

Dr inż. Monika CIOCH-SKONECZNY

Mgr inż. Krystian KLIMCZAK

Mgr inż. Edyta BABRAJ

Mgr inż. Weronika PIECHOWICZ

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Technologii Żywności

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

WYKORZYSTANIE DROŹDŹY NIE NALEŻĄCYCH DO RODZAJU SACCHAROMYCES W PRODUKCJI PIWA NISKOALKOHOLOWEGO®

The use of non–Saccharomyces yeast in the production of low-alcohol beer®

Badania zostały sfinansowane z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową

Słowa kluczowe: drożdże dzikie, brzezka, piwo, kultury mieszane.

Drożdże dzikie są powszechnie uważane za mikroorganizmy powodujące psucie napojów alkoholowych. Ich obecność związana jest z produkcją różnych związków odpowiedzialnych za aromat. Większość tych drożdży wytwarza estry oraz kwasy w różnych stężeniach, a ich niewielka zawartość w piwie jest pożądana.

Celem pracy przedstawionej w artykule było sprawdzenie potencjału wykorzystania kultur mieszanych drożdży do produkcji piw niskoalkoholowych. Zastosowane w badaniach szczepki wyizolowane zostały podczas spontanicznej fermentacji moszczów gronowych, pozyskanych z winogron pochodzących z polskich winnic. Po przeprowadzonej fermentacji, wykonano szereg analiz laboratoryjnych, tj. oznaczenie zawartości alkoholu, ekstraktu, cukrów, wolnego azotu aminowego, kwasowości ogólnej oraz barwy. Niniejsza praca stanowi próbę określenia, czy wybrane szczepki nie–Saccharomyces, używane w przemyśle winiarskim, mogą znaleźć zastosowanie w piwowarstwie, stanowiąc alternatywę dla drożdży Saccharomyces.

Key words: wild yeast, wort, beer, mixed cultures.

Wild yeasts are commonly considered as microorganisms that causes spoilage of alcoholic beverages. Their presence is associated with the responsibility for aroma. Most of these yeasts produce esters and acids in various concentrations, their low content in beer is desirable.

The aim of the study presented in the article was to examine the potential of using mixed yeast cultures in the production of low–alcohol beers. The yeast strains used in the research were isolated during spontaneous fermentation of musts obtained from grapes from Polish vineyards. After fermentation, a number of laboratory analyzes were performed, i.e. alcohol content, extract, sugars, free amine nitrogen, total acidity and color. This study is an attempt to determine whether selected non–Saccharomyces strains used in the wine industry can be used in brewing as an alternative to Saccharomyces yeast.

WPROWADZENIE

Piwo od wielu lat cieszy się niesłabnącą popularnością wśród konsumentów, będąc najpowszechniejszym napojem alkoholowym na świecie. Trend ten widoczny jest również w Polsce, gdzie po okresie transformacji gospodarczej, z roku na rok znacznie spada spożycie napojów wysokoalkoholowych na rzecz piwa. Przemysł piwowarski w ostatnich dziesięcioleciach został zdominowany przez piwa dolnej fermentacji, tzw. lagery, co w opinii konsumentów może oznaczać pewnego rodzaju stagnację. Pozwoliło to na stworzenie niszy dla tzw. browarów kraftowych oraz rzemieślniczych. W przeciwieństwie do dużych browarów, które produkują

piwo odpowiednie dla jak największej grupy konsumentów, kraftowe skupiają się na wytworzeniu piw o wyjątkowych cechach sensorycznych, nierzadko eksperymentując z nietypowymi składnikami. Produkty przygotowane przez te browary – nazywane inaczej piwami kraftowymi, często wytwarzane są z użyciem specjalistycznych sładów lub surowców niesłodowanych, rzadkich odmian chmielu oraz składników tradycyjnie niepowiązanych z przemysłem piwowarskim, jak choćby skórki pomarańczy bądź przyprawy. Na rynku pojawiają się mało popularne style piw, jak India Pale Ale, Sour Ale, Stout lub Bock. Z biegiem lat stosuje się coraz to inne dodatki, aby wytworzyć produkt o odmiennych cechach sensorycznych, jednak większość tych piw fermentowanych

jest z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Drożdże, jako bazowy składnik piwa odpowiedzialny za fermentację, wywierają decydujący wpływ na jego cechy sensoryczne oraz zawartość alkoholu. Szczepy spoza rodzaju *Saccharomyces* od lat stosowane są w fermentacjach winiarskich, m. in. do produkcji win o wyraźnych, owocowych aromatach. Biorąc pod uwagę potrzebę producentów w zakresie wytwarzania wyjątkowych, charakterystycznych produktów oraz zainteresowanie konsumentów tymi wyrobami, wybrane szczepy mogą posłużyć w produkcji nowej generacji piw.

Celem artykułu jest prezentacja uzyskanych wyników badań dotyczących sprawdzenia potencjału wykorzystania monokultur oraz kultur mieszanych drożdży do produkcji piw niskoalkoholowych. Zastosowane w badaniach szczepy drożdży wyizolowane zostały podczas spontanicznej fermentacji moszczów gronowych, pozyskanych z winogron pochodzących z polskich winnic.

MATERIAŁ, METODY BADAŃ I OZNACZEŃ

Przygotowanie inokulum. Czyste kultury drożdży pasażowano trzyetapowo. W pierwszym etapie szczepy namnażano na skosach z agarem Sabouraud (Biocorp) przez 24 godziny w temperaturze 20°C, następnie przeszczepiano do pożywki płynnej Sabouraud (Biocorp) o objętości 10 cm³. Po upływie kolejnych 24 h, prowadzono propagację dynamiczną w 200 cm³ pożywki płynnej Sabouraud przez 48 h na wytrząsarce z łaźnią wodną (120 rpm, 20°C). Po zakończonym procesie namnażania oznaczano suchą masę drożdży na wagosuszarce, a następnie odpowiednią ilość gęstwy odwirowano (10 minut, 4 989×g/min). Osad przemywano sterylną wodą, ponownie odwirowano w takich samych warunkach i wprowadzano do brzeczki.

Przygotowanie brzeczki. Brzeczke przygotowano w średniej skali poprzez podgrzanie 23,7 dm³ wody do temperatury 72,5°C, do której następnie dodano 7,9 kg słołu pilzneńskiego firmy Viking. Zacier podgrzano do temperatury 65°C, w której został przetrzymany przez 30 minut, następnie podniesiono temperaturę do 72°C i utrzymywano przez kolejne 30 minut. Pod koniec przerwy w 72°C wykonano próbę jodową, aby sprawdzić czy cała dostępna skrobia uległa scukrzeniu. Następnie zacier podgrzano do 78°C i przetrzymano w tej temperaturze przez 10 minut. Po zakończeniu procesu, zacier przeniesiono do zbiornika filtracyjnego i pozostawiono na 30 minut do ułożenia warstwy młota. Zacier poddano filtracji, używając wody o temperaturze 72°C do wysładzania. Otrzymano 40,5 dm³ brzeczki o ekstrakcie 9,1°Błg. W celu zapewnienia klarowności brzeczki, pierwszy 1 dm³ przefiltrowanej brzeczki zawrócono do ponownej filtracji. Brzeczke poddano gotowaniu przez godzinę, dodając w momencie rozpoczęcia gotowania 18,2 g chmielu Cascade, aby uzyskać niski stopień nachmielenia (około 7 IBU). Następnie brzeczke pozostawiono na godzinę w celu wytrącenia się przelomu białkowo-garbnikowego, od którego oddzielono brzeczke. Otrzymałą brzeczke o ekstrakcie 11°Błg pozostawiono do ochłodzenia, a następnie zaszczipiono drożdżami.

Zaszczepienie oraz fermentacja. Bezpośrednim surowcem do fermentacji była brzeczka (ekstrakt 11°Błg, 7 IBU), którą rozlewano po 300 cm³ do kolb Erlenmeyera o pojemności 500 cm³. Namnożoną gęstwą drożdżową wprowadzano

do brzeczki w ilości 0,5 g s.s./dm³. Po dokładnym zamknięciu kolb i zamocowaniu rurek fermentacyjnych wypełnionych gliceryną, układ dodatkowo uszczelniono parafilmem. Proces fermentacji prowadzono przez 13 dni w temperaturze 20°C w trzech powtórzeniach.

Fermentacje przeprowadzono z zastosowaniem następujących kombinacji szczepów (każda w trzech powtórzeniach):

a) monokultury:

- ◆ *Saccharomyces cerevisiae*,
- ◆ *Wickerhamomyces anomalus*,
- ◆ *Metschnikowia pulcherrima*,
- ◆ *Torulaspora delbrueckii*,
- ◆ *Dekkera bruxellensis*.

b) fermentacja symultaniczna:

- ◆ *W. anomalus* + *S. cerevisiae* (0,1 g s.s./dm³: 0,4 g s.s./dm³; 1:4),
- ◆ *W. anomalus* + *S. cerevisiae* (0,25 g s.s./dm³: 0,25 g s.s./dm³; 1:1),
- ◆ *M. pulcherrima* + *S. cerevisiae* (0,1 g s.s./dm³: 0,4 g s.s./dm³; 1:4),
- ◆ *M. pulcherrima* + *S. cerevisiae* (0,25 g s.s./dm³: 0,25 g s.s./dm³; 1:1),
- ◆ *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* (0,1 g s.s./dm³: 0,4 g s.s./dm³; 1:4),
- ◆ *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* (0,25 g s.s./dm³: 0,25 g s.s./dm³; 1:1),
- ◆ *D. bruxellensis* + *S. cerevisiae* (0,1 g s.s./dm³: 0,4 g s.s./dm³; 1:4),
- ◆ *D. bruxellensis* + *S. cerevisiae* (0,25 g s.s./dm³: 0,25 g s.s./dm³; 1:1).

Oznaczenie zawartości alkoholu etylowego. Stężenie alkoholu w gotowym piwie oznaczono metodą piknometryczną. W tym celu prowadzono destylację prostą próbek po fermentacji. Otrzymany destylat dopełniano wodą destylowaną do pierwotnej objętości i wyznaczano gęstość, a koncentrację etanolu odczytano z odpowiednich tablic.

Ekstrakt rzeczywisty. Pozostałość po destylacji uzupełniono do 100 g wodą destylowaną i po wymieszaniu oznaczano zawartość ekstraktu rzeczywistego, poprzez pomiar gęstości roztworu metodą piknometryczną. Ekstrakt rzeczywisty odczytano z tablic zależności między gęstością, a zawartością ekstraktu.

Oznaczenie kwasowości ogólnej brzeczki i piwa wykonywano metodą potencjometryczną, miareczkując próbkę 0,1M roztworem NaOH do uzyskania pH = 8.

Oznaczenie barwy brzeczki laboratoryjnej i piwa wykonywano przy długości fali 430 nm w kuwetach o grubości 10 mm, zgodnie z fotometryczną metodą wg Analytica EBC (1987). Do oznaczenia wykorzystano aparat Lovibond®EBC Colorpod 440100.

Oznaczenie cukrów ogółem (HPLC). Analizy wykonywano z wykorzystaniem aparatu firmy Shimadzu (Japonia) NEXERA XR z detektorem refraktometrycznym RF-20A. Rozdział prowadzono na kolumnie Asahipak NH2P-50 250×4,6 mm Shodex (Showa Denko Europe, Germany), termostatowanej w temperaturze 30°C. Fazę ruchomą stanowiły roztwór wodny acetonitrylu (70%), a izokratyczny program elucji (0,8 cm³/min) trwał 20 minut. Do ilościowych oznaczeń

wykorzystano krzywe wzorcowe sporządzone dla odpowiednich standardów: glukozy, fruktozy, sacharozy, maltozy, glicerolu i sorbitolu.

Oznaczenie związków azotowych. Próbkę rozcieńczano w wodzie destylowanej i przenoszono po 2 cm³ do szklanych probówek za pomocą pipety. Następnie dodawano 1 cm³ barwnego odczynnika ninhydrynowego i gotowano 16 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu do probówek wprowadzano 5 cm³ odczynnika do rozcieńczeń, mieszano i mierzono absorbancję przy długości fali 575 nm. Jako próbkę standardową użyto roztworu glicyny, zawierającego 2 mg/dm³ azotu. Wynik obliczono wykorzystując wzory do oszacowania zawartości protein i określenia ilości azotu w próbce.

$$\text{zawartość azotu} = \frac{\text{absorbancja próbki} \cdot 2 \text{ mg azotu}}{\text{absorbancja r-ru wzorcowego}} \times 50$$

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

Analiza statystyczna

Rezultaty prezentowane w artykule są średnimi z trzech niezależnych powtórzeń, z określeniem odchylenia standardowego. Dane analizowano za pomocą analizy wariancji (ANOVA), celem ustalenia istotności badanych parametrów. Statystycznie istotne różnice pomiędzy średnimi weryfikowano z wykorzystaniem testu Duncan'a, przy użyciu programu statystycznego Statistica wersja 10 (StatSoft Polska, Kraków).

WYNIKI I DYSKUSJA

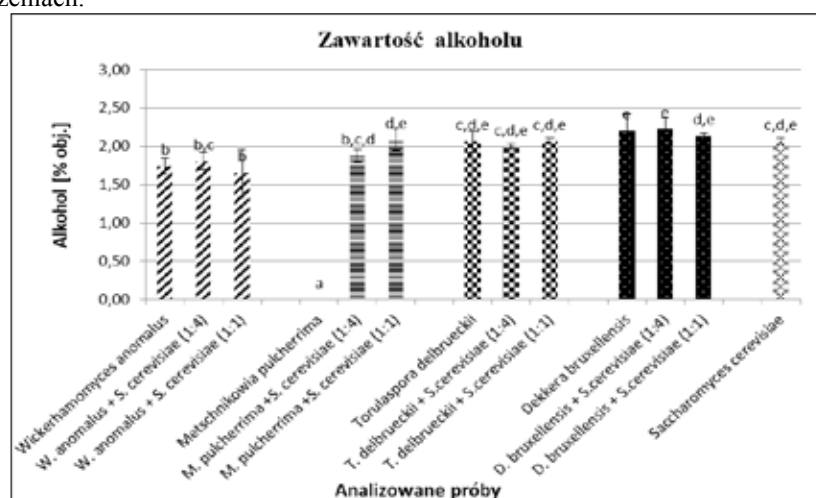
Analizę podstawowych parametrów piwa przeprowadzono po zakończonej fermentacji. Oznaczano zawartość alkoholu oraz ekstraktu, cukrów, kwasowość ogólną, a także barwę brzezki i piwa.

Niska ilość etanolu, szczególnie z próbek fermentowanych z udziałem *S. cerevisiae*, mogła być spowodowana słabymi parametrami użytego słoju. Podczas procesu słodowania następuje aktywacja enzymów, niezbędnych w trakcie zacierania do degradacji ziaren skrobi. Nieodpowiednie słodowanie ziarna skutkuje niską wydajnością ekstraktu, wysoką lepkością brzezki, a także zwiększeniem mętności piwa [18]. Drożdże *D. bruxellensis* produkują podobną ilość etanolu do *S. cerevisiae* (rys. 1). Wysoka wydajność fermentacyjna tego gatunku nie jest zaskakująca, ze względu na istotne znaczenie w fermentacjach spontanicznych piw typu lambic [14, 16].

Szczep *T. delbrueckii* wykorzystywany jest głównie w przemyśle winiarskim. Pozytywnie oddziałuje na smak napojów, głównie pod kątem wytwarzania alifatycznych laktonów i dihydrocynamonianu etylu, co odróżnia go od drożdży *S. cerevisiae*. Ponadto, produkuje również niewielkie ilości aldehydu octowego [1]. W badaniach przeprowadzonych przez Canonico i in. [3]

piwo fermentowane z udziałem *T. delbrueckii* zawierało 2,62% (v/v) alkoholu, analogicznie w pracy Michel i in. [13] – od 0,83 do 4,00% (v/v). Piwo otrzymane przez Tataridis i in. [19] z wykorzystaniem *T. delbrueckii* charakteryzowało się zawartością alkoholu na poziomie 4,2% (v/v). Wyniki te świadczą o bardzo wysokim zróżnicowaniu zdolności fermentacyjnych poszczególnych szczepów w obrębie gatunku *T. delbrueckii*.

Drożdże *M. pulcherrima* nie fermentują brzezki piwnej. Występowanie alkoholu w piwach uzyskanych z ich kulturami mieszanymi, może być spowodowane zdominowaniem procesu fermentacji przez *S. cerevisiae* (rys. 1). Badania naukowe potwierdzają natomiast możliwość wykorzystania szczepu *W. anomalus* do produkcji piwa. Zaletą stosowania tych drożdży w piwowarstwie jest wytwarzanie kwasu mlekowego o mało intensywnym charakterze. Odpowiedzialny jest on za wyjątkowe walory sensoryczne napojów alkoholowych, nadając piwu nuty gruszeki, jabłka i moreli [15].

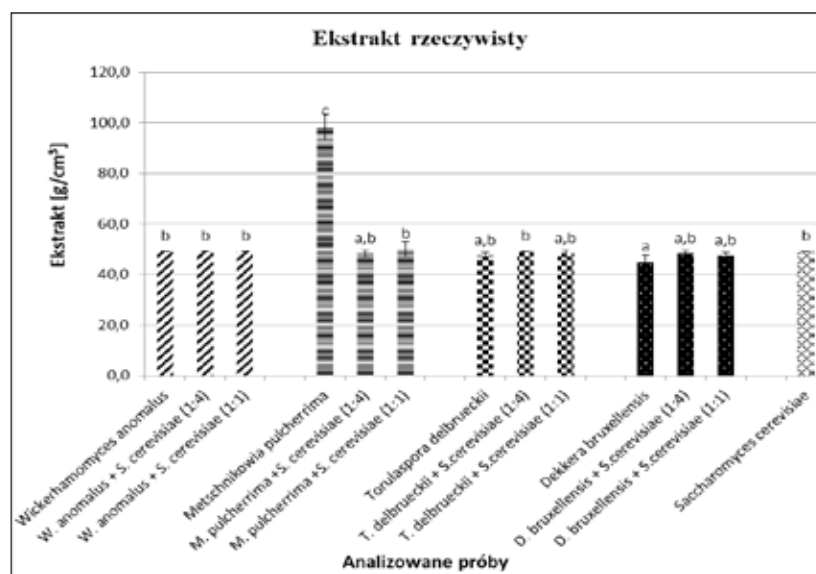


Rys. 1. Zawartość alkoholu etylowego w analizowanych piwach.

Fig. 1. The content of ethyl alcohol in the analyzed beers.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

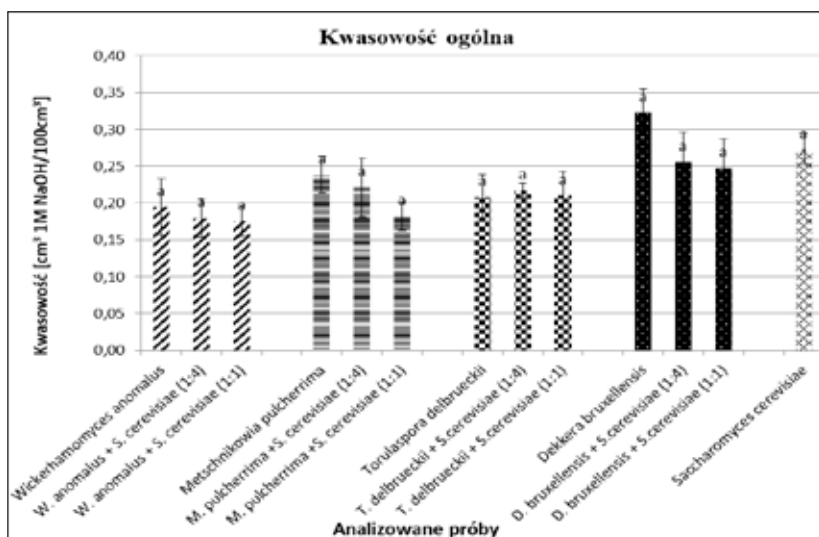


Rys. 2. Zawartość ekstraktu w analizowanych piwach.

Fig. 2. The extract content in the analyzed beers.

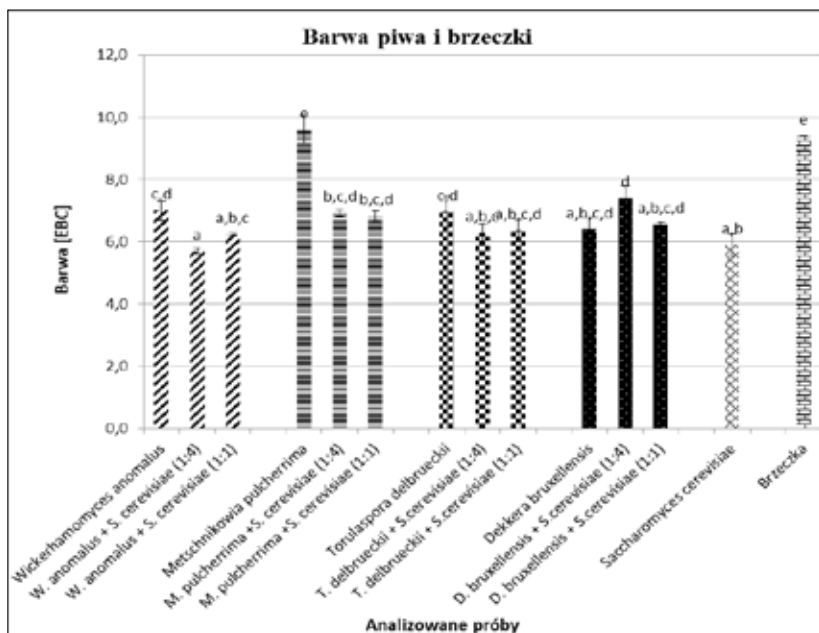
Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 3. Zawartość kwasowości ogólnej w analizowanych piwach.
Fig. 3. The acidity content in the analyzed beers.

Źródło: Badania własne
Source: The own study



Rys. 4. Charakterystyka barwy analizowanych piw.
Fig. 4. Color characteristics in the analyzed beers.

Źródło: Badania własne
Source: The own study

Zawartość ekstraktu jest jednym z najważniejszych wskaźników jakości jęczmienia i słodu. Niższa jego wartość w próbie fermentowanej z wykorzystaniem *D. bruxellensis* może być związana z występującą w obrębie gatunku aktywnością α -glukozydazy, pozwalającą na asymilację cukrów złożonych (rys. 2). Tradycyjnie zawartość ekstraktu resztkowego w piwach wynosi od poniżej 1%, w głęboko odfermentowanych piwach typu np. lambic, do prawie 10% w słodkim barley wine. Wysoka zawartość cukrów resztkowych nadaje produktom pełni, oraz nierzadko słodkiego smaku, a niska pozwala na uzyskanie lżejszego odczucia w ustach [7]. Znaczna pozostałość ekstraktu, nawet w piwie fermentowanym z użyciem *S. cerevisiae*, sugeruje stosunkowo niewielką zawartość

fermentowalnych cukrów. Brak alkoholu w próbach fermentowanych z udziałem *M. pulcherrima* (rys. 1), może tłumaczyć wartość ekstraktu na tak wysokim poziomie.

W analizowanych piwach kwasowość ogólna występowała na poziomie od 0,18 do 0,32 cm³ 1M NaOH/100 cm³ (rys. 3). Najwyższą wartość odnotowano dla próby fermentowanej z udziałem *D. bruxellensis*, a najniższą dla *W. anomalus* i *S. cerevisiae* (1:1, 1:4) oraz *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae* (1:1). Piwo zawiera bardzo zróżnicowaną ilość kwasów organicznych, które należą do istotnych związków odpowiedzialnych za jakość i stabilność smaku. Największy wpływ na profil smakowy wywołany obecnością kwasów organicznych mają mikroorganizmy, odmiana jęczmienia oraz warunki słodowania [11].

Barwa piwa zależna jest w głównej mierze od związków będących wynikiem reakcji Maillarda, w mniejszym stopniu od produktów utleniania polifenoli pochodzących ze słodu i chmielu oraz częściowo od procesu karmelizacji. Uważa się, że naturalnie występujące w surowcach piwarskich związki barwne, takie jak antocyjany, związki flawonowe i karotenoidy, nie wywierają istotnego wpływu na barwę gotowego produktu [4]. Brzezka przed fermentacją charakteryzowała się jasną barwą (9,4 j. EBC), która w trakcie procesu uległa rozjaśnieniu o około trzy jednostki EBC. Zmiany koloru brzezki, w kierunku jaśniejszej barwy podczas trwania fermentacji, związane są z absorpcją substancji barwnych na powierzchni komórek drożdży, ich redukcją oraz zmianą strukturalną niektórych związków chemicznych, spowodowaną spadkiem pH [12]. Drożdże *M. pulcherrima* nie przeprowadziły fermentacji, dlatego kolor próby z ich udziałem jest taki, jak brzezki. Najjaśniejszy odcień miały próby zaszczerpięte drożdżami *W. anomalus* i *S. cerevisiae* (1:4). Najciemniejszym zabarwieniem spośród analizowanych napojów odznaczało się piwo z udziałem *D. bruxellensis* i *S. cerevisiae* (1:4), (rys. 4). Ciemniejszy odcień piwa może być związany z zawartością związków azotowych o niskiej masie cząsteczkowej, które odgrywają główną rolę w tworzeniu koloru. Wysoka koncentracja FAN prowadzi do niepożądanego smaku wynikającego z reakcji Maillarda.

Piwa z dużą ilością FAN charakteryzują się ciemniejszą barwą [18]. W największym stopniu barwa piwa uzależniona jest od zastosowanego słodu. W trakcie procesu słodowania ziarno podlega suszeniu. W zależności od zastosowanej temperatury suszenia, powstają melanoidy, czyli związki reakcji Maillarda. W trakcie zacierania oraz gotowania brzezki, występują reakcje pomiędzy cukrami redukującymi i białkami, w wyniku których wytwarzane są aromatyczne związki barwne [2].

Pojęciem wolnego azotu aminowego określa się wszystkie związki azotowe, możliwe do zasymilowania przez drożdże podczas procesu fermentacji, takie jak m.in. wolne aminokwasy, niskocząsteczkowe peptydy oraz amoniak [17].

Tabela. 1. Zawartość cukrów w brzeczce i piwach

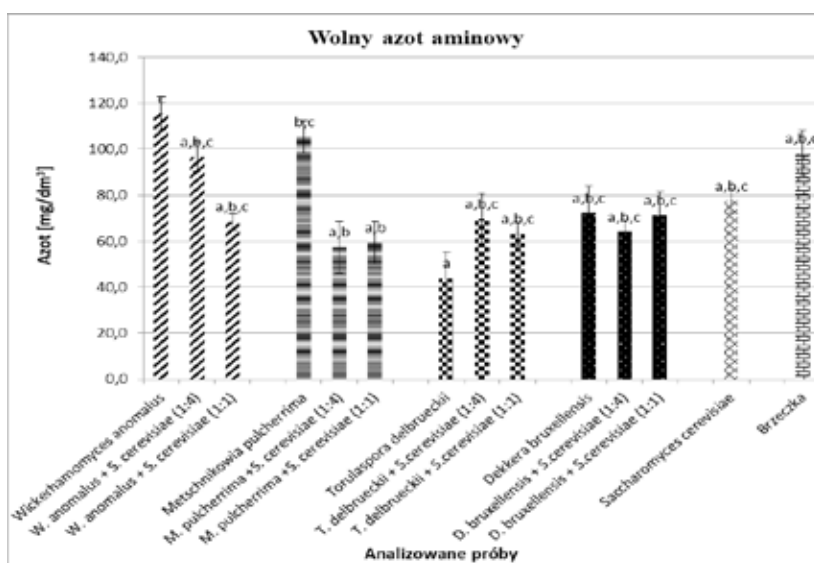
Table. 1. Sugar content in wort and beers

Próbka	Glicerol	Fruktoza	Sorbitol	Glukoza	Sacharoza	Maltoza
	g/l					
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1,82 ^b (± 0,13)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,30 ^{ab} (± 0,36)
<i>W. anomalus</i> (0,1) + <i>S. cerevisiae</i> (0,4)	1,99 ^b (± 0,30)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,39 ^{ab} (± 0,14)
<i>W. anomalus</i> (0,25) + <i>S. cerevisiae</i> (0,25)	2,03 ^b (± 0,10)	0,00 ^a (± 0,0)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,43 ^{ab} (± 0,16)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3,11 ^b (± 0,17)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	16,78 ^b (± 0,45)	0,00 ^a (± 0,00)	26,56 ^c (± 0,43)
<i>M. pulcherrima</i> (0,1) + <i>S. cerevisiae</i> (0,4)	1,97 ^b (± 0,12)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,66 ^{ab} (± 0,22)
<i>M. pulcherrima</i> (0,25) + <i>S. cerevisiae</i> (0,25)	3,67 ^b (± 0,61)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,29 ^{ab} (± 0,06)
<i>Torulospira delbrueckii</i>	2,89 ^b (± 0,10)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,48 ^{ab} (± 0,19)
<i>T. delbrueckii</i> (0,1) + <i>S. cerevisiae</i> (0,4)	1,89 ^b (± 0,06)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,05 ^a (± 0,10)
<i>T. delbrueckii</i> (0,25) + <i>S. cerevisiae</i> (0,25)	1,92 ^b (± 0,19)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,50 ^{ab} (± 0,25)
<i>Dekkera bruxellensis</i>	2,66 ^b (± 0,75)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,50 ^{ab} (± 0,22)
<i>D. bruxellensis</i> (0,1) + <i>S. cerevisiae</i> (0,4)	2,63 ^b (± 0,40)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,30 ^{ab} (± 0,08)
<i>D. bruxellensis</i> (0,25) + <i>S. cerevisiae</i> (0,25)	2,43 ^b (± 0,40)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,28 ^{ab} (± 0,26)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,42 ^b (± 0,28)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	1,86 ^b (± 0,62)
Brzeczka	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	0,00 ^a (± 0,00)	17,18 ^b (± 0,32)	0,00 ^a (± 0,00)	27,06 ^c (± 0,30)

Wartości średnie oznaczone różnymi literami w tabeli wykazują różnicowanie według testu Duncana ($\alpha > 0,05$)

Źródło: Badania własne

Source: The own study



Rys. 5. Zawartość azotu aminowego w analizowanych piwach.

Fig. 5. Amine nitrogen content in the analyzed beers.

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Zawartość oraz skład aminokwasowy brzeczki wywierają istotny wpływ na produkcję alkoholi wyższych w szlaku Ehrlicha [8]. Użyta brzeczka charakteryzowała się stosunkowo niską zawartością wolnego azotu aminowego, wynoszącą 98,12 mg/dm³ (rys. 5), co prawdopodobnie było związane z jakością słoju, z którego została przygotowana. W zależności od źródła przyjmuje się, że minimalna zawartość FAN powinna wynosić 100 mg/dm³ lub 150 mg/dm³ [6, 8]. Poziomy poniżej mogą powodować przedłużony czas rozpoczęcia fermentacji lub jej niedokończenie, wysoką produkcję niepożądanych związków lotnych oraz niskie stężenia estrów. W próbach po fermentacji ilość FAN mieściła się w zakresie od 44,0 do 115,4 mg/dm³. Najniższą zawartością azotu charakteryzowała się próba fermentowana z udziałem *T. delbrueckii*, natomiast najwyższą ilość FAN oznaczono w piwie z udziałem *W. anomalus* (rys. 5).

Brzeczka jest bogatym źródłem węgla dla drożdży. Zawarte w niej cukry – glukoza,

fruktoza, maltoza oraz sacharoza, fermentowane są w podanej kolejności. Drożdże zużywają ich około 98%, a kolejne 2% węglowodanów przeznaczane jest na funkcje życiowe [10]. W badanej brzeczce nie stwierdzono zawartości fruktozy ani sacharozy (tab. 1). Typowa brzeczka piwna zawiera niewielkie ilości tych cukrów. Ich brak związany jest najprawdopodobniej z parametrami użytego słoju. Nie były one również obecne nawet w śladowych ilościach w piwach. Użyta brzeczka odznaczała się niższym od typowego stężeniem glukozy, a także niewielką ilością maltozy (tab. 1).

Glicerol jest trzecim, najbardziej obfitym po etanolu i dwutlenku węgla produktem metabolizmu drożdży. Związek ten charakteryzuje się słodkim smakiem i w znacznej części odpowiada za pełnię smakową fermentowanych napojów. Wzmacnia on percepcję smaku, zmniejsza odczuwalną szorstkość przy spożyciu oraz wpływa na retencję lotnych substancji zapachowych. Jego typowa zawartość w piwach zawiera się w przedziale od 1 do 3 g/dm³ [5, 21]. Głównym powodem dla którego mikroorganizmy produkują glicerol, są jego właściwości ochronne przeciw stresom osmotycznym i termicznym [9]. Jako, że glicerol jest produktem ubocznym metabolizmu drożdży, nie stwierdzono jego obecności w brzeczce. Jego zawartość w poszczególnych piwach cechuje się znacznym zróżnicowaniem (tab. 1).

Brzeczka powinna zawierać wszystkie wyżej wymienione związki węgla. Glukoza i maltoza to główne cukry, które ulegają fermentacji, z czego maltoza jest zdecydowanie najistotniejsza. Stanowi ona zazwyczaj 50–70% cukrów, w przetwarzanej brzeczce piwnej. Sacharoza oraz fruktoza są zazwyczaj obecne w bardzo niskim stężeniu. W przeprowadzonym doświadczeniu, brzeczka była bogata jedynie w glukozę oraz maltozę. Wynik ten mógł być spowodowany słabymi parametrami użytego słoju [20].

WNIOSKI

1. Drożdże *D. bruxellensis* oraz *W. anomalus* wykazują zbliżone parametry fermentacji do *S. cerevisiae*, dlatego możliwe jest wykorzystanie ich do produkcji piw niskoalkoholowych.
2. Badane gatunki drożdży spoza rodzaju *Saccharomyces* i ich kultury mieszane pozwalają na uzyskanie piw o cechach zbliżonych do wytwarzanych przez drożdże *S. cerevisiae*.
3. Monokultury *M. pulcherrima* nie przeprowadzają fermentacji alkoholowej brzeczki piwnej.

LITERATURA

- [1] **BREDA V., N.P. JOLLY, M. BOOYSE, J. WYK. 2018.** „*Torulaspota delbrueckii* yeast strains for small-scale Chenin blanc and Pinotage vinifications”. South African Journal of Enology and Viticulture 39: 47–57.
- [2] **BRIGGS E.D., C.A. BOULTON, P.A. BROOKES, R. STEVENS. 2004.** „Brewing Science and Practice”. CRC Press, New York, Washington.
- [3] **CANONICO L., F. COMITINI, M. CIANI. 2017.** „*Torulaspota delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains”. International Journal of Food Microbiology 259: 7–13.
- [4] **DANIELS R. 1996.** „Designing great beers. The Ultimate Guide to Brewing Classic Beer Styles”. Boulder, Brewers Publications.
- [5] **EBLINGER H.M. (Ed.). 2009.** „Handbook of Brewing. Processes, Technology, Markets”. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA.
- [6] **FIX G. J. 1999.** „Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues”. Boulder, Brewers Publications.
- [7] **GARRET O. (Ed.). 2012.** „The Oxford Companion to Beer”. New York, Oxford University Press.
- [8] **HILL A., G. STEWART 2019.** „Free Amino Nitrogen in Brewing”. Fermentation 5: 22.
- [9] **KLEIN M., S. SWINNEN, J.M. THEVELEIN, E. NEVOIGT. 2017.** „Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities”. Environmental Microbiology 19: 878–893.

LITERATURA

- [1] **BREDA V., N.P. JOLLY, M. BOOYSE, J. WYK. 2018.** „*Torulaspota delbrueckii* yeast strains for small-scale Chenin blanc and Pinotage vinifications”. South African Journal of Enology and Viticulture 39: 47–57.
- [2] **BRIGGS E.D., C.A. BOULTON, P.A. BROOKES, R. STEVENS. 2004.** „Brewing Science and Practice”. CRC Press, New York, Washington.
- [3] **CANONICO L., F. COMITINI, M. CIANI. 2017.** „*Torulaspota delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains”. International Journal of Food Microbiology 259: 7–13.
- [4] **DANIELS R. 1996.** „Designing great beers. The Ultimate Guide to Brewing Classic Beer Styles”. Boulder, Brewers Publications.
- [5] **EBLINGER H.M. (Ed.). 2009.** „Handbook of Brewing. Processes, Technology, Markets”. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA.
- [6] **FIX G. J. 1999.** „Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues”. Boulder, Brewers Publications.
- [7] **GARRET O. (Ed.). 2012.** „The Oxford Companion to Beer”. New York, Oxford University Press.
- [8] **HILL A., G. STEWART 2019.** „Free Amino Nitrogen in Brewing”. Fermentation 5: 22.
- [9] **KLEIN M., S. SWINNEN, J.M. THEVELEIN, E. NEVOIGT. 2017.** „Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities”. Environmental Microbiology 19: 878–893.

- [10] **KUNZE W. 1999.** „Technologia piwa i siodu”. Warszawa: PiwoChmiel.
- [11] **LI H., F. LIU. 2015.** „Changes in Organic Acids During Beer Fermentation”. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 73: 275–279.
- [12] **MATZ S.A. 1991.** „Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed”. Second Edition. New York, Van Nostrand Reinhold.
- [13] **MICHEL M., J. KOPECKÁ, T. MEIER-DÖRNBERG, M. ZARNKOW, J. FRITZ, M. HUTZLER. 2015.** „Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model”. *Yeast* 33: 129–144.
- [14] **MICHEL M., T. MEIER-DÖRNBERG, J. FRITZ, F. METHNER, R.S. WAGNER, M. HUTZLER. 2016.** „Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications”. *Institute of Brewing & Distilling* 122: 569–587.
- [15] **OSBURN K., J. AMARAL, S.R. METCALF, D.M. NICKENS, C.M. ROGERS, C. SAUSEN, R. CAPUTO, J. MILLER, H. LI, J.M. TENNESSEN, M.L. BOCHMAN. 2018.** „Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production”. *Food Microbiology* 70: 76–84.
- [16] **SCHIFFERDECKER A.J., S. DASHKO, O.P. ISHCHUK, J. PIŠKUR. 2014.** „The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*”. *Yeast* 31: 323–332.
- [17] **STARCHER B. 2001.** „A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples”. *Analytical Biochemistry* 292: 125–129.
- [18] **STEINER E., A. AUER, T. BECKER, M. GASTL. 2011.** „Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(4): 803–813.
- [19] **TATARDIS P., F. DROSOU, A. KANELLIS, D. KECHAGIA, S. LOGOTHESIS, A. CHATZILAZAROU. 2016.** „Differentiating beer aroma, flavor and alcohol content through the use of *Torulaspora delbrueckii*”. *Young Scientists Symposium for Brewing, Malting and Distilling, Chico, USA*. 21–23 kwiecień, 2016.
- [20] **WILLAERT R. 2012.** „Biochemistry of Beer Fermentation”. W: Benjamin K., Simpson Ph.D. (Ed.), *Food Biochemistry and Food Processing* (627–653). Stany Zjednoczone, John Wiley & Sons.
- [21] **ZHAO X., S. PROCOPIO, T. BECKER. 2015.** „Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review”. *Journal of Food Science and Technology* 52: 7588–7598.
- [10] **KUNZE W. 1999.** „Technologia piwa i siodu”. Warszawa: PiwoChmiel.
- [11] **LI H., F. LIU. 2015.** „Changes in Organic Acids During Beer Fermentation”. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 73: 275–279.
- [12] **MATZ S.A. 1991.** „Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed”. Second Edition. New York, Van Nostrand Reinhold.
- [13] **MICHEL M., J. KOPECKA, T. MEIER-DORNBERG, M. ZARNKOW, J. FRITZ, M. HUTZLER. 2015.** „Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model”. *Yeast* 33: 129–144.
- [14] **MICHEL M., T. MEIER-DORNBERG, J. FRITZ, F. METHNER, R.S. WAGNER, M. HUTZLER. 2016.** „Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications”. *Institute of Brewing & Distilling* 122: 569–587.
- [15] **OSBURN K., J. AMARAL, S.R. METCALF, D.M. NICKENS, C.M. ROGERS, C. SAUSEN, R. CAPUTO, J. MILLER, H. LI, J.M. TENNESSEN, M.L. BOCHMAN. 2018.** „Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production”. *Food Microbiology* 70: 76–84.
- [16] **SCHIFFERDECKER A.J., S. DASHKO, O.P. ISHCHUK, J. PISKUR. 2014.** „The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*”. *Yeast* 31: 323–332.
- [17] **STARCHER B. 2001.** „A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples”. *Analytical Biochemistry* 292: 125–129.
- [18] **STEINER E., A. AUER, T. BECKER, M. GASTL. 2011.** „Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(4): 803–813.
- [19] **TATARDIS P., F. DROSOU, A. KANELLIS, D. KECHAGIA, S. LOGOTHESIS, A. CHATZILAZAROU. 2016.** „Differentiating beer aroma, flavor and alcohol content through the use of *Torulaspora delbrueckii*”. *Young Scientists Symposium for Brewing, Malting and Distilling, Chico, USA*. 21–23 kwiecień, 2016.
- [20] **WILLAERT R. 2012.** „Biochemistry of Beer Fermentation”. W: Benjamin K., Simpson Ph.D. (Ed.), *Food Biochemistry and Food Processing* (627–653). Stany Zjednoczone, John Wiley & Sons.
- [21] **ZHAO X., S. PROCOPIO, T. BECKER. 2015.** „Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review”. *Journal of Food Science and Technology* 52: 7588–7598.