

Drożdże browarnicze a produkty uboczne fermentacji.

Część 1. Lotne związki siarkowe

Dr. hab. Anna Sałek

International Bio-Consulting, Germany

1. Wstęp

Proces produkcji piwa jest uzależniony od użytych surowców, zastosowanych technologii oraz od wyposażenia browaru. Smak piwa, aromat, odpowiednia goryczka oraz obecność CO₂ - określają harmonijne cechy organoleptyczne prawidłowego piwa i determinują jego jakość [3].

Wiele produktów przemiany materii drożdży, wytwarzanych podczas procesu fermentacji i leżakowania, przechodzi do piwa. Niektóre z nich reagują między sobą lub też ulegają zmianom pod względem ilości i składu chemicznego.

Aromat piwa w dużej mierze zależy od tworzonych przez drożdże produktów ubocznych fermentacji, od odmiany i dawki chmielu lub jego ekstraktów, jak również od substancji pochodzących ze słodu. Rasy drożdży różnią się między sobą zdolnością wytwarzania produktów ubocznych fermentacji, do których należą, m.in. lotne związki siarkowe, dające często wyraźnie wyczuwalny niepożądany smak [14].

Wśród wielu czynników stabilizujących smak piwa znajduje się również jeden z pożądanych związków siarkowych, a mianowicie dwutlenek siarki, który z reguły wpływa pozytywnie na ogólny charakter napoju.

2. Stan fizjologiczny drożdży podczas „stressingu”

W warunkach przemysłowej fermentacji drożdże są narażone na wiele czynników stresujących pochodzenia fizycznego, lub chemicznego, szczególnie wówczas, kiedy biomasa komórkowa znajduje się w początkowych stadiach przygotowywania inoculum (drożdże zarodowe), a następnie przechodzi ze stadium względnie anaerobowego (stacjonarnego) do natlenionej brzeczki, czyli do stanu aerobowego. W zasadzie natlenianie hodowli z drożdżami pochodzącymi z kultury względnie anaerobowej nie wpływa istotnie na kinetykę wzrostu i żywotność komórek. Jednakże, drożdże z hodowli stacjonarnej są niezwykle wrażliwe na zewnętrzny stres oksydacyjny, jeśli porównamy je z biomasą pochodzącą z hodowli tlenowej [1, 18].

Ponadto do czynników stresujących drożdże można zaliczyć praktycznie wszystkie operacje związane z przechowywaniem drożdży nastawnych. Przedłużanie, bowiem czasu ich przechowywania, wysoka

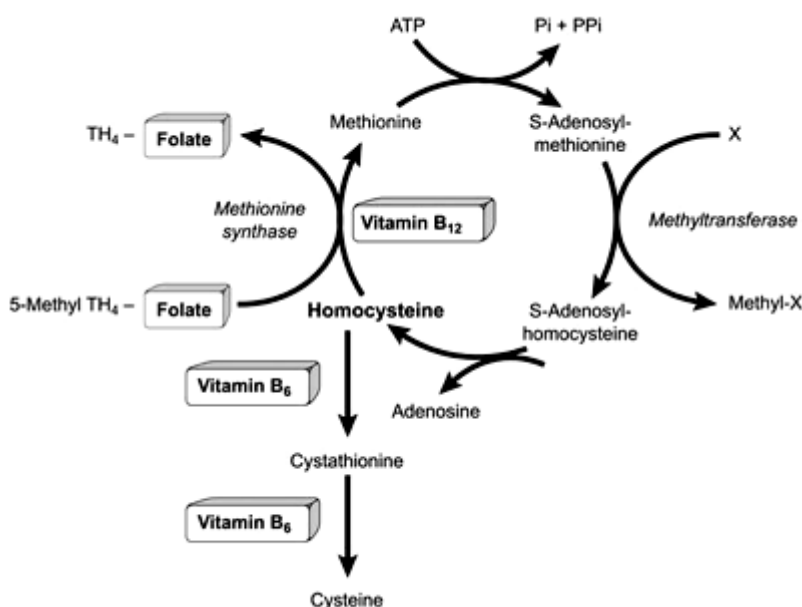
temperatura, długotrwała cyrkulacja biomasy drożdżowej przez płytowy wymiennik ciepła - redukują zapasy komórkowe glikogenu i trehalozy, a tym samym pogarszają stan fizjologiczny kultur [18].

Krótkie natlenianie hodowli drożdży nastawnych przed ich skierowaniem do warunków aerobowych, uruchamia wewnątrzkomórkowy system genów adaptacyjnych Yap1 i Skn7p, odpowiedzialnych za produkcję czynników transkrypcyjnych, wpływających w dalszej kolejności na produkcję biomasy. Delecja (wycięcie) tych genów utwierdziła badaczy o roli w.w. genów w ochronie komórki drożdżowej przed stresem oksydacyjnym [1].

3. Źródła lotnych związków siarkowych

W piwie zidentyfikowano cały szereg lotnych związków siarkowych (*VSC*, *volatile sulfur compounds*), wpływających na cechy organoleptyczne gotowego produktu oraz na jego trwałość [2, 3, 4, 10, 14, 15, 16, 17].

Związki siarkowe (siarczany, siarczyny, H_2S , merkaptany, i inne, w większości lotne) są ważną grupą składników determinujących procesy metabolizmu drożdży browarniczych i decydujących o właściwościach organoleptycznych oraz o stabilności piwa. Związki siarkowe charakteryzują się bardzo niskim progiem sensorycznej wyczuwalności i już ich śladowe ilości powodują nietypowe dla piwa, nieprzyjemne zmiany bukietu. Mogą pochodzić zarówno z surowców, tj. ze słodu (aminokwasy siarkowe, np. metionina, cystyna, cysteina oraz witaminy: biotyna i tiamina), jak również z chmielu (Rys. 1 i 2).

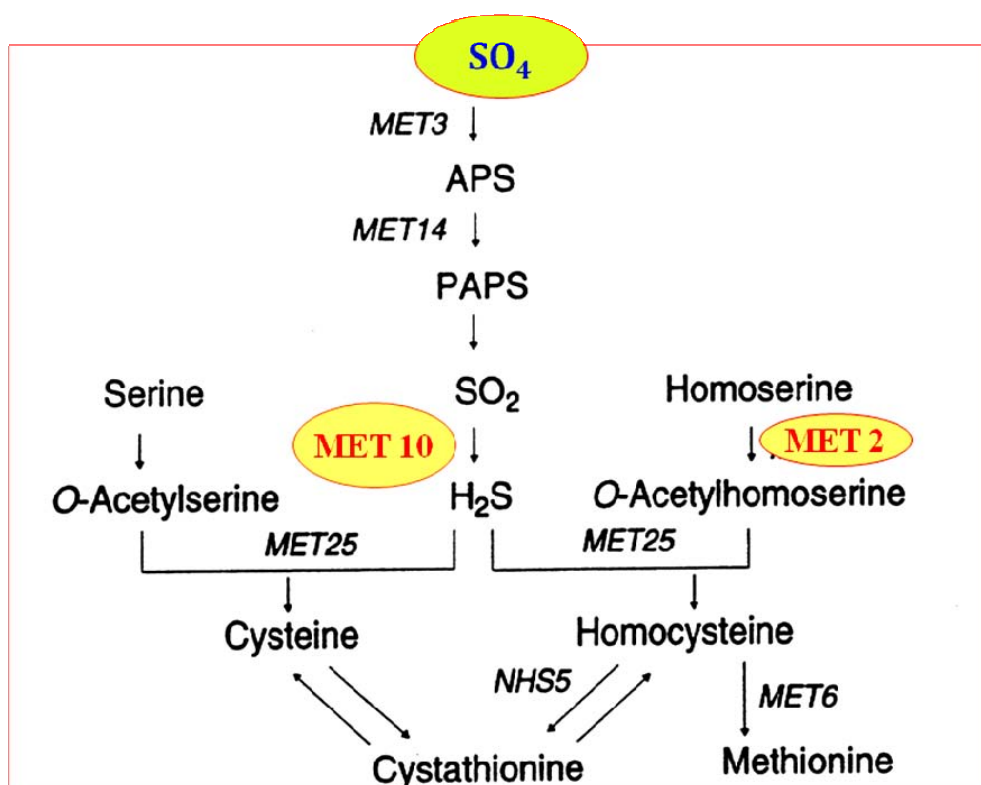


Rys. 1. Metabolizm aminokwasów siarkowych, np. metioniny, w drożdżach [9].

Brzeczka zawiera zmienne ilości siarki związanej, która waha się od 13 – 17 µg/l [2, 9, 10]. Część związków siarkowych pochodzi z wody technologicznej, która jest największym źródłem anionów siarczanowych.

Obecne w piwie siarczyny wytwarzane są przez drożdże podczas fermentacji głównej lub we wczesnej fazie procesu dojrzewania piwa. Poziom siarczynów, których nadmierna ilość jest niekorzystna dla smaku piwa, można regulować enzymatycznie w czasie procesu fermentacji [6, 7, 8, 11] lub poprzez zmianę genomu. Częściowa, bowiem, mutacja drożdży w genach MET10 i MET2, kodujących (odpowiednio) reduktazę siarczynową oraz transferazę acetylohomoseryny, w rezultacie powoduje akumulację SO₂ (lub acetylohomoseryny) w komórce drożdży (Rys. 2) [6]. Natomiast amplifikacja (powielanie) genów MET17 (znanych również jako MET25), kodujących sulfhydrylazę seryny w drożdżach, w wyniku przemian metabolicznych siarczanów, prowadzi do enzymatycznej redukcji (*overexpression*) gromadzącego się H₂S, [9, 11, 13].

Początkowa ilość siarczynów w brzeczce chmielonej jest zwykle bardzo mała, ponieważ podczas gotowania brzeczki większość SO₂ usuwana jest z gazami fermentacyjnymi lub jest utleniana do siarczanów ($\text{SO}_3^{2-} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$).



Rys. 2. Metabolizm zewnątrzkomórkowych siarczanów ($-\text{SO}_4^{2-}$) w drożdżach browarniczych. Mutacja w genie MET10 powoduje nagromadzenie się SO₂ w komórce drożdży, a mutacja w genie MET2 – brak acetylohomoseryny [2]. SO₄²⁻ przesyłany jest do wnętrza komórki dzięki enzymatycznemu systemowi transportowemu błony komórkowej [2, 11, 13].

Do czynników pośrednich, obniżających wydzielanie siarczynów, należy zaliczyć podwyższoną zawartość tlenu i lipidów w brzeczce nastawnej oraz dobry stan fizjologiczny drożdży, które powodują

większy przyrost biomasy drożdży. Natomiast zmniejszona zawartość lipidów w brzezce oraz zły stan fizjologiczny drożdży skraca czas wykorzystywania aminokwasów z brzezki, co jednocześnie przyspiesza i zwiększa wytwarzanie siarczynów. W efekcie, więcej ekstraktu fermentuje i więcej siarczynów przechodzi do środowiska. Produkcja siarczynów przez drożdże podczas fermentacji jest wprost proporcjonalnie skorelowana z ilością hydrolizowanych cukrów w brzezce.

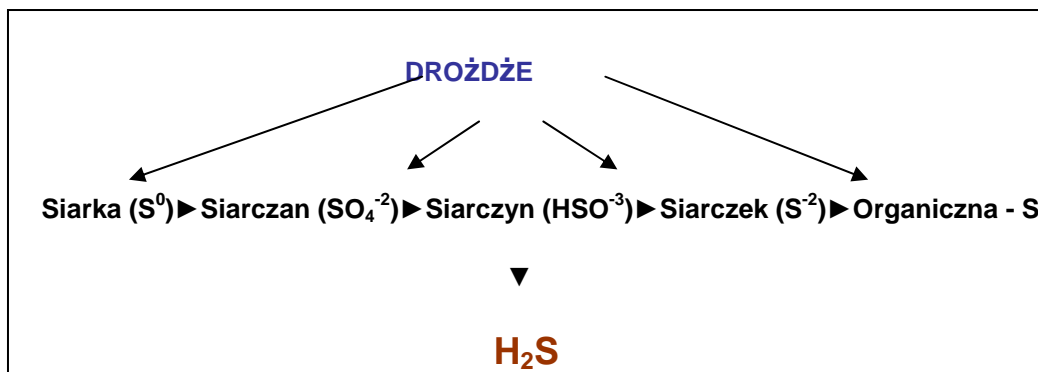
W browarnictwie wytwarzanie siarczynów podczas fermentacji brzezki jest kontrolowane głównie z czterech powodów:

1. Nadmierny wzrost ilości siarczynów jest niekorzystny dla smaku.
2. Siarczyny działają jako antyoksydanty, tzn. utleniając się - wiążą wolne rodniki, dając mniej szkodliwe jony siarczanowe; stąd siarczyny są uznawane za stabilizatory aromatu.
3. Siarczyny reagując z grupami karbonylowymi mogą blokować reakcje aldehydów oraz ketonów i ulegają przemianie w nietolne dwusiarczki, mające niewielki wpływ na bukiet piwa.
4. Z siarczynów wytwarzany jest siarkowodór i inne tiole.

Tiole są to związki, w których grupa -OH alkoholu została zastąpiona przez grupę -SH i generalnie powstają podczas przemian metylomerkaptanów lub metioniny w brzezce, wywołanych przez drożdże. Związki te, pochodzące głównie z chmielu, są substancjami najbardziej szkodliwymi dla aromatu piwa i w części odpowiedzialne za tzw. smak świetlny lub zapach zepsutych, gotowanych warzyw, jak np. w przypadku S-metylotiooctanu.

Siarkowodór, jeden z linearnych tioli, powstaje głównie podczas fermentacji w wyniku procesów metabolizmu drożdży browarniczych i jest wydzielany przez komórki do środowiska. H_2S , o zapachu „zepsutych jaj”, jest również produktem rozpadu cysteiny w wyniku reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez dwusulfhydrazę cysteinową (Rys. 2) [2, 9, 14]. Suplementacja brzezki wolną cysteiną wyraźnie stymuluje ten proces, bez wpływu na dynamikę produkcji biomasy. Natomiast dodatek 100 ppm (tj. 100 mg/l) metioniny, w obecności cysteiny (do 300 ppm), hamuje powstawanie H_2S , bez widocznego wpływu na tworzenie się SO_2 . Analogiczny efekt obserwuje się w przypadku użycia mutantów drożdży z nadprodukcją (amplifikacją) genu MET17 [13].

Podwyższanie zawartości związków azotowych w medium (w tym szczególnie związków amonowych), limituje syntezę H_2S w fazie logarytmicznego wzrostu drożdży (jakkolwiek poziom SO_2 nie obniża się). Jednakże zdarzają się braki azotu asymilacyjnego, szczególnie w brzezkach *high-gravity* (HG), przygotowanych z niezmodyfikowanego słodu; wówczas możliwa jest nadprodukcja H_2S [2]. Siarkowodór tworzy się również w wyniku redukcji siarczanów podczas namnażania drożdży i bierze udział w biosyntezie aminokwasów siarkowych (Rys. 2, 3) [2]. Dodatek amonokwasów niesiarkowych, jak treoniny lub glicyny (do 200 ppm, tj. 200 mg/l) również stymuluje syntezę siarkowodoru [2].



Rys. 3. Etapy przemian siarki i związków siarkowych, indukowane przez komórki drożdżowe, podczas fermentacji (Rys. 3).

Na zawartość siarkowodoru w brzeczce ma wpływ wiele czynników, m.in. metale. Np. w starych browarach, wyposażonych w linie produkcyjne, posiadające miedziane rury czy kadzie zacierne, o tradycyjnej technologii, często pojawia się mierzalny poziom H_2S , bowiem gotowanie brzeczki w obecności minimalnych ilości jonów miedzi wyraźnie indukuje podwyższenie jego poziomu. Z kolei dodanie do piwa jonów Cu^{2+} w ilości $< 1,6$ mg/l, wyraźnie redukuje stężenie H_2S oraz etanetriolu.

W nowoczesnych browarach, stosujących zmodernizowane technologie, celem pozbycia się wadliwego zapachu wywołanego przez siarkowodor, stosowany jest tzw. system elektrolizy miedzi. W systemie tym piwo, przepływa z odpowiednią prędkością pomiędzy dwiema miedzianymi elektodami (o nadzwyczajnej czystości metalu), z których jedna jest anodą, a druga katodą. Przy określonym stężeniu prądu (1A/s) z katody powinno przechodzić do środowiska, bez ujemnych wpływów na piwo, od 10 do 30 μg Cu^{2+} /l (10-30 ppb). Następuje strącanie CuS , który może być przed rozlewem usuwany na filtrach lub przy użyciu odpowiednich absorberów. Poziom H_2S może spaść, np. z 4 μg /l do pewnego minimum, niemożliwego do identyfikacji [12]. Obecność innych jonów metali, np. Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ni^+ i Pb^{2+} nie ma istotnego wpływu na ilość siarkowodoru oraz pozostałych lotnych związków siarkowych w brzeczce [17].

Poziom siarkowodoru jest jednak przede wszystkim zależny od drożdży (Tab. 1). W młodym piwie otrzymanym z tej samej brzeczki przy użyciu różnych szczepów ilość siarkowodoru wynosiła od 0 do 30 ppb (0-30 μg /l), a więc w granicach progu wyczuwalności (1-5-10 ppb, czyli 1-5-10 μg /l), przy czym drożdże dolnej fermentacji wytwarzają więcej H_2S , aniżeli drożdże górnej fermentacji (próg wyczuwalności do 20 ppb = 20 μg /l) [2].

Przyczyną wzrostu stężenia siarkowodoru może być również niedostateczne natlenienie brzeczki lub obecność osadów w brzeczce. Np. zmniejszenie ilości tlenu z 9 ppm (9 mg/l) do 5 ppm (5 mg/l) powoduje wzrost zawartości siarkowodoru w młodym piwie. Tę samą tendencję zaobserwowano

podczas jego przetłaczania do tanku leżakowego lub w przypadku dodatku krążków, celem przyspieszenia dojrzewania.

Tab. 1. Produkcja lotnych tioli przez różne szczepy drożdży.

Szczep drożdży	H ₂ S µg/l	Metanetiol, µg/l	Metylotiooctan, µg/l	DSM, µg/l
<i>S. cerevisiae</i> BBYC 118	32,80	0,34	3,70	10,00
<i>S. cerevisiae</i> BBYC 121	1,70	0,05	25,20	13,00
<i>S. cerevisiae</i> BBYC 131	10,30	0,22	35,10	7,00
<i>S. cerevisiae</i> BBYC 114	≤ 0,20	≤ 0,05	≤ 0,10	11,00
<i>S. cerevisiae</i> BBYC 138	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,10	9,00

Gotowe piwo normalnie nie zawiera znaczących ilości H₂S. Poziom H₂S, z powodu swej wysokiej lotności, obniża się podczas fermentacji wskutek „wypychania” go przez wydzielający się intensywnie dwutlenek węgla, który tym samym ma wpływ na usuwanie, a więc na oczyszczanie środowiska z siarkowodoru. Ponadto H₂S aktywnie reaguje z różnymi związkami obecnymi w piwie, w tym z metalami ciężkimi, przy czym z powstałych produktów podczas leżakowania może oddzielać się ponownie H₂S (lub inne grupy tiolowe).

Zaobserwowano również, że niektóre drobnoustroje, przede wszystkim *Zymomonas*, *Pectinatus* lub *Megasphaera* są potencjalnymi producentami siarkowodoru, którego obecność wpływa na wadliwy aromat, przechodzący w zapach gnilny. Lotne związki siarki mogą również przedostać się do piwa wraz z dwutlenkiem węgla, używanym do karbonizacji, jeżeli był on niedostatecznie oczyszczony przez węgiel aktywny.

Do grupy linearnych tioli zalicza się również metanetiol (CH₃-SH, MTL), o progu wyczuwalności 0,2 – 0,5 ppb (0,2-0,5 µg/l) i zapachu gotowanej kapusty, pojawiający się w brzeczce w czasie fermentacji. Początkowo stężenie MTL jest niewielkie, spowodowane absorpcją przez drożdże, przemianą do tiooctanumetylu oraz wymywaniem z brzeczki przez CO₂. W późniejszym etapie fermentacji ilość MTL zwiększa się w wyniku intensyfikacji procesów metabolicznych drożdży. Metanetiol może być również wytwarzany z metioniny po jej dezaminacji do kwasu α-ketomasłowego oraz po metylacji siarkowodoru. W następstwie acylacji MTL dochodzi do powstania tiooctanumetylu.

Kolejny tiol, etanetiol $(\text{CH}_2)_2\text{-SH}$, określany jako identyfikator ścieków, podobnie, jak metanetiol, powstaje w trakcie fermentacji. Może również pojawiać się w wyniku autolizy drożdżowej.