

PRODUKCIA NEALKOHOLICKÝCH PÍV KVASINKAMI S DEFEKTOM V SYNTÉZE ENZÝMOV CITRÁTOVÉHO CYKLU

PRODUCTION OF NON-ALCOHOLIC BEER USING YEAST DEFICIENT IN THE CITRIC ACID CYCLE

DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, ZOLTÁN DÖMÉNY, MARIÁN NAVRÁTIL – Katedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika

Kľúčové slová: nízkoalkoholické pivo, *Saccharomyces cerevisiae*, pektát vápenatý, imobilizácia, mutantné kvasinky
Keywords: low-alcoholic beer, *Saccharomyces cerevisiae*, calcium pectate, immobilization, mutant yeast

1 ÚVOD

V súčasnej dobe je preferovaná výroba nápojov so zníženým obsahom alkoholu z legislatívnych i zdravotných dôvodov. Avšak pri tradičných fermentovaných nápojoch, akým je aj pivo, alkohol zohráva dôležitú úlohu pri tvorbe aromatického a chuťového profilu, preto tieto nápoje po odstránení alkoholu strácajú na svojom charaktere. Z toho dôvodu je snaha neustále modifikovať a inovovať spôsoby ich výroby [1].

Pri klasickej technológii výroby nízkoalkoholických, resp. nealkoholických pív sa využívajú rôzne spôsoby. Jedným z mnohých je tzv. stop fermentácia, pri ktorej však ostáva v pive relatívne vysoká koncentrácia sacharidov a pivo má typickú arómu i chuť mladiny. Okrem toho je takéto pivo vďaka zvýšenej hladine reziduálnych sacharidov a takmer žiadnemu alkoholu oveľa citlivejšie na mikrobiálnu kontamináciu ako pivo alkoholické. Pri klasickej výrobe nealkoholického piva je preto nutné znižovať pH, najvhodnejšia je kyselina mliečna, prídavok ktorej však zvyšuje náklady na výrobu a vnáša riziko kontaminácie mliečnymi baktériami, ktoré sa na jej prípravu používajú [2, 3]. Pri ďalších technológiách sa alkohol odstraňuje, napr. reverznou osmózou, dialýzou, destiláciou alebo vákuovým odparovaním, avšak tieto procesy sú finančne náročné a v dôsledku extrémnych podmienok dochádza k rozkladu senzorycky aktívnych zložiek piva. Posledným prístupom je použitie špeciálnych kmeňov kvasiniek, pri ktorých je tvorba etanolu metabolicky reprimovaná.

Jedným zo spôsobov zefektívnenia fermentačného procesu je aplikácia imobilizovaných kvasiniek, ktoré umožňujú viesť proces aj kontinuálne využívaním vysokých koncentrácií buniek bez vyplavovania z reaktorov [4].

Cieľom práce bolo overiť možnosti využitia mutantných, nerekombinantných kmeňov *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sa vyznačujú defektom v syntéze enzýmov citrátového cyklu, na produkciu nízkoalkoholických, resp. nealkoholických pív. Použili sme tri kmene defektné v aktivite 2-oxo-glutarátdehydrogenázy a dva v aktivite fumarázy, voľne aj imobilizované, vo vsádzkovom aj kontinuálnom režime.

2 MATERIÁL A METÓDY

Mikroorganizmy: Spodné pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* W 96 (referenčný kmeň), mutantné kmene *Saccharomyces cerevisiae* defektné v syntéze enzýmov citrátového cyklu (Zbierka Katedry mikrobiológie a virológie, UK Bratislava):

S. cerevisiae JS 10-3C (MAT α ogd1 ade1 leu2-3, 112), *S. cerevisiae* JS 164 (α/a leu2-3, 112 ogd1 [JS10-3CxJS10-9B]), *S. cerevisiae* E2 (MAT α met2 fum1), *S. cerevisiae* EF2 (fum1 [E2xF2-15C]) a *S. cerevisiae* W303 (a ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 /kgd1: URA3/ura3 can1-100).

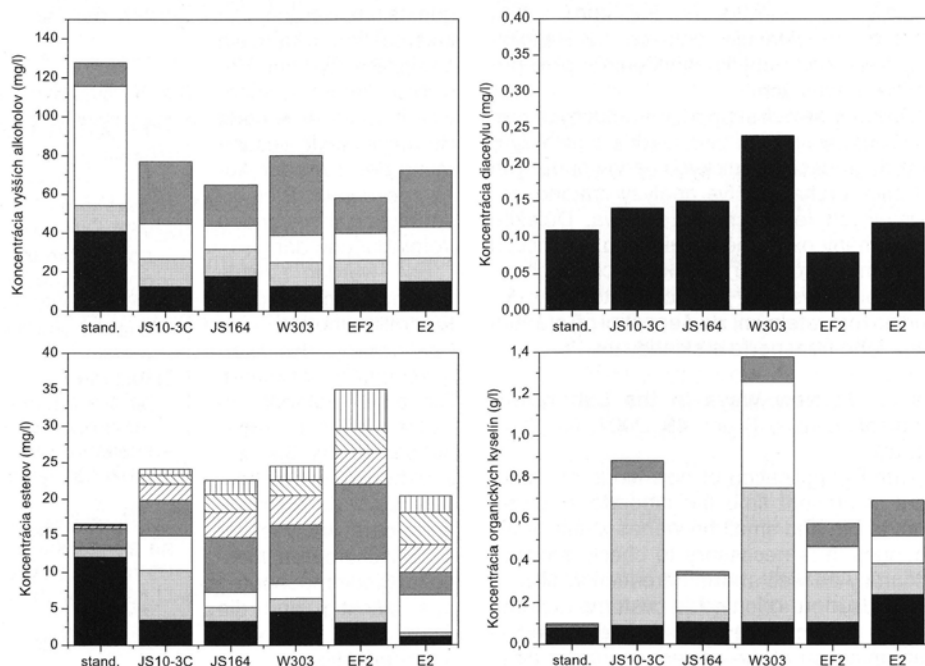
Inokulačné médium: Glukóza 100 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l, kvasničný autolyzát 3 g/l, CaCl_2 0,1 g/l, NaCl 0,1 g/l.

Imobilizácia kvasiniek: Suspenzia kvasiniek a pektátu draselného o koncentrácii 50 g/l prikvapávaná do roztoku CaCl_2 o koncentrácii 0,1 mol/l poskytovala guľičky o priemere 2 mm. Koncentrácia buniek v guľičkách bola 12,1 gDW/l.

Fermentačné médium: Mladina z miestneho pivovaru s obsahom redukujúcich sacharidov 110 g/l.

Fermentácie: Vsádzkové fermentácie boli robené v 500 ml bankách s kvasným uzáverom, v ktorých bolo 400 ml mladiny, kontinuálna fermentácia v kolónovom bioreaktore s 8 etážami (packed-bed reactor). Objem reaktora bol 521 ml s priemerom vnútornej rúry 4,6 cm. Fermentácia prebiehala pri 15 °C, reaktor obsahoval 400 ml mladiny a 100 ml gélových imobilizátov.

Analytické stanovenia: Celkové polyfenoly podľa EBC, celkové dusíkaté látky podľa Kjeldahla, bielkovinový dusík pomocou farbiva CBB, farba a horkosť podľa EBC, zdanlivý a skutočný extrakt destilačne, etanol a prchavé zložky plynovou chromatografiou (CHROM 5, náplňová kolóna 8 % FFAP metóda head-space), aminokyseliny plynovou chromatografiou (CHROM 5, náplňová kolóna fáza SE 30). Koncentrácia aktívnej biomasy bola stanovená bioluminometrickou metódou.



Obr. 1 Profil prchavých látok pív produkovaných kontinuálne imobilizovanými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* W 96 a mutantnými kmeňmi. Vľavo hore: koncentrácia vyšších alkoholov (■ 2-metylpropanol, ■ butanol, □ 2- a 3-metylbutanol, ■ 2-fenyletanol), vpravo hore: koncentrácia diacetyl, vľavo dole: koncentrácia esterov (■ etylacetát, ■ amylacetát, □ 2-metylpropylacetát, ■ etylhexanoát, □ etylheptanoát, □ etyltetradekanoát), vpravo dole: koncentrácia organických kyselín (■ citrónová, ■ mliečna, □ asparágová, ■ jantárová)

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Experimenty boli realizované vsádzkovo aj kontinuálne. Na fermentáciu boli použité voľné aj imobilizované kmene kvasiniek (tri defektné v aktivite 2-oxo-glutarátdehydrogenázového komplexu, dva v aktivite fumarázy a referenčný pivovarský kmeň). V pivách boli sledované základné parametre, obsah alkoholu, diacetylu, vyšších alkoholov a esterov a iných prchavých látok. Vzorky boli hodnotené aj degustačne.

Na rozdiel od voľných kvasiniek, kedy fermentácia mutantnými kmeňmi prebiehala pomalšie, imobilizované mutantné kmene prekvasili mladinu v časoch porovnateľných s referenčným kmeňom.

Produkcia etanolu jednotlivými kmeňmi imobilizovanými v pektátovom géle za kontinuálnych podmienok a profil produkovaných organických kyselín je v tab. 1 a na obr. 1. Ako je vidieť z tabuľky 1, mutantné kmene majú obmedzenú schopnosť produkcie etanolu. Koncentrácia etanolu bola vo všetkých pivách zanedbateľná v porovnaní s pivom produkovaným referenčným pivovarským kmeňom kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* W 96.

Obsah ostatných alkoholov, 2-metylpropanolu, butanolu, 2, 3-metylbutanolu je v pivách pripravených mutantnými kmeňmi tiež nižší ako v pive pripravenom referenčným kmeňom. Z esterov bol vo všetkých pivách najviac zastúpený etylacetát a etylhexanoát, aj keď v referenčnom pive bolo množstvo etylacetátu výrazne väčšie.

Imobilizované kvasinky produkovali piva s nižším obsahom alkoholov, diacetylu

a esterov, avšak koncentrácia kyseliny asparágovej a jantárovej bola vyššia. V degustáčnych skúškach najviac obstálo pivo produkované imobilizovanými kvasinkami mutantného kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* W303.

Kontinualizácia fermentácie výrazne skrátila dobu fermentácie. Voľné kvasinky produkovali väčšie množstvá organických kyselín, ostatné parametre pív boli porovnateľné s parametrami pív produkovanými vsádzkovo.

Mutantné kmene kvasiniek produkujú senzorycky významné organické kyseliny, ktoré pozitívne ovplyvnili organoleptické vlastnosti nealkoholického piva. Tým, že znižujú pH piva, ho navyše chránia pred bakteriálnou kontamináciou. Ako najefektívnejšia sa ukázala kontinuálna fermentácia imobilizovanými kvasinkami, kedy mutantný kmeň *Saccharomyces cerevisiae* W303 produkoval až 640 mg/l kyseliny mliečnej.

4 ZÁVER

Mutantné kmene *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sa vyznačujú defektom v syntéze enzýmov citrátového cyklu, sú vhodné na produkciu nealkoholických pív, pretože majú obmedzenú schopnosť produkcie etanolu, jeho koncentrácia bola vo všetkých pivách zanedbateľná – výrazne menej ako 0, 5 % obj. a vďaka produkcii organických kyselín zlepšujú aj mikrobio-

Tab. 1 Množstvo etanolu (% hm.) v pivách produkovaných referenčným pivovarským kmeňom *Saccharomyces cerevisiae* W 96 a mutantnými kmeňmi *Saccharomyces cerevisiae* JS10-3C, JS 164, W303, EF2 a E2

Fermentácia, kvasinky	W 96	JS10-3C	JS 164	W303	EF2	E2
Vsádzková, voľné	3,80	0,11	0,18	0,09	0,21	0,31
Vsádzková, imobilizované	3,90	0,09	0,08	0,11	0,08	0,07
Kontinuálna, voľné	3,60	0,17	0,09	0,17	0,15	0,11
Kontinuálna, imobilizované	4,10	0,08	0,11	0,07	0,08	0,24

logickú stabilitu piva. Navyše produkované organické kyseliny pozitívne ovplyvnili organoleptické vlastnosti nealkoholického piva. Z testovaných kmeňov sa ako najvhodnejší ukázal kmeň *Saccharomyces cerevisiae* W303, ktorý bol schopný naprodukovať až 640 mg/l kyseliny mliečnej. Pivo malo príjemnú chuť i arómu a degustáčna komisia sa zhodla, že sa vyznačuje najpriaznivejšími a najvyrovnanjšími organoleptickými charakteristikami.

Literatúra

- [1] HUIGE, N. J, SANCHEZ, G. W., LEIDING, A. R.: Process of preparing non-alcoholic (less than 0,5 volume percent alcohol) malt beverages, *US Pat. No. 4970082*, 1990
- [2] BACK, W., et al.: Process for the production of non-alcoholic beer and device for effecting this process. *Euro Pat. No. 0601362 A1*, 1993
- [3] NARZISS, L., BACK, W., LIEBHARD, M.: *Brauwelt* 129, 1990, s. 2206
- [4] RYDER, D. S., MASSCHELEIN, C. A.: *Proc. Eur. Brew. Conv. Lisbon Elsevier, New York*, 1990, s. 345

Zpracováno na základě posteru prezentovaného na 19. Pivovarsko-sladařských dnech, Brno, říjen 2001
Do redakce došlo 11. 12. 2001

Šmogrovičová, D. – Dömény, Z. – Navrátil, M.: Produkcia nealkoholických pív kvasinkami s defektom v syntéze enzýmov citrátového cyklu. *Kvasny Prum.* 48, 2002, č. 2, s. 34–35.

Na produkciu nealkoholických pív boli použité kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s defektom v syntéze enzýmov citrátového cyklu. Koncentrácia etanolu bola vo všetkých pivách produkovaných vsádzkovo alebo kontinuálne, voľnými alebo imobilizovanými mutantnými kmeňmi zanedbateľná, výrazne nižšia ako 0,5 % obj. Najvhodnejším sa ukázal kmeň *Saccharomyces cerevisiae* W303, ktorý v imobilizovanej forme pri vsádzkovej fermentácii produkoval až 640 mg/l kyseliny mliečnej a organické kyseliny, ktoré prispievajú k priaznivému senzoryckému profilu piva a navyše ho chránia pred bakteriálnou kontamináciou. Vyrobené nealkoholické pivo malo organoleptické vlastnosti porovnateľné s alkoholickým pivom vyrobeným klasickým spôsobom pivovarskými kvasinkami spodného kvasenia *Saccharomyces cerevisiae* W 96.

Šmogrovičová, D. – Dömény, Z. – Navrátil, M.: Production of Non-Alcoholic Beer Using Yeast Deficient in the Citric Acid Cycle. *Kvasny Prum.* 48, 2002, No. 2, p. 34–35.

For production of alcohol free beer was used *Saccharomyces cerevisiae* with citric acid cycle defect. The ethanol concentration of all beers, produced in charge or continuous

process by means of traditional or immobilised yeast was negligible, significantly below 0,5% (vol). The strain *Saccharomyces cerevisiae* W303 proved to be as the best one. This immobilised strain in charge process produced nearly 640 mg/l lactic and organic acids improving sensory properties of beer and protecting beer from bacterial contamination. The sensory properties of the alcohol free beer were comparable with traditional beer produced by means of bottom yeast *Saccharomyces cerevisiae* W96.

Šmogrovičová, D. – Dömény, Z. – Navrátil, M.: Produktion alkoholfreier Biere mittels Hefen mit einem Defekt in der Synthese der Enzyme des Zitratzyklus. *Kvasny Prum.* 48, 2002, Nr. 2, S. 34–35.

Zur Produktion alkoholfreier Biere wurden Hefen *Saccharomyces cerevisiae* mit einem Defekt in der Enzymsynthese des Zitratzyklus appliziert. Die Äthanol-Konzentration war in allen Bieren, ob sie chargenweise oder kontinuierlich, durch freie oder immobilisierte Mutantenstämme produziert wurden, vernachlässigbar und lag beträchtlich unter 0,5 Vol.%. Am besten bewährte sich der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* W303, der in immobilisierter Form in Chargenfermentation bis 640 mg/l Milchsäure und organischer Säure produzierte, die einen Beitrag zu dem positiven sensorischen Profil darstellen und das Bier auch noch vor bakterieller Kontami-

nation schützen. Das produzierte alkoholfreie Bier weist organoleptische Eigenschaften auf, welche mit den alkoholischen Bieren vergleichbar sind, die auf klassische Art mit den untergärigen Brauereihefen *Saccharomyces cerevisiae* W 96 hergestellt wurden.

Шмогрови́чова, Д. – Дэме́ны, З. – Навра́тил, М.: Производство безалкогольных пив с использованием дрожжей с дефектом в синтезе энзимов цитратового цикла. *Kvasny Prum.* 48, 2002, No. 2, стр. 34–35.

Для производства безалкогольных пив были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* с дефектом в синтезе энзимов цитратового цикла. Концентрация этилового спирта была во всех пивах изготовленных непрерывным или дисконтинуальным процессами значительно ниже чем 0,5 объемных процентов, не смотря на использование непрерывного или дисконтинуального процессов, на свободные или иммобилизованные мутантные штаммы. Самым подходящим оказался штамм *Saccharomyces cerevisiae* W 303, производящий в иммобилизованной форме при дисконтинуальном брожении до 640 мг/л молочной и органической кислот, которые содействуют хорошему сенсорическому профилю пива и предохраняют его от бактериальной контаминации. Органолептические свойства изготовленного безалкогольного пива были сравнимы с алкогольным пивом, изготовленным классическим путем с использованием дрожжей низового брожения *Saccharomyces cerevisiae* W 96.