

PRODUKCIA NÍZKOALKOHOLICKÉHO PIVA MUTANTNÝMI PIVOVARSKÝMI KVASINKAMI

LOW-ALCOHOLIC BEER PRODUCTION USING MUTANT BREWING YEAST

RADOSLAV SELECKÝ, DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, MARTIN ŠULÁK

Katedra biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika / Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic, e-mail: radoslav.selecky@stuba.sk

Selectký, R. – Šmogrovičová, D. – Šulák, M.: Produkcia nízkoalkoholického piva mutantnými pivovarskými kvasinkami. Kvasny Prum. 51, 2005, č. 7–8, s. 235–239.

Bola overená možnosť prípravy nízkoalkoholického piva pomocou mutantných kmeňov pivovarských kvasiniek s defektom v enzýmoch citrátového cyklu. Mutačný faktor – UV žiarenie – bol použitý na štyri zbierkové kmene *Saccharomyces cerevisiae* a na štyri izoláty kvasiniek spodného kvasenia zo slovenských pivovarov. Získalo sa 16 mutantov, z ktorých desať produkovalo požadované organické kyseliny. Po fermentácii 11% mladín bol vo všetkých mladých pivách obsah alkoholu v rozmedzí od 0,54 do 0,64 % obj., pH kolísalo v rozmedzí hodnôt 4,2–4,7. Ostatné parametre pív boli tiež v rozsahu bežnom pre nízkoalkoholické pivo.

Selectký, R. – Šmogrovičová, D. – Šulák, M.: Low-Alcoholic Beer Production Using Mutant Brewing Yeast. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 7–8, p. 235–239.

Possibility of low-alcoholic beer production by brewing yeast mutant in genes corresponding to tricarboxylic acid cycle enzymes was investigated. Four collection strains of *Saccharomyces cerevisiae* and four strains of brewing yeast isolated from Slovak breweries was exposed to UV radiation. As a result we have obtained 16 mutant yeast, ten of them were able to produce required organic acids. After fermentation of 11 % w/w. wort the final young beers showed alcohol content between 0.54–0.64 % v/v., pH varied between 4.2–4.7. Other parameters did not differ too much from those of classical low-alcoholic beers.

Kľúčové slová: pivovarské kvasinky, UV mutagenéza, cyklus trikarboxylových kyselín, nízkoalkoholické pivo

1 ÚVOD

Nealkoholické pivo zahŕňa do svojho sortimentu čoraz viac pivovarov. Je to však aj jeden z najproblematickejších výrobných artiklov a vyžaduje si značné zmeny výrobných postupov. Navyše kvôli absencii alkoholu sa svojou chuťou značne odchyľuje od pív alkoholických a konzument to reflektuje. Napriek tomu, že dialýza [1] a reverzná osmóza sú už dnes v priemysle na značne vysokej úrovni a dovoľujú vyrábať nealkoholické pivo bez tepelného zaťaženia a dobrej kvality, neodstraňujú ich prázdnu mladinovú chuť. Z takéhoto uhla pohľadu je výhodnejšie používať obmedzenú fermentáciu pomocou voľných alebo imobilizovaných pivovarských kvasiniek. Pokusy s geneticky manipulovanými kvasinkami sú zatiaľ iba opatrné, aj keď niektorí výrobcovia už na výrobu nealkoholických pív používajú mutantné kmene kvasiniek produkujúce málo etanolu. Naša práca sa zamerala hlavne na túto problematiku.

Adachi a kol. [2] použili vo vsádzkových a semikontinuálnych fermentáciách s prístupom kyslíka aj bez neho rekombinantný kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, ktorý mal prerušený gén *PDC1* pre pyruvátdekarboxylázu. Do kvasinky bol zároveň transformovaný plazmid nesúci *LDH-A* štruktúrny gén pre laktátdehydrogenázu. Pri pH 4,5 bola zaznamenaná maximálna hodnota koncentrácie etanolu 20,15 g.l⁻¹ a pri pH 3,5 iba 19,01 g.l⁻¹ etanolu. Mutant s prerušeným *PDC1* tvoril približne o tretinu menej etanolu v porovnaní s rodičovským kmeňom.

Výskumníci z Technickej univerzity v Berlíne [3] k zníženiu obsahu etanolu v pive nadmerne exprimovali gén *GPD 1* kódujúci glycerol-3-fosfátdehydrogenázu v pivovarskej kvasinke *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*. Obsah glycerolu v experimente simulujúcom kvasenie na 11,38% mladine vzrástol 5,6krát, množstvo

Selectký, R. – Šmogrovičová, D. – Šulák, M.: Die Alkoholarmesbierherstellung durch Bierhefenmutantstämme. Kvasny Prum. 51, 2005, Nr. 7–8, S. 235–239.

Es wurde die Möglichkeit der Alkoholarmesbierherstellung durch die Anwendung der Bierhefenmutantstämme mit einem in den Zyt-ratzyklusenzymen Defekt getestet. Der Mutantfaktor – UV Strahlung – wurde auf vier Sammlungsstämme *Saccharomyces cerevisiae* und auf vier Isolate der Untergärigehefestämme aus den slowakischen Bierbrauereien angewandt. Es wurden 16 Mutante erhalten, davon 10 Stämme die gewünschte organische Säure produzierten. Nach der Hauptgärung von allen 11% Würzen wurde der Alkoholgehalt des gesamten hergestellten Jungbieres im Bereich 0,54–0,64 % (Vol.) und der pH Wert im Bereich 4,2–4,7 festgestellt. Die andere Parameter liegen im Bereich, geläufig für ein alkoholarmes Bier.

Селецкий, Р. – Шмогровицова, Д. – Шулак, М.: Производство низкоалкогольного пива мутантными пивными дрожжами. Kvasny Prum. 51, 2005, No. 7–8, стр. 235–239.

Проверялась возможность производства низкоалкогольного пива при помощи мутантных штаммов пивных дрожжей с дефектом в энзимах цитратового цикла. Фактор мутации – ультрафиолетовое излучение – было использовано у четырех штаммов *Saccharomyces cerevisiae* из банка дрожжей и у четырех изолатов низового брожения из словацких пивзаводов.

Было получено 16 мутантов, из которых десять производило желаемые органические кислоты. После брожения 11 процентново сусла находилась уровень алкоголя во всех молодых пивах в пределах 0,54–0,64 % объем., pH колебалось в пределах величин 4,2–4,7. Остальные параметры пив находились в пределах обыкновенных для низкоалкогольных пив.

Keywords: brewing yeast, UV mutagenesis, tricarboxylic acid cycle, low-alcoholic beer

1 INTRODUCTION

Alcohol-free beer includes in its assortment still more breweries but it is one of the most problematic article due to differences in recipe and production methods. Because of absention alcohol differs from alcoholic beers in its taste and consumer reflects it. In spite of fact that dialysis [1] and reverse osmosis are sophisticated industrial methods that enable brewers to produce non-alcoholic beer of good quality without thermal stress, they do not eliminate its worty-off flavour and taste. From this point of view seems to be limited fermentation with free or immobilized yeast preferable. Experiments with genetic manipulated yeast are still cautious, otherwise some breweries use mutant strains of yeast producing less ethanol for non-alcoholic beer brewing. Our work has been oriented to this topic.

Adachi et al. [2] used for low-alcoholic beer production in batch and fed-batch fermentations, under aerobic and anaerobic conditions, recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with disruption in pyruvate decarboxylase coding gene *PDC1*. The yeast was also transformed with plasmid carrying *LDH-A* structure gene coding lactate dehydrogenase. At pH of media 4.5 has been detected the ethanol content 20.15 g.l⁻¹, when pH of media was 3.5 only 19.01 g.l⁻¹ of ethanol has been measured. Mutant with disrupted *PDC1* formed about third less ethanol as parental strain.

Researchers from Technical University in Berlin [3] overexpressed gene *GPD 1* coding glycerol-3-phosphate dehydrogenase in brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis* to cut down ethanol content in beer. Concentration of glycerol in experiment simulating brewing in hop wort of 11.38 % increased 5.6 times, ethanol content decreased for 18 % compared to original non-recombinant strain from 37 down to 30.4 g.l⁻¹. Some default could

etanolu kleslo o 18 % oproti pôvodnému kmeňu z 37 na 30,4 g.l⁻¹. Nedostatkom bol závažný nárast koncentrácie acetoínu, diacetylu a acetaldehydu. Arteficiálne kmene *Saccharomyces cerevisiae*, ktorým chýba alkoholdehydrogenáza, už boli izolované [4, 5], ale pivovarský priemysel v Európe je nervóznym z genetického inžinierstva a len málo pivovarníkov je ochotných ich použiť.

Jednou z výhod kvasiniek je, že prežívajú aj s niektorými mutáciami, ktoré sú pre vyššie eukaryotické organizmy letálne. Tieto mutácie sú buď indukované, alebo vyvolané prostredím, v ktorom sú kvasinky adaptované. Veľký počet publikovaných prác sa zaoberá biotechnologickým využitím mutácií spôsobujúcich defekty v aktivitách enzýmov citrátového cyklu s cieľom zvýšiť produkciu, alebo cielene regulovať tvorbu organických kyselín v priebehu fermentácie, čo umožňuje modifikovať senzorické vlastnosti potravín pripravených ich použitím. Tieto mutantné kmene boli v 90. rokoch popísané v rôznej literatúre [6, 7, 8]. Podstatou ich biotechnologického využitia je, že k zníženej produkcii alkoholu dochádza v dôsledku poklesu pH média počas fermentácie spolu s tvorbou organických kyselín. Akonáhle je čerstvé médium prevzdušnené, nastáva na začiatku fermentácie rapidná produkcia organických kyselín. Keď sa aeróbnym metabolizmus po vyčerpaní kyslíka zmení na anaeróbnym, nízke pH vplyva na pokles aktivity enzýmov alkohol dehydrogenázy a pyruvátdekarboxylázy, ktorých pH optimum je pri vyšších hodnotách. Z toho vyplýva, že produkcia alkoholu je potlačená a dochádza ďalej k redukcii pyruvátu na laktát enzýmom laktátdehydrogenázou v súlade s metabolizmom týchto mutantných kmeňov. Na základe týchto poznatkov vyrobili nealkoholické pivo Navrátil a kol. [9]. Pomocou nerekombinantných mutantov *S. cerevisiae* defektných v aktivite enzýmov citrátového cyklu, vsádzkovým aj kontinuálnym spôsobom, voľnými bunkami aj imobilizovanými do pektátu dosiahli v produktoch hladinu etanolu v rozmedzí 0,07–0,31 % hm. Kyselina mliečna v získaných pivách naprodukovávaná v koncentráciách do 1,38 g.l⁻¹ mala silný ochranný efekt proti mikrobiálnej kontaminácii konečného produktu a slúžila zároveň ako senzoricky aktívna zložka. V tejto práci boli však použité mutanty liehovarských a nie pivovarských kvasiniek.

Uvedené práce hľadajú alternatívy k súčasným klasickým metódam na výrobu nealkoholického, resp. nízkoalkoholického piva.

2 MATERIÁL A METÓDY

2.1 Mikroorganizmy

V práci boli použité mutantné kmene pivovarských kvasiniek: *Saccharomyces cerevisiae* BZ I/30 a BZ I/60 (pôvodný kmeň: *S. cerevisiae* CCY 68-16), *S. cerevisiae* BZ II/30 a BZ II/60 (pôvodný kmeň: *S. cerevisiae* CCY 48-22), *S. cerevisiae* BZ III/30 a BZ III/60 (pôvodný kmeň: *S. cerevisiae* CCY 48-48), *S. cerevisiae* BZ IV/30 a BZ IV/60 (pôvodný kmeň: *S. cerevisiae* CCY 48-61) a mutantné kmene RZ I/30, RZ I/60, RZ II/30, RZ II/60, RZ III/30, RZ III/60, RZ IV/30 a RZ IV/60 vyšľachtené zo štyroch izolátov zo slovenských pivovarov.

2.2 Mutácia a selekcia

Rodičovské kmene boli vystavené UV žiareniu vlnovej dĺžky 254 nm (1 W.m⁻²) po dobu 30 sekúnd (.../30), resp. 30+60 sekúnd (.../60). Tvorba organických kyselín mutantmi bola zisťovaná na tuhej identifikáčnej pôde s bromkrezolovou zeleňou a získané kmene boli podrobené selekcii na základe schopnosti skvasovať niektoré jednoduché sacharidy.

2.3 Kultivačné a fermentačné médiá

Tuhé identifikáčné médium malo zloženie (v g.l⁻¹): glukóza (100); (NH₄)₂SO₄ (0,2); (NH₄)₂HPO₄ (0,03); KH₂PO₄ (0,15); MgSO₄·7H₂O (0,19); NaCl (0,1); CaCl₂ (0,1); bromkrezolová zeleň (0,1); agar (5). pH bolo upravené na hodnotu 7.

Médium použité na kvasné testy obsahovalo 20 g.l⁻¹ zdroja uhlíka (sacharóza, glukóza, rafinóza, trehalóza, melibióza, galaktóza, maltóza a laktóza) a 10 g.l⁻¹ kvasničného autolyzátu.

Kultivačné médium bolo nasledujúceho zloženia (v g.l⁻¹): glukóza (100); (NH₄)₂SO₄ (5); kvasničný autolyzát (3); KH₂PO₄ (2); MgSO₄·7H₂O (1); CaCl₂ a NaCl (0,1). Hodnota pH bola upravená na 5,8. Bunky boli kultivované 72 h pri 28 °C v 500 ml kultivačných bankách pri semi-aeróbnym podmienkach na rotačnej trepačke. Objem média bol 100 ml.

Na fermentáciu bola použitá 11% mladina z miestneho pivovaru. Vsádzková fermentácia prebiehala v 600 ml infúzných fľašiach, opatrených kvasným uzáverom. Objem fermentačného média bol 500

be seriously high concentration of acetoin, diacetyl and acetaldehyde. Artificial strains of *Saccharomyces cerevisiae* lacking alcohol dehydrogenase were isolated [4, 5], but European brewing industry is nervous of genetic engineering and only a few brewers are obliged to use them.

One of the advantages of yeast is that they survive with some mutations, which are lethal for eukaryotes. These mutations can be induced in laboratory or spontaneously influenced by an environment they are adapted in. Couple of published works concern of biotechnical applications of mutations causing defects in Citrate cycle enzyme activity to enhance production, or to regulate creation of organic acids during fermentation, what enables to modify sensoric properties of fermented foods prepared by using such a microorganisms. These mutant strains were described in 90-ties in different literature [6, 7, 8]. Reason for their biotechnical application for non-alcoholic beer production is the fact, that limited ethanol production is caused by decreasing pH of medium during fermentation along with organic acids creation. When fresh media is aerated at the beginning, rapid production of organic acids takes place. When aerobic metabolism after all oxygen is spent switches to anaerobic, low pH influences downswing of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activity whose pH optimum lies in higher domains. Ethanol production is consecutively pulled down and reduction of pyruvate to lactic acid by lactate dehydrogenase occurs responsively to metabolism of these mutant strains. With this information produced Navrátil et al. [9] non-alcoholic beer with non-recombinant mutants of *S. cerevisiae* defective in Citrate cycle enzymes activity. In batch and continuous fermentations with both, free cells and immobilized to calcium pectate reached an ethanol content values between 0.07-0.31 % w/w. in all products. Lactic acid in green beers produced in concentrations up to 1.38 g.l⁻¹ had a strong protective effect against microbial contamination of terminal product with some important sensoric properties as well. Authors worked with distillery yeast, not brewing.

All mentioned works searching alternatives to classical methods for non-alcoholic or low-alcoholic beer production of nowadays.

2 METHODS AND MATERIALS

2.1 Microorganisms

Following cultures of brewing yeast were used: *Saccharomyces cerevisiae* BZ I/30 and BZ I/60 (parental strain: *S. cerevisiae* CCY 68-16), *S. cerevisiae* BZ II/30 and BZ II/60 (parental strain: *S. cerevisiae* CCY 48-22), *S. cerevisiae* BZ III/30 and BZ III/60 (parental strain: *S. cerevisiae* CCY 48-48), *S. cerevisiae* BZ IV/30 and BZ IV/60 (parental strain: *S. cerevisiae* CCY 48-61) and mutant strains RZ I/30, RZ I/60, RZ II/30, RZ II/60, RZ III/30, RZ III/60, RZ IV/30 and RZ IV/60 selected from four isolates from Slovak breweries.

2.2 Mutation and selection

Parental strains were exposed to UV radiation of wave-length 254 nm (1 W.m⁻²) during 30 seconds (.../30) and 30+60 seconds (.../60). Organic acid production by mutant strains was detected on identification medium containing bromocresol purple as an indicator and obtained strains were selected on basis of some basic sugars fermentation ability.

2.3 Cultivation and fermentation media

Composition of solid identification medium was following (g.l⁻¹): glucose (100); (NH₄)₂SO₄ (0.2); (NH₄)₂HPO₄ (0.03); KH₂PO₄ (0.15); MgSO₄·7H₂O (0.19); NaCl (0.1); CaCl₂ (0.1); bromocresol purple (0.1); agar 5. pH was adjusted to 7.

Medium for fermentation tests contained 20 g.l⁻¹ of carbonic source (sucrose, glucose, raffinose, trehalose, melibiose, galactose, maltose and lactose) and 10 g.l⁻¹ of yeast extract.

Cultivation medium of following constitution was used (g.l⁻¹): glucose (100); (NH₄)₂SO₄ (5); yeast extract (3); KH₂PO₄ (2); MgSO₄·7H₂O (1); CaCl₂ and NaCl (0.1). pH was adjusted to 5.8. Cells were cultivated in cultivation flasks of 500 ml in volume during 72 h with temperature 28 °C under semi-aerobic conditions on rotary shaker. Volume of cultivation medium in each flask was 100 ml.

As a medium for fermentation was used 11% wort from local brewery. The batch fermentation process was carried out in 600 ml bottles with fermentation seal, containing 500 ml of wort. Temperature was 6 °C. Initial concentration of free yeast cells was 3 g.l⁻¹ of dry weight.

ml, teplota fermentácie 6 °C. Počiatočná koncentrácia voľných buniek v médiu bola 3 g.l⁻¹ suchej hmotnosti.

2.4 Analytické stanovenia

Etanol plynovou chromatografiou (náplňová kolóna – PORAPAK Q, FID detektor), celkové polyfenoly a farba podľa EBC, celkový dusík podľa Kjeldahla, aminokyseliny plynovou chromatografiou (náplňová kolóna, fáza SE 30), organické kyseliny plynovou chromatografiou (náplňová kolóna s náplňou CHROMOSORB G, AW-DMCS a stacionárnou fázou 8% FFAP). Postupy boli realizované podľa Basařovej a kol. [10].

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

3.1 Selekcja mutantov

Tvorba organických kyselín bola sledovaná po dvoch a siedmych dňoch po naočkovaní. Kmene RZ I/30 a RZ I/60 nemali schopnosť tvoriť organické kyseliny vôbec, ani po opätovnom naočkovaní. Pri kmeňoch BZ II/30, BZ II/60 a DZ I/60 bol zaznamenaný slabý náznak okyslenia indikačného média až po siedmych dňoch po naočkovaní, preto uvedených päť kmeňov nemalo pre ďalšiu prácu význam.

Bola sledovaná aj schopnosť skvasovať vybrané sacharidy mutantnými kmeňmi kvasiniek. Experiment trval šesť dní pri laboratórnej teplote. Kmeň DZ I/30 neskvasoval žiaden zo sacharidov a tiež bol z ďalších experimentov vylúčený. Výsledky z priebehu týchto testov sú zhrnuté v tab. 1.

3.2 Fermentácia

Fermentácie s pripravenými mutantnými kmeňmi prebiehali vsádzkovo pri teplote 6 °C v 600 ml infúzných fľašiach opatrených kvasným uzáverom. Množstvo 11% mladiny bolo 500 ml, zákvasná dávka 5 ml inokula. Analýzy boli uskutočnené po 13 dňoch. Parametre mladých pív sú uvedené v tab. 2. Všetky piva boli nízkoalkoholické, obsah etanolu sa pohyboval v rozmedzí 0,54–0,64 % objemových. Farba dosahovala hodnoty málo nad 10 jednotiek EBC, celkové polyfenoly variovali v rozmedzí 196–270 mg.l⁻¹. Pivo vykvasené kmeňom BZ I/30 zaznamenalo oproti ostatným značné množstvo celkového dusíka,

2.4 Analytical methods

Ethanol was determined by GC (PORAPAK Q-filled column and FID), total polyphenols and colour were measured according to current EBC recommended methods, total nitrogen according to Kjeldahl, amino acids by GC (SE 30 phase-filled column), organic acids by GC (CHROMOSORB G, AW-DMCS, filled column with stationary phase of 8 % FFAP). Methods available also in Basařová et al. [10].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Mutants selection

Organic acids production was detected after two and seven days since the indication media were inoculated. Strains RZ I/30 and RZ I/60 did'n produce organic acids, not even after re-inoculation. In case of strains BZ II/30, BZ II/60 a DZ I/60 was determined moderate acidity of indication medium after seven days and those five mentioned strains had no importance for further experiments.

Also the fermentation of some basic saccharides present in wort by mutant strains was investigated. Experiment lasted six days under laboratory conditions. Strain DZ I/30 fermented none of the saccharides and it was cast out following experiments too. Results are shown in Tab. 1.

3.2 Fermentation

Batch fermentations with prepared mutant strains were carried out in 600 ml bottles with fermentation seals, temperature was 6 °C, amount of 11 % wort 500 ml, inoculated with 5 ml of cells suspension. Beers were analyzed after 13 days. Parameters of green beers are presented in Tab. 2. All of them were low-alcoholic, ethanol content varied between 0.54 and 0.64 % v/v. Colour reached values a little over 10 EBC units and total polyphenols ranged between 196–270 mg.l⁻¹. Compared to others, beer fermented with strain BZ I/30 contained considerably more total nitrogen, 1495.2 mg.l⁻¹. In other samples were its amounts from three to seven times lower. As we expected, pH values were also lower compared with classical beers, in interval from 4.2 to 4.5. pH value of 4.7 showed beer prepared using strain BZ I/60.

Low pH relates with low alcohol content. Mutant strains produce

Tab. 1 Výsledky kvasných testov po šiestich dňoch v identifikačnom médiu. Daný mikroorganizmus skvasuje daný sacharid (●), daný mikroorganizmus neskvasuje daný sacharid (○) / Results of fermentation tests after six days in identification medium. Given microorganism ferment given saccharide (●), given microorganism does not (○)

Kmeň / Strain	sacharóza / sucrose	glukóza / glucose	rafinóza / raffinose	trehalóza / trehalose	melibióza / melibiose	galaktóza / galactose	maltóza / maltose	laktóza / lactose
BZ I/30	●	●	●	○	○	●	●	○
BZ I/60	●	●	●	○	○	●	●	○
BZ III/30	●	●	●	○	●	○	●	○
BZ III/60	●	●	●	○	●	●	●	○
BZ IV/30	●	●	●	○	●	●	●	○
BZ IV/60	●	●	●	○	●	●	●	○
RZ II/30	●	●	●	○	●	●	●	○
RZ II/60	●	●	●	○	●	●	●	○
DZ I/30	○	○	○	○	○	○	○	○
DZ II/30	●	●	●	○	●	●	●	○
DZ II/60	●	●	●	○	●	●	●	○

Tab. 2 Základné parametre nízkoalkoholického piva vyrobeného vsádzkovou fermentáciou mladiny pri teplote 6 °C mutantnými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* / Basic parameters of low-alcoholic beer produced during batch fermentation of wort with temperature 6 °C by mutant yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Parameter	BZ I/30	BZ I/60	BZ III/30	BZ III/60	BZ IV/30	BZ IV/60	RZ II/30	RZ II/60	DZ II/30	DZ II/60
Etanol, % obj. / Ethanol, v/v %	0,55	0,54	0,58	0,64	0,59	0,60	0,62	0,60	0,61	0,64
Farba, j. EBC / Colour, EBCu	10,6	10,7	10,2	10,3	10,3	10,4	9,9	10,1	10,1	9,4
pH	4,4	4,7	4,3	4,5	4,3	4,4	4,4	4,3	4,3	4,2
Celkový dusík, mg.l ⁻¹ / Total nitrogen, mg.l ⁻¹	1495	498	697	498	199	249	299	598	598	498
Celk. polyfenoly, mg.l ⁻¹ / Total polyphenols, mg.l ⁻¹	213	180	230	201	196	197	269	270	251	258

Tab. 3 Aminokyseliny v nízkoalkoholickom pive vyrobenom vsádkovou fermentáciou mladiny pri teplote 6 °C mutantnými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* / Amino acids of low-alcoholic beer produced during batch fermentation of wort with temperature 6 °C by mutant yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Obsah aminokyselín / Amino acids content (mg.l ⁻¹)	BZ I/30	BZ I/60	BZ III/30	BZ III/60	BZ IV/30	BZ IV/60	RZ II/30	RZ II/60	DZ II/30	DZ II/60
Serín / Serine	16	15	14	19	15	14	17	15	16	19
Threonín / Threonine	44	39	41	45	48	46	42	49	47	48
Asparagín / Asparagine	29	26	25	19	31	25	29	24	31	26
Arginín / Arginine	15	16	19	18	14	19	16	14	19	16
Izoleucín / Isoleucine	19	12	16	14	18	17	16	21	18	19
Leucín / Leucine	14	13	15	14	16	12	12	15	15	14
Lyzín / Lysine	11	9	8	11	12	19	13	15	11	13
Metionín / Methionine	20	19	20	21	19	18	21	15	21	19
Valín / Valine	18	15	14	16	19	15	14	19	19	15
Glycín / Glycine	15	12	13	12	14	15	13	14	12	11
Alanín / Alanine	19	20	20	21	20	21	23	24	22	23
Fenylalanín / Phenylalanine	26	29	28	24	22	24	28	26	24	22
Tyrozín / Tyrosine	14	12	13	14	15	12	16	14	13	15
Tryptofán / Tryptophane	19	18	19	14	15	16	19	17	18	19
Histidín / Histidine	21	26	23	25	24	26	29	24	26	22

až 1495,2 mg.l⁻¹, kým v ostatných bol jeho obsah tri až sedemkrát menší. Podľa očakávania bolo vo vyrobených pivách nižšie pH vzhľadom na tvorbu organických kyselín mutantmi, a to v rozmedzí 4,2–4,5. Výnimkou bolo pivo pripravené kmeňom BZ I/60 s pH 4,7.

Nízke pH súvisí s nízkym obsahom alkoholu. Mutantné kvasinky produkujú do mladiny organické kyseliny, čím dochádza znížením pH k inaktívácii enzýmov zodpovedných za tvorbu etanolu, teda alkoholdehydrogenázy a pyruvátdekarboxylázy, ktorých pH optimum je vyššie. Mutanty vykazovali pomerne dlhú aeróbnú fázu, počas ktorej prebiehala tvorba biomasy, tvorba oxidu uhličitého bola výrazne redukovaná, a tak je dosycovanie hotových pív nevyhnutné. UV mutagenéza je nešpecifická, a preto počas nej môže dôjsť k porušeniu niektorých regulačných mechanizmov zodpovedných za utilizáciu pre kvasinky prirodzených zdrojov uhlíka. Metabolizmus týchto kmeňov teda nie je podrobne objasnený a musí byť predmetom ďalšieho výskumu. Tak isto vysoká hodnota celkového dusíka v pive pripravenom mutantným kmeňom BZ I/30 môže mať svoje genetické pozadie. V kvasinke mohlo dôjsť k poškodeniu génov regulujúcich autolýzu, ktorá prebehla a zapríčinila zvýšenie koncentrácie dusíkatých látok. Iné vysvetlenie je, že kvasinka dusíkaté zdroje neutilizovala vôbec, to však nezodpovedá koncentráciám zvyškových aminokyselín (tab. 3), ktoré boli spotrebované všetkými kmeňmi rovnomerne, teda aj kmeňom BZ I/30. Zo spotreby aminokyselín je ďalej zrejme, že ich utilizácia prebiehala rovnomerne, a ich profil je vo všetkých získaných nízkoalkoholických pivách podobný. Najvyššie koncentrácie boli zaznamenané u aminokyseliny treonínu, a to do 50 mg.l⁻¹, čo je dva až dva a pol krát viac ako u ostatných aminokyselín. O niečo vyššie je aj množstvo asparagínu, ktoré sa pohybovalo v rozmedzí od 19 do 31 mg.l⁻¹. Môžeme teda konštatovať, že tieto dve aminokyseliny boli utilizované najmenej. Z uvedeného možno predpokladať tvorbu vyšších alkoholov, zodpovedných za znižovanie hustoty takýchto pív.

Na konci fermentácie bol sledovaný obsah kyseliny mliečnej, citrónovej, asparágovej a jablčnej (tab. 4). Najviac bola v pivách zastúpená kyselina mliečna, čo zodpovedá predpokladu o jej tvorbe z pyruvátu v anaeróbných podmienkach. Jej koncentrácia sa pohybovala od 541 do 698 mg.l⁻¹. Ostatné kyseliny sa vyskytovali v oveľa menších koncentráciách v zostupnom poradí od kyseliny jablčnej cez asparágovú až po kyselinu citrónovú.

lactic and some other acids into the wort and along with fall of pH values alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activity decrease, because of its higher pH optima. For mutants was characteristic longer respiratory phase along with the biomass formation. Production of carbon dioxide was markedly reduced, therefore is an additional saturation necessary. UV mutagenesis is not specific and some regulation mechanisms responsible for natural uptake of carbonic sources by yeast can be disrupted. Metabolism of these strains is still not well known and there is a need of future research. Also high level of total nitrogen in beer fermented with mutant strain BZ I/30 has its genetic background and genes regulating autolysis could have been damaged during mutation and so autolysis might cause increase of total nitrogen concentration. Different explanation is that nitrogen sources was not utilized by this mutant yeast at all, but such an argument does not reflect final concentrations of amino acids (Tab. 3), which were utilized by all the strains equally as well as BZ I/30. From amino acids consumption is clear that they were utilized equally and their profile is in all beer samples similar. Highest concentrations were recorded for threonine, up to 50 mg.l⁻¹, what was two times more compared to other amino acids. Moderately higher is also concentration of asparagines, from 19 to 31 mg.l⁻¹. These two amino acids were less utilized. From presented facts the higher alcohols formation reducing beer density can be predicted.

At the end of fermentation the amount of lactic, citric, asparagic and malic acids were detected (Tab. 4). Highest concentration of lactic acid in beers responds to purpose that this acid is formed from pyruvate under anaerobic conditions. Its concentrations varied from 541 to 698 mg.l⁻¹. Other acids were present in much lower concentration descending from malic and asparagic acid down to citric acid.

Lactic acid is frequently used in brewing for acidification of wort, pH decrease to value of 2.8–3.2, to reduce a risk of microbial contamination. Lactic acid is fermentative produced by *Lactobacillus sp.* (LAB) but it is difficult to optimize their propagation not to mention the time needed for this pre-acidification step [11]. Advantage of mutant strains described, is their direct production of lactic acid to the medium during fermentation.

Organic acids represent also eminent additives in the food technology [12]. They can effectively cover

Tab. 4 Obsah organických kyselín v nízkoalkoholickom pive vyrobenom vsádkovou fermentáciou mladiny pri teplote 6 °C mutantnými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* / Content of organic acids in low-alcoholic beer produced during batch fermentation of wort with temperature 6 °C by mutant yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Kmeň / Strain	Koncentrácia organických kyselín / Organic acids concentration (mg.l ⁻¹)			
	Citrónová / Citric acid	Mliečna / Lactic acid	Asparágová / Asparagic acid	Jablčná / Malic acid
BZ I/30	42	605	96	99
BZ I/60	56	698	97	104
BZ III/30	72	608	88	112
BZ III/60	81	541	96	108
BZ IV/30	29	589	95	123
BZ IV/60	41	625	87	142
RZ II/30	32	598	89	154
RZ II/60	41	598	96	112
DZ II/30	42	622	94	142
DZ II/60	45	618	89	123

Kyselina mliečna je v pivovarníctve bežne používaná na acidifikáciu mladiny, čím sa hodnota pH zníži na úroveň 2,8–3,2 a znižuje sa riziko kontaminácie. Kyselina mliečna je produkovaná fermentačne mliečnymi baktériami (LAB). Je však náročné optimalizovať aktivitu ich rastu a čas potrebný na takúto preacidifikáciu je značný [11]. Výhodou opísaných mutantných kmeňov je ich priama produkcia kyseliny mliečnej do média počas fermentácie.

Organické kyseliny patria medzi významné potravinárske aditíva [12]. V súvislosti s nízkoalkoholickým pivom môžu výrazne prekryť prázdnu a mladinovú chuť, ktorá je týmito pivám značne vyčítaná. Z hľadiska senzorického posúdenia produktov je možno u získaných pív konštatovať jemnú ovocnú arómu a slabú nakyslajúcu chuť, pripomínajúcu v podtónoch biele víno. Z nedostatku oxidu uhličitého vyplýva slabá penivosť a absentujúca rezkosť.

4 ZÁVER

V práci sme sa zamerali na prípravu mutantných kmeňov pivovarských kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* vhodných na prípravu nízkoalkoholického, prípadne nealkoholického piva. Predpoklad, že mutanty defektné v cykle trikarboxylových kyselín produkujú zvýšené množstvo týchto kyselín do mladiny a vytvárajú tak prostredie vhodné pre blokovanie enzýmov dôležitých pre tvorbu alkoholu, sa ukázal ako správny. Na osem rodičovských kmeňov kvasiniek sme pôsobili fyzikálnym mutagénom UV žiarením po 30 a 30+60 sekúnd. Získané mutanty boli podrobené testom na produkciu organických kyselín a skvasovanie niektorých jednoduchých sacharidov bežne prítomných v mladine. Na základe výsledkov z nich sme vybrali desať mutantných kmeňov, s ktorými sme uskutočnili vsádzkové fermentácie pri teplote 6 °C v objeme 500 ml 11% mladiny. Získali sme tak nízkoalkoholické piva s obsahom etanolu 0,54–0,64 % objemových. Hodnoty farby aj celkových polyfenolov boli porovnateľné s bežnými alkoholickými pivami. Nízke pH týchto pív (4,2–4,7) je zapríčinené prítomnosťou organických kyselín, predovšetkým mliečnej. Zvýšená kyslosť tu môže byť chápaná ako nevýhoda. Treba však brať do úvahy, že nie všetci spotrebitelia sú ochotní prispôbovať sa unifikovanému vkusu presadzovanému pivovarníkmi predovšetkým v našich zemepisných oblastiach a z hľadiska senzoriky môže prítomnosť týchto kyselín pomáhať maskovať prázdnu mladinovú príchuť, navyše protektívny účinok laktátu z hľadiska ochrany pred nežiadúcou mikrobiálnou kontamináciou je nesporný. Mutantné pivovarské kvasinky predstavujú zároveň legislatívne schodnú perspektívu v príprave špeciálnych fermentovaných nápojov.

POĎAKOVANIE:

Práca bola vypracovaná s podporou Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA, reg. č.: 1/2391/05.

Literatúra / Literature

- [1] Zufall, C., Wackerbauer, K.: Die Entalkoholisierung von Bier durch Dialyse – Verfahrenstechnische Beeinflussung der Bierqualität und ihr Einfluss auf die Bierqualität. *Mschr. Brauwiss.* **53**, 2000, 104–179.
- [2] Adachi, E., Torigoe, M., Sugiyama, M., Nikawa, J., Shimizu, K.: Modification of metabolic pathway of *S. cerevisiae* by the expression of lactate-dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 1998, 284–289.
- [3] Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L., Stahl, U.: Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res.* **2**, 2002, 225–232.
- [4] Perpete, E., Collin, S.: Contribution of 3-methyl thiopropionaldehyde to the warty flavour of alcohol-free beers. *J. Agr. Food Chem.* **47**, 1999, 2374–2378.
- [5] MacKenzie, D.: Foul Brew. *New Sci.* **162**, 1999, 2190–2197.
- [6] Kacliková, E.: Tvorba extracelulárnych organických kyselín mutantami kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. *Bulletin potravinárskeho výskumu* **3**, 1996, 135–144.
- [7] Mockovčiaková, D., Janitorová, V., Zigová, M., Kacliková, E., Zagulski, M., Šubík, J.: The *ogd1* and *kgd1* mutants lacking 2-oxo-

warty off-flavour and fill the taste of alcohol-free beer. From sensorial arbitration of our products results soft fruity aroma and slightly sour taste reminding white wine in the undertones. A low carbon dioxide concentration causes a poor foaming of beers, lacking persistence.

4 CONCLUSION

The aim of study was to prepare mutant strains of brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* applicable for low-alcoholic, or non-alcoholic beer production. Prediction that mutants they are defective in tricarboxylic acid cycle activity produce considerable amounts of appropriate acids in wort and so create conditions adequate for alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase deactivation seemed to be right. Eight parental strains were exposed to physical mutagen, that represents UV radiation, for 30 and 30+60 seconds. Acquired mutants were tested for organic acids production and fermentation of some basic saccharides present in wort. Taking into consideration, results of these tests showed that ten mutant strains could be chosen to carry out batch fermentations in 500 ml of 11 % wort with temperature 6 °C. Green beers were all low-alcoholic with 0.54–0.64 % w/w. of ethanol content. Values of colour and total polyphenols were comparable with classical alcoholic beer. Low pH (4.2–4.7) is caused by higher concentration of organic acids, all above lactic acid. Acidity can be understood as a disadvantage but not all the consumers are agreeable accommodate themselves to an unified tastes dictated by breweries in our geographic area and from sensoric point of view can presence of these acids help to cover warty off-flavour characteristic for alcohol-free beers. After all protective effect of lactic acid from unacceptable microbial contamination and spoilage is undeniable. Mutant brewing yeast constructed this way represent legislatively safe perspective in special fermented drinks development.

ACKNOWLEDGMENT:

This research was supported by VEGA grants of the Ministry of Education SR and Slovak Academy of Science Grant Agency (no. 1/2391/05).

- lutarate dehydrogenase activity in yeast are allelic and can be differentiated by the cloned amber suppressor. *Curr. Genet.* **24**, 1993, 377–381.
- [8] Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D. M., Ducharme, K., McCammon, M. T.: Genetic and Biochemical Interactions Involving Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) Function Using a Collection of Mutants Defective in All TCA Cycle Genes. *Genet.* **152**, 1999, 153–166.
- [9] Navrátil, M., Dömény, Z., Šturdík, E., Šmogrovičová, D., Gemeiner, P.: Production of non-alcoholic beer using free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in the tricarboxylic acid cycle. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**, 2002, 133–140.
- [10] Basařová, G., Čepička, J., Doležalová, A., Kahler, M., Kubíček, J., Poledníková, M., Voborský, B.: Pivovarsko-sladařská analytika 1–3 zv. Merkanta, Praha, 1993, 965.
- [11] Back W., Lommi H., Swinkels W. J., Vilijsa T. T.: European Patent No. 0 601 362 A1, 1993.
- [12] Whiting, G. C.: Organic acid metabolism of yeasts during the fermentation of alcoholic beverages – a review. *J. Inst. Brew.* **82**, 1976, 84–92.

Lektoroval doc. Ing. Jan Šavel, CSc.
Do redakcie došlo 9. 12. 2004