

Drożdże browarnicze a produkty uboczne fermentacji.

Część 2. Grupa siarczków

Dr. hab. Anna Sałek

International Bio-Consulting, Germany

1. Siarczki typu DMS, DMDS, DMTS

DMS, siarczek dwumetylu, $(\text{CH}_3)_2\text{-S}$, o smaku określanym jako warzywny lub kukurydziany, jest powszechnie występującym związkiem siarkowym, wchodzącym w skład pełnego aromatu piwa. Jego ilość, wahającą się w szerokich granicach, tj. między 14 - 144 $\mu\text{g/l}$, po raz pierwszy oznaczono w 1964, stosując technikę chromatografii gazowej.

DMS charakteryzuje się niskim progiem wyczuwalności sensorycznej, rzędu 30 do 45 $\mu\text{g/l}$ [10]. Powyżej tych stężeń zapach DMS przypomina zapach gotowanej kukurydzy czy kapusty i w nadmiarze (tj. powyżej 100 ppb, czyli 100 $\mu\text{g/l}$) zaczyna być wyjątkowo niekorzystny dla piwa. DMS w piwie powstaje w wyniku:

- termicznej degradacji S-metylometioniny (SMM), szczególnie podczas gotowania brzezki i leżakowania piwa oraz
- w wyniku enzymatycznej redukcji sulfotlenku dimetylu DMSO (jako prekursora DMS) w piwie, prowadzonej przez drożdże podczas intensywnej fermentacji i leżakowania (źródłem SMM i DMSO jest sód, przy czym ilość DMSO w słodzie jest cechą odmianową jęczmienia),
- użycia niewłaściwie przygotowanego słodu, zbyt rozluźnionego w przypadku zastosowania nieodpowiedniej metody suszenia,
- zachodzących reakcji Maillarda, jeżeli z glukozą reagują aminokwasy zawierające siarkę, przy czym DMS ma względnie niską temperaturę wrzenia 38°C (stąd fakt, iż jest on bardzo lotny),
- w warunkach, kiedy prekursor DMS (tj. DMSO) tworzy się w czasie moczenia oraz kiełkowania jęczmienia, ilość DMSO zwiększa się wraz ze stopniem namoczenia jęczmienia i wzrostem temperatury kiełkowania; DMSO jako termostabilny związek ulega rozkładowi dopiero w wysokiej temperaturze.

Wobec powyższego, aby zapobiec utrzymywaniu się nadmiaru DMS i jego prekursorów w brzezce, należy unikać słodów z ozimego jęczmienia, nie moczyć go zbyt mocno, jeśli jest przeznaczony na

słód, nie stosować podwyższonej temperatury roszenia słodu, nie wydłużać czasu roszenia słodu, stosować wyższą temperaturę końcową suszenia słodu (85°C w ciągu co najmniej 3 godzin), intensywnie, minimum przez 1 godzinę, gotować brzeczki (celem usunięcia DMS), w stosunkowo szybkim tempie opróżniać Whirlpool i błyskawicznie schłodzić brzeczki, aby nie dopuścić do ponownego tworzenia się DMS.

Znaczna część prekursorów wędruje do kielków korzeniowych, tak że w gotowym, wysuszonym, polerowanym słodzie ilość ich jest znacznie mniejsza.

Pod wpływem ciepła (suszenie, zacieranie, gotowanie brzeczki) prekursor DMS ulega rozpadowi, tworząc lotny DMS, z którego po utlenieniu powstaje "nieaktywny" sulfotlenek dimetylowy (DMS-O). DMS-O to substancja o bardzo wysokiej temperaturze wrzenia i w związku z tym w czasie zacierania słodu przechodzi całkowicie do brzeczki. Czasami drożdże przetwarzają DMS-O w DMS. Inny „nieaktywny” prekursor, SMM, jest przez drożdże wchłaniany i nie przekształcany w DMS.

DMS natomiast, na skutek podwyższonej temperatury podsuszania słodu, jest redukowany. Duży wpływ na jego zawartość ma również temperatura dosuszania. Dosuszanie w temperaturze 70°C nie jest wystarczające do całkowitego usunięcia DMS ze słodu, nawet przy zwykle stosowanej temperaturze, wynoszącej 80°C przez 5 godzin. Podnosząc temperaturę suszenia słodu z 80 do 85°C i utrzymując ją przez 4 godziny - można uzyskać zmniejszenie zawartości, ale prekursora DMS, o około 40%. Inną zaletą stosowania wyższej temperatury suszenia słodu jest również rozległa inaktywacja jego lipooksygenaz. Lipooksygenazy, bowiem, katalizują utlenianie kwasów tłuszczowych do wodoronadtlenków, z których następnie tworzą się związki karbonylowe odpowiedzialne za smak i zapach "starego" piwa.

Problem z wysokim stężeniem prekursora DMS (np. DMSO) znacznie łatwiej jest rozwiązać w słodowni, aniżeli w browarze, tym bardziej, że w browarach istnieje tendencja do skracania czasu i obniżania temperatury gotowania brzeczki, co uniemożliwia rozłożenie i usunięcie dużych ilości DMSO. Ten prekursor ulatnia się całkowicie, jeżeli gotowanie trwa 75 do 80 minut w temperaturze 106 do 107°C. Obecnie takiego procesu już się nie przeprowadza ze względu na obciążenie termiczne nastawu. Brzeczki natomiast gotuje się 60 do 70 minut w 102 do 104°C. Jednakże i takie warunki przygotowywania brzeczki stwarzają problemy. Podczas gotowania brzeczki w kotle warzelnym nie jest możliwe nadrobienie nieefektywnego procesu usuwania DMS podczas wytwarzania słodu, dlatego wymaga się, ażeby zawartość, np. SMM (innego prekursora DMS) w słodzie wynosiła maksymalnie 1-5 mg/kg.

Efektywność odparowania lotnych składników, szczególnie DMS, można podnieść przy pomocy specjalnych parasoli do rozdzielania brzeczki oraz w wyniku jej "dynamicznego gotowania". System ten ma polegać nie na utrzymywaniu stałej wysokiej temperatury (103-105°C) gotowania, lecz na zastosowaniu tzw. odpuszczania brzeczki poprzez zmienne ciśnienie. Skutkiem tego ujednocila się brzeczki w kotle warzelnym, ponieważ wznoszące się pęcherzyki pary w wyniku rozprężania

powodują jej silne mieszanie. Wznoszące się pęcherzyki pary jednocześnie "przemijają gazowo" całą objętość brzeczki. W konsekwencji osiąga się szybsze usuwanie strąconych niewłaściwych związków aromatycznych, stąd dzięki temu może być skrócony czas gotowania i całkowite odparowanie lotnych związków siarkowych bez niekorzystnych efektów w całym procesie gotowania brzeczki.

Istotne jest, aby podczas procesu gotowania brać pod uwagę również inne parametry. Uwzględnione muszą być okresy utrzymania gorącej brzeczki przed i po gotowaniu. Nie ma wątpliwości, że w tej fazie odtwarzają się związki DMS, jak również związki furfurylowe, co wpływa negatywnie na stabilizację smaku i trwałości piwa.

Dlatego nowe rozwiązania technologiczne przewidują schłodzenie brzeczki przy wybijaniu. Podczas przepompowywania brzeczki do Whirlpoola poprzez wymiennik płytowy jest ona schładzana do 88°C, przy czym woda chłodząca o temperaturze 13°C jest ogrzewana do 80°C. Utrzymanie brzeczki w temperaturze 88°C obniża poziom odtwarzania DMS i innych lotnych związków siarkowych aż 4-krotnie. Sposób przeprowadzenia gotowania brzeczki określa koagulację substancji białkowych i przemiany goryczek chmielowych oraz w dużej mierze odparowanie DMS. Ze względu na wytwarzanie produktów Maillarda należy utrzymywać obciążenia termiczne na możliwie najniższym poziomie, np. przerwa w Whirlpoolu i chłodzenie brzeczki powinny być jak najkrótsze. Po procesie gotowania brzeczki zachodzą również przemiany SMM w DMS, tym większe im wyższa jest temperatura gotowania oraz im dłużej trwa proces warzenia.

DMS jest również wydzielany podczas fermentacji, szczególnie w końcowej fazie wzrostu drożdży, tj. w 80 - 120 godzinie fermentacji. Z badań laboratoryjnych wynika, że 53% DMS z brzeczki nastawnej jest usuwane przez dwutlenek węgla podczas fermentacji, a 80% stwierdzonego w gotowym produkcie (piwie) DMS zostało wytworzone podczas fermentacji i leżakowania. Wzrost temperatury na początku fermentacji zmniejsza znacznie poziom DMS w piwie. Również pH brzeczki nastawnej ma wpływ na jego poziom, który rośnie, gdy pH jest wyższe.

Podczas fermentacji drożdże normalnie redukują mniej niż 25% DMSO, a rozmiar przemian DMSO do DMS zależy od właściwości drożdży (wchłaniania przez komórkę), bowiem poszczególne szczepy determinują poziom DMS w piwie oraz tempo pobierania DMSO przez ich komórki.

Skład brzeczki wpływa także na wytworzenie DMS podczas fermentacji. Zwiększenie stężenia ekstraktu w brzeczce powoduje nieproporcjonalny wzrost jego ilości w gotowym produkcie. Ponadto, jeżeli przy tej samej zawartości ekstraktu w brzeczce część słodu zostanie zastąpiona dodatkiem np. maltozy, ilość DMS w piwie znacznie wzrośnie. Jest to prawdopodobnie spowodowane zmniejszeniem ilości substancji odżywczych, szybszym wyczerpaniem się metioniny i wykorzystywaniem siarczanów jako źródła siarki.

Oprócz słodu źródłem siarczku dimetylu (DMS) mogą być zakażenia bakteryjne, w szczególności bakteriami *Enterococcus* lub *Obesumbacterium proteus*. Wytwarzają one siarczek dimetylu i siarczek dietylu jako produkty uboczne przemiany materii. Te drobnoustroje występują przy niedostatecznym myciu kotłów warzelnych lub naczyń fermentacyjnych, przewodów, pomp, szkielek wziernych, itp.

Również przy ponownym wykorzystywaniu osadów łatwo może dojść do zakażenia wymienionymi bakteriami, które przede wszystkim rozwijają się podczas fermentacji, przed spadkiem pH, a więc przy wyższych jego wartościach. Drożdże piwne również mogą być zainfekowane tymi drobnoustrojami, stąd pomocne jest kwaśne przemywanie drożdży.

Inny związek pochodzący z chmielu, dwu-metylo-trójsiarczek (DMTS), nadaje piwu charakterystyczny zapach świeżej cebuli oraz posmak gotowanych jarzyn. Cechuje go bardzo niski próg wyczuwalności smakowej, wynoszący 0,1 ppb (0,1 µg/l) [4].

W piwie obok wymienionych związków występują i inne organiczne związki siarki, takie jak: wielofunkcyjne tiole, tioestry i merkaptany, ale w mniejszych ilościach. Składniki te bardzo aktywnie oddziałują na smak i zapach piwa, chociaż występują w śladowych ilościach.

2. Wielofunkcyjne tiole, merkaptany i tioestry w piwie

W piwie oprócz całego szeregu lotnych tioli (VSC), jak H₂S, metanetiol, propanetiol, butanetiol, zidentyfikowano również tiole wielofunkcyjne, np. 2-metylo-2-butanetiol, 2-metylo-2-propanetiol oraz tiole nienasycone (np. allytiol), a wśród nich merkaptany, np. 3-merkaptano-3-butylo-2-metanol oraz tioestry (S-metylotiooctan i S-etylotiooctan) stanowią oddzielne grupy [10].

W piwach, w odróżnieniu od wina, znaleziono tylko 6 wielofunkcyjnych tioli [14, 15]. Należy do nich, m.in., związek odpowiedzialny za zapach skunksowy (lub cebulowy) lub słoneczny, zidentyfikowany jako 3-metylo-2-butano-1-tiol, który jest produktem degradacji izohumulonów z chmielu, zachodzącej w obecności cysteiny, światła i ryboflawiny jako absorbera UV. Wyżej wymieniony tiol ma istotny wpływ na własności sensoryczne piwa, bowiem jego próg wyczuwalności wynosi zaledwie 1 - 35 - 100 ppt (tj. 0,001-0,035-0,1 µg/l) i w związku z tym trudny jest do zidentyfikowania. Niekorzystne zmiany nasilają się w piwie przetrzymywanym w butelkach z zielonego szkła, np. Heineken. Niektóre browary, aby zapobiec tym niekorzystnym zmianom zapachowym - używają do produkcji pre-izomeryzowane ekstrakty chmielu lub tylko butelki z brązowego szkła. Ponadto, w obecności siarkowodoru i światła może tworzyć się 2-merkaptanoetanol, 1-merkaptano-2-pentanol lub 2-metylo-3-furantiol. Sporadycznie powstaje 3-merkaptanoheksanol [15].

Podczas fermentacji piwa zidentyfikowano związek dający „koci” zapach, wywoływany przez 4-merkaptano-4-metylo-2-pentanol, pochodzący z zanieczyszczonego jęczmienia, szczególnie dotkliwy w piwach lager.

Poziom związków siarkowych, ich zapach i próg wyczuwalności oraz znane prekursorzy zaprezentowano w skrócie w poniższej tabeli (Tab. 2).

Tab. 2. Związki siarkowe w piwie oraz ich pochodzenie i próg wyczuwalności.

Związki siarkowe	Zapach	Próg wyczuwalności	Prekursor	Końcowe stężenie w piwie
SO ₂	Palących się zapalek	25 ppm	SO ₄ ⁻² , SO ₃ ⁻²	200 ppm
Tiole: - H ₂ S, - MLT	- Zepsutych jaj, - Gotowanej kapusty	5 – 10 ppb 2 ppb	SO ₄ ⁻² , Cysteina, metionina	0,5 -20 ppb Nie znane
Wielofunkcyjne tiole, np. - 3-metylo-2-butano-1-tiol	- cebulowy, skunksa	1 – 100 ppt	Chmiel + B ₂ + Cysteina + UV	Nie badano
Siarczki: - DSM, - DMDS	- kapuściany, - gotowanej kapusty	30 ppb 3 – 50 ppb	SMM, MLT	5 – 90 ppb 0,3 – 1,5 ppb
Tioestry: - metyltiooctan, - etyltiooctan	- gotowanych warzyw, - kapuściany	Powyżej 100 ppb 0,8 – 3,5 ppb	MLT i Ac-CoA Nieznany	3 – 8 ppb 40 ppb

3. Aspekty „stressingu” w praktyce browarniczej

Ogólnie, znaleziono ponad 100 genów odpowiedzialnych za ochronę komórek drożdżowych przed stresem oksydacyjnym, w tym za syntezę głównego składnika membrany, ergosterolu, jak również trehalozy i glikogenu [1].

Trehaloza i glikogen są stabilizatorami oraz czynnikami ochronnymi błony komórkowej, natomiast prekursor ergosterolu, kumulowany przez komórki, czyni je bardziej wrażliwymi na zewnętrzny stres oksydacyjny. Glutation, którego nadprodukcję indukują pewne metale ciężkie, podobnie, jak trehaloza

i glikogen - zmniejsza ujemny efekt stresu oksydacyjnego, podczas, gdy typowe przeciwutleniacze, takie jak kwas askorbinowy, czy NADH, nie są w stanie zatrzymać wielu dróg oksydacyjnych [16, 17].

U drożdży w czasie stresu oksydacyjnego, termicznego czy osmotycznego (tzw. stressingu) - w pierwszej kolejności na zmiany narażona jest błona komórkowa (membrana), a następnie elementy wewnątrzkomórkowe, w tym tio-proteiny (białka i peptydy zawierające siarkę). Np. w warunkach oksydacyjnych aminokwas cysteina (z grupą -SH), jest utleniana do cystyny (-S-S-) w wyniku określonych przemian metabolicznych. Proces ten jest bardzo złożony i nie zawsze pod kontrolą właściwych genów oraz systemu enzymatycznego komórki [5, 18]. Stąd być może w hodowli drożdży czasami wyczuwa się obecność pochodnych siarki, a w skrajnych przypadkach wydzielanie się siarki w postaci stałej (*solid sulphur*) (2008 r., wg informacji ustnej uzyskanej od pracowników browarów w Polsce).

LITERATURA

- [1] Beckhouse A.G.: The transcriptional and physiological alterations in brewers yeast when shifted from anaerobic to aerobic growth conditions, *A thesis presented for the degree of Doctor Philosophy, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Australia*, (2006).
- [2] Duan Weidong, Roddick F.A., Rogers P.J.: A parallel analysis of H₂S and SO₂ formation by brewing yeast in response to sulphur-containing acids and ammonium ions, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, nr 1, vol. 62, (2004), 35-41.
- [3] Dufour J.P.: Influence of industrial brewing and fermentation working conditions on beer SO₂ level and flavour stability, *Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.*, vol. 23, (1991), 209-214.
- [4] Gijs L., Perpete Ph., Timmermans A., Collin S.: 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers, *J. Agric. Chem.*, vol. 48, (2000), 6196-6199.
- [5] Giles G.I., Tasker K.M., Collins C.: Reactive sulphur species: an *in vitro* investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxide, *Biochem. J.*, vol. 364, (2002), 579-585.
- [6] Hansen J., Klielland-Brandt M.C.: Inactivation of MET10 in brewer's yeast specifically increases SO₂ formation during beer production, *Nature Biotechnology*, 14, (1996), 1587-1591.
- [7] Hansen J., Bruun S.V., Bech L.M., Gjermansen C.: The level of MXR1 gene expression in brewing yeast during beer fermentation is a major determinant for the concentration of dimethyl sulphide in beer, *FEMS Yeast Res.*, vol. 2, (2002), 137-149.
- [8] Kuras L., Cherest H., Surdin-kerjan Y., et al.: A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factor, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism, *The EMBO*, nr 10, vol. 15, (1996), 2519-2529.
- [9] Lafaye A., Junot Ch., Pereira Y., et al.: Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulphur metabolism, *The Journal of Biological Chemistry*, nr 26, vol. 280, (2005), 24723-24730.
- [10] Landaud S., Helinck S., Bonnarme P.: Formation of volatile sulphur compounds and metabolism of methionine and other compounds in fermented food, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 77, (2008), 1191-1205.
- [11] Linderholm A.L., Findleton C.L., Kumar G., Hong Y., Bisson L.F.: Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *App. Environ. Microbiol.*, vol. 74, (2008), 1418-1427.
- [12] Pfisterer E., Richardson I., Soti A.: Control of hydrogen sulfide in beer with a copper electrolysis system, *MBAA TQ*, nr 1, vol. 41, (2004), 50-52.
- [13] Spiropoulos A., Bisson L.F.: MET17 and hydrogen sulphide formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, nr 10, vol. 66, (2000), 4421-4426.

- [14] Vermeulen C., Gijs L., Collin S.: Sensorial contribution and formation pathways of thiols in food: a review, *Food Rev. Int.*, vol. 21, (2005), 69-137.
- [15] Vermeulen C., Lejeune I., Tran T.T.H., Collin S.: Occurrence of polyfunctional thiols in fresh lager beers, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, (2006), 5061-5068.
- [16] Vanderhaegen B., Neven H., Verachtert H., Derdelinckx G.: The chemistry of beer aging – a critical review, *Food Chemistry*, vol. 95, (2006), 357-381.
- [17] Walker D.: The influence metal ions on concentrations of flavour-active sulphur compounds measured in beer using dynamic headspace sampling, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, nr 1, vol. 67, (1995), 25-28. Wiseman A.: Avoidance of oxidative-stress perturbation in yeast bioprocesses by proteomic and genomic biostrategies?, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 40, (2005), 37-43.
- [18] Wiseman A.: Avoidance of oxidative-stress perturbation in yeast bioprocesses by proteomic and genomic biostrategies?, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 40, (2005), 37-43.

BREWER'S YEAST AND SECONDARY PRODUCTS OF THE FERMENTATION SULPHUR COMPOUNDS

Abstract

The formation of sulphur compounds in beer is a subject of great interest. Such compounds, especially sulphur volatile compounds (VSC), are essential for the aroma of beer (and some of them were identified as key compounds, i.e. dimethyl sulfide & dimethyl trisulfide, in which they can play an attractive or a repulsive role (for example: accumulate sulphur atoms from the growth medium).

Sulphur compounds essentially arise from common sulphur-bearing precursors such amino acids, i.e. methionine, which being the most commonly found, moreover, methionine repress the cysteine-induced increase in the H₂S production but had no effect on the formulation of SO₂. Differences are also seen in H₂S compared with SO₂ production in response to nitrogen levels in wort. However, biochemically H₂S and SO₂ production are closely linked, environmental condition in brewery can have different effects on their rate of formation. These facts provide insights into possible opportunities to modulate the levels of H₂S and SO₂ in industrial fermentations. Analyses on worts indicated that thioesters resulted from fermentation, whereas the polysulfides derive primarily from malt and hop.

Changes in process conditions such as temperature, aeration, nutrient type and availability as well as metabolite concentrations can significantly affect brewer's yeast metabolism during fermentation. Alterations in these factors serve to stress, which causes changes in the cellular composition that may either directly or indirectly impact on fermentative performance.