

# **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 CO<sub>2</sub> - 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

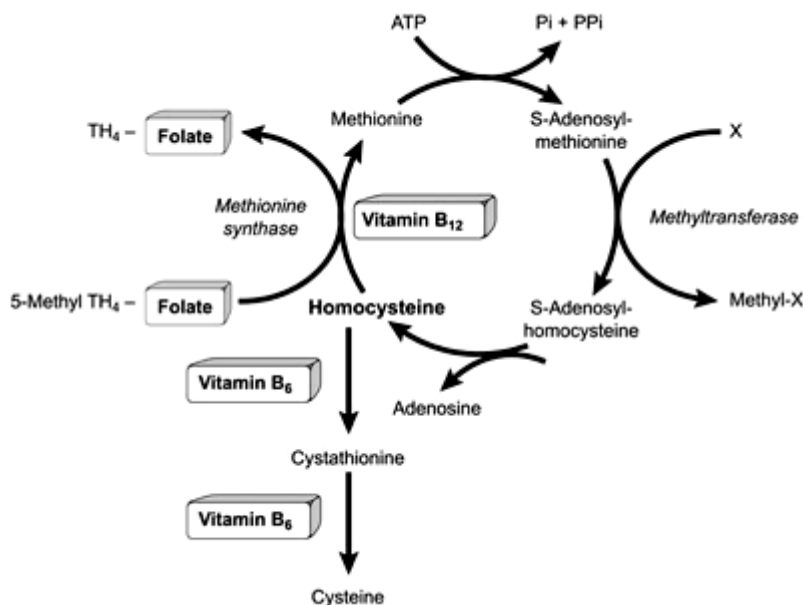
temperatura, długotrwała cyrkulacja biomasy drożdżowej przez płytowy wymiennik ciepła - redukują zapasy komórkowe glikogenu i trehalozy, a tym samym pogarszają stan fizjologiczny kultur [18].

Krótkie natlenianie hodwli 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<sub>2</sub>S, 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).

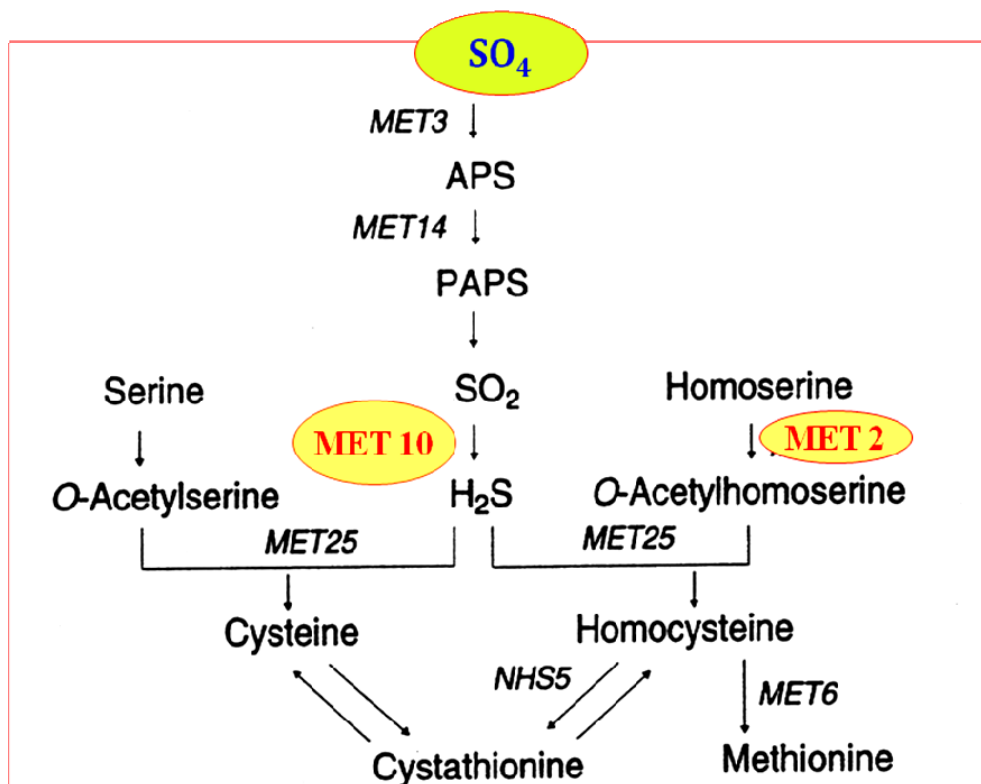


Rys. 1. Metabolizm aminokwasów siarkowych, np. metioniny, w drożdżach [9].

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 SO<sub>2</sub> (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 H<sub>2</sub>S, [9, 11, 13].

Początkowa ilość siarczynów w brzeczce chmielonej jest zwykle bardzo mała, ponieważ podczas gotowania brzeczki większość SO<sub>2</sub> 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 SO<sub>2</sub> w komórce drożdży, a mutacja w genie MET2 – brak acetylohomoseryny [2]. SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 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 brzeczce oraz zły stan fizjologiczny drożdży skraca czas wykorzystywania aminokwasów z brzeczki, 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 brzeczce.

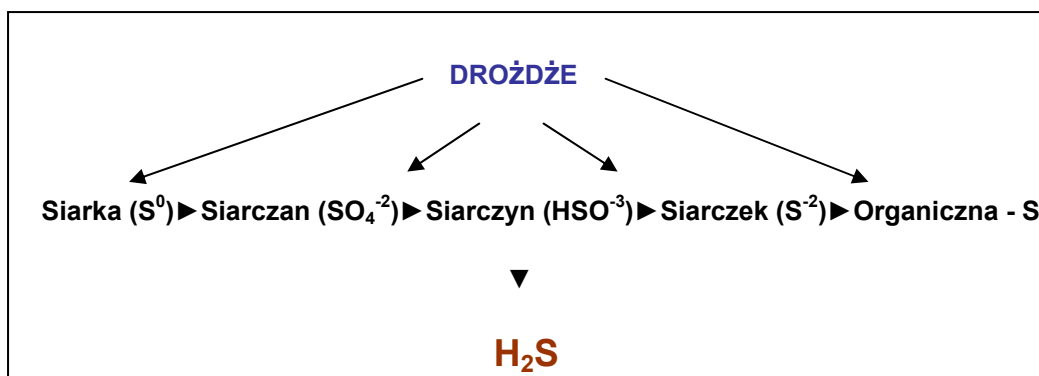
W browarnictwie wytwarzanie siarczynów podczas fermentacji brzeczki jest kontrolowane głównie z czterech powodów:

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 karbonyłowymi mogą blokować reakcje aldehydów oraz ketonów i ulegają przemianom w nietolne dwusiarczki, mające niewielki wpływ na bukiet piwa.
4. Z siarczynów wytwarzany jest siarkowódór 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 brzeczce, 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.

Siarkowódór, 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 brzeczki 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 brzeczках *high-gravity* (HG), przygotowanych z niezmodyfikowanego słodu; wówczas możliwa jest nadprodukcja  $H_2S$  [2]. Siarkowódór 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 wywoływanego przez siarkowódór, stosowany jest tzw. system elektrolizy miedzi. W systemie tym piwo, przepływa z odpowiednią prędkością pomiędzy dwiema miedzianymi elektrodami (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  $\mu g$   $Cu^{2+}$ /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  $\mu g$ /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  $\mu g$ /l), a więc w granicach progu wyczuwalności (1-5-10 ppb, czyli 1-5-10  $\mu g$ /l), przy czym drożdże dolnej fermentacji wytwarzają więcej  $H_2S$ , aniżeli drożdże górnej fermentacji (próg wyczuwalności do 20 ppb = 20  $\mu g$ /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 <sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>S. Poziom H<sub>2</sub>S, 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 H<sub>2</sub>S aktywnie reaguje z różnymi związkami obecnymi w piwie, w tym z metalami ciężkimi, przy czym z powstałych produktów podczas leżakowania może oddzielać się ponownie H<sub>2</sub>S (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 (CH<sub>3</sub>-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 CO<sub>2</sub>. 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 (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH, określany jako identyfikator ścieków, podobnie, jak metanetiol, powstaje w trakcie fermentacji. Może również pojawiać się w wyniku autolizy drożdżowej.

# **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 srodu, 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  $38^\circ\text{C}$  (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 srodów z ozimego jęczmienia, nie moczyć go zbyt mocno, jeśli jest przeznaczony na sód, nie stosować podwyższonej temperatury roszczenia srodu, nie wydłużać czasu roszczenia srodu,

stosować wyższą temperaturę końcową suszenia słodu (85°C w ciągu co najmniej 3 godzin), intensywnie, minimum przez 1 godzinę, gotować brzeczkę (celem usunięcia DMS), w stosunkowo szybkim tempie opróżnić Whirlpool i błyskawicznie schłodzić brzeczkę, 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 brzeczeki) 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 brzeczeki. 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 brzeczeki, 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. Brzeczkę natomiast gotuje się 60 do 70 minut w 102 do 104°C. Jednakże i takie warunki przygotowywania brzeczeki stwarzają problemy. Podczas gotowania brzeczeki 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 brzeczeki 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 brzeczeki poprzez zmienne ciśnienie. Skutkiem tego ujednocila się brzeczkę w kotle warzelnym, ponieważ wznoszące się pęcherzyki pary w wyniku rozprężania powodują jej silne mieszanie. Wznoszące się pęcherzyki pary jednocześnie "przemycają gazowo" całą objętość brzeczeki. 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 brzezki.

Istotne jest, aby podczas procesu gotowania brać pod uwagę również inne parametry. Uwzględnione muszą być okresy utrzymania gorącej brzezki 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 brzezki przy wybijaniu. Podczas przepompowywania brzezki 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 brzezki w temperaturze 88°C obniża poziom odtwarzania DMS i innych lotnych związków siarkowych aż 4-krotnie. Sposób przeprowadzenia gotowania brzezki 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 brzezki powinny być jak najkrótsze. Po procesie gotowania brzezki 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 brzezki 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 brzezki 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 brzezki wpływa także na wytworzenie DMS podczas fermentacji. Zwiększenie stężenia ekstraktu w brzezce powoduje nieproporcjonalny wzrost jego ilości w gotowym produkcie. Ponadto, jeżeli przy tej samej zawartości ekstraktu w brzezce 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, szkielec 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 przemycie 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 H<sub>2</sub>S, 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-merkapt-3-butylomrówczan 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-merkapt-2-pentanol, 1-merkapt-2-pentanol lub 2-metylo-3-furantiol. Sporadycznie powstaje 3-merkapt-3-heksanol [15].

Podczas fermentacji piwa zidentyfikowano związek dający „koci” zapach, wywoływany przez 4-merkapt-4-metylo-2-pentanon, 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 <sub>2</sub>	Pałących się zapalek	25 ppm	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	200 ppm
Tiole: - H <sub>2</sub> S, - MLT	- Zepsutych jaj, - Gotowanej kapusty	5 – 10 ppb 2 ppb	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , Cysteina, metionina	0,5 -20 ppb Nie znane
Wielofunkcyjne tiole, np. - 3-metylo-2-butano-1-tiol	- cebulowy, skunksa	1 – 100 ppt	Chmiel + B <sub>2</sub> + 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: - metylotiooctan, - etylotiooctan	- 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 H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> 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 SO<sub>2</sub> 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 SO<sub>2</sub> formation during beer production, *Nature Biotechnology*, 14, (1996), 1587-1591.
- [7] Hansen J., Braun 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., Bonnarne 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] Spirpoulos 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 H<sub>2</sub>S production but had no effect on the formulation of SO<sub>2</sub>. Differences are also seen in H<sub>2</sub>S compared with SO<sub>2</sub> production in response to nitrogen levels in wort. However, biochemically H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> 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.