose, sucrose, maltose en maltotriose) van een wort met stamwortgehalte van 10 °P (= 10 suiker per 100 g) door een boven fermenterende gist bij 18 °C<sup>5</sup>**

De opname van glucose en fructose gebeurt simultaan en sucrose wordt in het periplasma omgezet naar fructose en glucose door het enzym invertase ( $\beta$ -D-fructofuranosidase, EC 3.2.1.26)<sup>6</sup>. Glucose en fructose kunnen direct gebruikt worden in het aerobe en anaerobe metabolisme via de glycolyse en zullen dus in de eerste uren van de fermentatie opgebruikt worden. Pas nadat deze suikers onder een detecteerbare concentratie gaan, zal de opname van maltose beginnen. Na maltose zal de gist verder gaan met maltotriose als suikerbron.<sup>5</sup>

Er zijn een veelvoud aan hexose transporters geïdentificeerd in verschillende giststammen. Glucose is telkens het geprefereerde substraat, maar ook andere hexosen kunnen getransporteerd worden doorheen het membraan. Er zijn twee type transporters voor hexosen, namelijk hoge affiniteit en lage affiniteit transporters. De transporters voor D-glucose en D-fructose zijn hoge affiniteit transporters onder de vorm van transporteiwitten die in het membraan zitten en suikers binnenbrengen onafhankelijk van de suikerconcentratie. Ze hebben een  $K_m$  waarde van ongeveer 1 mM. De opname gaat gepaard met een fosforylatie van de suikermolecule door de hexokinasen en de glucokinasen uit de glycolyse.<sup>5</sup>

De snelheid van de opname van sucrose hangt samen met het aanmaken van invertase door de SUC genen. Het invertase wordt gesecreteerd in het periplasma van de gistcel en is verantwoordelijk voor de omzetting van sucrose in D-glucose en D-fructose, die vervolgens via de hexose transporters binnengebracht worden in de cel.<sup>5</sup>

Maltose is het belangrijkste suiker in wort (tot 50 %) en de opname en het verbruik ervan in de gist wordt gereguleerd door de MAL genen. Deze coderen onder andere voor een maltose transporteiwit, maltase (EC 3.2.1.20) en een post-translationele regulator voor het transporteiwit en maltase. De transcriptie van de genen wordt onderdrukt door de aanwezigheid van glucose en wordt geïnduceerd door de aanwezigheid van maltose. De maltose transporteiwitten worden gecombineerd met het maltase zodat het maltose bij het binnenkomen van de cel direct wordt gesplitst in twee glucose eenheden.

## 1.5. Suikermetabolisme in gist

Gist dankt zijn succes voor diverse toepassing vooral aan de mogelijkheid om zich aan te passen aan een enorm variabele omgeving. De centrale metabolische pathways zijn voor elke giststam dezelfde, maar de mechanismen voor het opnemen van voedingsstoffen, het aantal iso-enzymen en het reguleren van de fermentatie verschillen enorm.

Gist haalt zijn energie uit de oxidatie van organische moleculen en die doen tegelijkertijd dienst als koolstofbron. Er is in de natuur een enorme variëteit aan koolstofbronnen die door de gist kunnen worden gebruikt, maar suikers zijn altijd de te prefereren bron. Brouwersgisten zijn facultatief anaerobe gisten omdat ze hun energie kunnen halen uit respiratie, fermentatie of een combinatie van beide systemen.<sup>7</sup>

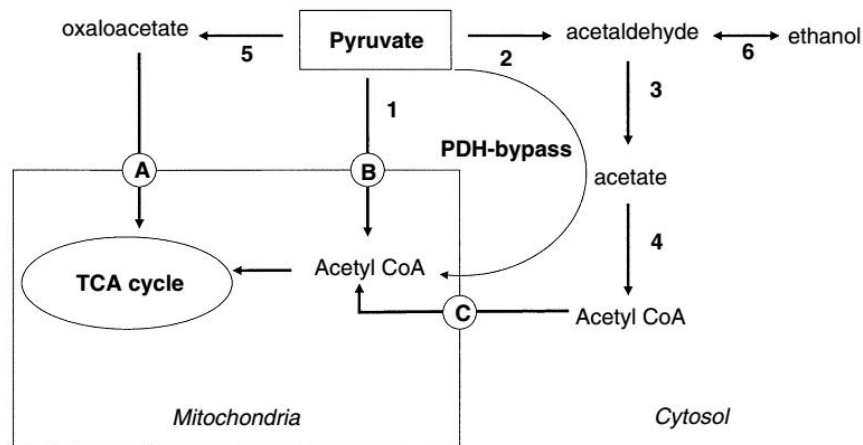
De suikersamenstelling van het medium en de beschikbaarheid van zuurstof zijn de meest bepalende omgevingsfactoren op het verloop van het metabolisme. Door te variëren met deze twee factoren kunnen twee verschillende effecten waargenomen worden. Een eerste effect is de deactivatie van de anaerobe fermentatie bij lage suikerconcentraties of het Pasteur effect. Dit wordt bij *S. cerevisiae* enkel waargenomen onder speciale condities, namelijk tijdens groei bij een lage suikerconcentratie en voldoende zuurstof. Bij die omstandigheden zorgt de respiratie voor zo goed als alle ATP en is de fermentatie uitgeschakeld. Men maakt hiervan gretig gebruik bij de gistproductie. Door de suikerconcentratie voldoende laag te houden bij het opgroeien van de gist gaat al de toegevoegde suiker naar de aangroei van celmassa en is er nagenoeg geen omzetting van suiker naar alcohol.<sup>7</sup>

Een tweede effect is het vormen van alcohol onder aerobe condities ofwel het Crabtree effect. Dit is alcoholische fermentatie onder aerobe condities bij een overmaat van suiker wat verder evalueert tot een mengeling van respiratie en fermentatie. Het effect is te verklaren door het verschil in snelheid van de glycolyse en de daaropvolgende stappen van het aeroob metabolisme. Het aangemaakte pyruvaat kan niet snel genoeg afgebroken worden en wordt omgezet in ethanol om het gevormde NADH terug te kunnen recupereren. Dit effect speelt een belangrijke rol in het begin van de bierfermentatie van de met zuurstof gesatureerde wort en zorgt ervoor dat er tijdens de aangroei van celmassa ook al vorming is van ethanol. Het Crabtree effect treedt natuurlijk ook op bij de propagatie van gist op wort.<sup>7</sup>

### 1.5.1. De centrale metabolische pathway<sup>7</sup>

De centrale metabolische pathway van gist bestaat uit drie grote reactiewegen namelijk de glycolyse waarbij glucose omgezet wordt naar pyruvaat, de omzetting van pyruvaat en de citroenzuurcyclus. De omzetting van pyruvaat gebeurt in een gistcel vooral op volgende drie verschillende manieren.(zie Figuur 3).

Pyruvaat kan rechtstreeks omgezet worden naar acetyl-CoA met behulp van het multi-enzym complex pyruvaat dehydrogenase (1) nadat het met behulp van een mitochondriale pyruvaat carrier in de mitochondriën werd gebracht.



**Figuur 3: De drie mogelijke pathways voor de omzetting van pyruvaat in de gistcel<sup>7</sup>**

Pyruvaat kan ook omgezet worden in acetaldehyde met behulp van pyruvaat decarboxylase(2). Acetaldehyde kan dan verder omgezet worden in ethanol door alcohol dehydrogenase of in acetaat door acetaldehyde dehydrogenase(3). Deze laatste omzetting maakt deel uit van de PDH-bypass of de pyruvaat dehydrogenase bypass. Daarin wordt acetaat verder omgezet in acetyl-CoA door acetyl-CoA synthetase. Dat acetyl-CoA wordt vervolgens getransporteerd van het cytosol naar de mitochondriën. Een derde mogelijkheid is de omzetting van pyruvaat naar oxaloacetaat door pyruvaat carboxylase. Het gevormde oxaloacetaat wordt rechtstreeks in de citroenzuurcyclus gebruikt.

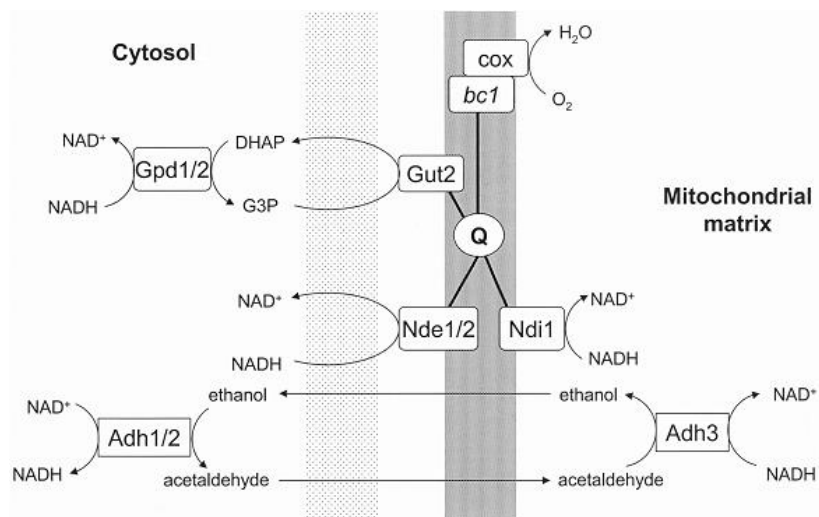
Het PDH-complex heeft de hoogste affiniteit voor pyruvaat, dus bij lage suikerconcentraties zal het meeste pyruvaat hierdoor omgezet. Bij stijgende suikerconcentraties zullen het PDH complex en de PDH bypass verzadigd geraken en kan de vorming van ethanol starten. Hoge suikerconcentraties zorgen in *S. cerevisiae* voor een verdrievoudiging van de pyruvaat decarboxylase activiteit en een vermindering in acetaldehyde dehydrogenase activiteit, wat er voor zorgt dat alcoholische fermentatie voorrang krijgt.

Het hoofddoel van de citroenzuurcyclus is het leveren van reducerende moleculen aan de oxidatieve fosforylatie via de oxidatieve decarboxylatie van acetyl-CoA. De citroenzuurcyclus gaat volledig door in de mitochondriën en geeft per molecule pyruvaat vier moleculen NADH, één molecule GTP en een molecule FADH. Wanneer een tekort aan zuurstof dreigt wordt deze cyclus een opgesplitste pathway. In dit geval gaat enkel de synthese van de biomassa precursoren oxaloacetaat en  $\alpha$ -ketoglutaaraat door als een pathway met twee vertakkingen in plaats van een cyclische pathway.

### 1.5.2. Aeroob metabolisme<sup>7</sup>

*S. cerevisiae* heeft verschillende manieren om NADH te oxideren zodat het metabolisme van de gist niet stilvalt (zie Figuur 4). Het NADH komt zowel uit het cytosol (via de glycolyse) als uit de mitochondriën (citroenzuurcyclus). Het NADH kan dan geoxideerd worden in de respiratorische cyclus in de mitochondriën met zuurstof als terminale elektronenacceptor.

De twee meest belangrijke systemen voor de oxidatie van NADH zijn de externe NADH dehydrogenase (Nde1 en Nde2) en de glycerol 3-fosfaat shuttle (Gpd1 en Gpd2). De glycerol 3-fosfaat shuttle is een efficiënter systeem met een hogere ATP/O ratio dat vooral gebruikt wordt wanneer er weinig energie beschikbaar is. Ondanks de lagere efficiëntie is het externe NADH dehydrogenase toch het meest gebruikte systeem dankzij de veel hogere snelheid waarmee het enzym het NADH reduceert. De elektronen worden in alle pathways onder aerobe condities getransporteerd naar het ubiquinone complex. *S. cerevisiae* heeft geen multi-subunit complex type 1 NADH dehydrogenase, maar wel een singe-subunit NADH:ubiquinone oxidoreductase, die de oxidatie van intramitochondriaal NADH koppelt aan respiratiecyclus. Dit enzym zorgt voor de transfer van twee elektronen van NADH naar ubiquinone.



**Figuur 4:** Schema van de verschillende mechanismen die de redox balans onderhouden in *Saccharomyces cerevisiae* Legende: Nde: NADH dehydrogenase; Gpd: oplosbaar glycerol 3-fosfaat dehydrogenase; Adh: alcoholdehydrogenase ; Gut: membraangebonden glycerol 3-fosfaat dehydrogenase ; cox: cytochroom c oxidase; bc1: bc1 complex<sup>7</sup>

### 1.5.3. Anaeroob metabolisme<sup>5, 7</sup>

De anaerobe pathway die van belang is voor de bierproductie is die met vorming van ethanol met een nettorendement van 2 moleculen ATP. Het is theoretisch een redoxneutraal proces.

De opsplitsing tussen oxidatief en fermentatief suikermetabolisme gebeurt ter hoogte van de verwerking van pyruvaat. Pyruvaat wordt door het enzym pyruvaat decarboxylase omgezet naar acetaldehyde. Er zijn drie genen die coderen voor het enzym, namelijk PDC1, PDC5 en PDC6. PDC1 wordt zeer sterk tot expressie gebracht in aanwezigheid van glucose en vormt dus het dominante iso-enzym. PDC5 wordt enkel sterk tot expressie gebracht als PDC1 niet afgeschreven wordt en PDC6 wordt enkel afgeschreven wanneer de gist groeit op ethanol. De volgende stap is het omzetten van acetaldehyde naar ethanol met het alcohol dehydrogenase. Bij gist zijn er vier iso-enzymen gecodeerd door ADH1, ADH2, ADH3 en ADH4. ADH1 wordt geïnduceerd door aanwezigheid van zuurstof en codeert dus voor het iso-enzym gebruikt in de ethanolvorming. ADH2 codeert dan weer voor het enzym dat gebruikt wordt voor de groei met behulp van ethanol.

De vorming van ethanol is dan wel een redox neutraal proces, maar de gistgroei is gelinkt met anabolische processen en de biomassa van gisten is meer geoxideerd dan de bouwstenen die het gebruikt voor de opbouw van biomassa. Er is dus een overschot aan reducerende stoffen bij een anaeroob metabolisme, wat kan opgelost worden via de vorming van glycerol uit glucose in twee stappen. De eerste stap is de reductie van dihydroxyaceton fosfaat, een intermediair uit de glycolyse, naar glycerol-3-fosfaat door het NAD<sup>+</sup> afhankelijke glycerol 3-fosfaat dehydrogenase. De tweede stap is de defosforylatie van glycerol-3-fosfaat naar glycerol door glycerol 3-fosfatase.

## **1.6. Gistflocculatie<sup>8, 9</sup>**

Gistflocculatie is de vorming van vlokken door de aggregatie van duizenden gistcellen. De vlokken zakken na de vorming relatief snel naar de bodem van de fermentatietank en het proces zorgt voor een goedkope en effectieve manier om de gistcellen van het bier te scheiden op het einde van de fermentatie. Het is belangrijk dat de vlokkenvorming op het juiste moment gebeurt. Een premature flocculatie zorgt voor een onvolledige fermentatie met een hoog restsuikergehalte en een afwijkend smaakprofiel als gevolg.

Het flocculatiegedrag van een ideale brouwersgist zou niet mogen veranderen bij het hergebruiken van de gist bij meerdere opeenvolgende fermentaties. De stabiliteit van flocculatie eigenschappen en het verbeteren ervan wordt steeds belangrijker, aangezien steeds meer brouwerijen overgaan tot high gravity brouwen met bijhorende flocculatieproblemen.

De adhesie van de verschillende gistcellen met behulp van lectines is het meest voorkomende mechanisme voor de flocculatie van gistcellen. Lectines zijn een groep van glycoproteïnen die specifiek aan koolhydraten kunnen binden en zo interacties geven tussen gistcellen. De lectines die verantwoordelijk zijn voor de flocculatie van gistcellen worden flocculinen genoemd. De flocculinen van de ene cel binden aan de mannose residuen van de andere cellen. De binding vereist ook de aanwezigheid van Ca<sup>2+</sup>-ionen, om de flocculinen de correcte structuur te geven.

Zonder flocculatie zakken de gisten ook naar de bodem maar de snelheid is veel te laag waardoor dit economisch niet interessant genoeg is. De gistcellen kunnen uitzakken wanneer de celgrootte en de celdensiteit ervoor zorgt dat de Brownse beweging, die hen in oplossing houdt, kan overwonnen worden.

Er is steeds een dynamisch evenwicht tussen cellen in oplossing en cellen die vastzitten in vlokken. Dit verklaart waarom er voldoende cellen in oplossing moeten zitten om over te gaan tot de flocculatie en waarom er op het einde van de fermentatie nog altijd cellen in oplossing zitten.

Op het einde van de fermentatie is de flocculatie het sterkst, omdat op dat moment de voorwaarden zeer gunstig zijn. De stroming die veroorzaakt wordt door de stijgende CO<sub>2</sub> bellen is minimaal en de celconcentratie is maximaal. De vorming van de vlokken is een zeer snel proces dat zich in enkele seconden voltooid, maar het uitzakken van de vlokken is een trager proces dat zich in enkele uren voltooid. De sedimentatiesnelheid wordt beïnvloed door de eigenschappen van de vlokken, maar ook door de eigenschappen van het bier zoals viscositeit, turbiditeit en densiteit. Het zijn vooral de viscositeit en densiteit die voor problemen zorgen bij het gebruik van high gravity wort.

Flocculatie is een reversibel proces dat beïnvloed wordt door verschillende factoren. Die factoren zijn onder te verdelen in drie categorieën: fysische, genetische en fysiologische factoren.

#### **1.6.1. Fysische achtergrond**

De fysische omgeving heeft vooral een invloed op de manier waarin cellen in contact komen. De hydrodynamische krachten moeten zodanig zijn dat er voldoende botsingen zijn tussen de verschillende cellen. De botsingen moeten krachtig genoeg zijn, maar ook niet te krachtig en dit om de gevormde interacties niet te verbreken. De concentratie van de cellen moet ook hoog genoeg zijn om flocculatie te laten doorgaan. Verder heeft de fysische omgeving nog invloed op het hydrofoob karakter van de gistcel en op de negatieve ladingen op de celwand.

#### **1.6.2. Genetische achtergrond**

De genetische eigenschappen bepalen mee de mate waarin de gist flocculeert. Er zijn twee veel voorkomende fenotypes namelijk Flo1 en NewFlo. De stammen met het Flo1 fenotype hebben een flocculatie die geïnhibeerd wordt door de aanwezigheid van mannose. De gisten met het NewFlo fenotype kennen een inhibitie van het flocculatieproces in aanwezigheid van mannose, maar ook in aanwezigheid van glucose, sucrose, maltose en maltotriose. Deze giststammen zullen dan ook enkel flocculeren wanneer de concentratie van deze suikers in het medium laag genoeg is en dit maakt ze heel geschikt als brouwgisten, wat verklaart waarom bijna alle brouwgisten van het NewFlo type zijn.



Er zijn minstens negen genen in *Saccharomyces cerevisiae* geïdentificeerd die coderen voor flocculine eiwitten. De sequenties bevatten lange tandem repeats en zijn daardoor zeer lang. Een sequentie van ongeveer 100 bp wordt 10 tot 20 keer herhaald. De FLO genen veranderen door deze herhalingen sneller dan de rest van het genoom. De instabiliteit komt niet enkel van de tandem repeats maar ook van de locatie. De FLO genen liggen dicht bij de telomeren en zijn dus sterker onderhevig zijn aan deleties, duplicaties en translocaties. Die instabiliteit zorgt mogelijks voor een veranderend flocculatiegedrag bij het hergebruiken van de gist voor meerdere fermentaties al sluiten studies niet uit dat de veranderingen het gevolg zijn van veranderingen in procesomstandigheden of van het gebruik van andere grondstoffen.

### **1.6.3. Fysiologische achtergrond**

Zuurstof kan een invloed hebben op de flocculatie, al heeft het geen directe invloed op het proces zelf. Wanneer de wort onvoldoende geaëreerd is, krijgt men een premature en incomplete flocculatie. Er is geen rechtstreeks verband, maar het gebrek aan zuurstof zorgt voor een gebrekkige productie van sterolen en onverzadigde vetzuren. Die zorgen voor het transport van de flocculinen naar de celwand en de stabilisatie in de celwand.

De temperatuur heeft ook een effect op de flocculatie, al is dat effect sterk afhankelijk van de gebruikte stam. Vooral lagere temperaturen hebben een positieve invloed op de flocculatie.

De pH kan ook een invloed hebben en dan vooral op de ladingen op de celwand van de gistcellen. Hoe hoger de pH, hoe sterker de negatieve ladingen op de gistcellen en hoe sterker de afstoting tussen de gistcellen. De dalende pH bij de fermentatie zorgt dus voor een minder negatieve lading tegen het einde van de fermentatie met een betere flocculatie als gevolg.

## **2. Het brouwproces**

Het brouwproces wordt kort overlopen om de gebruikte terminologie, resultaten en de bespreking ervan te kunnen plaatsen binnen het proces.

### **2.1. Grondstoffen**

De basisgrondstoffen die nodig zijn voor de productie van bier worden perfect beschreven door het Duitse reinheitsgebot, wat werd ingevoerd in 1516 en nu nog altijd wordt toegepast in bepaalde delen van Duitsland. De oorspronkelijke wet bepaalde dat bier enkel mocht geproduceerd worden met water, gerstemout en hop. Toen men ontdekte dat gist verantwoordelijk was voor de productie van alcohol werd gist als vierde component toegevoegd. In de rest van de wereld is men gelukkig iets minder streng. In België moet 60 % van het extract afkomstig zijn van mout. Dit laat het gebruik toe van een aantal andere grondstoffen toe die mee verantwoordelijk zijn, en soms zelfs onmisbaar, voor de grote diversiteit van het Belgische bier.

## **Mout<sup>10</sup>**

Mout voor bierproductie is vooral afkomstig van gerst (*Hordeum vulgare*). Brouwers verkiezen de twee-rijige zomergerst, omdat die zorgt voor grote en uniforme korrels met een fijne pel.

De enzymen die nodig zijn voor de conversie van zetmeel naar vergistbare suikers, worden gevormd tijdens het vermouten van de gerst.

Het moutproces omvat drie stappen: het weken, de kieming en het drogen of eesten van de mout. Hoe hoger de temperatuur tijdens deze stap laatste, hoe donkerder de verkregen mout zal zijn.

## **Hop<sup>10</sup>**

Hop is de tweede natuurlijke grondstof die gebruikt wordt in de productie van bier. Het heeft een dubbele functie: enerzijds zorgt het voor de bitterheid en bepaalde aroma's en anderzijds helpt het bij de bewaring van bier.

De hopbel bevat drie componenten die zeer belangrijk zijn voor het brouwproces. Polyfenolen hebben een anti-oxiderend effect en helpen bij het neerslaan van eiwitten. Hopbellen leveren naast polyfenolen ook nog de bitterstoffen, met  $\alpha$ -zuren als belangrijkste. Als laatste levert een hopbel ook nog de hopoliën die bijdragen tot het aroma van bier.

Hop kan in verschillende vormen gebruikt worden zoals, hopbellen, hoppellets en hopextracten.

## **Water<sup>10</sup>**

Water is de meest gebruikte grondstof tijdens het brouwen. Het water wordt niet enkel gebruikt in het bier, maar ook om allerlei reinigingen uit te voeren. De kwaliteit van het eigenlijke brouwwater heeft een groot effect op de uiteindelijke smaak van het bier. Die kwaliteit wordt vooral bepaald door de ionensamenstelling. Een eerste belangrijke parameter is de hardheid van het water, is afkomstig van Ca- en Mg-ionen. Fe-ionen moeten worden verwijderd, aangezien ze, in combinatie met polyfenolen, zorgen voor een bruine kleur en een slechte smaak. Ca-ionen stabiliseren het  $\alpha$ -amylase en slaan fosfaten neer terwijl  $Mg^{2+}$  belangrijk is als co-enzym.  $Na^+$  geeft een slechte smaak terwijl  $Cl^-$  de zoete smaken kan versterken.  $Zn^{2+}$  is toxisch voor de gist in hoge concentraties, maar moet toch aanwezig zijn in kleine concentraties om de gist te stimuleren.

## **Gist<sup>10</sup>**

Gist zorgt niet enkel voor de ethanolproductie maar ook voor het aroma van het geproduceerde bier. Aangezien een groot deel van deze literatuurstudie gewijd is aan de rol van gist in bier, wordt dan ook hier niet dieper ingegaan op de rol van gist in bier.

### **Overige toevoegingen<sup>10</sup>**

De basisingrediënten zijn al lang niet meer beperkt tot mout, water, hop en gist. Het zijn net de vele toevoegingen die een zekere creativiteit toelaten binnen een brouwerij en ervoor zorgen dat we in België zo een divers bierlandschap hebben.

Suiker is het grootste onderdeel van deze groep, zowel onder de vorm van zetmeel of ongemoute granen of onder een geraffineerde vorm (vooral sucrose). Er zijn ook nog andere toevoegingen mogelijk zoals karamel om het bier een donkere kleur en aroma's te geven en ook verschillende kruiden.

## **2.2. Processen in de brouwzaal**

Het brouwen is de verzameling van alle processen in de brouwzaal vanaf het binnenkomen van de mout tot aan de fermentatie. Het begint met het vermalen van de mout en eindigt met het koelen en aereren van de wort net voor deze in de fermentatietank gaat.

### **Schroten<sup>10</sup>**

Het eerste proces binnen de brouwzaal is het schroten of vermalen van de moutkorrel. Hier wordt de moutkorrel in kleine fragmenten gebroken om de enzymwerking te vergemakkelijken. Er zijn twee soorten maaltechnieken, namelijk met een walsmolen of met een hamermolen. Bij walsmolens kan het malen droog of nat zijn.

De filter die gebruikt wordt voor het scheiden van de draf en de wort bepaalt de techniek die gebruikt wordt. Bij een traditionele filterkuip vormt het kaf het filterbed, waardoor deze zeker moet bewaard blijven en dan is malen met een walsmolen aangewezen. Als men gebruik maakt van een wortfilter om het beslag te filteren, heeft men het kaf niet nodig en kan er gebruik gemaakt worden van een hamermolen.

### **Beslag<sup>10</sup>**

Het schroot wordt na het vermalen vermengd met water en gaat naar de beslagkuip. Daar worden de koolhydraten omgezet worden in vergistbare suikers met behulp van de moutenzymen. De zetmeelafbraak berust vooral op de werking van drie enzymen namelijk  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase en grensdextrinase. Daarnaast is er ook beperkt afbraak van de celwand en treedt er proteolyse op met vorming van (poly)peptiden en aminozuren.

De afbraak van het zetmeel tot vergistbare suikers verloopt in drie fasen. Eerst barsten de zetmeelkorrels open in het warme water, waarna de polymeerketens afgebroken worden met vervloeiing tot gevolg. De laatste stap is de saccharificatie met de vorming van de vergistbare suikers, namelijk glucose, maltose en maltotriose. De maischprocessen worden opgedeeld in twee grote categorieën afhankelijk van de manier waarop de temperatuur wordt verhoogd.

Bij de infusieprocessen ondergaat het volledige beslag hetzelfde temperatuursverloop, terwijl bij de decoctiemethoden een deel van het beslag in een tweede ketel (adjunct cooker) aan de kook wordt gebracht. Door dat deel vervolgens terug bij de rest van het beslag te brengen, krijgt men de gewenste temperatuursverhoging. Deze methode laat ook gemakkelijker het gebruik van andere granen (zoals rijst en mais) toe.

### **Wortfiltratie<sup>10</sup>**

Het beslag is na het maischen een mengsel van opgeloste en niet-opgeloste deeltjes en moet gefilterd worden. Het resultaat is een klare wort en de vaste deeltjes, restgranen of draf. Het filtreren van het beslag kan op twee manieren namelijk via een filterkuip of via een wortfilter. De filter in een filterkuip wordt door de vaste bestanddelen uit het beslag gevormd met het kaf als belangrijkste. Het is een goedkope maar tijdrovende methode. De wortfilter maakt gebruik van een speciale platenfilter, waardoor een snellere filtratie van het beslag verkregen wordt.

### **Wort koken<sup>10</sup>**

De volgende stap in het brouwproces is het koken van de wort, wat nodig is om de wort te stabiliseren en te steriliseren.

Tijdens het koken wordt er twee maal gehopt. Aan het begin van het koken worden de bitterhoppen toegevoegd. Door het koken worden de aanwezige  $\alpha$ -hopzuren omgezet naar iso- $\alpha$ -zuren die veel beter oplosbaar zijn. De aromahoppen worden aan het einde van het koken toegevoegd, omdat vluchtige hopoliën verantwoordelijk zijn voor het bieraroma en niet verloren mogen gaan door het koken.

Een tweede belangrijk proces is het neerslaan van eiwitten tijdens het koken, een proces dat nog versneld wordt door de aanwezigheid van polyfenolen uit mout en hop.

Koken zorgt ook voor de vernietiging van alle aanwezige micro-organismen en nog resterende enzymen. Het is belangrijk te beseffen dat de wort vanaf dit punt met de grootste zorg moet behandeld worden om te voorkomen dat deze opnieuw gecontamineerd wordt. Verder wordt tijdens het wortkoken de pH verlaagd, worden reductonen gevormd die later kunnen reageren met zuurstof en worden ongewenste smaakstoffen verwijderd, zoals dimethylsulfide en zijn precursor S-methyl methionine. Deze zorgen voor een slechte smaak in het bier.

De kookketels zijn meestal voorzien van een interne of een externe boiler. Door de stijgende energiekosten wordt er meer en meer onderzoek gedaan naar nieuwe technieken die het energieverbruik tijdens het koken verlagen.

### **Wortklaring en koeling<sup>10</sup>**

De wortklaring is het proces waarbij de warme breuk wordt gescheiden van de wort. De technieken hiervoor zijn decanteren, centrifugeren, klaren via separatoren of het gebruik van een whirlpool.

De wort moet gekoeld worden voor de fermentatie en dit gebeurt met een platenkoeler. De laatste stap voor de eigenlijke fermentatie is het beluchten van de wort. Door steriele lucht in de wort te brengen, komt de nodige zuurstof in de wort voor de gistgroei in het begin van de fermentatie.

### **2.3. Fermentatie en afwerking <sup>5</sup>**

De rol van gist in de fermentatie zal uitgebreid beschreven worden in het volgende onderdeel van de literatuurstudie. Hier wordt kort ingegaan op het proces en niet op welke omzettingen er doorgaan of welke producten er gevormd zullen worden. Het primaire doel van de fermentatie is de synthese van alcohol uit de fermenteerbare suikers en de productie van smaakcomponenten door de *Saccharomyces* brouwersgisten.

De fermentatie kan gebeuren in kuipen (zowel open als gesloten), maar wordt tegenwoordig vooral uitgevoerd in een cilinderconische tank of CCT. Deze hebben onderaan een conisch gedeelte met een hoek van 60 tot 70°, hebben industrieel veelal een inhoud van 1000 tot 10 000 hl en beschikken over een cilindrisch gedeelte dat minstens twee maal zo hoog is als het breed is. De CCT laat ook CO<sub>2</sub>-recuperatie toe en heeft typisch vier koelzones die ervoor zorgen dat zowel de fermentatie als de lagering kunnen doorgaan in dezelfde tank.

Na de hoofdgisting moet het bier nog lageren. Tijdens de lagering zakt de gist uit, wordt het bier verzadigd met CO<sub>2</sub>, worden bepaalde smaakcomponenten omgezet en verdwijnt het restextract.

Na het lageren moet het bier gefiltreerd worden om een helder product te bekomen. De filtratie gebeurt steeds koud en meestal met behulp van kieselguhrfilters. Er zijn echter een aantal nadelen aan deze manier van filteren zoals de hoge kostprijs en een dure afvalverwerking, waardoor men opzoek gaat naar alternatieven zoals cellulosefilters.

De laatste stap bij de productie van de meeste bieren is het afvullen en pasteuriseren van het eindproduct. Er is echter ook nagisting op de fles mogelijk waardoor het bier een smaakevolutie kan ondergaan. Daarvoor wordt na de flashpasteurisatie gist en suiker toegevoegd en worden de flessen meestal gedurende twee weken in een warme kamer geplaatst.

## **3. Gist in de bierproductie**

### **3.1. Fermentatie**

De fermentatie of hoofdgisting heeft als belangrijkste doel de vergistbare suikers omzetten in ethanol via het anaeroob metabolisme van de gist zoals beschreven in 1.5. Naast alcohol worden nog tal van bijproducten gevormd tijdens het metaboliseren van suikers en aminozuren. Deze bijproducten spelen een belangrijke rol in de smaak van bier. De samenstelling en de concentratie kunnen sterk verschillen en zijn afhankelijk van

de gekozen giststam en de wortsamenstelling. De stoffen die verantwoordelijk zijn voor de smaak in het bier zijn onder te verdelen in een aantal categorieën: organische zuren en vetzuren, carbonylverbindingen, hogere alcoholen, esters en zwavelhoudende componenten.

### 3.1.1. Organische zuren en vetzuren<sup>5</sup>

Er zijn meer dan 100 verschillende organische zuren en vetzuren geïdentificeerd in bier en de meeste zijn het resultaat van het metabolisme van de gist. De excretie van de zuren heeft niet enkel een effect op de smaak van het bier, maar zorgt ook voor een verlaging van de pH tijdens de fermentatie. De meeste zuren worden gevormd door de onvolledige citroenzuurcyclus tijdens de anaerobe groei (zie 1.5). Deze zuren geven een zure of een zoute smaak aan het bier.

De concentratie van sommige organische zuren kan fluctueren tijdens de fermentatie. Zo wordt er pyruvaat vrijgesteld in het begin van de fermentatie. In een later stadium wordt het extracellulaire pyruvaat terug opgenomen door de gistcellen en komt er acetaat vrij. Er zijn nog twee belangrijke oxo-zuren waarvan de concentratie kan fluctueren tijdens de fermentatie, namelijk  $\alpha$ -acetylactaat en  $\alpha$ -acetylhydroxybutyrate. Zij vormen de precursoren voor de vicinale diketonen, diacetyl en 2,3-pentaandion, die verder zullen worden besproken.

**Tabel 2: De meest voorkomende organische zuren en hun concentratierange in bier<sup>5</sup>**

| Organic acid           | Typical concentration in beer (mg/l) |
|------------------------|--------------------------------------|
| Acetic                 | 10–50                                |
| Citric                 | 100–150                              |
| Lactic                 | 50–300                               |
| Malic                  | 30–50                                |
| $\alpha$ -ketoglutaric | 0–60                                 |
| Pyruvic                | 100–200                              |
| Succinic               | 50–150                               |

Vetzuren in bier geven ongewenste smaken aan het bier en hebben ook een negatief effect op de schuimvorming. De middellange vetzuren (C16 en C18) worden vervangen door korte vetzuren (C6-C10) tijdens de fermentatie. Deze korte ketens zijn sterke detergenten en worden niet vrijgesteld door een gecontroleerd proces. Het is waarschijnlijk dat deze de cel verlaten als gevolg van het lekken van het plasmamembraan door ethanolstress of in extreme gevallen door celdood en autolyse.

### 3.1.2. Carbonylverbindingen<sup>5</sup>

De carbonylverbindingen bestaan uit aldehyden en ketonen en hiervan zijn er meer dan 200 verschillende geïdentificeerd in bier. De concentratie van de meeste aldehyden en ketonen verandert onder invloed van het gist metabolisme tijdens de

fermentatie. De vorming ervan dient trouwens sterk gecontroleerd te worden, aangezien ze meestal een ongewenste smaak geven aan het bier.

De aldehyden kunnen gevormd worden tijdens de wortproductie of als intermediair van het omzetten van oxo-zuren naar hogere alcoholen door de gist. Er zijn verschillende reductasen aanwezig in gist die verantwoordelijk zijn voor het omzetten van de aldehyden en ze gebruiken allemaal NADH of NADPH als waterstofdonoren. Het fermentatief alcohol dehydrogenase is verantwoordelijk voor de omzetting van pentanal en pentenal, terwijl het aldose reductase 3-methyl butanal kan reduceren. Acetaldehyde is een belangrijke carbonylverbinding, aangezien ze een rechtstreekse precursor is in de vorming van ethanol. Acetaldehyde wordt in het beginstadium van de fermentatie gevormd en zorgt voor een smaak en een aroma die beide aan gras en groene appels doen denken. In een normale fermentatie wordt het acetaldehyde in een later stadium terug omgezet naar ethanol, zodat de concentratie onder de smaakdrempel zakt (10–20 ppm). Er kan tijdens de fermentatie ook een accumulatie van acetaldehyde optreden door te enten met gist van slechte kwaliteit, door met te veel gistcellen te enten, door te fermenteren met bij een te hoge temperatuur of door te veel zuurstof toe te voegen aan de wort. *S. cerevisiae* heeft een mitochondrieel acetaldehyde dehydrogenase dat  $\text{NAD}^+$  en  $\text{K}^+$  nodig heeft en beschikt ook over een acetaldehyde dehydrogenase dat in het cytosol zit en  $\text{NADP}^+$  en  $\text{Mg}^{2+}$  nodig heeft voor zijn werking.

Naast acetaldehyde zijn er nog twee vicinale diketonen (VDK) die zeer belangrijk zijn in de fermentatie, namelijk diacetyl (2,3-butaandion) en 2,3-pentaandion. Ook deze stoffen zijn ongewenst in concentratie hoger dan de smaakdrempel (respectievelijk 0,1 ppm en 0,9 ppm). Ze worden gevormd als een bijproduct tijdens de synthese van valine en isoleucine. Een deel van de door gist vrijgestelde  $\alpha$ -acetolactaat en  $\alpha$ -acetohydroxybutyraat wordt via spontane oxidatie omgezet naar diacetyl en 2,3-pentaandion. In een later stadium (vooral tijdens de lagering) worden beide componenten opgenomen door de gist en opnieuw gereduceerd. De vorming van deze componenten wordt sterk beïnvloed door het FAN gehalte in de wort.

### 3.1.3. Hogere alcoholen<sup>5</sup>

Naast ethanol en glycerol worden er nog talrijke andere alcoholen geproduceerd die bijdragen aan de uiteindelijke smaak van het bier. De concentratie aan hogere alcoholen stijgt gedurende de fermentatie en bereikt een piek wanneer het FAN gehalte het laagst is. De belangrijkste alcoholen die bijdragen tot de smaak zijn n-propanol, iso-butanol, 2-methylbutanol en 3-methylbutanol. Ze versterken de smaak van ethanol en vormen precursoren voor esters.

De vorming van hogere alcoholen kan mogelijk een rol spelen bij het in stand houden van de redoxbalans binnen de cel. De vorming van hogere alcoholen gebeurt door de reductie van aldehyden en ketonen die uit in de wort of aldehyden die uit van de

decarboxylatie van 2-oxozuren voortkomen. De reductie gebeurt met behulp van  $\text{NAD}^+$  afhankelijke alcohol dehydrogenasen.

De controle over de vorming van hogere alcoholen kan gebeuren door het selecteren van de juiste giststam, het aanpassen van de fermentatieomstandigheden of het aanpassen van de samenstelling van de wort. Toch heeft de giststam nog altijd het meeste invloed op de vorming van hogere alcoholen.

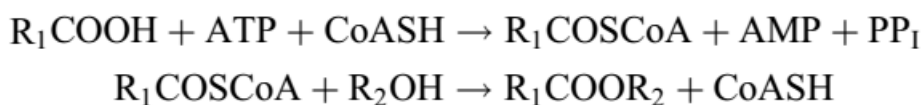
### 3.1.4. Esters<sup>5, 11</sup>

De esters zijn de belangrijkste door gist gevormde componenten die bijdragen aan de uiteindelijke smaak van bier. Er zijn meer dan 100 verschillende esters aangetroffen in bier en ethylacetaat is daarvan de belangrijkste. De concentratie aan esters is meestal lager dan 1 ppm in bier maar de eindconcentratie aan ethylacetaat kan oplopen tot 50 pp

| Component            | Concentration range (mg/l) | Average concentration (mg/l) | Threshold level (mg/l) | Flavor description   |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------|
| Ethyl acetate        | 8–32                       | 18.4                         | 21–30                  | Fruity, solvent-like |
| Isoamyl acetate      | 0.3–3.8                    | 1.72                         | 0.6–1.2                | Banana, pear         |
| Ethyl caproate       | 0.05–0.3                   | 0.14                         | 0.17–0.21              | Apple, aniseed       |
| Ethyl caprylate      | 0.04–0.53                  | 0.17                         | 0.3–0.9                | Apple                |
| Phenyl ethyl acetate | 0.10–0.73                  | 0.54                         | 3.8                    | Roses, honey, sweet  |

**Figuur 5: Enkele belangrijke esters die bijdragen aan de smaak van het bier met hun concentratiegebied in bier, smaakdrempel en smaakbeschrijving<sup>11</sup>**

De meeste esters in bier worden gevormd door de verestering van ethanol of een hoger alcohol en een vetzuur gekoppeld aan CoASH. Het reactiemechanisme wordt weergegeven in Figuur 6. De eerste reactie is de enzymatische koppeling van het vetzuur met de CoA groep met acyl-CoA synthetase. Vervolgens wordt het acyl-CoA ester omgevormd naar een ester met alcohol acyl transferase. Aangezien veel esters gebruik maken van hogere alcoholen, worden de hoogste esterconcentraties worden waargenomen nadat de vorming van hogere alcoholen gestopt is. De combinatie van verschillende esters kan ook leiden tot een bepaalde smaak, waardoor esters die aanwezig zijn in een concentratie onder de smaakdrempel een effect hebben op de uiteindelijke smaak van het bier.



**Figuur 6: De meest voorkomende reacties voor de vorming van esters tijdens de fermentatie<sup>5</sup>**

De vorming van esters vraagt een investering van ATP en dus speelt de vorming een belangrijke rol binnen het metabolisme van de gist. Verschillende studies tonen aan dat de vorming van esters in verband staat met de synthese van vetten. De vormingssnelheid van de esters ligt het hoogst in het midden van de fermentatie en op het moment dat de synthese van vetten stilvalt. Het gevormde acetyl-CoA wordt



op dat moment niet meer gebruikt voor de synthese van vetten en de vorming van esters voorkomt de opstapeling van acetyl-CoA.

De concentratie van de verschillende esters wordt vooral beïnvloed door de wortsamenstelling. Welke esters er precies gevormd worden, is sterk afhankelijk van de gebruikte giststam. Er bestaan verschillende iso-enzymen van alcohol acyltransferase en niet elke giststam heeft dezelfde iso-enzymen. Naast de aanwezigheid van de verschillende iso-enzymen is ook de specificiteit van de enzymen belangrijk.

### **3.1.5. Zwavelhoudende componenten**

De zwavelhoudende componenten die gevormd worden door het metabolisme van de gist zijn afkomstig van organische zwavelhoudende moleculen, zoals de aminozuren methionine, cysteïne en cystine en vitaminen of van anorganische componenten in de wort zoals sulfaat.

Het sulfaat komt de cel binnen met behulp van een specifiek permease en wordt vervolgens gereduceerd tot sulfiet met verbruik van ATP. Het sulfiet wordt omgezet naar sulfide met een  $\text{NADP}^+$  afhankelijk reductase. Het gevormde sulfiet kan worden gebruikt voor het aanmaken van verschillende organische bouwstenen. Soms treedt echter een accumulatie op van waterstofsulfide, een gewenst effect bij sommige biersoorten. In andere bieren moet de accumulatie worden tegengegaan en dat kan wanneer het bier wordt blootgesteld aan koper, waardoor een onoplosbaar sulfide wordt gevormd.

## **3.2. Lagering**

De hoofdgisting levert groenbier, een troebel bier met weinig  $\text{CO}_2$  en verschillende ongewenste aroma's en smaken. Het bier moet dus eerst lageren of een maturatie ondergaan. De lagering gaat in een moderne brouwerij door in dezelfde cilinderconische tanks waar de hoofdgisting is door gegaan. Ook tijdens het lageren vinden verschillende processen plaats die allemaal bijdragen tot de uiteindelijke smaak en eigenschappen van het bier.<sup>5</sup>

Op het einde van de fermentatie is het grootste deel van de gist uitgezakt maar er blijft nog een deel in oplossing (zie 1.6). Die gist zet de overgebleven vergistbare suikers om naar alcohol en  $\text{CO}_2$ . Het  $\text{CO}_2$  blijft opgelost in het bier doordat de tank wordt afgesloten tijdens het lageren. De gistcellen zorgen verder ook voor de omzetting van een aantal ongewenste componenten naar vluchtige componenten of naar componenten die zorgen voor een verbeterde smaak van het eindproduct. De vluchtige componenten ontsnappen samen andere ongewenste gasvormige componenten tijdens het aflaten van de druk op van de lagertank.<sup>5</sup>

Het bier wordt steeds helderder tijdens de maturatie door het sedimenteren van de koude breuk onder invloed van de lage temperatuur. De koude breuk wordt gevormd door

complexvorming tussen polyfenolen en eiwitten aanwezig in het bier. In de lagertank gebeuren ook de addities die de kleur of de smaak aanpassen zoals karamel of hopadditieven. Aangezien deze masterproef handelt over de vergelijking tussen verschillende gisten, zullen enkel die processen worden besproken met betrekking tot de gist.<sup>5</sup>

Tijdens de lagering mag de gist niet zo actief zijn als tijdens de hoofdfermentatie. De verminderde activiteit komt vooral door het verlagen van de temperatuur en het verlagen van de gistconcentratie in suspensie. Na de hoofdfermentatie wordt er gist verwijderd onderaan de cilinderconische tank, zodat er tussen één en vier miljoen cellen per milliliter groenbier overblijven. De gist zorgt voor enkele belangrijke smaakveranderingen.<sup>5</sup>

### **Vetzuren**

Het zijn vooral de korte vetzuren die kunnen bijdragen tot de uiteindelijke smaak van het bier. De synthese van deze korte vetzuurketens stopt bij het begin van de fermentatie. Vetzuren die een invloed kunnen hebben op de smaak worden tijdens de maturatie omgezet naar langere vetzuren, fosfolipiden en glyceriden. De concentratie van deze langere vetzuren daalt tijdens de maturatie, maar als deze te lang doorloopt, zal de concentratie ervan weer stijgen door de hydrolyse van de glyceriden. Een te hoge temperatuur tijdens de maturatie kan zorgen voor een excretie van C10 vetzuren en bij een concentratie hoger dan 10 mg/l kan deze zorgen voor een ongewenste smaak. De smaak van dit vetzuur kan omschreven worden als de smaak van talg of het vet van runderen en schapen.

### **Aldehyden**

Acetaldehyde is het belangrijkste aldehyde dat kan zorgen voor ongewenste smaken in het uiteindelijke bier. Het wordt gevormd door de oxidatie van ethanol en kan het gevolg zijn van een onzorgvuldige transfer van fermentatietank naar lagertank met insluipen van zuurstof als gevolg. Een normale maturatie zorgt voor een reductie van acetaldehyde tot onder de smaakdrempel.

### **Zwavel bevattende componenten**

Zwavel bevattende componenten zijn in zeer lage concentraties aanwezig maar dragen toch sterk bij tot de uiteindelijke smaak van het bier. Tijdens de eerste vijf tot zeven dagen van de maturatie wordt de concentratie van het ongewenste waterstofsulfide verlaagd tot onder de smaakdrempel.

### **Vicinale diketonen**

De belangrijkste smaakverandering tijdens de maturatie is de omzetting van de diketonen diacetyl en 2,3-pentaandion die tijdens de fermentatie gevormd worden. Het gevormde diacetyl wordt door de gist omgezet naar 2,3-buthaandiol, terwijl 2,3-pentaandion wordt omgezet naar 2,3-pentaandiol, beide met een veel hogere smaakdrempel. De snelheid waarmee deze vicinale diketonen uit het bier verwijderd worden, hangt af van de gebruikte giststam en de voorgeschiedenis ervan. Het verwijderen van de vicinale diketonen is belangrijk, omdat een vertraagde omzetting zorgt voor een vertraging in het productieproces.

### **3.3. Hergisting op fles**

De hergisting op fles is een typisch Belgisch proces dat door zo goed als alle brouwerijen voor een aantal van hun bieren wordt uitgevoerd. Na de lagering, filtratie en pasteurisatie wordt onder een CO<sub>2</sub>-atmosfeer verse gist en suiker toegevoegd onder de vorm van glucose, sucrose of maltose. De gist zorgt niet enkel voor smaakevolutie door de vorming van extra esters en hogere alcoholen, maar beschermt het bier ook tegen oxidatie en zorgt verder voor een hogere alcoholconcentratie en hoger CO<sub>2</sub>-gehalte.<sup>12</sup>

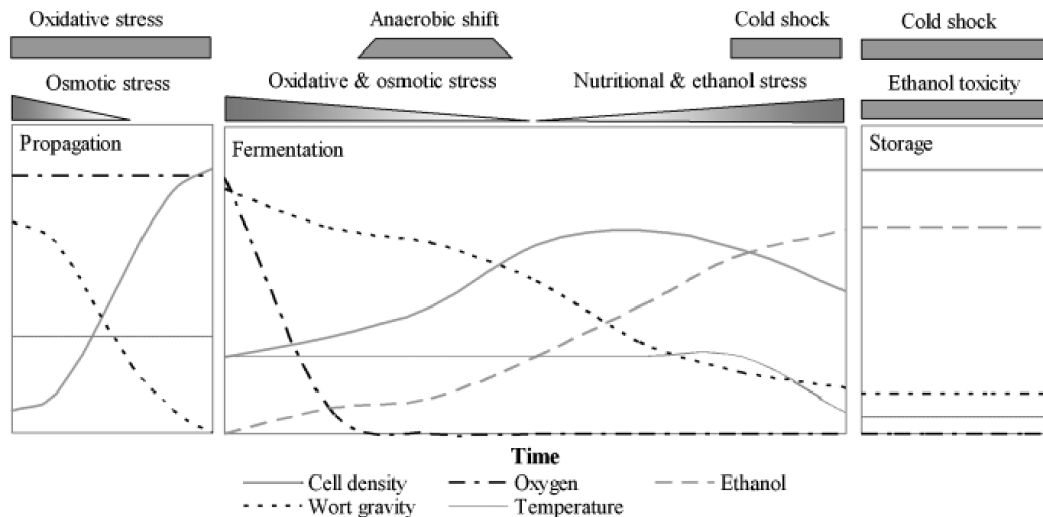
Het biermilieu waarin de gist terecht komt, verschilt sterk van dat tijdens de hoofdgisting en vormt een zeer stressvolle omgeving voor de geënte gistcellen. Het bier heeft een lage pH, hoge concentratie aan alcohol en CO<sub>2</sub> en bevat weinig verzadigde vetzuren, aminozuren en vitaminen.<sup>13</sup>

De toegevoegde suiker is dan ook zeer belangrijk voor de nagisting op de fles. Te weinig suiker kan zorgen voor een te lage CO<sub>2</sub>-concentratie, terwijl een te hoge suikerconcentratie kan zorgen voor te veel druk op de fles. Ook het type suiker is ook zeer belangrijk. Het beste resultaat wordt bereikt met suikers die de gist gemakkelijk kan opnemen, zoals glucose, fructose en sucrose. Het toevoegen van maltose of maltotriose kan zorgen voor een onvolledige of trage hergisting op fles.<sup>13</sup>

De hergisting op fles zorgt niet voor een smaakrevolutie, maar eerder voor een smaakevolutie. De keuze van de te gebruiken giststam is zeer belangrijk, aangezien de viabiliteit gedurende lange tijd hoog moet blijven. Celdood en autolysis zorgen voor een negatief effect op de smaak en op de schuimstabiliteit door het vrijstellen van hydrolyserende enzymen. De gist mag ook niet in suspensie blijven, maar moet goed uitzakken, aangezien de consument een min of meer helder product verkiest.<sup>12</sup>

### 3.4. Stressfactoren voor gist tijdens de productie van bier

Gist is tijdens de propagatie, de industriële fermentatie en de lagering onderhevig aan een aantal stressfactoren zoals temperatuur, zuurstof en osmotische stress. Een overzicht van de verschillende stressfactoren wordt gegeven in Figuur 7.



Figuur 7: Overzicht van alle stressfactoren die gist ondervindt tijdens een industrieel brouwproces<sup>4</sup>

#### 3.4.1. Ethanol<sup>4</sup>

Gist wordt dikwijls na de fermentatie geoogst om opnieuw te gebruiken. Het is dus belangrijk dat de vorming van alcohol niet ten koste gaat van de vitaliteit en viabiliteit van de gistcultuur. Het belang van een hoge ethanol tolerantie neemt dan ook steeds meer toe, aangezien high gravity brouwen steeds meer aan populariteit wint. Ethanol richt de meeste schade aan ter hoogte van de membranen en zorgt o.a. voor inhibitie van de groei, gereduceerde celgrootte en viabiliteit en enzym inactivatie. De manier waarop een giststam met deze problemen omgaat, bepaalt de mate van tolerantie tegen de hoge concentraties.

De samenstelling van het plasmamembraan draagt in grote mate bij tot de ethanol tolerantie. Gisten reageren op hogere ethanolconcentraties door het aantal onverzadigde vetzuren te verhogen in het membraan om zo de fluiditeit van het membraan te verhogen. De meest voorkomende onverzadigde vetzuren in het membraan zijn palmitoleïnezuur en oliezuur, afgeleid van respectievelijk palmitinezuur en stearinezuur met behulp van een membraandesaturase. Het is vooral oliezuur dat bijdraagt tot een hogere alcohol tolerantie.

Er zijn nog een aantal andere mogelijke factoren die bijdragen tot een verhoogde tolerantie tegen ethanol. Er is aangetoond dat een gistcel een verhoogde ATPase activiteit vertoont bij blootstelling aan ethanol. Gisten met zo een verhoogde activiteit hebben een verhoogde tolerantie.

De aanwezigheid van  $Mg^{2+}$  ionen zorgen voor een sterker membraan, maar ook het antistress suiker trehalose vermindert de permeabiliteit van het membraan.

Hoge alcoholconcentraties hebben dezelfde invloed als hoge temperaturen tijdens het brouwen en zorgen voor een verhoogde permeabiliteit van het membraan en alle gevolgen die daaraan gelinkt zijn. De effecten zijn cumulatief en hogere temperaturen tijdens high gravity brouwen zorgen voor een verdere vermindering van de viabiliteit van de gistcultuur.

### **3.4.2. Osmotische stress<sup>4</sup>**

Osmotische stress ontstaat ten gevolg van een hoge concentratie aan opgeloste stoffen. Tijdens de bierproductie zijn er twee stappen waarbij de gist wordt blootgesteld aan osmotische stressomstandigheden.

Sommige brouwers wassen de gist met zuren door zuur toe te voegen tot een pH tussen 2,2 en 2,4 bereikt wordt. Dit zorgt ervoor dat bacteriële contaminanten vernietigd worden en dat de gistslurrie vloeibaarder wordt, waardoor deze makkelijker te manipuleren is. De hoge concentratie aan  $H^+$  ionen in dit zure milieu kan zorgen voor osmotische stress en schade berokkenen aan de gist.

De tweede blootstelling aan een milieu met een hoge concentratie aan opgeloste stoffen gebeurt tijdens de inoculatie van de wort voor de propagatie van de gist of voor het inzetten van de fermentatie. Wort is een complex en een geconcentreerd medium met vooral hoge concentraties aan suiker. Bij high gravity wort kan deze concentratie zelfs oplopen tot 24 °P. Aangezien een groot deel van het onderzoek van deze masterproef handelt over brouwen met high gravity wort, wordt deze problematiek in een apart hoofdstuk. In dit hoofdstuk ligt de focus dan eerder bij de manier hoe de gist omgaat met osmotische stress.

Er zijn twee mogelijk reacties mogelijk van gist op osmotische stress, namelijk osmotolerantie en osmoadaptatie. De eerste responsbarrière is die van osmotolerantie en indien die niet volstaat, zet de cel het mechanisme van osmoadaptatie in gang.

Osmotolerantie is de initiële fysiologische weerstand tegen osmotische stress als een gevolg van acute of chronische blootstelling aan een milieu met hoge concentraties aan opgeloste stof. Osmotolerantie is een eigenschap die verschilt van stam tot stam en zelfs verschilt volgens het stadium waarin de gistcultuur zich bevindt. Tijdens de stationaire fase van een gistcultuur is er een verhoogde osmotolerantie als gevolg van een steviger membraan, de vacuole werking en de resten van trehalose. Trehalose speelt dus niet enkel een rol in de reactie tegen oxidatieve stress, maar helpt bij de bescherming tegen osmotische stress.

Osmoadaptatie gebeurt met behulp van een aantal processen waarin de gistcel zijn normale fysiologie aanpast in een milieu dat water onttrekt aan de cellen. De cel accumuleert moleculen die zorgen voor een hoger osmotisch potentiaal en tegelijk de

mogelijkheid bezitten om watermoleculen te binden om verder verlies van water te voorkomen. Deze moleculen vormen samen het osmoticum.

Er zijn twee grote voordelen aan de accumulatie van oplosbare bestanddelen. Ze zijn niet alleen in staat om de potentiaal binnen een cel te verhogen zonder nood aan stabiliserende moleculen, maar kunnen ook na het verdwijnen van de osmotische druk weer gebruikt worden in het metabolisme van de cel.

Brouwersgisten gebruiken glycerol als osmoticum. Glycerol speelt zoals beschreven in het eerste hoofdstuk ook een belangrijke rol in de recuperatie van  $\text{NAD}^+$  onder anaerobe stress. De gistcellen die onderhevig zijn aan een hoge externe concentratie van opgeloste stoffen kunnen dit heel efficiënt detecteren en erop reageren door de activatie van de 'high-osmolarity glycerol pathway' (HOG pathway) te activeren. Deze pathway is ontworpen om de gist te laten overleven wanneer de cel onderhevig is aan fysiologische stress.

### **3.4.3. Zuurstof<sup>14,4</sup>**

De gistcellen hebben zuurstof nodig om via het aeroob metabolisme voldoende energie te verkrijgen om te kunnen groeien bij de start van de fermentatie. Tegelijkertijd kan zuurstof echter ook giftig zijn voor de gistcel. Bepaalde componenten, de reactieve oxygen species of ROS, worden door de cellen zelf endogeen aangemaakt en zijn schadelijk voor de gistcellen. Tot de ROS behoren het zuurstofradicaal ( $\text{O}_2^\bullet$ ), waterstofperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en het hydroxylradicaal ( $^\bullet\text{OH}$ ). Zij kunnen schade veroorzaken aan macromoleculen zoals vetten, eiwitten en DNA.

De fermentatie tot bier is hoofdzakelijk een anaeroob proces, maar tijdens de propagatie, de enting en de bewaring van de gist wordt die toch blootgesteld aan zuurstof. De gistcel kan zich tegen de toxische componenten van zuurstof ofwel enzymatisch of niet-enzymatisch beschermen. Onder enzymatische bescherming valt bijvoorbeeld katalase, cytochroom c peroxidase, thioredoxine, ... De niet-enzymatische bescherming gebeurt door onder andere flavohaemoglobine, trehalose of ubiquinol. Beide categorieën treden op als antioxidanten om de cel te beschermen tegen de zuurstofradicalen.

Een voorbeeld van een niet-enzymatische reactie tegen oxidatieve stress is trehalose. Trehalose is een belangrijke component voor de cel. Het zorgt voor stabiliteit in het plasmamembraan, enzymstabiliteit en voor de juiste opvouwing en het herstel van eiwitten. Het wordt gevormd als antwoord op de blootstelling aan hitte, chemische componenten, ethanol en hoge concentraties aan opgeloste stoffen. Onderzoek heeft aangetoond dat trehalose ook helpt om de gistcellen te beschermen tegen ROS. Het is niet enkel essentieel dat deze component snel wordt aangemaakt bij blootstelling aan ROS, maar ook dat het snel weer wordt afgebroken, want trehalose inhibeert ook bepaalde essentiële enzymen zoals glutathion reductase, een

enzym verantwoordelijk voor het onderhouden van de cellulaire homeostase en het reduceren van oxidatieve schade binnen de cel.

Voorkomen is altijd beter dan genezen. Zuurstof is echter essentieel in een aantal stappen, dus kunnen we enkel proberen het zuurstofgehalte zo laag mogelijk te houden. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk om tijdens de propagatie maar een korte periode te aereren in plaats van de hele tijd. Een andere mogelijkheid is om de gistsuspensie te oxygenen en die vervolgens toe te voegen aan niet beluchte wort.

De gistcel kan ook op een enzymatische manier reageren op oxidatieve stress met bijvoorbeeld katalase. Katalase vormt het primaire defensiemechanisme tegen waterstofperoxide, maar het wordt bijgestaan door niet-enzymatische antioxidanten zoals glutathion. *S. cerevisiae* bezit twee genen die voor een katalase coderen, een katalase in de peroxisomen (A) en een katalase in het cytosol (T). Beide katalasen worden vooral aangemaakt in de stationaire fase en worden geïnduceerd door zuurstof. De katalase A genexpressie kan ook worden geïnduceerd door bepaalde vetzuren en groei op niet-fermenteerbare suikers. Het gen wordt sterk onderdrukt door de aanwezigheid van glucose. De genen die coderen voor katalase T worden dan weer onderdrukt door de aanwezigheid van cAMP en worden geïnduceerd door stressfactoren zoals oxidatieve stress. De katalase activiteit is dus sterk afhankelijk van de gebruikte stam, van het medium en van verschillende stressfactoren.

#### **3.4.4. Temperatuur<sup>4</sup>**

Een fermentatie bij hogere temperaturen heeft vooral effect op het membraan van de gistcel. De hoge temperatuur zorgt voor een verminderde viabiliteit, verminderde glycerolconcentratie en een lagere alcoholdehydrogenase activiteit.

De gistcel kan ook stress ondervinden bij een plots dalende temperatuur. Het effect kan al zichtbaar zijn wanneer de temperatuur plots onder 20°C zakt. Men spreekt over een koude shock. De lage temperatuur zorgt voor een meer geordende structuur in het membraan met een veranderende vloeibaarheid van het membraan als gevolg. Deze verandering heeft vooral invloed op de eiwitten die gebonden zitten op het membraan, zoals transporteiwitten. De lage temperatuur zorgt ook voor een vermindering van de hydrofobe interacties in native eiwitten, waardoor niet polaire delen van de polypeptiden worden blootgesteld aan water, wat kan leiden tot denaturatie.

De eerste reacties van de cel op een koude shock zijn vooral gericht op het herstellen van de fluiditeit van het membraan en op het voorkomen van destabilisatie van RNA. In een later stadium worden de global stress response genen (GSR) tot expressie gebracht. Deze bevatten de heat shock genen en bevatten alsook de genen die coderen voor enzymen die verantwoordelijk zijn voor de aanmaak van trehalose en glycogeen.

### **3.4.5. pH<sup>4</sup>**

De wort zuurt aan tijdens de fermentatie met een pH daling van 5,5 tot 4,1 voor een fermentatie met een lage gist. Deze daling is het gevolg van de vorming van CO<sub>2</sub> tijdens de fermentatie, de secretie van organische zuren door de gist en de consumptie van bufferende componenten tijdens de fermentatie, zoals aminozuren en primaire fosfaten. De grote pH daling kan alleen hierdoor niet verklaard worden. Verder onderzoek heeft uitgewezen dat de secretie van protonen door de gist verantwoordelijk is voor een groot deel van deze daling.

De pH daling kan een effect hebben op de gistcel. Zo werd een verminderde productie van DMS waargenomen (tot 50%) bij een dalende pH. Er werd bovendien aangetoond dat de omzetting van  $\alpha$ -acetolactaat tot diacetyl verviervoudigde wanneer de pH van de wort zakte van 5,5 tot 4.<sup>15</sup> Ook werd bij onderzoek<sup>16</sup> vastgesteld dat de daling in pH tijdens de fermentatie invloed had op de expressie van 36 genen, waaronder genen gerelateerd met onder andere de celwand, suikermetabolisme en redoxmetabolisme.

De gistcellen ondergaan tijdens het wassen met zuur ook een enorme verlaging van de pH, wat een drastisch effect kan hebben op de viabiliteit van de cultuur en op de fermentatie.

### **3.4.6. Schaarste aan nutriënten<sup>4</sup>**

Een gistcel heeft tijdens de groei en de fermentatie vooral nood aan een koolstofbron en een stikstofbron. Een tekort aan één van beide componenten kan ernstige gevolgen hebben voor de gistcel. Tijdens de productie van bier vormen de vergistbare suikers de voornaamste koolstofbron en ze worden opgenomen worden in een zeer specifieke volgorde (zie 1.4). Gist kan niet elke stikstofbron gebruiken om aan zijn noden te voldoen. Enkel stikstof in ammoniak (of ammonium), stikstofzouten, aminozuren en korte peptiden kunnen gebruikt worden als stikstofbron. Ook voor de opname van stikstof is er een strikte volgorde. Soms kan het brouwen met high gravity wort leiden tot problemen met het stikstofgehalte als er extra vergistbare suikers worden toegevoegd, aangezien er dan een verdunning optreedt van de aanwezige stikstofcomponenten ten opzichte van het totale suikergehalte. Meestal zal men er bij high gravity echter voor kiezen om te brouwen met meer mout.

### **3.4.7. Anaerobe shift<sup>4</sup>**

De gist haalt in het begin van de fermentatie zijn energie uit het aeroob metabolisme door de opgeloste aanwezige zuurstof (8-12 µg/ml) in de geaëreerde wort. Als die zuurstof opgebruikt is, gaat de gist over van het aeroob naar het anaeroob metabolisme en die overgang zorgt voor stress in de gistcel. De effecten van deze stress zijn echter niet zo dramatisch als de eerder beschreven stressreacties. Anaerobiosis (overgang naar anaeroob metabolisme) heeft een effect op het celvolume, genexpressie, opname van aminozuren en de celwand.



Stijgende CO<sub>2</sub> concentraties zorgen voor een inhibitie van de knopvorming en celdeling als gevolg van veranderend celvolume. De anaerobiosis zorgt voor een verandering in genexpressie bij 352 genen. De invloed is dus eerder beperkt, aangezien de gistcel dankzij het Crabtree effect ook onder aerobe condities het fermentatief metabolisme al in gang heeft gezet.

### **3.5. Brouwen met high gravity wort**

De fermentatie met bijhorende lagering is het meest tijdrovende deel van het brouwproces en een efficiënte fermentatie is dan ook van groot belang. De efficiëntie kan verhoogd worden door de selectie van de juiste giststam of door te werken bij optimale procesomstandigheden. Er zijn ook nog andere mogelijkheden, zoals een continue fermentatie of het brouwen met high gravity wort.

High gravity brouwen is brouwen met een verhoogd stamwortgehalte. Het verkregen bier wordt dan voor het bottelen gemengd met zuurstofvrij water om zo het gewenste alcoholpercentage te krijgen. Deze manier van brouwen zorgt voor een efficiënter gebruik van de brouwzaal maar ook voor een efficiëntere fermentatie, omdat het volumetrisch rendement verhoogt. Het geeft ook een zekere flexibiliteit aan de brouwer want die kan vanuit het moederbier, gebrouwen met high gravity wort, verschillende andere bieren produceren.<sup>17</sup>

Er zijn echter niet enkel voordelen aan deze techniek. Het verhoogde suikergehalte en de verhoogde ethanolconcentratie aan het einde van de fermentatie zorgen voor meer stress in de gistcel (zie 3.4). High gravity brewing kan leiden tot nutritionele stress door een tekort aan bijvoorbeeld stikstof of een tekort aan zuurstof bij het begin van de fermentatie. Niet elke giststam kan evengoed overweg met de stress die optreedt en soms zijn wortsupplementen een must om tot een succesvolle fermentatie te komen. Het verkregen bier moet voor het bottelen ook verdund worden. De concentratie aan belangrijke componenten zoals smaak- en aromacomponenten moet hoog genoeg zijn.

## **Materiaal en methode**

### **1. Gisten**

#### **1.1. Giststammen**

Voor het onderzoek werden vijf giststammen gebruikt.

- Gist 1: Laboratorium brouwerij, Campus Schoonmeersen
- Gist 2: Industriële hoge gist
- Gist 3: Industriële lage gist
- Gist 4: Droge gist Safale US-05
- Gist 5: Droge gist Safale K97

Giststammen 1, 2 en 3 werden opgegroeid vanuit een stockcultuur in wort broth en werden nadien op een wortagarplaat gebracht om de zuiverheid te controleren. Van die plaat werd telkens de cultuur op een schuine agarbuis gebracht. Die agarbuis werd na incubatie, tot voldoende groei van de gist, bewaard bij 4 °C en dient als werkcultuur om het inoculum te bereiden.

Voor de opmaak van de schuine agarbuizen wordt gebruik gemaakt van wort agar met 0,5% extra agar.

De twee droge gisten werden gerehydrateerd door 1 g droge gist in 10 ml steriel wort broth te suspenderen en dit vervolgens gedurende 30 minuten te laten rusten bij kamertemperatuur. Daarna werd deze suspensie gebruikt om te enten naar een groter volume wort broth medium (zie 1.2). Na het enten werd hiervan 100 µl op een wortagarplaat gebracht om te controleren op zuiverheid. Van die plaat werd de cultuur op een schuine agarbuis gebracht om ook voor de droge gisten een werkcultuur te hebben.

In dit onderzoek werd er voor gekozen om de droge gist niet rechtstreeks te enten maar om, net zoals de andere giststammen, op een schuine agarbuis te brengen en vandaar het inoculum te bereiden. Zo zijn de condities voor elke giststam dezelfde en worden de problemen met smaak omzeild die in de literatuur worden gerapporteerd<sup>18</sup>.

#### **1.2. Voorbereiden inoculum**

Het inoculum is de gistsuspensie die gebruikt wordt om de fermentatie op te starten. De bedoeling is om een gistcultuur te verkrijgen die op het einde van de exponentiële fase zit en een voldoende hoge celconcentratie heeft. Er moeten  $10^7$  gistcellen per ml geënt worden en dit zonder de wort al te veel te verdunnen.

De gist werd opgegroeid in wort broth. Wort broth is enkel selectief door zijn lage pH (4,8) en is daardoor geschikt om gisten en schimmels te laten groeien. De samenstelling lijkt op die van wort om zo de lag-fase zo kort mogelijk te maken. Het gebruikte wort broth heeft volgende samenstelling: amoniumchloride (1 g/L), dextrines (2,5 g/L), casein peptone (1 g/L), kaliumfosfaat (1 g/L), moutextract (15 g/L) en maltose (12,5 g/L). Casein

peptone bestaat gedeeltelijk gehydrolyseerde melkeiwitten waardoor een mengeling van aminozuren, korte peptiden en eiwitten ontstaat.

De gisten werden opgekweekt aan de hand van een aangepaste versie van het protocol opgesteld door het European Brewery Convention (EBC).

- Gistcultuur oppikken van stockcultuur op schuine agarbuis met entnaald en overbrengen in steriele erlenmeyer met 50 ml steriele wort broth
- Incuberen bij 25°C op schudplaat (150 rpm) gedurende 72 uur
- De 50 ml gistsuspensie overbrengen in 250 ml vers wort broth
- Incuberen bij 25°C op schudplaat (150 rpm ) gedurende 72 uur
- Staal nemen en gisttelling uitvoeren
- Indien niet voldoende geconcentreerd: gist laten uitzakken en gistarm wort broth verwijderen

## 2. Opvolgen van een fermentatie

Voor het opvolgen van een fermentatie zijn er een aantal toestellen en technieken nodig. De gebruikte technieken zijn onafhankelijk van de schaal van de fermentatie en deze zullen dan ook apart besproken worden in dit deel.

### 2.1. Telling levende gistcellen door uitplating

Een gisttelling kan veel informatie verschaffen. Zo krijgt men een idee over de concentratie aan cellen, maar kan men ook de verhouding bepalen tussen het aantal levende en dode cellen of de viabiliteit. De viabiliteit geeft aan in hoeverre een cultuur nog levend is met aanwijzingen en of ze nog in staat is om een nieuwe fermentatie uit te voeren.

De gisttelling door uitplating geeft enkel informatie over het aantal levende cellen en de daarmee samenhangende viabiliteit.

- Bierstaal homogeniseren door roeren met steriele roerstaaf
- 1 ml suspensie overbrengen in 9 ml steriel fysiologisch water (0,9 % NaCl)
- Telkens 1 ml suspensie in 9 ml steriel fysiologisch water overbrengen om een verdunningsreeks te maken van  $10^{-1}$  tot  $10^{-6}$
- Verdunningsreeks uitplaten (100 µl) op wortagar
- Na incubatie de platen tellen die tussen 30 en 300 kolonies bevatten

Het aantal levende cellen per milliliter kan nu bepaald worden door het getelde aantal kolonies te vermenigvuldigen met de verdunning en een factor 10. Die factor is nodig omdat we in plaats van 1 ml slechts 100 µl uitgeplaat hebben.

Om de viabiliteit te bepalen hebben we ook het totaal aantal cellen per ml nodig. Die waarde halen we uit een telling met een telkamer of uit een telling met de Cellometer. De viabiliteit is namelijk het aantal levende cellen ten opzichte van het totale aantal cellen en wordt uitgedrukt in %.

## 2.2. Gisttelling telkamer Thoma

De gisttelling met de Thoma telkamer kan zowel gebruikt worden om het totaal aantal cellen te bepalen als om de viabiliteit te bepalen. Gisttelling met telkamer van Thoma verloopt volgens volgend protocol.

- Homogeen staal nemen en 100 maal verdunnen
- Telkamer reinigen met alcohol
- Dekglasje aanbrengen en 10 µl verdund staal inbrengen aan beide telkamers
- Gistcellen tellen in beide telkamers die binnen het telraam vallen. Dochtercellen van delende gisten worden enkel geteld als de dochtercel groter is dan de helft van de moedercel
- $\text{Aantal cellen/ml} = \frac{\text{getelde cellen} \cdot \text{verdunningsfactor} \cdot 1000}{0,2 \text{ mm}^3}$

Indien de viabiliteit van de gistcultuur moet bepaald worden, dient men 500 µl van het verdunde staal te mengen met 500 µl methyleenblauw. Na 10 minuten wordt een gisttelling uitgevoerd zoals hierboven beschreven. De blauw gekleurde cellen worden als dood geteld en de kleurloze als levend. De levende cellen kunnen het binnengedrongen methyleenblauw omzetten naar zijn kleurloze gereduceerde vorm terwijl de dode cellen daartoe niet in staat zijn.

## 2.3. Gisttelling Cellometer

De Nexcelom Cellometer Auto M10 is een toestel dat, met behulp van een lichtmicroscoop gekoppeld aan patroonherkenningssoftware, een volledig geautomatiseerde gisttelling en viabiliteitsmeting kan uitvoeren. Na het inbrengen van het staal moet de microscoop in het toestel manueel scherp gesteld worden. Daarna worden met een interne camera meerdere foto's genomen en met behulp van gespecialiseerde herkenningssoftware wordt er een gisttelling uitgevoerd. Volgend protocol werd uitgevoerd bij het gebruik van de cellometer.

- Homogeen staal nemen en verdunnen
- Indien viabiliteitsmeting: evenveel methyleenblauw toevoegen als er staal aanwezig is en tien minuten laten inwerken
- 20 µl staal aanbrengen in wegwerp telkamer
- Software laten tellen en manueel elk telraam nakijken op eventuele fouten
- Resultaten aflezen

## 2.4. Beer analyser Anton Paar

### 2.4.1. Principe

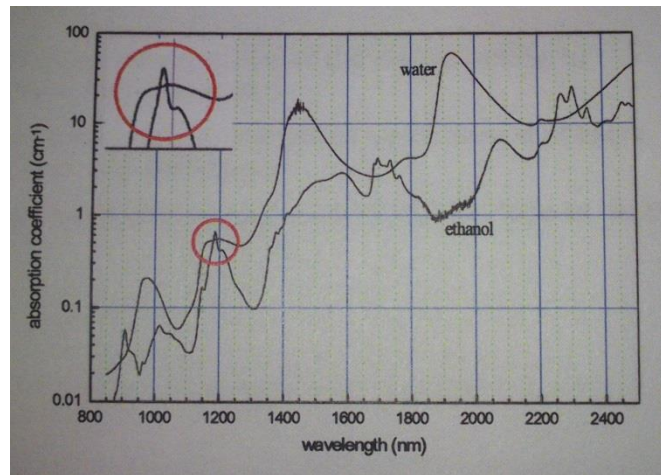
De beer analyser van Anton Paar wordt veel gebruikt voor analyses van wort en bier. In één analyse worden de meest belangrijke parameters gemeten. Na analyse krijgt men informatie over stamwortgehalte, werkelijk en schijnbaar extract, alcoholgehalte (vol/vol en m/m), werkelijke en schijnbare vergistingsgraad, pH, kleur en de

energetische waarde. Het toestel voert vier verschillende metingen uit en berekent de andere waarden uit de resultaten van deze vier metingen.<sup>19</sup>

De eerste meting is een densiteitsmeting. De densiteit of dichtheid geeft de verhouding weer tussen massa en volume en wordt uitgedrukt in g/cm<sup>3</sup> (SI: kg/m<sup>3</sup>). Een densiteitsmeting kan op verschillende manieren uitgevoerd worden, maar hier werd gekozen om de densiteit te meten aan de hand van een oscillerende U-tube. Het systeem bestaat uit een referentie oscillator, een oscillerende U-tube en een Pt-100 sonde. De temperatuursonde is nodig aangezien het volume afhankelijk is van de temperatuur. Het toestel corrigeert de temperatuur automatisch naar 20°C voor de analyse. De tube oscilleert constant aan de karakteristieke frequentie van de U-tube aan de hand van een elektromagnetisch systeem. Die karakteristieke frequentie is nu rechtstreeks te linken aan de dichtheid van de vloeistof in de U-tube. Hoe lager de frequentie van het oscillerend systeem is, hoe hoger de densiteit van de aanwezige vloeistof. De relatie tussen densiteit en de periode wordt weergegeven in volgende formule:  $\rho = A * P^2 - B$ .  $A$  en  $B$  zijn constanten die afhangen van de gebruikte apparatuur en worden bepaald aan de hand van een analyse met producten waarvan de dichtheid exact bepaald is, bijvoorbeeld water en gestandaardiseerde suikeroplossingen.  $P$  is de periode van de oscillatie.<sup>19</sup>

Op basis van de densiteitsmeting worden de meeste gegevens die volgen uit een analyse berekend. Naast het stamwortgehalte, het schijnbare en werkelijk extract, schijnbare en de werkelijke vergistingsgraad wordt ook de specifieke dichtheid berekend aan de hand van de bepaalde densiteit. De specifieke dichtheid of de SG<sup>20/20</sup> waarde geeft de verhouding aan van de gevonden dichtheid bij 20°C en de dichtheid van water bij 20°C.

Het alcoholgehalte wordt door dit toestel bepaald via een NIR meting, een optische methode die gebruik maakt van nabij infrarood (NIR) licht (760 nm tot 2500 nm). Het grote voordeel van deze methode is dat er enkel moet ontgast worden voor het staal gemeten kan worden. Het absorptiespectrum van water ligt in het NIR gebied meestal hoger dan dat van ethanol, waardoor ethanol niet kan aangetoond worden aangezien bier voor een groot deel uit water bestaat. Er bestaan echter een aantal golflengten waarbij ethanol sterker absorbeert dan water. Die golflengten kunnen gebruikt worden voor het aantonen van alcohol. Het is ook belangrijk dat de restsuikers die aanwezig zijn in het bier niet interfereren met de meting. De golflengte mag dus niet tussen 1300 nm en 1800 nm liggen, de golflengten waarbij de verschillende mogelijk aanwezige suikers het sterkst absorberen. Tussen 1150 en 1200 nm ligt een piek die voldoet aan alle eisen (zie Figuur 8). Door de oppervlakte onder de absorbantiecurve van ethanol te meten tussen golflengte 1 (daar waar de absorbantie van ethanol groter wordt dan die van water) en golflengte 2 (daar waar de absorbantie weer lager wordt) ten opzichte van een basislijn getrokken door de absorbantie bij golflengte 1 en 2, kan de alcoholconcentratie bepaald worden.<sup>19</sup>



**Figuur 8: Absorptiespectrum van ethanol in water<sup>19</sup>**

Er is nog een tweede optisch systeem aanwezig in de beer analyser om de kleur van het bier te bepalen. De kleur wordt bepaald door de absorptie te meten bij 430 nm via een doorvloeicel van 5 mm breed. Door de lage weglengte kan ook van sterk absorberende bieren (zeer donkere bieren) de kleur bepaald worden. De kleur wordt uitgedrukt in EBC, een eenheid opgesteld door de European Brewery Convention.<sup>19</sup>

De pH wordt bepaald aan de hand van een pH flow-trough cel die de simultane bepaling van de pH en de andere parameters toelaat. De aanwezigheid van een temperatuursonde in de pH meter zorgt ervoor dat er kan gecompenseerd worden voor de temperatuur. De pH wordt omgerekend naar die bij 25°C.<sup>19</sup>

#### **2.4.2. Analyses**

De analyse met de beer analyser van Anton Paar verloopt volgens onderstaand protocol.

- Indien eerste analyse van de dag: standard operation procedure (SOP) voor kalibratie uitvoeren
- Staal ontgassen door filtratie
- Anton Paar sample cup vullen met 30 ml ontgast staal en in de autosampler brengen
- Anton Paar Data Collector opstarten op PC en daarna analyse starten

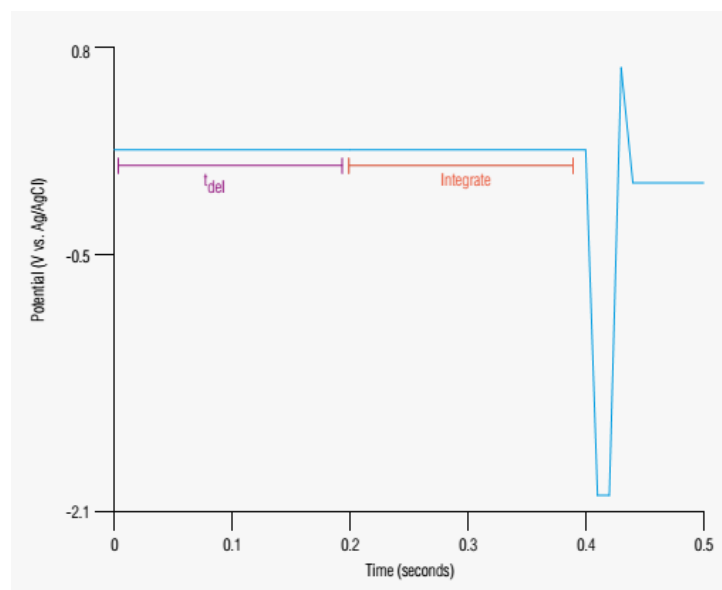
### **2.5. HPAEC – PAD (Dionex IC-3000)**

#### **2.5.1. Principe**

HPAEC-PAD of High Performance Anion Exchange Liquid Chromatography met Pulsed Amperometric Detection is een toestel dat in dit onderzoek gebruikt wordt om de concentratie van monosacchariden en enkele oligosacchariden te bepalen in wort en bier.

De bepaling van suikers met behulp van anion uitwisselingschromatografie maakt gebruik van de zwakzure eigenschappen van suikers bij hoge pH. Suikers hebben een pKa waarde tussen 12 en 14 en verliezen dus een proton bij een pH hoger dan 12. De OH-groepen van suiker worden gedeprotoneerd door de mobiele fase (165 mM NaOH). De lading hangt af van het aantal OH-groepen op de suikerketen en dus voornamelijk van de lengte van de suikerketen in dit onderzoek. De eerste stap is de bindingsstap aan de sterk positief geladen stationaire fase. De neutrale en positief geladen deeltjes worden weggespoeld in de mobiele fase. Na de bindingsstap worden de negatief geladen deeltjes losgemaakt van de stationaire fase door een zoutgradiënt aan te leggen met een oplossing van NaAc (165 mM NaOH en 300 mM NaAc). De minst sterk gebonden suikers komen eerst vrij en worden dus eerst gedetecteerd worden in de detector.<sup>20</sup>

De suikers worden gedetecteerd op basis van voltametrie. Er wordt een golfvormig potentiaal aangelegd over de gouden elektrode. Er kan elke halve seconde een meting uitgevoerd worden. Eerst is er de meetpotentiaal met uitstel. Hier zullen de suikers geoxideerd worden en de stroom die gegenereerd wordt tijdens deze oxidatie is een maat voor de concentratie aan de gouden elektrode. De volgende stap is een reductie door een dalende potentiaal over de elektrode, wat de elektrode reinigt en de productopbouw tegenhoudt. Na de reductie volgt een oxidatiestap om het goudverbruik te beperken. Het H<sub>2</sub> gas dat hier vrijkomt zorgt voor een nog betere reiniging. Daarna is er weer een reductie om goudoxide om te zetten naar goud (zie Figuur 9). Deze cyclus herhaalt zich telkens en geeft de concentratie van de verschillende componenten in functie van de tijd aan de hand van de stroomsterkte in de meetcel.<sup>20</sup>



Figuur 9: Het golfvormig potentiaal aangelegd over de gouden elektrode<sup>20</sup>

### 2.5.2. Standaarden en eluens

Alles wordt bereid met Milli-Q water (18MΩ), NaOH oplossing en de NaAc oplossing uit NaAc poeder zonder carbonaten. Carbonaat kan immers bij een pH hoger dan 12 een divalent anion vormen dat zich irreversibel aan de kolom zal binden. Dit zorgt voor een blijvend capaciteitsverlies van de kolom.

#### Fles A

- Eluensfles vullen met 1800 ml Milli-Q water
- 16,5 ml 50% NaOH toevoegen
- Aanlengen tot 2000 ml met 183,5 ml Milli-Q water
- Zacht mengen
- 10 minuten ultrasoonbad om te ontgassen
- Fles aansluiten en kraan opendraaien om fles onder He atmosfeer te brengen
- Pomp purgeren met nieuw eluens

#### Fles B

- Eluensfles vullen met 1800 ml Milli-Q water
- 16,5 ml 50% NaOH toevoegen
- 49,2 g NaAc toevoegen
- Aanlengen tot 2000 ml met 183,5 ml Milli-Q water
- Zacht mengen
- 10 minuten in ultrasoonbad om te ontgassen
- Fles aansluiten en kraan opendraaien om fles onder He atmosfeer te brengen
- Pomp purgeren met nieuw eluens

#### Standaarden

- Stockoplossingen maken: 1 mM glucose (0,018 g/100 ml), 1 mM fructose (0,018 g/100 ml), 1 mM sucrose (0,0171 g/50 ml), 1 mM maltose.1H<sub>2</sub>O (0,018 g/50 ml), 1 mM maltotriose (0,0252 g/50 ml) en 1 mM maltotetraose (0,01667 g/25ml)
- Aanmaken van ijklijn glucose (G), fructose (F) en sucrose (S) uit stockoplossing
  - 20 μM: 20 μl G + 20 μl F + 20 μl S + 940 μl Milli-Q water
  - 40 μM: 40 μl G + 40 μl F + 40 μl S + 880 μl Milli-Q water
  - 60 μM: 60 μl G + 60 μl F + 60 μl S + 820 μl Milli-Q water
  - 80 μM: 80 μl G + 80 μl F + 80 μl S + 760 μl Milli-Q water
  - 100 μM: 100 μl G + 100 μl F + 100 μl S + 700 μl Milli-Q water
- Aanmaken van ijklijn maltose (M2), maltotriose (M3) en maltotetraose (M4) uit stockoplossing
  - 20 μM: 20 μl M2 + 20 μl M3 + 20 μl M4 + 940 μl Milli-Q water
  - 40 μM: 40 μl M2 + 40 μl M3 + 40 μl M4 + 880 μl Milli-Q water



- 60 µM: 60 µl M2 + 60 µl M3 + 60 µl M4 + 820 µl Milli-Q water
- 80 µM: 80 µl M2 + 80 µl M3 + 80 µl M4 + 760 µl Milli-Q water
- 100 µM: 100 µl M2 + 100 µl M3 + 100 µl M4 + 700 µl Milli-Q water

### 2.5.3. Analyses

- Ijkljn aanmaken rechtstreeks aanmaken in geschikte vials
- Geschikte vial vullen met 1000 µl als blanco
- Staalname (eiwitvrij)
- Staal verdunnen met Milli-Q water om binnen de ijkljn te vallen en de verdunning in de vials brengen
- Chromeleon opstarten, stalen ingeven en juiste programma selecteren
- Blanco staal lopen om de kolom te equilibreren
- Ijlijnoplossing laten lopen aan het begin van de analyse en vervolgens na 20 à 25 stalen opnieuw laten lopen
- Bekomen chromatogram manueel controleren op fouten bij integratie
- Ijkljn maken op basis van de oppervlakte onder de curve
- Concentratie berekenen van de stalen aan de hand van de ijkljn en de bekomen oppervlakte onder de curve

## 2.6. Fermentatieprofiel opstellen

Het fermentatieprofiel is het verloop van de fermentatie in functie van de tijd. Voor de experimenten tot en met literschaal wordt de fermentatie gevolgd aan de hand van de maltoseconcentratie. Bij de experimenten op grotere schaal werd voor elk tijdstip een volledig suikerprofiel gemaakt om te bepalen in welke volgorde de verschillende gisten de verschillende suikers metaboliseren.

De maltose concentratie wordt bepaald met behulp van HPAEC-PAD zoals beschreven in Materialen en methoden, hoofdstuk 2.5. In de eerste week van de fermentatie wordt er dagelijks een staal genomen van 1 ml uit de fermenterende wort en in de tweede week gebeurt dit om de twee dagen. Van die stalen wordt de maltoseconcentratie bepaald en uitgezet in functie van de tijd.

## 3. Kwaliteitsonderzoek wort en bier

Het kwaliteitsonderzoek van wort en bier zijn hetzelfde voor elke proefopzet.

### 3.1. Opstellen suikerprofiel

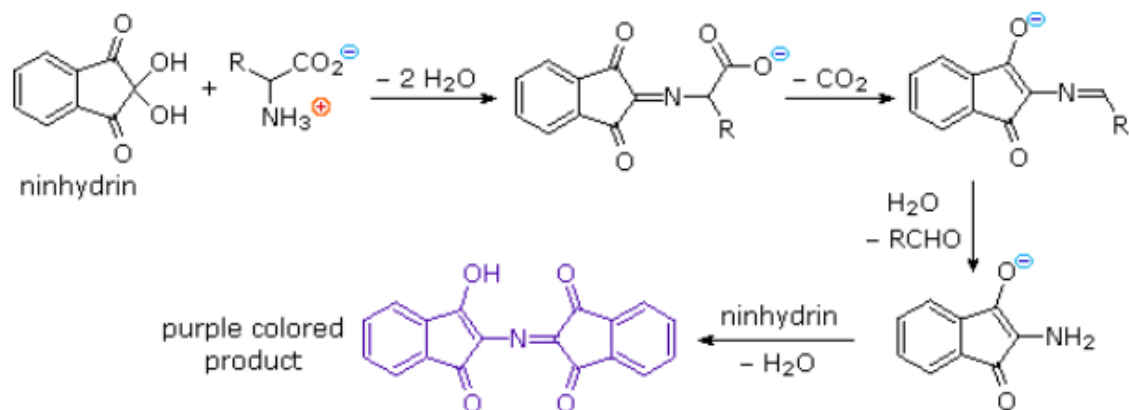
Het opstellen van een suikerprofiel gebeurt aan de hand van een HPAEC-PAD analyse, zoals beschreven in Materiaal en methoden, hoofdstuk 2.5. Een volledig suikerprofiel bestaat uit de concentratie van glucose, fructose, sucrose, maltose en maltotriose. De analyse voor de wortstalen moet in twee keer gebeuren omdat de pieken van glucose en fructose te dicht bij elkaar liggen in het chromatogram wanneer een volledig suikerprofiel zou bepaald worden in één analyse. Er wordt een programma gelopen voor het glucose-,

fructose- en sucrosegehalte te bepalen en een programma voor het maltose-, maltotriose en maltotetraose te bepalen.

### 3.2. FAN-gehalte

Zoals aangegeven in de literatuurstudie, zijn vrije aminozuren en korte peptiden zeer belangrijke stikstofbronnen voor de gist. Het FAN gehalte of free amino nitrogen gehalte is het gehalte aan aminozuren en di- en tripeptiden, een goede index voor de groeimogelijkheden van en fermentatiepotentieel van gist.<sup>21</sup>

De bepaling van het FAN gehalte gebeurt op basis van het protocol beschreven in Analytica-EBC<sup>22</sup>. Het is een methode gebaseerd op een kleurreactie met ninhydrine.



Figuur 10: Kleurreactie tussen aminozuren en ninhydrine

#### 3.2.1. Reagentia

- Kleurreagens: 10 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g ninhydrine en 0,3 g fructose oplossen in AD en aanlengen tot 100 ml
- Verdunningsvloeistof: 0,2 g KIO<sub>3</sub> oplossen in 60 ml en 40 ml 96%(vol/vol) ethanol toevoegen
- Glycine stock: 0,1072 g glycine oplossen in AD en aanlengen tot 100 ml
- Glycine standaard: 1 ml stockoplossing aanlengen tot 100 ml met AD

#### 3.2.2. Procedure wort

- Staal 100 maal verdunnen met AD zodat het 1 tot 3 mg aminostikstof bevat
- Proefbuizen en knickers eiwitvrij maken met chroomzuur
- 2 ml verdund staal of glycine standaardoplossing en 1 ml kleurreagens in proefbuis
- Drie glycine standaarden (10,72 mg/l) maken van 2 ml
- Proefbuizen afsluiten met knikker
- Proefbuizen in warm waterbad van 100 °C plaatsen gedurende 16 minuten
- Afkoelen in waterbad van 20 °C gedurende 20 minuten
- 5 ml verdunningsvloeistof toevoegen en absorbantie meten bij 570 nm

- $$FAN \left( \frac{mg}{liter} \right) = \frac{\text{Absorbantie} \cdot 2 \cdot \text{verdunningsfactor}}{(\text{gemiddelde absorptie standaarden})}$$

### 3.2.3. Procedure bier

De procedure voor bier is dezelfde als die voor wort maar er moet slechts 50 keer verdund worden.

## 3.3. Kleur

De kleurbeoordeling gebeurt met behulp van de beer analyser van Anton Paar, zoals beschreven in hoofdstuk 2.4.

## 3.4. Bitterheid

De bitterheid van bier komt voornamelijk van de iso- $\alpha$ -zuren die tijdens het kookproces uit de  $\alpha$ -zuren van de hop worden gevormd. Het iso- $\alpha$ -zuur wordt uit het aangezuurde wort of bier geëxtraheerd met iso-octaan en de absorptie bij 275 nm van de iso-octaanlaag kan worden omgerekend naar bittereenheden (EBU).

### 3.4.1. Reagentia

- 6 N HCl
- 2,2,4-trimethylpentaan of iso-octaan, spectroscopisch zuiver

### 3.4.2. Procedure

- Monster ontgassen zonder schuimvorming en helder maken door centrifugatie
- 10 ml bier overbrengen in maatcilinder met stop
- 1 ml HCl toevoegen
- 20 ml 2,2,4-trimethylpentaan toevoegen
- Maatcilinder afsluiten en 90 seconden krachtig schudden
- 15 minuten laten rusten
- Absorptie van 2,2,4-trimethylpentaanlaag meten ten opzichte van 2,2,4-trimethylpentaan blanco
- $EBU = A_{275} \cdot 50$

## 3.5. Totaal stikstofgehalte

### 3.5.1. Principe

Het totale stikstofgehalte hangt samen met het eiwitgehalte en kan worden bepaald met behulp van gaschromatografie. Het stikstofgehalte werd bepaald met van de elemental analyzer Flash EA1112 van Interscience.

Een CHN-analyse is een veelgebruikte analyse binnen de analytische chemie en geeft informatie over de koolstof-, waterstof- en stikstofgehalten. Het is een relatief eenvoudige analyse die het monster aan hoge temperaturen blootstelt in aanwezigheid van zuurstof. De gasvormige verbrandingsproducten worden daarna geanalyseerd met behulp van gaschromatografie.

De verbrandingsproducten zullen echter niet zonder voorbehandeling op de gaschromatografische kolom worden gebracht. De interesse ligt enkel bij het stikstofgehalte dus moeten het gevormde  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  verwijderd worden uit het gasmengsel.  $\text{CO}_2$  wordt verwijderd met behulp van soda lime (75%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 20%  $\text{H}_2\text{O}$ , 3%  $\text{NaOH}$  en 1%  $\text{KOH}$ ). Tijdens de reactie wordt er extra  $\text{H}_2\text{O}$  gevormd dat samen met het reeds aanwezige  $\text{H}_2\text{O}$  wordt verwijderd door moleculaire zeven met silica. Het gevormde  $\text{N}_x\text{O}_y$  wordt gereduceerd tot  $\text{N}_2$  in aanwezigheid van koper waardoor het door de moleculaire zeef geraakt.

De detectie gebeurt met behulp van een TCD detector of een thermische conductiviteitsdetector, een algemene detector op basis van thermische geleidbaarheid. De detector bestaat uit een elektrische verwarmde vezel die in een cel zit met een constante temperatuur. Zolang enkel het dragergas ( $\text{He}$ ) door de detector stroomt, blijft de warmtecapaciteit van het gas constant en dus ook de temperatuur in de detector. De warmtecapaciteit van een gas is afhankelijk van het aantal atomen in de moleculen van het gas. Wanneer er een ander gas dan het dragergas aanwezig is in de detector zal de warmtecapaciteit toenemen en de detector afkoelen. De veranderende temperatuur zorgt voor een veranderende weerstand die kan gemeten worden met een Wheatstone brug.

### 3.5.2. Protocol

- Software opstarten en toestel gebruiksklaar maken
- Cupje maken
- 75 mg chromosorb toevoegen en tarreren
- 60  $\mu\text{l}$  vloeibaar staal toevoegen
- Cupje sluiten
- Toestel ijken met drie cupjes die ongeveer 50 mg pasta referentiemateriaal bevatten (nettogewicht noteren)
- Gewicht ingeven in software en analyse opstarten
- % eiwit aflezen

## 4. Fermentatie op laboschaal

### 4.1. Materiaal

- Wort tripel, hier afgetapt in steriele containers van 1 liter na het koken en voor het afkoelen en steriel en gemaakt en gefilterd door koude sterilisatie (microfiltratie) voor gebruik
- Duran proefbuizen van 70 ml met metalen deksel, gesteriliseerd met autoclaaf
- 4 giststammen (gist 1 tot en met gist 4) opgegroeid zoals beschreven in deel 0 Gisten

## **4.2. Werkwijze bij experimenten bij verschillende temperaturen**

- Staalname wort voor kwaliteitsonderzoek
- 36 proefbuizen vullen met 55 ml wort (brouwnummer 383) in laminaire flow
- Negen buizen enten per giststam met  $10^7$  cellen/ml
- Drie buizen per giststam incuberen bij 18°C in anaerobe container in koelcel, drie buizen per giststam incuberen in anaerobe kast bij 25°C en drie buizen per giststam incuberen in de incubator in de anaerobe kast bij 30°C
- Staalname na 25,5u; 52,5u; 94u; 144u; 168u; 236u en 307u
- Opstellen van fermentatieprofiel aan de hand van de maltoseconcentratie (zie 2.6)
- Beëindigen van de fermentatie na 307u of 13 dagen
- Homogeen staal nemen voor viabiliteitsmeting door methyleenblauw en door uitplating
- Anton Paar analyse van het groenbier

## **4.3. Werkwijze experimenten met verschillende stamwortgehaltes**

- Staalname wort voor kwaliteitsonderzoek
- Wort (brouwnummer 681) na koude filtratie verdelen over drie duranflessen
- Stamwortgehalte bepalen
- Toe te voegen maltose berekenen via volgende formule  $m = (sM/100) / (z-s)/100$  met m de massa van de toe te voegen maltose, s de gewenste stijging van het stamwortgehalte in °P, M de massa van de wort en Z de zuiverheidsgraad van het gebruikte maltose
- Wort op hoger stamwortgehalte brengen met maltose
- 12 buizen vullen met 55 ml wort van 15,78°P, 12 buizen vullen met wort van 18,81°P en 12 vullen met wort van 21,76°P
- Drie buizen per giststam per stamwortgehalte enten met  $10^7$  cellen/ml
- Proefbuizen incuberen in de anaerobe kast bij 25°C
- Staalname na 24,0u; 50,0u; 70,5u; 170,5u; 219,5u; 315,5u; 386,5u en 504,0u
- Opstellen fermentatieprofiel aan de hand van de maltoseconcentratie
- Fermentatie beëindigen na 21 dagen
- Homogeen staal nemen voor viabiliteitsmeting via methyleenblauw en uitplating
- Anton Paar analyse van het bekomen groenbier

## **5. Fermentatie op literschaal**

### **5.1. Materiaal**

- Wort tripel, hier afgetapt na het koken en voor de koeling in een steriele Carlsbergfles van 20 liter
- 9 steriele erlenmeyers van 1 l door autoklaveren
- 9 steriele Duranflessen van 1 l door autoklaveren
- 3 giststammen (gist 3 t.e.m. gist 5) opgegroeid zoals beschreven in deel 0

## 5.2. Experiment op literschaal

- Staalname wort voor kwaliteitsonderzoek
- Stamwortgehalte bepalen
- Erlenmeyers tarreren
- 0,750 liter wort per erlenmeyer
- Massa en volume van de wort bepalen per erlenmeyer
- 3 erlenmeyers naar 19,5°P brengen en 3 erlenmeyers naar 22,7°P brengen met maltose zoals beschreven in 4.3
- Stamwortgehalte bepalen van elke erlenmeyer
- Temperatuurloggers instellen en in de erlenmeyers brengen
- Per stamwortgehalte 1 erlenmeyer enten per giststam met  $10^7$  cellen
- Incuberen in anaerobe kast bij 25 °C
- Staalname na: 24u; 45,5u; 69,5u; 95u; 167u; 212,5u; 260,5u; 327,5
- Fermentatie beëindigen na 14 dagen
- Anton Paar analyse op het verkregen groenbier
- Groenbier met deel van de uitgezakte gist overbrengen naar Duranflessen
- 2 weken lageren bij 2°C
- Kwaliteitsonderzoek op het bier

## 6. Fermentatie in piloot installatie

De fermentatie op pilotschaal werd uitgevoerd in de installaties aanwezig in het labo Brouwerij, Campus Schoonmeersen.

- Gist 5 opgroeien in tweevoud volgens volgend schema
  - Gistcultuur oppikken vanop schuine agarbuis met entnaald en overbrengen in 50 ml wortbroth
  - Na 48u incuberen gistsuspensie overbrengen in 250 ml wortbroth
  - Na 48u incuberen gistsuspensie overbrengen in 1 l wortbroth en 24u incuberen
- Wort aanmaken in de pilootinstallatie
- Enten met inoculum, geen telling uitgevoerd
- Staalname voor beeranalyser Anton Paar en voor het opstellen van een suikerprofiel na 19u; 43u; 65u; 137u en 161u
- Opstellen van fermentatieprofiel

## Resultaten en bespreking

### 1. Effect van temperatuur op de fermentatie

Het effect van de temperatuur op het fermentatieverloop werd onderzocht op 50 ml schaal met 4 industriële gisten, bij drie verschillende temperaturen en met wort BRN 383.

#### 1.1. Kwaliteitsonderzoek gebruikte wort

De resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de gebruikte industriële wort voor dit onderzoek worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 3). Hieruit blijkt dat de wort aan de eisen voor een goed fermentatieverloop voldoet. De verhoogde concentratie aan sucrose ten opzichte van de te verwachten concentratie na het beslaan, wijst op een aanpassing van de brouwer van het stamwortgehalte met sucrose tijdens het koken.

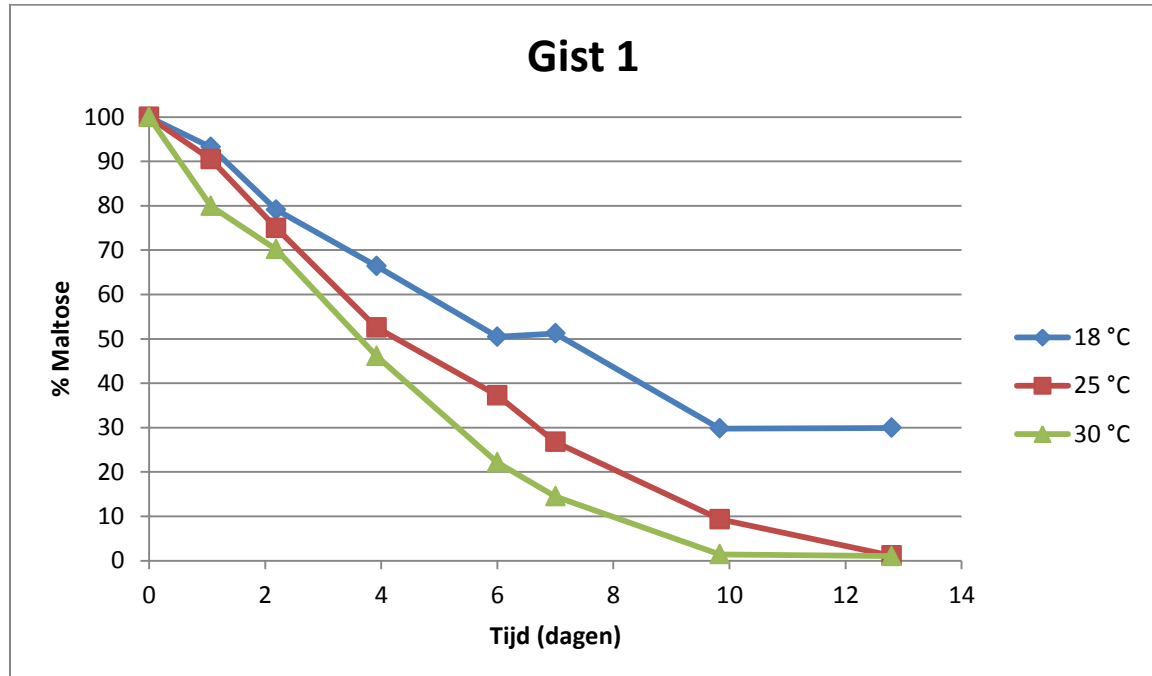
**Tabel 3: Overzicht van de kenmerken van de wort die gebruikt werd voor de studie van het effect van temperatuur op het fermentatieverloop**

| Parameter                                                               | Waarde      |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Bitterheid                                                              | 45,9        |
| FAN                                                                     | 212 mg/l    |
| Eiwitgehalte                                                            | 7,66 g/l    |
| Stamwortgehalte                                                         | 15,45 °P    |
| Kleur                                                                   | 13,8 EBC    |
| pH                                                                      | 5,09        |
| Glucoseconcentratie                                                     | 11,61 g/l   |
| Fructoseconcentratie                                                    | 1,19 g/l    |
| Sucroseconcentratie                                                     | 11,61 g/l   |
| Maltoseconcentratie                                                     | 69,98 g/l   |
| Maltotrioseconcentratie                                                 | 22,31 g/l   |
| Totaal fermenteerbare suikers                                           | 116,7 g/l   |
| Theoretisch te verwachten werkelijke vergistingsgraad                   | 75,5%       |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige fermentatie                    | 7,56% (v/v) |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige fermentatie zonder maltotriose | 6,11% (v/v) |

## 1.2. Het verloop van de fermentatie

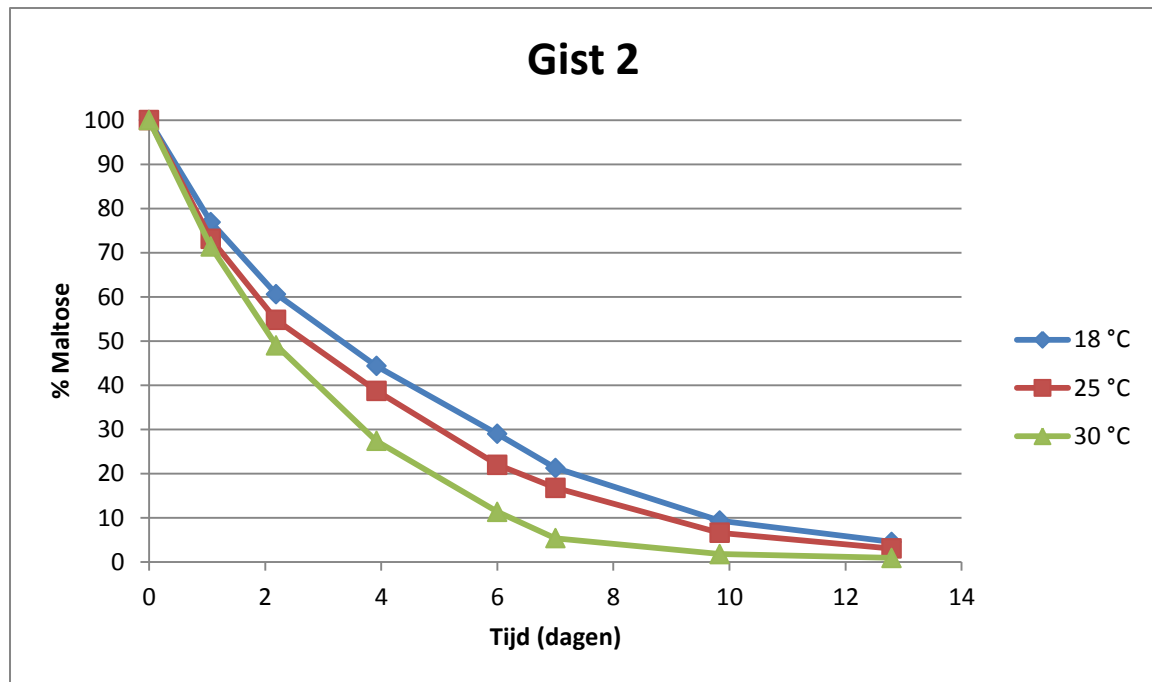
Een fermentatieprofiel geeft het verbruik van de vergistbare suikers in functie van de tijd en laat toe om het verloop van de fermentatie te schetsen. Er werd gekozen om de fermentatie op te volgen in functie van de maltoseconcentratie, omdat maltose aanwezig is in de hoogste concentratie en maltose gedurende de hele fermentatie aanwezig blijft in de fermenterende wort. De horizontale as geeft de tijd in fermentatiedagen weer, terwijl de verticale as het percentage resterend maltose geeft.

Onderstaande fermentatieprofielen tonen duidelijk aan dat een stijgende temperatuur zorgt voor een hogere fermentatiesnelheid. De mate waarin de fermentatiesnelheid wordt beïnvloed is afhankelijk van de gebruikte biergist. Het profiel van gist 1 toont een lichte verhoging in snelheid wanneer we de temperatuur met 5°C verhogen terwijl het verlagen van de temperatuur met 7 °C een dramatisch effect heeft op de snelheid (Figuur 11). De fermentatie valt zelfs volledig stil na 10 dagen met nog 25 % maltose over. Gist 2 en gist 3 worden minder beïnvloed door de temperatuursveranderingen maar er is nog steeds een snellere fermentatie met stijgende temperatuur (Figuur 12 en Figuur 13). Gist 4 heeft minder last van lage temperaturen tijdens de fermentatie. Het effect bij hoge temperaturen is voor deze gist spectaculair. De temperatuur in de anaerobe kast is tijdens het experiment door externe factoren wel opgelopen tot 28 °C (afgelezen op de thermometer aanwezig in de kast) en in de incubator tot 32 °C (afgelezen op de thermometer aanwezig op de incubator).

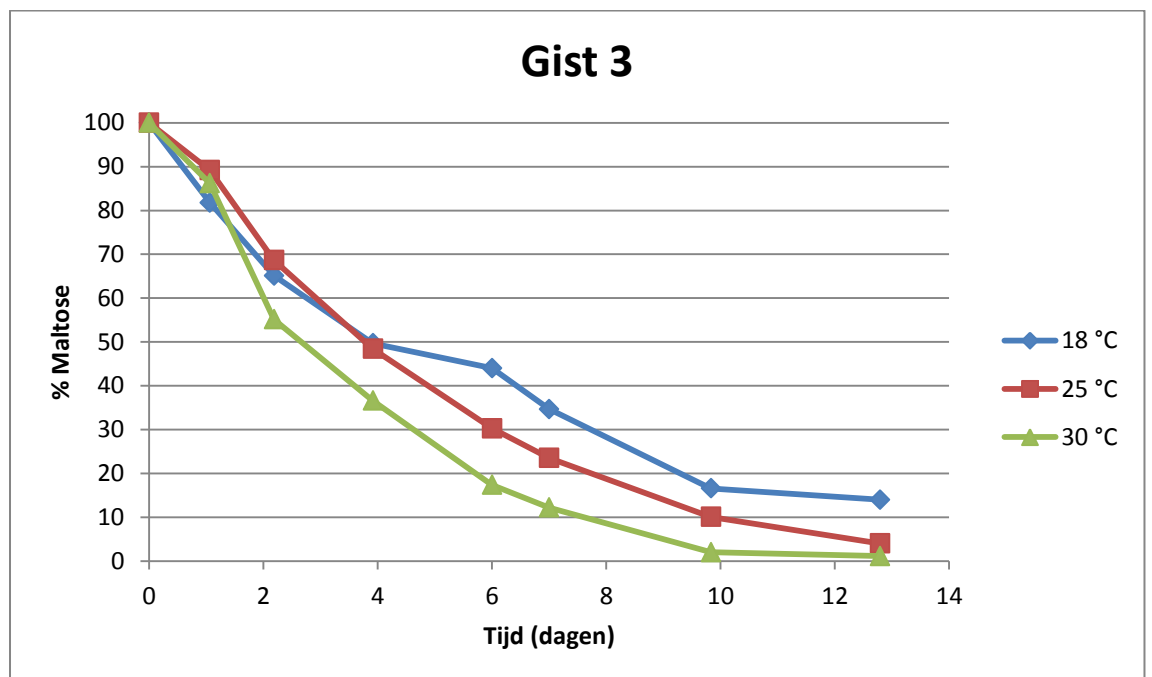


Figuur 11: Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort

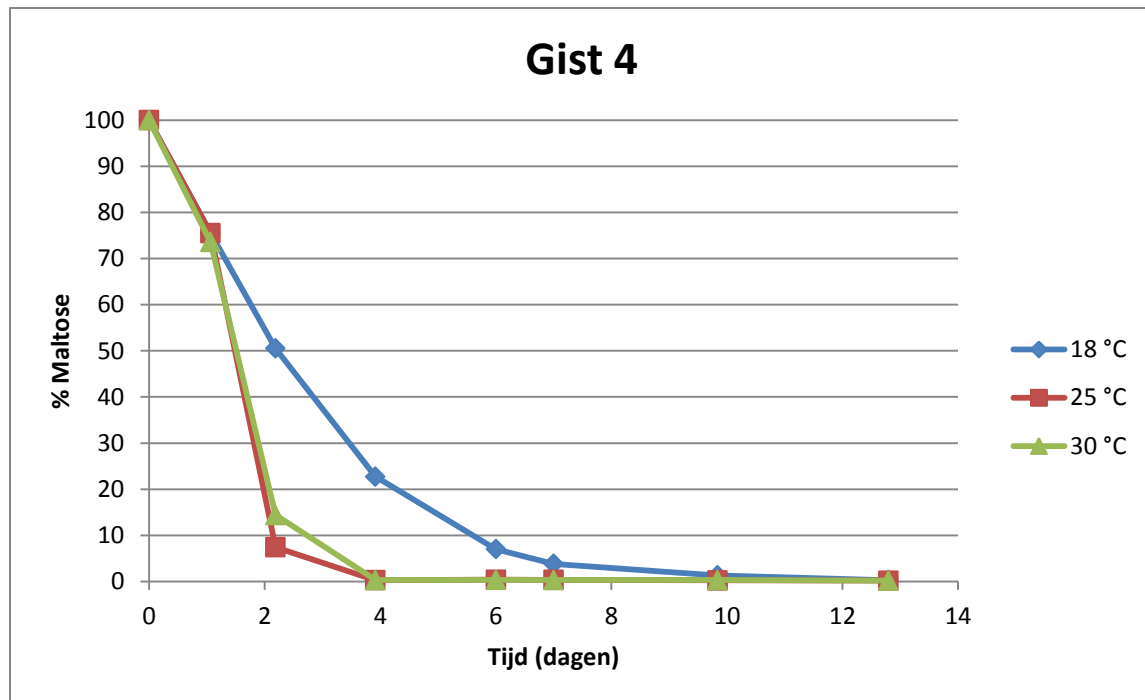




Figuur 12: Fermentatieprofiel van gist 2 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



Figuur 13: Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



**Figuur 14: Fermentatieprofiel van gist 4 bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort**

Na de fermentatie werd het groenbier gehomogeniseerd en werd een celconcentratie bepaald. De resultaten worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 4). Alle gisten vertonen ten opzichte van het startaantal gistcellen van  $10^7$  bij alle fermentatietemperaturen een stijging van het gistaantal. Dit komt overeen met 2 tot 3,5 generaties groei. Voor de gisten 2 en 4 neemt de stijging in gistaantal licht toe of blijft ongeveer gelijk met stijgende temperatuur. Gisten 1 en 3 daarentegen hebben ongeveer een zelfde gistaantal voor de temperaturen 18 en 30 °C met ongeveer een dubbele waarde voor 25 °C.

**Tabel 4: De resultaten van de gisting (in cellen/ml) na 13 dagen fermenteren bij drie verschillende temperaturen (18, 25 en 30 °C)**

|        | 18 °C              | 25 °C              | 30 °C              |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Gist 1 | 6,60E+07 cellen/ml | 11,2E+07 cellen/ml | 6,29E+07 cellen/ml |
| Gist 2 | 2,73E+07 cellen/ml | 2,99E+07 cellen/ml | 3,56E+07 cellen/ml |
| Gist 3 | 2,82E+07 cellen/ml | 5,28E+07 cellen/ml | 3,65E+07 cellen/ml |
| Gist 4 | 4,84E+07 cellen/ml | 4,58E+07 cellen/ml | 5,32E+07 cellen/ml |

### 1.3. Kenmerken van het groenbier

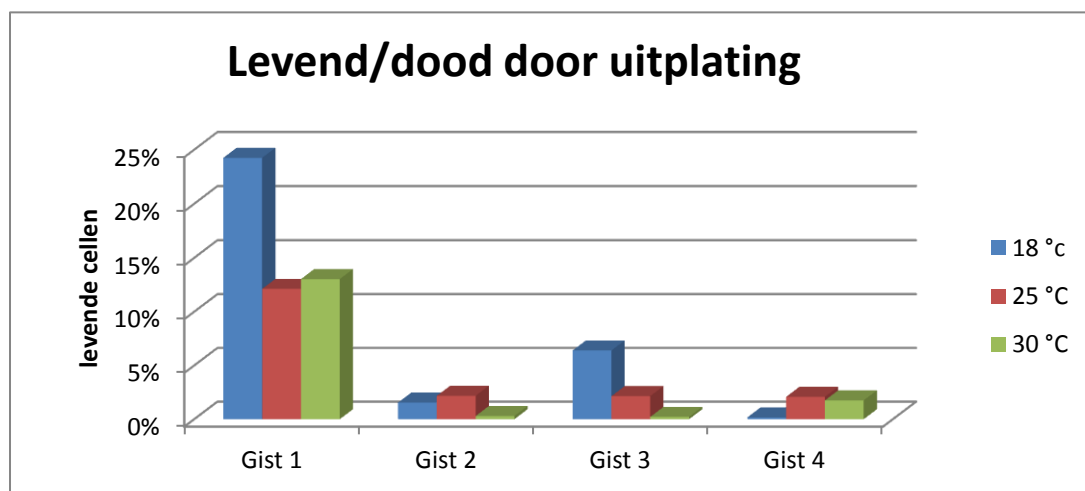
Het groenbier werd onderworpen aan een analyse met de beer analyser van Anton Paar en de onderstaande tabel geeft een overzicht van de verkregen resultaten (Tabel 5). De fermentatie bij 18°C levert voor de 4 gisten minder alcohol op dan bij het controle experiment bij 25 °C. Het verschil in restextract is echter niet zo groot bij gist 2 en gist 3. De fermentatie bij 30 °C geeft vergelijkbare resultaten als het experiment bij 25 °C voor gist 1, gist 2 en gist 3. Gist 4 geeft ondanks het snellere verbruik van maltose steeds minder alcohol en meer restextract dan de andere gisten bij 25 °C en 30 °C, met een slechtere vergistingsgraad als gevolg. De gisten 2 en 3 bij 25 °C en de gisten 1, 2 en 3 bij 30 °C vergisten minstens alle fermenteerbare suikers. De laatste kolom in Tabel 5 geeft het percent gevormde alcohol op verbruikte suikers met aanpassing voor 2 mol ethanol die gevormd wordt uit 1 mol suiker. Het verbruikte suiker wordt berekend door het startstamwortgehalte (15,45 °P) te verminderen met het werkelijke restextract van het groenbier. Het alcoholgehalte in % (m/m) wordt dan gedeeld door het verbruikte suiker in °P en vermenigvuldigd met 180/92 en omgezet naar %. Dit is voor meerdere van de fermentaties hoger dan 100 omdat maltose in massa niet tweemaal de massa van glucose is en omdat geen rekening gehouden werd met de verdunning van de wort door de toevoeging van entgist. Het is duidelijk dat veel gisten ook een groot deel van de verbruikte suiker benut hebben voor het metabolisme/groei ipv voor de alcoholvorming en dit vooral bij de fermentatie bij 18 °C voor de gisten 1 en 2.

**Tabel 5: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Er in °P), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en de % gevormde alcohol ten opzichte van verbruikte suiker**

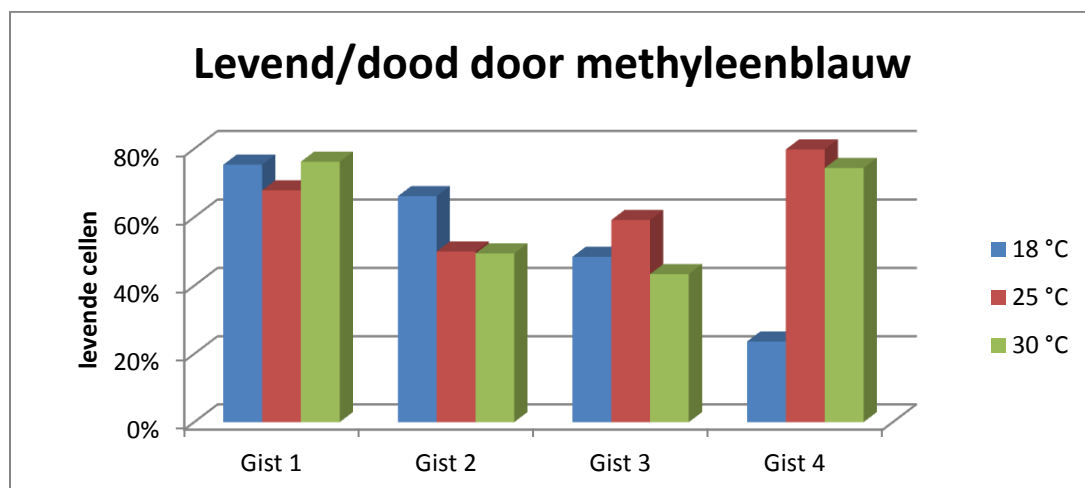
|              | Alcohol % (v/v) | Er (°P) | RDF (m/m) % | % alc/verbruikte suiker |
|--------------|-----------------|---------|-------------|-------------------------|
| 18 °C gist 1 | 4,62            | 6,61    | 52,8        | 84                      |
| 25 °C gist 1 | 6,69            | 5,15    | 67,7        | 89                      |
| 30 °C gist 1 | 6,83            | 5,29    | 67,6        | 93                      |
| 18 °C gist 2 | 5,80            | 4,93    | 65,5        | 85                      |
| 25 °C gist 2 | 6,97            | 5,27    | 67,7        | 105                     |
| 30 °C gist 2 | 6,97            | 5,07    | 68,7        | 109                     |
| 18 °C gist 3 | 5,64            | 5,72    | 62,5        | 114                     |
| 25 °C gist 3 | 7,00            | 5,48    | 67,4        | 104                     |
| 30 °C gist 3 | 7,00            | 5,47    | 67,7        | 109                     |
| 18 °C gist 4 | 5,26            | 5,52    | 60,5        | 107                     |
| 25 °C gist 4 | 6,11            | 6,03    | 62,0        | 108                     |
| 30 °C gist 4 | 6,01            | 5,64    | 62,4        | 95                      |

#### 1.4. Viabiliteit van de gist na de fermentatie

De viabiliteit van de gist na 13 dagen fermentatie werd bepaald door uitplaten en methyleenblauwkleuring. De resultaten zijn gegeven in Figuur 15 en Figuur 16. De resultaten van de viabiliteitsbepaling hangen sterk af van de gebruikte techniek. De bepaling met behulp van methyleenblauw vormt dan ook vaak enkel een indicatie van de viabiliteit van een gistcultuur. De viabiliteit is voor alle gisten na de fermentatie laag. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de gisten lang verbleven bij de fermentatietemperatuur. Uit de resultaten volgt wel dat gist 1 het meest bestand is tegen de onderzochte fermentatietemperatuur. (Figuur 15). De drie andere gisten zijn sterk gevoelig aan de stress van de fermentatietemperatuur, gecombineerd met een lange verblijftijd bij deze temperatuur en een relatief hoog alcoholgehalte.



Figuur 15: De viabiliteit na de fermentaties bij drie temperaturen (18, 25 en 30 °C), bepaald via uitplaten



Figuur 16: De viabiliteit na de fermentaties bij drie temperaturen (18, 25 en 30 °C), bepaald met methyleenblauwkleuring

## 2. Effect van stamwortgehalte op de fermentatie op 50 ml schaal

Het effect van het stamwortgehalte op het fermentatieverloop werd onderzocht op 50 ml schaal bij kamertemperatuur, met 4 industriële gisten en 3 verschillende stamwortgehaltenes.

### 2.1. Kwaliteitsonderzoek gebruikte wort

De resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de gebruikte industriële wort voor dit onderzoek worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 6). Hieruit blijkt dat de wort aan de eisen voor een goed fermentatieverloop voldoet. De verhoogde concentratie aan sucrose ten opzichte van de te verwachten concentratie na het beslaan wijst op een aanpassing van de brouwer van het stamwortgehalte met sucrose tijdens het koken.

Deze observatie was één van de redenen om tijdens de high gravity experimenten maltose te gebruiken om de hoger stamwortgehaltenes van 18,81 en 21,57 °P te bereiken.

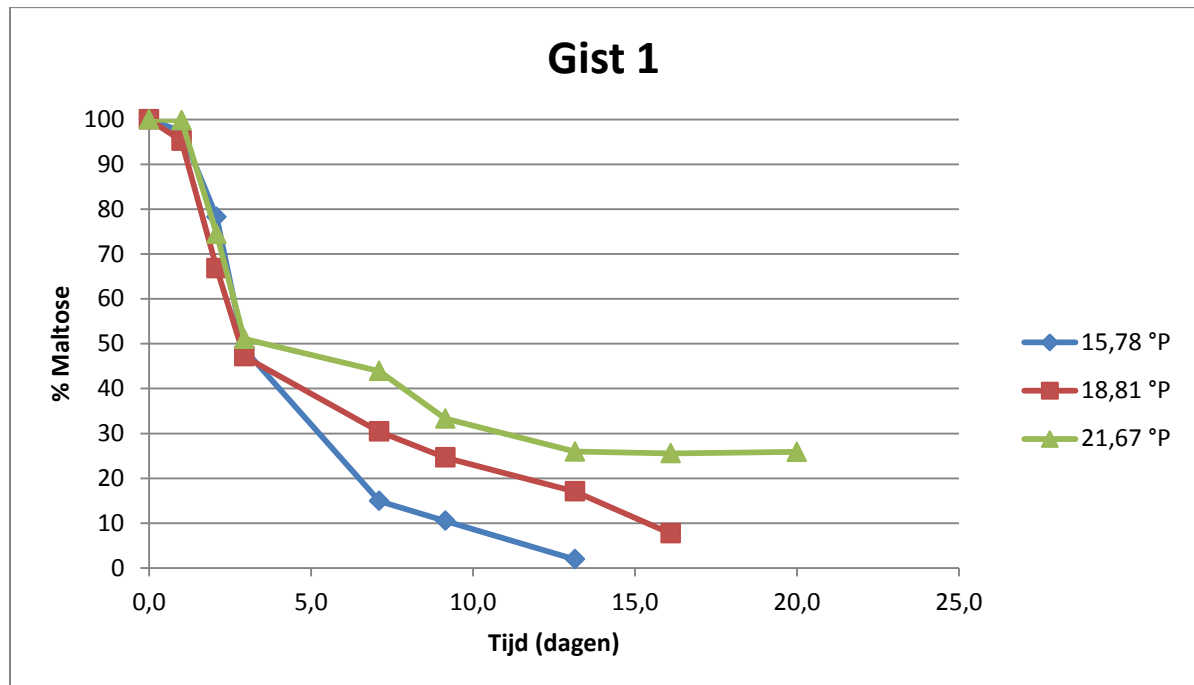
**Tabel 6: Overzicht van de kenmerken van de wort (BRN 681) die gebruikt werd voor de studie van het effect van stamwortgehalte op het fermentatieverloop van 4 gisten**

| Parameter                                                               | Waarde                              |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Bitterheid                                                              | 43,7 EBU                            |
| FAN                                                                     | 232 mg/l                            |
| Eiwitgehalte                                                            | 8,17 g/l                            |
| Stamwortgehalte                                                         | 15,78 °P - 18,81 °P - 21,57 °P      |
| Kleur                                                                   | 11,8 EBC                            |
| pH                                                                      | 5,19                                |
| Glucoseconcentratie                                                     | 12,15 g/l                           |
| Fructoseconcentratie                                                    | 1,79 g/l                            |
| Sucroseconcentratie                                                     | 9,62 g/l                            |
| Maltoseconcentratie                                                     | 66,81 g/l - 104,08 g/l - 137,70 g/l |
| Maltotrioseconcentratie                                                 | 23,13 g/l                           |
| Totaal fermenteerbare suikers                                           | 113,50 g/l – 150,77 g/l -184,39 g/l |
| Theoretisch te verwachten werkelijke vergistingsgraad                   | 71,2 % - 80,2 % - 85,5 %            |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige vergisting                     | 7,35 – 9,77 -11,94 %(v/v)           |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige fermentatie zonder maltotriose | 5,29 - 8,27 - 10,44 %(v/v)          |

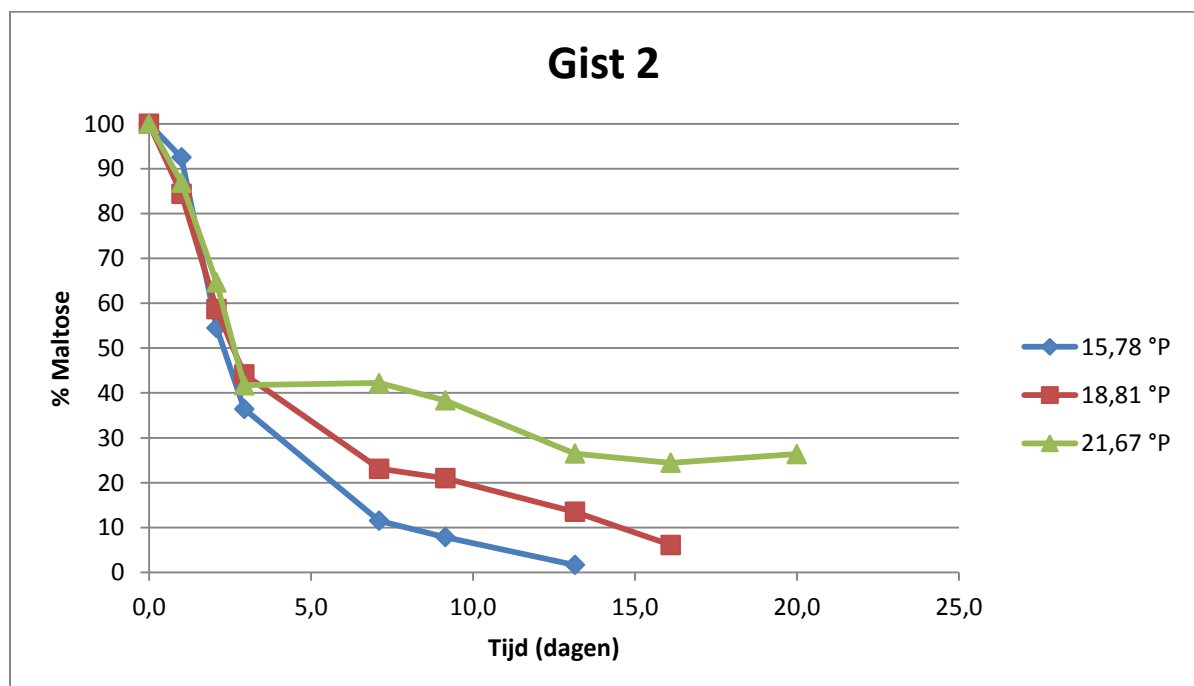
### 2.2. Het verloop van de fermentatie

Het fermentatieprofiel van gist 1 toont een tragere omzetting bij een stijgende concentratie aan vergistbare suikers (Figuur 17). Dit is een te verwachten trend. De fermentatie valt echter helemaal stil na 13 dagen wanneer men vertrekt van een stamwortgehalte van 21,67 °P. Het fermentatieprofiel van gist 2 lijkt sterk op dat van gist 1 (Figuur 18). Het effect van een stijgend stamwortgehalte is gelijkaardig en de

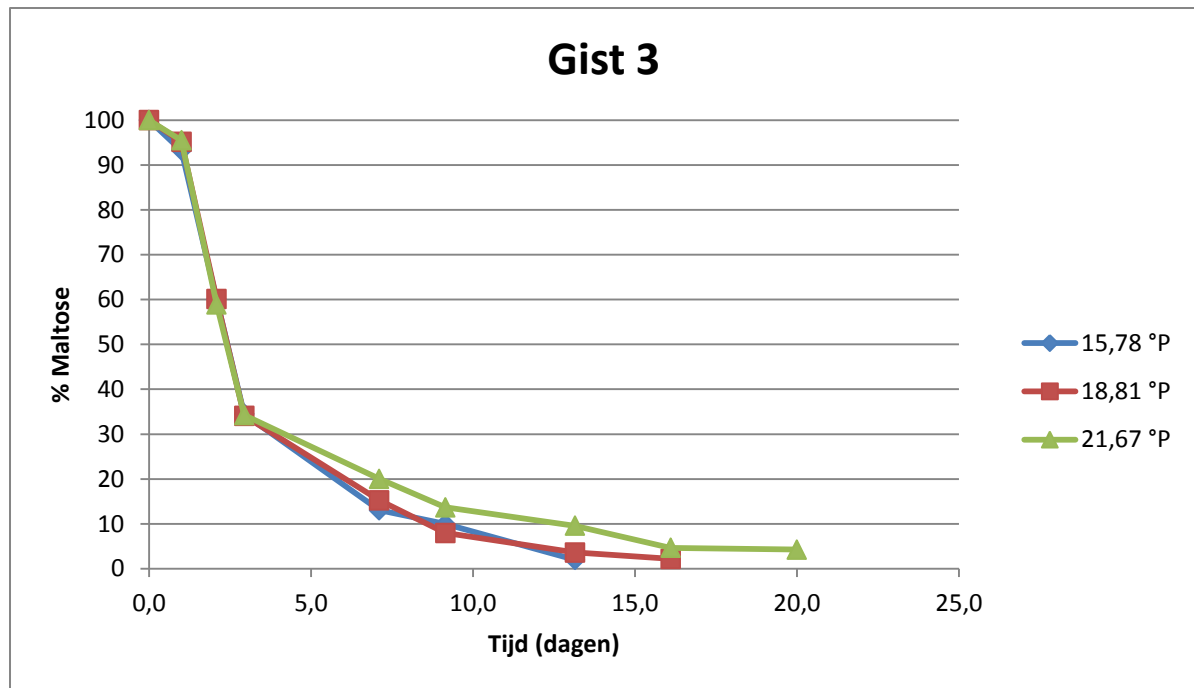
fermentatie valt ook stil rond dag 13. Bij gist 3 zien we ook een dalende snelheid bij een stijgend stamwortgehalte maar het effect is minder sterk dan bij de andere gisten (Figuur 19). Het effect van een stijgend stamwortgehalte op gist 4 lijkt op dat van gist 1 en 2 maar de fermentatie valt niet stil, zelfs niet bij het hoogste stamwortgehalte.



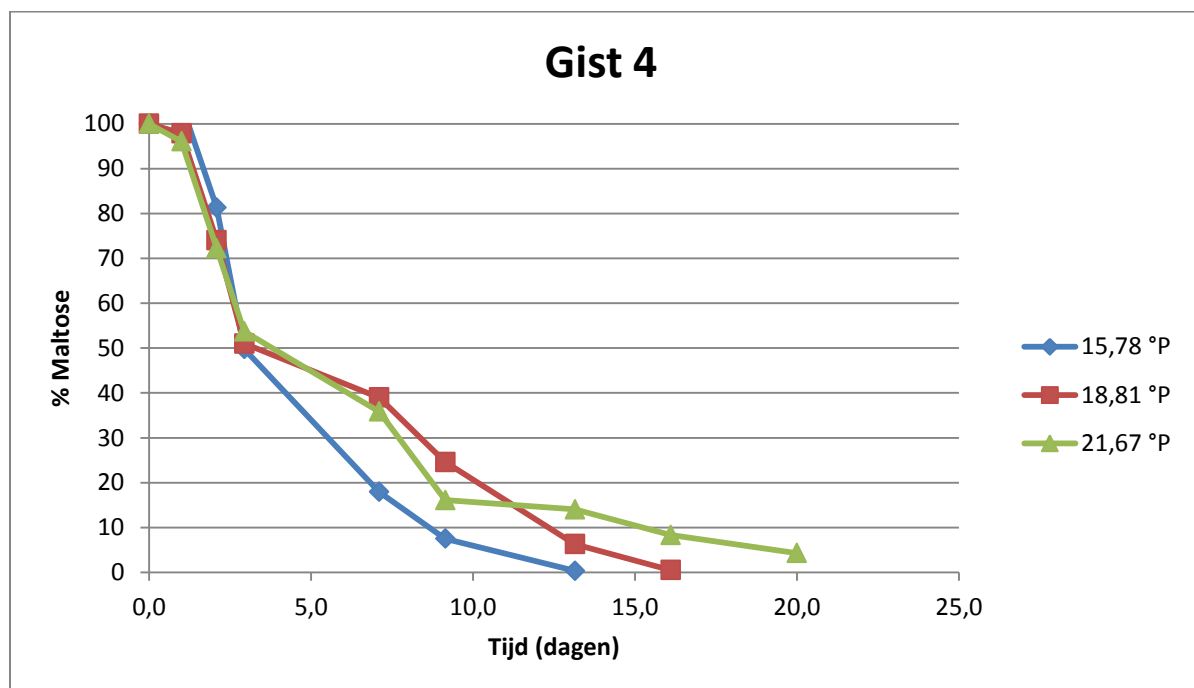
**Figuur 17:** Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende stamwortgehaltenes (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



**Figuur 18:** Fermentatieprofiel van gist 2 bij drie verschillende stamwortgehaltenes (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



**Figuur 19:** Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



**Figuur 20:** Fermentatieprofiel van gist 1 bij drie verschillende stamwortgehalten (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort

Na de fermentatie werd het groenbier gehomogeniseerd en werd een telling uitgevoerd in het kader van de bepaling van de viabiliteit. De telling leverde naast de viabiliteit ook het totaal aantal cellen per ml op. Tijdens de fermentatie bij 18,73 °P werd er voor de experimenten met gist 1, gist 3 en 4 meer biomassa gevormd dan bij de fermentatie bij 15,78 °P terwijl er bij de fermentatie bij 21,73 °P minder biomassa gevormd werd dan bij

de fermentatie bij 15,78 °P. De experimenten met gist 2 tonen een licht dalende biomassa met stijgend stamwortgehalte en bij het experiment bij 21,73 °P vond er geen celdeling plaats aangezien de wort werd geënt met  $10^7$  cellen/ml.

**Tabel 7: Het aantal cellen per ml, bepaald op het einde van de fermentatie**

|        | 15,78 °P           | 18,73 °P           | 21,73 °P           |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Gist 1 | 9,30E+07 cellen/ml | 13,0E+07 cellen/ml | 5,80E+07 cellen/ml |
| Gist 2 | 1,73E+07 cellen/ml | 1,48E+07 cellen/ml | 1,00E+07 cellen/ml |
| Gist 3 | 4,00E+07 cellen/ml | 4,80E+07 cellen/ml | 3,00E+07 cellen/ml |
| Gist 4 | 7,30E+07 cellen/ml | 9,00E+07 cellen/ml | 3,20E+07 cellen/ml |

### 2.3. Kenmerken van het groenbier

De resultaten van de analyses van het verkregen groenbier worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 8). Gist 4 heeft voor de fermentatie van 15,78 °P een lager alcoholgehalte en een hoger restextract dan de andere gisten. De vergelijking tussen de experimenten bij 18,81 °P en 21,67 °P toont een beperkte verhoging in alcoholgehalte bij gist 1 en 2 terwijl gist 3 en 4 de fermentatie als maltoseverbruik bij 21,67 °P wel tot een goed einde brengen met een RDF van respectievelijk 72,5 % en 71,4 %. Ook hier werd het percent alcoholopbrengst ten opzichte van de verbruikte suiker weergegeven in de tabel. De verbruikte suiker is door alle gisten grotendeels benut voor de alcoholvorming.

**Tabel 8: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en % gevormde alcohol ten opzichte van verbruikte suiker**

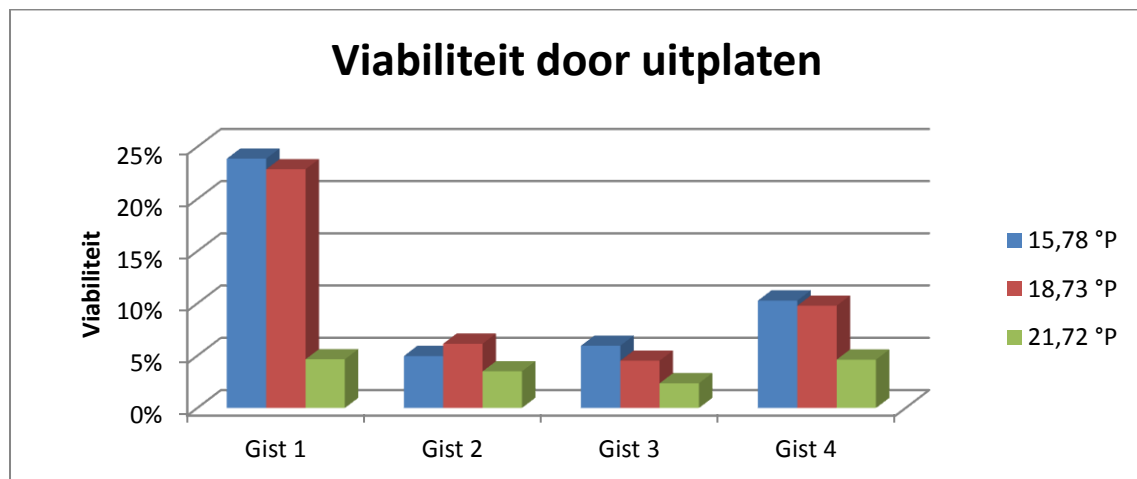
|                  | Alcohol %(v/v) | Er %(m/m) | RDF (m/m) % | % alc/verbruikte suiker |
|------------------|----------------|-----------|-------------|-------------------------|
| 15,78 °P Gist 1  | 6,94           | 5,42      | 67,4        | 108                     |
| 18, 81 °P Gist 1 | 8,00           | 6,24      | 67,4        | 106                     |
| 21,67 °P Gist 1  | 8,84           | 8,67      | 61,1        | 107                     |
| 15,78 °P Gist 2  | 6,87           | 5,36      | 67,4        | 106                     |
| 18, 81 °P Gist 2 | 7,90           | 6,27      | 67,0        | 103                     |
| 21,67 °P Gist 2  | 8,16           | 9,01      | 59,1        | 101                     |
| 15,78 °P Gist 3  | 6,82           | 5,46      | 66,9        | 102                     |
| 18, 81 °P Gist 3 | 8,39           | 5,52      | 71,1        | 102                     |
| 21,67 °P Gist 3  | 10,02          | 6,14      | 72,48       | 106                     |
| 15,78 °P Gist 4  | 6,43           | 5,99      | 63,4        | 104                     |
| 18, 81 °P Gist 4 | 8,31           | 5,59      | 70,61       | 105                     |
| 21,67 °P Gist 4  | 9,76           | 6,34      | 71,38       | 104                     |



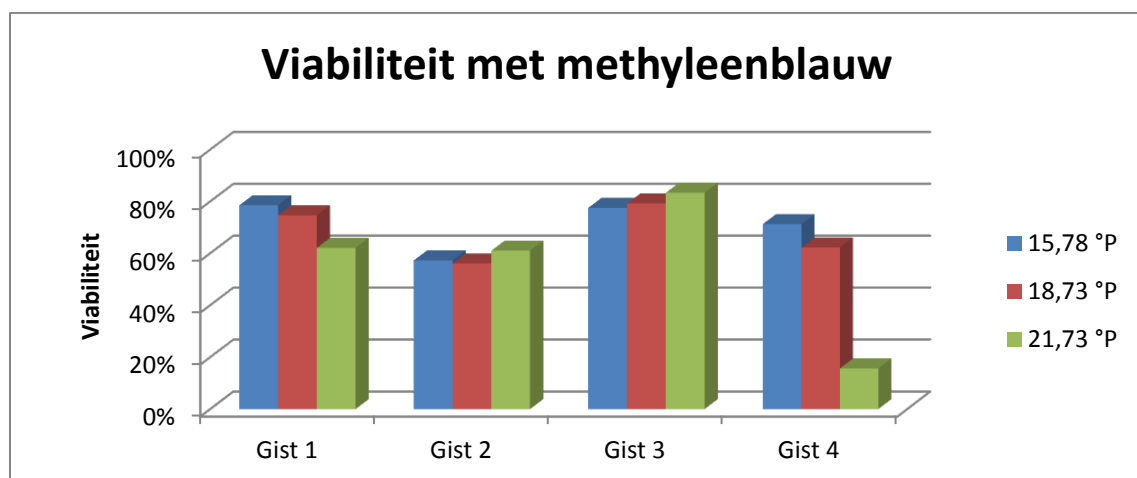
## 2.4. Viabiliteit van de gist na de fermentatie

De viabiliteit van de gist na 13, 16 en 20 dagen fermentatie voor respectievelijk de experimenten bij 15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P werd bepaald door uitplaten en methyleenblauwkleuring. De resultaten zijn gegeven in Figuur 21 en Figuur 22. Het verschil tussen de bepaling door uitplating en de bepaling met methyleenblauw is groot en de bespreking zal op basis van de meest betrouwbare methode gebeuren zijnde het uitplaten. De viabiliteit is lager dan verwacht maar de oorzaak kan weer worden toegeschreven aan de te lange verblijftijd bij de fermentatietemperatuur en het verhoogd alcoholgehalte.

Het effect van het verhogen van de suikerconcentratie resulteert telkens in een daling van de viabiliteit wat overeenstemt met de verwachtingen. Het verschil in viabiliteit van de gist tussen de fermentatie bij 18,81 °P en 21,67 °P is het grootst bij gist 1, hoewel de globale viabiliteit ongeveer dezelfde is dan deze van de drie andere gisten bij dit hoogste stamwortgehalte.



Figuur 21: Viabiliteit na de fermentaties bij drie stamwortgehaltes (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P), bepaald via uitplaten



Figuur 22: Viabiliteit na de fermentaties bij drie stamwortgehaltes (15,78 °P, 18,81 °P en 21,67 °P), bepaald met methyleenblauwkleuring

### 3. Effect van stamwortgehalte op de fermentatie op literschaal

Het effect van het stamwortgehalte op het fermentatieverloop werd onderzocht op 750 ml schaal bij kamertemperatuur, met 3 industriële gisten en 3 verschillende stamwortgehaltenes.

#### 3.1. Kwaliteitsonderzoek wort

De resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de gebruikte industriële wort (met code 1L) voor dit onderzoek worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 9). Hieruit blijkt dat de wort aan de eisen voor een goed fermentatieverloop voldoet. De verhoogde concentratie aan sucrose ten opzichte van de te verwachten na het beslaan wijst op een aanpassing door de brouwer van het stamwortgehalte met sucrose tijdens het koken. Deze vaststelling was één van de redenen waarom maltose werd gebruikt om de hogere stamwortgehaltenes van 19,5 °P en 22,7 °P te bereiken. De waarden voor de maltoseconcentratie en het stamwortgehalte zijn gemiddelde waarden aangezien voor elk erlenmeyer afzonderlijk op een hoger stamwortgehalte gebracht werd. De waarden die berekend werden vanuit deze concentratie zijn dus ook gemiddelde waarden. De concentraties die gebruikt werden om het fermentatieprofiel op te stellen zijn wel de afzonderlijke concentraties

**Tabel 9: Overzicht van de kenmerken van de wort (1L) die gebruikt werd voor de studie van het effect van stamwortgehalte op het fermentatieverloop**

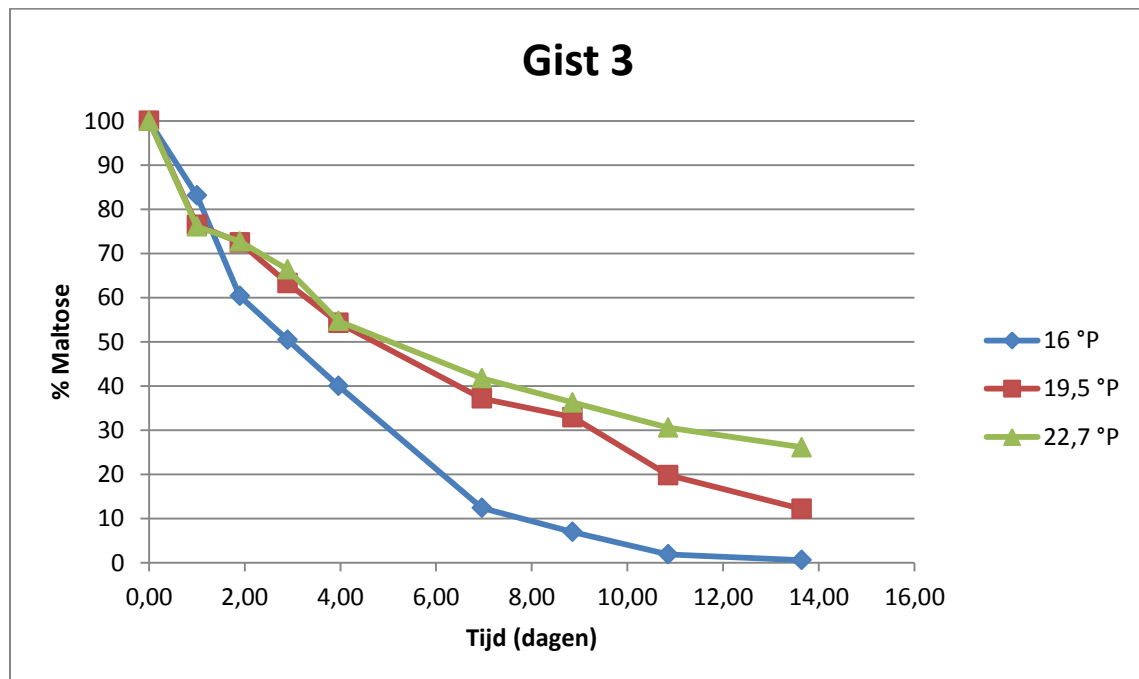
| Parameter                                                               | Waarde                               |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Bitterheid                                                              | 39,0 EBU                             |
| FAN                                                                     | 217 mg/l                             |
| Eiwitgehalte                                                            | 7,14 g/l                             |
| Stamwortgehalte                                                         | 15,64 °P – 19,5 °P – 22,7 °P         |
| Kleur                                                                   | 25,8 EBC                             |
| pH                                                                      | 5,2                                  |
| Glucoseconcentratie                                                     | 11,73 g/l                            |
| Fructoseconcentratie                                                    | 1,54 g/l                             |
| Sucroseconcentratie                                                     | 7,54 g/l                             |
| Maltoseconcentratie                                                     | 71,85 g/l - 103,45 g/l – 148,77 g/l  |
| Maltotrioseconcentratie                                                 | 15,74 g/l                            |
| Totaal fermenteerbare suikers                                           | 108,01 g/l – 140,00 g/l – 185,31 g/l |
| Theoretisch te verwachten werkelijke vergistingsgraad                   | 69,0 % - 71,79 % - 81,63 %           |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige vergisting                     | 7,00 – 9,06 – 12,01 %(v/v)           |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige fermentatie zonder maltotriose | 6,00 – 8,04 – 10,98 % (v/v)          |

### 3.2. Het verloop van de fermentatie

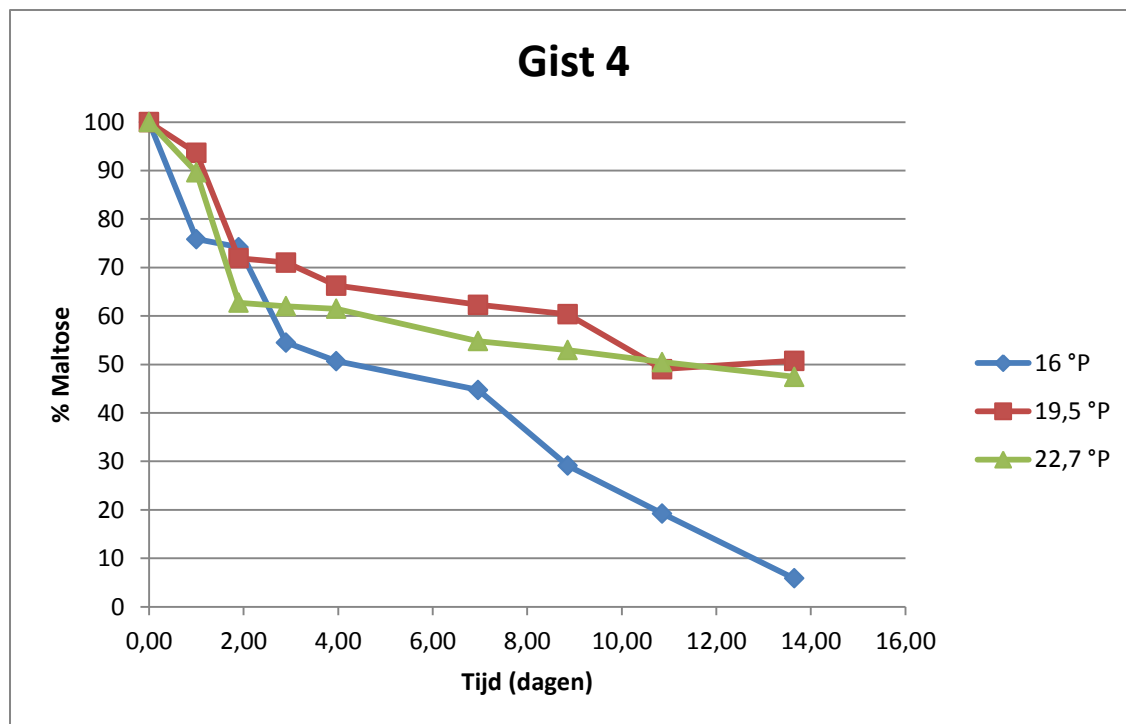
Het fermentatieprofiel van gist 3 toont net zoals bij de experimenten op laboschaal een dalende snelheid bij stijgende stamwortgehalten (Figuur 23). Het effect van de stijgende suikerconcentratie is echter groter bij de experimenten op literschaal dan bij de experimenten op laboschaal. Het fermentatieprofiel van gist 4 toont een geremde fermentatie bij 15,64 °P en het stilvallen van de fermentatie bij 19,5 °P en 22,7 °P (Figuur 24). Eerdere experimenten hebben aangetoond dat deze gist in staat is om fermentaties met een verhoogd stamwortgehalte tot een goed einde kan brengen dus het verhoogd stamwortgehalte kan dit resultaat niet verklaren.

Het fermentatieprofiel van gist 5 toont een tragere fermentatie bij een hogere suikerconcentratie maar de vertraging is niet zo uitgesproken als bij gist 3.

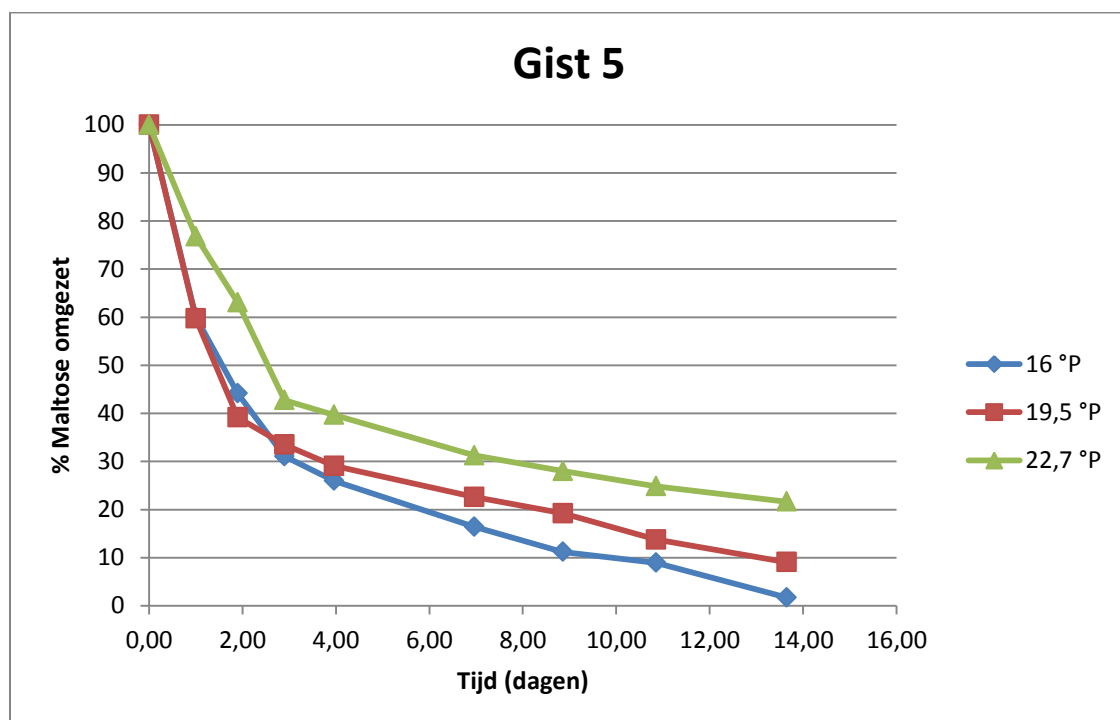
Gedurende de experimenten op literschaal werd de temperatuur geregistreerd voor elke fermentatie met behulp van een temperatuurlogger. De temperatuur liep gelijk voor alle giststammen en bleef tussen 22,5 °C en 28 °C. De schommelingen liepen gelijk met de schommelingen in de anaerobe kast.



Figuur 23: Fermentatieprofiel van gist 3 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort

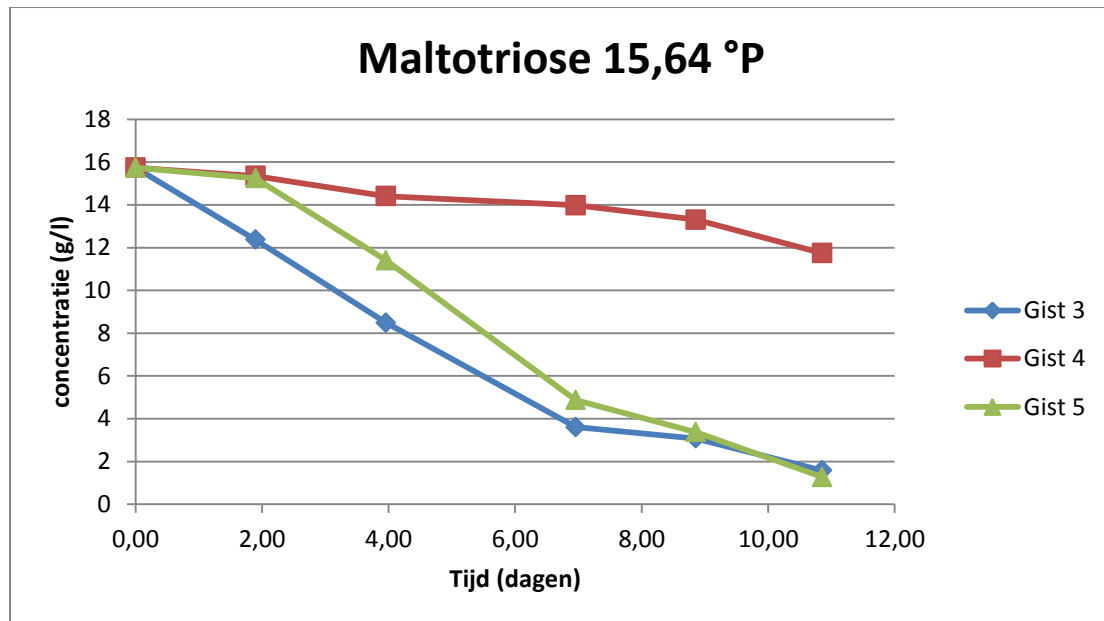


**Figuur 24:** Fermentatieprofiel van gist 4 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort



**Figuur 25:** Fermentatieprofiel van gist 5 bij drie verschillende stamwortgehalte (15,64 °P, 19,5 °P en 22,7 °P) aan de hand van het percentage maltose dat nog rest in de fermenterende wort

Onderstaande grafiek geeft de maltotriose concentratie weer in functie van de tijd tijdens het controle experiment dat werd uitgevoerd met wort met stamwortgehalte van 15,64 °P (Figuur 26). Er is te zien dat gist 3 al na twee dagen maltotriose heeft gebruikt als suikerbron. Gist 5 gebruikt maltotriose na vier dagen als suikerbron. Gist 4 begint pas na negen dagen fermenteren maltotriose te gebruiken als suikerbron.



**Figuur 26:** De concentratie van maltotriose in functie van de tijd bij fermentatie van wort met stamwort 15,64 °P en de gisten 3,4 en 5.

Onderstaande tabel geeft de glucoseconcentraties weer gedurende de eerste twee dagen van het experiment op literschaal. Zowel gist 4 als gist 5 hebben zo goed als al het glucose verbruikt na 1 dag terwijl gist 3 pas na 2 dagen zo goed als al het glucose heeft opgebruikt. Bij gist 3 zien we ook een versnelde opname van glucose bij een stijgend stamwortgehalte.

**Tabel 10:** Glucoseconcentraties tijdens de eerste twee dagen van het experiment

| Fermentatiedagen: | start | 1    | 1,9  |
|-------------------|-------|------|------|
| 15,64 °P Gist 3   | 11,73 | 3,22 | 0,61 |
| 15,64 °P Gist 4   | 11,73 | 0,23 | 0,12 |
| 15,64 °P Gist 5   | 11,73 | 0,49 | 0,44 |
| 19,5 °P Gist 3    | 11,73 | 2,74 | 0,67 |
| 19,5 °P Gist 4    | 11,73 | 0,25 | 0,10 |
| 19,5 °P Gist 5    | 11,73 | 0,47 | 0,45 |
| 22,7 °P Gist 3    | 11,73 | 2,33 | 0,45 |
| 22,7 °P Gist 4    | 11,73 | 0,20 | 0,12 |
| 22,7 °P Gist 5    | 11,73 | 0,48 | 0,40 |

### 3.3. Kenmerken van het groenbier

De resultaten van de analyses van het bekomen groenbier worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 11). Zowel gist 3 als gist 5 hebben geen problemen met het hoge alcoholgehalte. Gist 5 heeft in alle gevallen een hogere vergistingsgraad wat wijst op een efficiëntere omzetting van suikers naar alcohol en een snellere werking in het geval van de experimenten bij 22,7 °P. Het alcoholgehalte bij het experiment met gist 5 bij 19,5 °P ligt hoger dan het gemiddelde theoretisch maximum wat verklaard wordt door dat de maltoseconcentratie voor de experimenten met gist 5 hoger lagen dan de gemiddelde waarde.

**Tabel 11: : Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p) en werkelijke vergistingsgraad (RDF in %)**

|                 | Alcohol % (v/v) | Er % (m/m) | RDF(m/m) % |
|-----------------|-----------------|------------|------------|
| 15,64 °P Gist 3 | 7,06            | 5,65       | 66,7       |
| 19,5 °P Gist 3  | 8,63            | 6,97       | 66,6       |
| 22,7 °P Gist 3  | 9,58            | 9,48       | 61,7       |
| 15,64 °P Gist 4 | 6,01            | 6,81       | 58,6       |
| 19,5 °P Gist 4  | 5,03            | 11,83      | 40,0       |
| 22,7 °P Gist 4  | 6,17            | 13,61      | 41,4       |
| 15,64 °P Gist 5 | 7,55            | 4,69       | 72,3       |
| 19,5 °P Gist 5  | 9,21            | 5,69       | 72,4       |
| 22,7 °P Gist 5  | 9,6             | 8,71       | 63,8       |

Enkel de gisten 3 en 5 overschrijden het theoretisch te verwachten alcoholgehalte bij volledige fermentatie zonder maltotriose voor het stamwortgehalte 15,64 en 19,5 °P. Gist 4 doet dit voor geen enkel stamwortgehalte. In het kader van een ander project werden gist 4 en gist 5 getest in gelijkaardige omstandigheden. Wort 1L werd volgens de methode beschreven in Materiaal en methoden op een hoger stamwortgehalte gebracht. De fermentatie werd uitgevoerd met 500 ml wort in een fles die afgesloten werd met een alcoholslot. Het alcoholslot liet geen tussentijdse meting toe. Na 15 dagen werd de fermentatie stopgezet. De resultaten van dit experiment worden weergegeven in onderstaande tabel.

**Tabel 12: Resultaten van de analyse van het bekomen groenbier van het extra experiment met behulp van de beer analyser: alcoholgehalte in vol%, werkelijk extract (Ew in °p), werkelijke vergistingsgraad (RDF in %) en het oorspronkelijke stamwortgehalte (Extract in °P)**

|              | Extract (°P) | Alcohol % (v/v) | Er % (m/m) | RDF (m/m) % |
|--------------|--------------|-----------------|------------|-------------|
| 16 °P Gist 4 | 15,67        | 5,75            | 6,51       | 58,7        |
| 20 °P Gist 4 | 19,18        | 8,15            | 6,13       | 68,2        |
| 16 °P Gist 5 | 15,64        | 7,43            | 4,06       | 74,8        |
| 20 °P Gist 5 | 19,48        | 9,85            | 4,39       | 78,5        |

### 3.4. Kenmerken van het bier na lageren

Het groenbier werd na lagering opnieuw onderzocht op een aantal parameters en de resultaten worden in onderstaande tabel weergegeven (Tabel 13). Er is voor elk staal een verhoging van het alcoholgehalte en een verlaging van het werkelijk extract waar te nemen, wat overeenstemt met de verwachtingen.

De bitterheid is in elk staal afgenomen ten opzichte van de bitterheid van de wort. Gist 3 heeft in elke fermentatie de minste invloed op de bitterheid en het stamwortgehalte had geen invloed op de uiteindelijke bitterheid. Het FAN-gehalte in het bekomen bier hangt af van de gebruikte giststam maar ook van het stamwortgehalte waarmee gestart werd. Er werd een daling in FAN-gehalte waargenomen bij een stijgend stamwortgehalte.

**Tabel 13: Resultaten van de analyse van het bekomen bier na lageren met alcoholgehalte, schijnbaar extract, bitterheid en FAN.**

|                 | Alcohol %(v/v) | Er %(m/m) | Bitterheid<br>(EBU) | FAN (mg/l) |
|-----------------|----------------|-----------|---------------------|------------|
| 15,64 °P Gist 3 | 7,40           | 5,66      | 21,4                | 140        |
| 19,5 °P Gist 3  | 9,02           | 6,93      | 21,0                | 137        |
| 22,7 °P Gist 3  | 9,98           | 9,47      | 21,8                | 107        |
| 15,64 °P Gist 4 | 6,40           | 6,75      | 18,4                | 111        |
| 19,5 °P Gist 4  | 5,42           | 11,69     | 19,2                | 107        |
| 22,7 °P Gist 4  | 6,58           | 13,5      | 18,1                | 106        |
| 19,5 °P Gist 5  | 9,72           | 5,66      | 18,2                | 120        |
| 15,64 °P Gist 5 | 7,97           | 4,63      | 19,2                | 130        |
| 22,7 °P Gist 5  | 10,14          | 8,66      | 18,2                | 84         |

Het bekomen bier werd ook geanalyseerd door een proefpanel in het laboratorium Brouwerij, Campus Schoonmeersen. Het bier dat werd bekomen uit de experimenten bij 22,7 °P werd te zoet bevonden wegens de onvolledige vergisting. Gist 3 gaf bij beide andere experimenten een fruitige smaak die vermoedelijk wel te zwak zal zijn om na de saturatie met CO<sub>2</sub> over te blijven. De smaak van het bier bekomen met gist 4 wees op een infectie. De smaak werd geïdentificeerd als 4VG of 4-vinyl-guaiacol of de smaak van gerookt vlees. Gist 5 had bij beide experimenten een sterke alcoholische smaak. Er werd ook nog een suikerprofiel opgesteld van het bekomen bier en de resultaten van de concentraties van maltose en maltotriose worden weergegeven in onderstaande tabel. De bieren bekomen met behulp van gist 3 en 5 hebben een zeer gelijklopend suikerprofiel. De hoge eindconcentraties bij de bieren van de experimenten met verhoogd stamwortgehalte zijn te verklaren door het stoppen van de fermentatie voor de volledige gisting bereikt werd.

**Tabel 14: De concentratie van maltose en maltotriose gemeten na twee weken lagere**

|                 | Maltose (g/l) | Maltotriose (g/l) |
|-----------------|---------------|-------------------|
| 15,64 °P Gist 3 | 0,20          | 0,91              |
| 15,64 °P Gist 4 | 0,34          | 9,56              |
| 15,64 °P Gist 5 | 3,45          | 0,29              |
| 19,5 °P Gist 3  | 10,04         | 2,60              |
| 19,5 °P Gist 4  | 45,74         | 13,02             |
| 19,5 °P Gist 5  | 9,22          | 2,61              |
| 22,7 °P Gist 3  | 31,69         | 4,29              |
| 22,7 °P Gist 4  | 67,92         | 12,93             |
| 22,7 °P Gist 5  | 31,94         | 4,99              |

## 4. Effect van het verhogen van het fermentatievolume op de fermentatie

Het effect van het verhogen van het fermentatievolume op het fermentatieverloop werd onderzocht op 50 liter schaal bij kamertemperatuur met gist 5.

### 4.1. Kwaliteitsonderzoek wort

De resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de wort die gebruikt werd voor de experimenten op hectoliterschaal worden weergegeven in onderstaande tabel (Tabel 15). De grenswaarde voor FAN ligt afhankelijk van de bron tussen de 140 en 180 mg/l dus het FAN gehalte is eerder aan de lage kant. De kleur is donkerder dan bij de vorige experimenten aangezien er gebrouwen werd met caramelmout. Verder valt ook de hoge glucoseconcentratie, zeker in combinatie met de lage sucroseconcentratie op. Tijdens het koken werd het stamwortgehalte verhoogd door de brouwer met glucose, hier onder de vorm van een glucosestroop.

**Tabel 15: Resultaten van het kwaliteitsonderzoek van de wort die gebruikt werd voor de experimenten op hectoliterschaal**

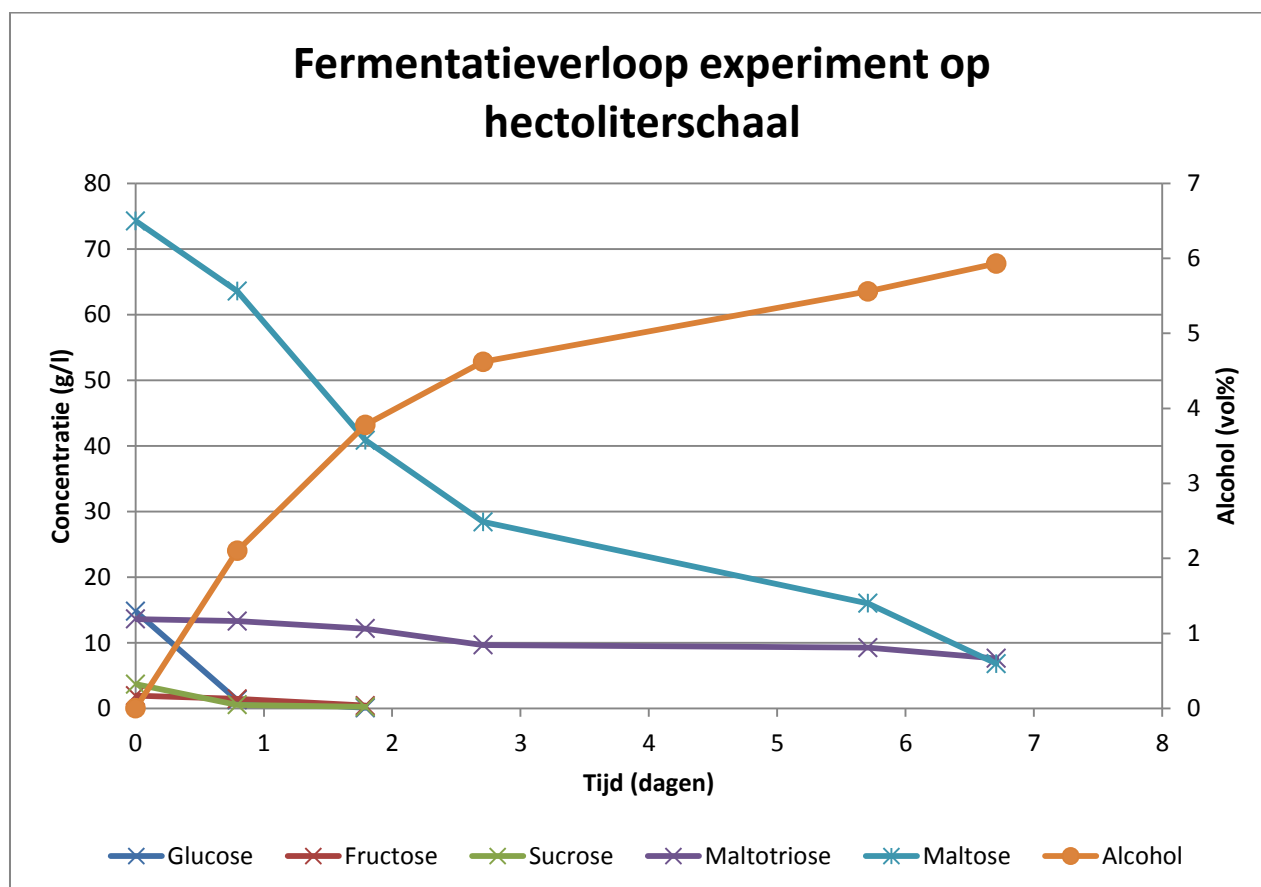
| Parameter               | Waarde    |
|-------------------------|-----------|
| Bitterheid              | 36,2      |
| FAN                     | 176 mg/l  |
| Eiwitgehalte            | 7,31 g/l  |
| Stamwortgehalte         | 17,45 °P  |
| Kleur                   | 56,1 EBC  |
| pH                      | 5,08      |
| Glucoseconcentratie     | 14,77 g/l |
| Fructoseconcentratie    | 1,94 g/l  |
| Sucroseconcentratie     | 3,69 g/l  |
| Maltoseconcentratie     | 74,26 g/l |
| Maltotrioseconcentratie | 13,61 g/l |



|                                                                         |             |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Totaal fermenteerbare suikers                                           | 108,27 g/l  |
| Theoretisch te verwachten werkelijke vergistingsgraad                   | 62,0 %      |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige vergisting                     | 7,01 %(v/v) |
| Theoretisch alcoholgehalte bij volledige fermentatie zonder maltotriose | 6,13 %(v/v) |

## 4.2. Fermentatieprofiel

Het fermentatieprofiel van het experiment op literschaal werd opgesteld aan de hand van de concentratie van alle vergistbare suikers. Glucose en sucrose werden het eerst verbruikt en pas daarna werd fructose opgenomen. De fermentatiecurve van gist 5 toont op hectoliterschaal een verwacht patroon (Figuur 27) , doch verloopt de fermentatie trager dan tijdens de experimenten op literschaal. De fermentatie werd na zeven dagen niet meer opgevolgd omdat een nieuw brouwsel werd toegevoegd aan het opgevolgde brouwsel.



Figuur 27: De concentraties van de vergistbare suikers (g/l) en alcohol (vol%) in functies van de tijd voor de fermentatie op hectoliterschaal met gist 5.

## Finale bespreking

De resultaten van de kwaliteitsanalyse die uitgevoerd werd op de industriële wort, gebruikt bij het **onderzoek op 50 ml schaal**, toonde aan dat er geen problemen zijn met de kwaliteit van de gebruikte wort. Het stamwortgehalte werd wel aangepast met sucrose door de brouwer tijdens het koken van de wort, wat normaal is binnen het brouwproces.

Het **onderzoek bij verschillende temperaturen** (18, 25 en 30 °C) en 4 gisten toont aan dat de manier waarmee omgegaan wordt met stress sterk afhankelijk is van de giststam en dat het effect op het fermenterend vermogen het sterkst is bij een temperatuurdaling. De literatuur beschrijft het fenomeen als een koude shock en het kan al optreden bij *S. cerevisiae* wanneer de temperatuur daalt naar 20 °C of lager. Gedurende dit experiment onderging de gist zo een temperatuurdaling aangezien het enten gebeurde bij kamertemperatuur en de fermentatie doorging bij 18 °C. De verlaagde temperatuur zorgt voor een verandering in fysiologie en dan vooral ter hoogte van het membraan. De veranderingen zoals een verminderd transport doorheen het membraan, accumulatie van eiwitten die verkeerd opgevouwen worden en een verminderde enzymactiviteit die daarmee gepaard gaan, hebben een sterke invloed op de fermentatie.<sup>4</sup>

De lage temperatuur heeft bij gist 2 en gist 3 het minste invloed op het fermentatieverloop. Er is een lichte stijging in fermentatietijd waar te nemen bij beide giststammen maar het verloop ligt dicht bij dat van 25 °C. Initieel lopen de fermentatiecurves van gist 1 dicht bij elkaar maar na een aantal dagen wordt het effect van de lagere temperatuur zichtbaar. De fermentatie vertraagt en valt zelfs helemaal stil na 10 dagen. Voor alle gisten geldt dat hoe hoger de temperatuur, hoe sneller de fermentatie verloopt. Voor gist 4 is er weinig verschil voor het verloop bij 25 °C en 30 °C, maar deze gist vertoont bij deze twee temperaturen al een uitzonderlijke snelle vergisting.

Wanneer de verhouding van het gevormde alcohol ten opzichte van de verbruikte suiker vergeleken wordt, is te merken dat veel gisten ook een groot deel van de verbruikte suiker benut hebben voor het metabolisme/groei in plaats van voor de alcoholvorming en dit vooral bij de fermentatie bij 18 °C voor de gisten 1 en 2. Een verklaring hiervoor werd ook al aangehaald in de literatuurstudie. Wanneer gistcellen stress ondervinden door een te lage temperatuur zal dit leiden tot het aanmaken van het trehalose en glycogeen. De stressrespons is hoe dan ook gistafhankelijk en hier het sterkst voor de gisten 1 en 2. Bij gist 1 lijkt deze stress ook beperkt temperatuur gebonden te zijn.

Het verhogen van de temperatuur tijdens de fermentatie met high gravity wort is iets dan in de literatuur veelvuldig gesuggereerd wordt om de fermentatietijd in te korten<sup>23, 24</sup>. Het verhogen van de temperatuur heeft zowel positieve als negatieve effecten. Het heeft een directe invloed op de fermentatiesnelheid zoals ook bleek uit de verkregen fermentatieprofielen. De versnelde groei en het versnelde metabolisme van de gist zorgen voor snellere fermentatie. Elke giststam heeft zijn eigen maximale groeitemperatuur maar de

maximale temperatuur waarbij men de fermentatie kan uitvoeren ligt tussen 30 °C en 35 °C. Wanneer deze temperatuur overschreden worden kan er verlies optreden van bepaalde aroma's en ethanol. Deze componenten worden meegesleurd door de gevormde CO<sub>2</sub>-bellen, die door de snelle fermentatie overmatig worden gevormd<sup>17</sup>. Er moet dus gezocht worden naar een evenwicht tussen een snellere fermentatie en het verlies van smaakcomponenten en zelfs ethanol. Als een verdere verhoging van de temperatuur van de fermentatie geen verschil in fermentatiesnelheid geeft en dus het risico op verlies aan ethanol en smaakcomponenten verhoogd, moeten zeker deze hogere temperaturen vermeden worden. De hogere fermentatietemperatuur heeft ook een negatieve invloed op de viabiliteit, zoals aangetoond werd. Bij het uitgevoerde onderzoek is de (zeer) lagere viabiliteit bij hogere temperaturen ook waarschijnlijk het gevolg van de langere verblijftijd bij deze temperatuur in een arm medium dat bovendien nog minstens 6 % (v/v) alcohol bevatte.

Het hoger stamwortgehalte bij het **high gravity onderzoek** (18,81 °P en 21,67 °P) werd bereikt door toevoegen van extra maltose. Er werd gekozen voor maltose als suikerbron omdat de gebruikte wort al een verhoogd sucrose gehalte had en maltose het suiker is waar de gist het best mee overweg moet kunnen aangezien het in de hoogste concentratie aanwezig zal zijn wanneer men wort zal bereiden met een hoger stamwortgehalte in een industriële omgeving. De gevolgde methodiek wijkt echter af van de methode die de brouwer zal hanteren bij het implementeren van high gravity brouwen. Er zal gekozen worden om een beslag te maken met een hogere concentratie aan mout. Deze methode heeft een aantal voordelen zoals een lagere kostprijs (opgezuiverde producten zijn duurder) en een betere verhouding tussen de verschillende voedingscomponenten die de gist nodig heeft uit de wort.

De werkwijze die hier toegepast werd zorgt voor de toevoeging van extra suiker maar terzelfdertijd voor een verdunning van de andere aanwezige voedingsstoffen zoals stikstof en mineralen. Het FAN-gehalte in wort kan gebruikt worden als een maatstaf voor onder andere de groei van de gist, viabiliteit, vergistingsgraad en de kwaliteit en stabiliteit van het bier. Het FAN-gehalte dat nodig is voor een succesvolle fermentatie hangt af van de gebruikte giststam maar ook van het stamwortgehalte. Voor een wort van 12 °P is een FAN- gehalte van 150 mg/l voldoende terwijl een FAN-gehalte van 200 mg/l voldoende is bij de fermentatie van een wort van 16°P. Voor de fermentatie van een wort van 18 °P wordt een minimum FAN-gehalte van 280 mg/l beschreven in de literatuur.<sup>23, 25</sup> Het FAN gehalte dat nodig is voor een goede fermentatie neemt dus toe met stijgend stamwortgehalte. Verschillende andere onderzoeken die werden uitgevoerd om high gravity brouwen te onderzoeken, werken met een FAN gehalte van 319 mg/l<sup>17</sup> tot zelfs 550 mg/l<sup>24</sup> voor een wort van 22°P. De lagere fermentatiesnelheid en vergistingsgraad is zeker niet enkel toe te schrijven aan de hogere suiker- en alcoholconcentraties maar mogelijks ook aan een stikstoftekort. Het effect is wel ook sterk gistafhankelijk.

De hoeveelheid geënte gistcellen heeft een positieve invloed op de fermentatiesnelheid<sup>24</sup> maar er zijn een aantal kanttekeningen. Zo kan een te groot inoculum zorgen voor problemen wanneer de gist moet hergebruikt worden omdat er te weinig jonge cellen gevormd<sup>24</sup> worden en het kan ook leiden tot een verhoogd diacetylgehalte in het groenbier<sup>26</sup>. In dit onderzoek werd geopteerd voor een inoculum van  $10 \cdot 10^6$  cellen voor het hele onderzoek maar verscheidene andere onderzoekers laten de sterkte van het inoculum afhangen van het gebruikte stamwortgehalte ( $10^6$  cellen/ml/ $^{\circ}\text{P}$ <sup>24</sup> of zelfs  $5 \cdot 10^6$  cellen/ml/ $^{\circ}\text{P}$ <sup>25, 27</sup>). Het verschil in fermentatiesnelheid met ander onderzoek over dit onderwerp kan mede verklaard worden door het hier gebruikte lager inoculum.

De fermentatieprofielen van het bij de high gravity onderzoek tonen voor gist 1, gist 3 en gist 4 een initiële vertraging in de opname van maltose bij hoger stamwort. Deze vertraging kan zowel te wijten zijn aan de lag-fase van de gist als aan de gestructureerde opname van de verschillende suikers. De gist moet zich aanpassen aan de nieuwe Deze fase wordt zo kort mogelijk gemaakt door de gist te laten opgroeien in dezelfde wort die zal gebruikt worden tijdens de fermentatie of door te werken met geogoste gist. Het inoculum het onderzoek werd voorbereid met wort broth, een medium dat lijkt op wort maar met een lagere suikerconcentratie. De wort voor de fermentatie in het onderzoek bevat veel meer suiker en dit zou kunnen zorgen voor een verlengde lag fase. Dit effect is enkel waar te nemen in het fermentatieprofiel van gist 1. Een andere oorzaak van de vertraagde opname van maltose is de gestructureerde opname van de verschillende suikers zoals beschreven werd in de literatuurstudie. Al is die vertraging bij gist 2 niet waar te nemen, wat er kan op wijzen dat gist 2 sneller glucose en sucrose opneemt uit het milieu of dat deze gist maltose begint te gebruiken nog voor al het aanwezige glucose en sucrose werd opgebruikt.

Het fermentatieprofiel van maltoseverbruik is na de initiële vertraging op te delen in een bijna exponentieel deel en een stationair deel. Bij gist 1 en 2 is het effect van de verhoging van het stamwortgehalte duidelijk waar te nemen op de snelheid waarmee maltose verbruikt werd en het vroeger optreden van het stationair deel van de fermentatie. De snelheid van de fermentatie neemt sterk af met verhoogd stamwortgehalte en de fermentatie valt zelfs volledig stil bij het hoogste stamwortgehalte. Het stilvallen van de fermentatie kan te wijten zijn aan het hoge alcoholgehalte of aan de osmotische druk aan het begin van de fermentatie. De kenmerken van het verkregen groenbier en de resultaten van de gisttelling na de fermentatie kunnen gebruikt worden om na te gaan wat het remmend effect op de fermentatie was. Het aantal cellen per ml geteld na de fermentatie bij gist 2 is lager als het stamwortgehalte wordt verhoogd en bij het experiment bij  $21,57^{\circ}\text{P}$  werd hetzelfde aantal gistcellen per ml geteld na de fermentatie als voor de fermentatie. Er vond gedurende dit laatste experiment dus geen celdeling plaats wat een verklaring geeft voor de vertraagde fermentatie. Het stilvallen van de fermentatie kan hier verklaard worden door de hogere osmotische druk maar het zal eerder in combinatie zijn met een hoger alcoholconcentratie aangezien beide experimenten met gist 2 en met verhoogd stamwortgehalte stilgevallen zijn na het bereiken van een alcoholconcentratie die zeer dicht bij elkaar ligt. De andere geteste gisten tonen een hoger aantal gistcellen per ml als het stamwortgehalte werd verhoogd met

3 °P. Het verhogen van het stamwortgehalte met 6 °P zorgt dan weer voor een daling in de gistconcentratie die gemeten werd na de fermentatie. De gemeten concentratie is het hoogst bij gist 1 dus hier is de hoge osmotische druk aan het begin van de fermentatie niet de reden voor het stilvallen van de fermentatie. Ook hier zal het eerder te wijten zijn aan stress als gevolg van de verhoogde alcoholconcentratie en/of aan het type gist.

Bij gist 4 is te zien dat bij alle drie de fermentaties ongeveer 50 % van het beschikbare maltose verbruikt werd tijdens het exponentiële deel van de fermentatie maar daarna is een duidelijke vertraging waar te nemen in de snelheid waarmee maltose wordt verbruikt. De resultaten van de gisting op het einde van de fermentatie tonen een lichte stijging in gistconcentratie als het stamwortgehalte met 3 °P wordt verhoogd maar er is een halvering in gistconcentratie als het stamwortgehalte met 6 °P wordt verhoogd.

Het behoud van de viabiliteit van gist kan een probleem vormen bij het high gravity. Gist wordt meestal geoogst en hergebruikt voor opeenvolgende fermentaties. Deze gist moet dan wel nog een voldoende hoge viabiliteit hebben (bij voorkeur >95 %). Er is een dalende viabiliteit waar te nemen met een stijgend stamwortgehalte. De viabiliteit valt in het onderzoek lager uit dan de te verwachten waarde wat te wijten is aan de lange verblijftijd bij de fermentatietemperatuur, hoge alcoholconcentraties en het voedingsarm milieu op het einde van de fermentatie.

Het doel van deze masterproef was de selectie van een nieuwe brouwersgist die geschikt is voor de fermentatie onder industriële omstandigheden, zowel de huidige als toekomstige.

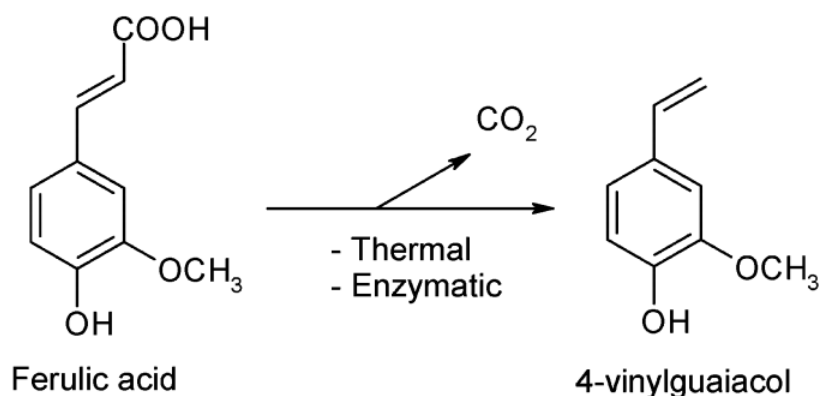
In het onderzoek op laboschaal werden een aantal gisten, die geselecteerd werden na een initiële screening, op toekomstige fermentatieomstandigheden getest zoals hogere fermentatietemperaturen en het brouwen met high gravity wort. De resultaten van dit onderzoek op laboschaal hebben geleid tot de uitsluiting van gist 1 en gist 2. Gist 1 presteerde ondermaats bij zowel verschillende temperaturen als bij verschillende stamwortgehaltenes. Gist 2 gaf onvoldoende fermentatie bij hoge stamwortgehaltenes. Zowel gist 3 als gist 4 werden ingesloten in het **onderzoek op literschaal** en een vijfde stam werd opgenomen zoals beschreven in de sectie Materiaal en methoden.

De kwaliteit van de gebruikte wort voor dit experiment voldeed met dezelfde kanttekening als bij de high gravity experimenten op laboschaal namelijk dat het FAN-gehalte wel voldoende hoog is om de fermentatie bij 16 °P tot een goed einde te kunnen brengen maar dat het te laag is voor wort met een hoger stamwortgehalte.

Het eerste dat opvalt bij het bekijken van de fermentatieprofielen is de lange fermentatietijd van gist 3 en 4 bij hogere stamwortgehaltenes. Hetzelfde is waar te nemen bij het fermentatieprofiel van gist 5 maar iets gunstiger. Het fermenterend vermogen hangt in grote mate af van een aantal procesvariabelen zoals temperatuur, het aantal geënte cellen, de concentratie van de verschillende componenten in de wort, druk en de concentratie aan zuurstof die opgelost zit in de wort<sup>5</sup>. Alle variabelen zijn vergelijkbaar gebleven in het onderzoek behalve waarschijnlijk de concentratie aan opgeloste zuurstof. Er werd geen extra

zuurstof toegevoegd aan de wort van het onderzoek op literschaal wat gezien het grotere volume ten opzichte van de 50 ml schaal kan leiden tot een lagere concentratie aan opgeloste zuurstof. De concentratie aan zuurstof staat rechtstreeks in verband met de groei van de gist en een verhoogde concentratie aan opgeloste zuurstof zorgt voor een snellere primaire fermentatie door een hoger aantal gevormde cellen<sup>5</sup>. Deze verklaring kan wel niet bevestigd worden aangezien er na dit experiment geen gisttelling uitgevoerd werd. Het groenbier werd na de fermentatie overbracht in flessen om te lageren waardoor een deel van de gist achterbleef en de bepaling van een correct cel aantal niet meer mogelijk was.

Aan de start van de fermentatie tot bier zullen de geënte gistcellen maar twee tot drie celdelingen ondergaan wat de kwaliteit van de geënte cellen zeer belangrijk maakt. Het onderzoek met gist 4 geeft resultaten die sterk afwijken van de resultaten van voorgaand onderzoek met deze biergist. Bij een met verhoogd stamwortgehalte is de fermentatie bijna volledig stilgevallen na twee dagen. Tijdens het proeven na lageren werd een afwijkende smaak gedetecteerd namelijk 4-vinylguaiacol (4VG). 4VG kan op verschillende momenten tijdens het brouwproces gevormd worden door de decarboxylatie van ferulinezuur (Figuur 28). Er zijn heel wat mogelijke oorzaken voor de vorming van 4VG maar hier werd 4VG gevormd tijdens de fermentatie en dat wijst meestal op de aanwezigheid van een stam die Pof<sup>+</sup> is, of die in staat is om de enzymatische decarboxylatie uit te voeren of op een bacteriële infectie. De smaak was aanwezig bij stalen van gist 4 wat wijst op een probleem tijdens het voorbereiden van het inoculum. Het bekomen bier werd microscopisch onderzocht en er werden zowel bacteriën aangetroffen als andere gisten. Identificatie was op basis van microscopie niet mogelijk.



**Figuur 28: Decarboxylatie van ferulinezuur tot 4-vinylguaiacol<sup>28</sup>**

Voor het literschaal onderzoek werd de concentratie van alle vergistbare suikers gevolgd en er zijn een aantal verschillen waarneembaar tussen de verschillende gisten. Zo begint gist 3 al na twee dagen langzaam maltotriose te verbruiken en gist 5 doet hetzelfde na 4 dagen, ook al is er nog maltose aanwezig. Gist 3 begint al maltose te verbruiken voor het glucose verbruikt is maar de snelheid waarmee glucose opgenomen wordt verhoogd met toenemend stamwortgehalte.

Gist 5 kan zeker de vergelijking doorstaan met de gist 3, die als beste uit de testen op laboschaal kwam. Er werd met deze gist steeds een hogere vergistingsgraad bereikt dan met gist 3. Gist 3 absorbeerde wel minder bitterstoffen en gaf telkens een hoger FAN gehalte na de fermentatie. Het experiment op literschaal toont het potentieel aan van droge gisten voor toepassingen binnen de brouwerij. Het zijn vaak stammen die geselecteerd worden op basis van zeer specifieke eigenschappen en ze worden door veelvuldig onderzoek nog verbeterd. De resultaten van het onderzoek ervoor dat gist 5 werd gekozen voor verdere opschaling tot op industriële schaal.

Het **onderzoek op hectoliterschaal** werd uitgevoerd met gist 5 aangezien deze als beste uit het onderzoek op literschaal kwam. Het onderzoek op hectoliterschaal werd uitgevoerd in de pilootinstallaties van het labo Brouwerij, Campus Schoonmeersen. De wort bleek na analyse een laag FAN gehalte te hebben. Dit wordt weerspiegeld in een langer dan verwachte fermentatietijd.

Het fermentatieprofiel werd opgesteld aan de hand van alle vergistbare suikers en geeft geen onregelmatigheden waardoor deze gist kan worden uitgetest op industriële schaal. De gist werd op industriële schaal al getest en leverde bier met een bevredigend smaakprofiel af. Er werd wel melding gemaakt van het moeilijk uitzakken van de gist naar het einde van de fermentatie.

## Algemeen besluit

De gebruikte brouwersgist kan het verschil kunnen maken tussen de verschillende brouwerijen en hun bieren. Het selecteren van een nieuwe brouwersgist moet dan ook met de grootste zorg gebeuren en net zoals vernieuwingen binnen het brouwproces moet ook dit met de nodige aandacht voor de toekomstige noden van de brouwerij gebeuren. Het brouwen zal door de stijgende kosten voor grondstoffen en energie steeds efficiënter worden en daarbij kan high gravity brouwen een heel belangrijke rol gaan spelen. Elke brouwersgist reageert anders op de stress die gepaard gaat met high gravity brouwen, zoals ook dit onderzoek heeft aangetoond.

Het temperatuuroptimum ligt voor de meeste gisten boven de 30 °C dus het verhogen van de temperatuur vormt voor de meeste brouwersgisten geen probleem qua groei en fermentatie. Wel is het belangrijk om de fermentatie goed op te volgen indien men de gist wil oogsten aangezien een te lange verblijftijd bij de hogere fermentatietemperatuur een drastisch negatief effect heeft op de gistviabiliteit. De temperatuur wordt niet gelimiteerd door de gist maar door een te snelle CO<sub>2</sub>-productie als gevolg van het versnelde metabolisme bij die temperatuur. De winst die bekomen wordt door de snellere fermentatie mag niet ten koste zijn van de kwaliteit van het bier door het verlies aan ethanol en aroma's door de CO<sub>2</sub> stripping.

Het onderzoek die werd uitgevoerd op laboschaal toont duidelijk aan dat niet elke biergist met de toekomstige procesomstandigheden kan omgaan en het falen kan niet teruggebracht worden tot één oorzaak. Het is vaak een combinatie maar drie redenen zijn problemen bij de celdelingen door de verhoogde osmotische druk, problemen met de viabiliteit door het te hoge alcoholgehalte en een schaarste aan voedingstoffen wat kan leiden tot problemen met het metabolisme. De laatste reden is eigen aan de manier waarop gedurende dit onderzoek het stamwortgehalte werd verhoogd en kan vermeden worden als het overgrote deel van het vergistbaar suiker afkomstig is mout. Elk van de oorzaken heeft een andere invloed op de fermentatie. Zo zorgt de verhoogde osmotische druk voor een gereduceerd cel aantal met een vertraagde fermentatie tot gevolg. Ook een tekort aan voedingsstoffen zorgt voor een reductie in cel aantal wat een extra vertragend effect geeft op de fermentatie. Het hoge alcoholgehalte heeft invloed op de viabiliteit van gist en zal zorgen voor het stilvallen van de fermentatie voor al de vergistbare suikers zijn omgezet naar alcohol.

Tijdens het onderzoek op literschaal kwam mogelijks een ander probleem met high gravity naar boven namelijk de concentratie aan opgeloste zuurstof. De concentratie aan zuurstof in de wort is bepalend voor het aantal cellen dat kan gevormd worden en het aantal cellen is rechtstreeks evenredig met de snelheid waarmee de fermentatie zal verlopen. Het is voor high gravity brewing belangrijk dat het aantal cellen evenredig blijft met het stamwortgehalte om zo de fermentatietijd te beperken en de economische winst die gepaard gaat met deze brouwmethode te maximaliseren.



Tijdens dit onderzoek werden twee droge gisten vergeleken met drie traditionele industriële gisten. Beide gisten doorstonden de vergelijking met glans en vormen zo een reële optie voor een moderne brouwerij. Deze stammen worden geselecteerd op bepaalde kwaliteiten en de brouwer kan dus opzoek gaan naar een droge gist die voldoet aan de eisen die hij voorop stelt. Het is dan ook een droge gist die als beste uit dit onderzoek komt en die zal gebruikt worden tijdens de industriële fermentaties.

## Referenties

1. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., and Clark, D. P. (2009) *Brock Biology of Microorganisms*, Vol. 12, Pearson Education.
2. Mosier, N. S., and Ladisch, M. R. (2009) *Modern Biotechnology, Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*, Wiley.
3. Esslinger, H. M. (2009) *Handbook of Brewing*, Wiley-VCH.
4. Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., and Smart, K. A. (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling, *Fems Microbiol. Rev.* 31, 535-569.
5. Briggs, D. E., Brookes, P., Stevens, R., and Boulton, C. (2004) *Brewing: Science and practice*, Elsevier.
6. Priest, F. G., and Campbell, I. (1996) *Brewing Microbiology*, 2nd Edition ed., Chapman & Hall, London.
7. Rodrigues, F., Ludovico, P., and Leão, C. (2006) Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism, In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, pp 101-121, Springer.
8. Vidgren, V., and Londesborough, J. (2011) 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing, *Journal of the Institute of Brewing* 117, 475-487.
9. Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know, *Applied microbiology and biotechnology* 61, 197-205.
10. Kunze, W. (2010) *Technology of Brewing and Malting* (3rd International English Edition). The Research and Teaching Institute for Brewing in Berlin (VLB), VLB's Publishing Department. Berlin.
11. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., and Delvaux, F. R. (2003) Flavor-active esters: adding fruitiness to beer, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 110-118.
12. Landschoot, A. V., Vanbeneden, N., Vanderputten, D., and Derdelickx, G. (2004) Effect of pitching yeast preparation on the refermentation of beer in bottles, *Cerevisiae* 29.
13. Vanbeneden, N., Vanderputten, D., Vanderhaegen, B., Derdelickx, G., and Landschoot, A. V. (2006) Influence of the Sugar Composition of the Added Extract on the Refermentation of Beer in Bottles, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64.
14. Smart, K. (2003) *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Vol. Second Edition, Blackwell Science, Oxford, UK.
15. Haukeli, A., and Lie, S. (1978) Conversion of  $\alpha$ -acetolactate and removal of diacetyl: a kinetic study, *J. Inst Brew* 84, 85-89.
16. Kapteyn, J., Ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H., and Klis, F. (2010) Low external pH induces HOG1-dependant changes in the organisation of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *Molecular Microbiology* 39, 469-479.
17. Lima, L., Brandão, T., Lima, N., and Teixeira, J. A. (2011) Comparing the Impact of Environmental Factors During Very High Gravity Brewing Fermentations, *Journal of the Institute of Brewing* 117, 359-367.
18. Jenkins, D., Powell, C., Fischborn, T., and Smart, K. (2011) Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability, *Journal of the Institute of Brewing* 117, 377-382.
19. Anton Paar Benelux. (2010) New trends in beer analysis.
20. Thermofisher Scientific. (2013) Carbohydrate analysis with HPAE-PAD.
21. C. Lekkas, G. G. Stewart, A. Hill, B. Taidi, and Hodgso, a. J. (2005) The importance of free amino nitrogen in wort and beer, *MBAA TQ* 42, 113-116.
22. European Brewery Convention. Analytica EBC.

23. Dragone, G., Silva, D. P., and de Almeida e Silva, J. B. (2004) Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing, *LWT - Food Science and Technology* 37, 797-802.
24. Jones, H. L., Margaritis, A., and Stewart, R. J. (2007) The Combined Effects of Oxygen Supply Strategy, Inoculum Size and Temperature Profile on Very-High-Gravity Beer Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the Institute of Brewing* 113, 168-184.
25. Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., and Zhao, M. (2012) Effects of Wort Gravity and Nitrogen Level on Fermentation Performance of Brewer's Yeast and the Formation of Flavor Volatiles, *Appl Biochem Biotechnol* 166, 1562-1574.
26. Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V. S. R., and Ko, S. (2011) Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38, 1133-1144.
27. Lei, H., Zhao, H., and Zhao, M. (2013) Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast, *Biochemical Engineering Journal* 77, 1-6.
28. Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., and Delvaux, F. R. (2004) Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 602-608.