

WPLYW SZCZEPÓW DROŻDŻY Z RODZAJU *KLUYVEROMYCES* I STĘŻENIA EKSTRAKTU W BRZECZKACH MIODOWYCH NA ZAWARTOŚĆ ETANOLU I UBOCZNYCH PRODUKTÓW FERMENTACJI

Dorota Zielińska, Elżbieta Baca, Krzysztof Baranowski, Agnieszka Salamon

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
Zakład Technologii Piwa, Słodu i Żywności Prozdrowotnej
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa
baca@ibprs.pl

Streszczenie

Wiele szczepów drożdży posiada właściwości osmofilne, niestety ich zdolności fermentacyjne są dość słabe i rzadko są w stanie wytworzyć duże ilości alkoholu etylowego, szczególnie przy brzeczce miodowej ubogiej w związki odżywcze.

Celem pracy był dobór szczepu drożdży *Kluyveromyces* do fermentacji wysokocukrowych brzeczek miodowych. Przydatność drożdży do fermentacji brzeczek oceniono na podstawie szybkości wytwarzania etanolu oraz zdolności do syntezy ubocznych produktów fermentacji w zależności od stężenia cukru w brzeczce.

Przebadano 4 szczepy drożdży rodzaju *Kluyveromyces* z kolekcji ZP-IBPRS. Proces fermentacji alkoholowej brzeczek miodowych o stężeniu 30, 35 i 40% ekstraktu prowadzono w warunkach laboratoryjnych. Brzeczkę przygotowano z miodu pszczelego z udziałem 10% sacharozy z dodatkiem $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,2% i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,05%. Dodatek inokulum wynosił 3,5%. Fermentację prowadzono w temperaturze 25°C, na wstrząsarce, przez 12 dni. Po fermentacji oznaczono stężenie ubocznych lotnych produktów fermentacji metodą chromatografii gazowej (GC) oraz zawartość alkoholu etylowego – metodą destylacyjną.

Stwierdzono znaczne różnice w szybkości fermentacji cukrów oraz w zawartości ubocznych produktów fermentacji przez poszczególne szczepy drożdży. Było to szczególnie widoczne przede wszystkim przy 40% początkowym stężeniu ekstraktu brzeczki. Najwyższą ilość alkoholu etylowego (15,8% obj.) wytwarzał szczep nr 1 w brzeczce o zawartości ekstraktu 30%. Najślabszą zdolność fermentacyjną wykazywał szczep nr 3, który wytwarzał ok. 9,0% obj. alkoholu etylowego, fermentując brzeczki miodowe o najwyższej (40%) zawartości ekstraktu.

W brzeczkach miodowych o zawartości 35 i 40% ekstraktu badane szczepy wytwarzały zwiększone w porównaniu z brzeczką 30% ilości n-propanolu, alkoholi amyłowych

(2 i 3-metylo-butanol) i aldehydu octowego.

Słowa kluczowe: drożdże *Kluyveromyces*, uboczne produkty fermentacji, wysokocukrowe brzeczki miodowe, etanol

THE EFFECT OF YEAST STRAINS OF THE GENUS *KLUYVEROMYCES* AND EXTRACT CONCENTRATION IN HONEY WORT ON THE ETHANOL AND FERMENTATION BY-PRODUCTS CONTENT

Summary

A lot of yeast strains have osmophilic properties, unfortunately their fermentation capabilities are quite poor and they are seldom able to produce large amounts of ethanol, particularly in poor in nutrients honey wort.

The aim of this study was the choice of *Kluyveromyces* yeast strain for fermentation of honey woon broth with high sugar content. The usefulness of yeast strain was estimated based on the rate of ethanol production and the ability for the synthesis of by-products of fermentation depending on the concentration of extract in the wort.

Four *Kluyveromyces* yeast strains from the collection of ZP-IBPRS were examined. Fermentation process of honey broth with a concentration of 30, 35 and 40% of the extract was carried out under laboratory conditions. Broth was prepared with: honey, and 10% sucrose with the 0.2 % addition of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the amount of 0.05%. The amount of inoculum was 3.5%. Fermentations were carried out at 25°C on a shaker for 12 days. After fermentation, the concentration of volatile by-products of fermentation was determined by gas chromatography (GC) and the ethanol content -by distillation.

It was found significant differences in the rate of fermentation of sugars and the content of by-products of fermentation by different yeast strains, particularly evident at high (40%) initial concentration of the broth extract. The highest concentration of ethanol (15.8% by volume) produced a No 1 strain in the broth containing 30% of extract. The least fermentation ability had No 3 strain, which produced a 9.0% volume of ethyl alcohol, in wort with the highest (40%) content of extract.

In comparison with 30% honey broth, the honey worts containing 35 and 40% of extract, examined strains produced increased amounts of n-propanol, 2 i 3-methyl-butanol and acetaldehyde.

Key words: yeast *Kluyveromyces*, fermentation by-products, honey worts with high sugar content, ethanol

WSTĘP

Drożdże z rodzaju *Kluyveromyces* zaliczane są do mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania alkoholu etylowego z laktozy, glukozy, fruktozy i sacharozy. Nie wykazują one natomiast zdolności fermentacji maltozy i maltotriozy. Aktywność fermentacyjna jest obserwowana w zakresie temperatur 22–35°C. Ze względu na brak możliwości asymilacji azotanów wymagają do wzrostu obecności fosforanów lub siarczanu amonu. Niektóre z nich potrzebują także obecności witamin [Baca 2005].

Drożdże z rodzaju *Kluyveromyces* zostały wykorzystane przede wszystkim w technologii utylizacji serwatki, a także do usuwania laktozy ze środowisk o wysokim stężeniu białka mlecznego. Wykorzystuje się ich również do wytwarzania napojów fermentowanych z serwatki oraz do produkcji drożdży paszowych z produktów ubocznych przemysłu fermentacyjnego, ziemniaczanego i mleczarskiego [Baca 2005].

Poszczególne szczepy drożdży *Kluyveromyces* różnią się w sposób istotny wydajnością wytwarzania biomasy drożdżowej i aktywnością fermentacyjną, zdolnością syntezy enzymów (β -galaktozydaz i proteaz), zakresem tolerancji na wysokie stężenia cukrów, rodzajem i ilością wytwarzanych w procesie fermentacji produktów ubocznych fermentacji. Zawartość produktów ubocznych zależy od rodzaju podłoża i warunków fermentacji [Baca 2005].

Fermentacja nastawów wysokocukrowych (brzeczki miodowych) niesie ryzyko przedwczesnego zatrzymania procesu, ponieważ drożdże narażone są na niekorzystne działanie wysokich stężeń cukru i etanolu [Sawicka 1970, Wootten 1983, Gogol i Tuszyński 1996]. Przyczyną zakłóceń mogą być także dodatkowe metabolity fermentacji, m.in. estry etylowe [Bonin i Kolas 2009]. Kolejnym problemem może być również zbyt mała ilość przyswajalnych związków azotowych. Jest to szczególnie ważne przy produkcji napojów winopodobnych, które z racji znacznego rozcieńczenia nie są pożywką pełnocenną dla drożdży [Gogol i Tuszyński 1996].

Związki azotowe występują w miodach zwykle w ilościach 0,25–0,3%. Połowę związków azotowych stanowią białka pochodzące z organizmów pszczoł oraz z pyłku kwiatowego. Poza białkami i aminokwasami w miodach występują enzymy, które również nie będą źródłem azotu dla drożdży [Popek 2001, Prabudzki 1998].

Do fermentacji nastawów wysokocukrowych zalecane jest stosowanie drożdży opornych na stosunkowo wysokie stężenia cukrów [Bonin i Kolas 2009].

Od drożdży osmofilnych oczekuje się przede wszystkim zdolności do wytwarzania dużych ilości alkoholu etylowego, a także estrów, czyli substancji odpowiedzialnych za bukiet

winny fermentowanego napoju, który jest charakterystyczny dla każdego rodzaju drożdży.

Wysokie stężenie alkoholu etylowego wywiera silniejsze (ok. 4,5-krotnie) działanie hamujące niż wysokie stężenie cukrów. Zdaniem Wzorka [Wzorek i wsp. 1992] zdolność drożdży do produkcji etanolu z cukrów jest często nie zależna od ich oporności na alkohol. Niejednokrotnie szczepy, które były odporne na wysoką zawartość alkoholu, nie wykazywały dobrych zdolności do jego produkcji, a drożdże, które były wrażliwe na wysokie stężenie alkoholu, wykazywały często bardzo dobrą zdolność jego wytwarzania. Uważa on, że tolerancja drożdży na etanol zależy od właściwości określonego gatunku czy rasy, a także od cech genetycznych i wieloletniej adaptacji [Wzorek i Pogorzelski 1998].

W trakcie fermentacji alkoholowej powstaje szereg produktów ubocznych, m.in. wyższe alkohole, aldehydy, estry i ketony [Bonin i Kur 2008]. Ilości ubocznych produktów fermentacji powstających w wyniku tego procesu zależą od: szczepu drożdży, rodzaju węglowodanów, parametrów fermentacji (temperatury, pH, intensywności mieszania), zawartości związków azotowych [Wzorek i Pogorzelski 1998].

Istotną rolę w kształtowaniu cech sensorycznych gotowego produktu wykazują estry. Większość estrów powstaje głównie podczas fermentacji burzliwej, po czym ich synteza ulega zmniejszeniu. Na skład jakościowy i ilościowy estrów w winie duży wpływ ma szczep drożdży, ponieważ w zależności od rasy uzyskuje się produkty o różnej ilości tych związków [Sobczak i Konieczna 1981, Wzorek i Pogorzelski 1998, Cabredo-Pinillos i wsp. 2004, Kłosowski i Czupryński 2006]. Estry są ważne dla jakości wina, ponieważ nadają mu przyjemny owocowy aromat i smak, np. ananasowy, bananowy, brzoskwiniowy, albo nutę ziołową. Najczęściej w winie występują estry takie jak: octan etylu, octan izoamylu, heksanian etylu, oktanian etylu. Wzrost zawartości estrów w winie jest także proporcjonalnie skorelowany z ilością związków azotowych dodanych do moszczu [Bonin i Kur 2008].

Do produktów ubocznych fermentacji alkoholowej należą także aldehydy. Dominującym związkiem w tej grupie jest aldehyd octowy, który tworzy się głównie we wczesnych etapach fermentacji, a jego zawartość w dalszym procesie zmniejsza się. Zawartość powstającego aldehydu octowego zależna jest od szczepu drożdży oraz od temperatury fermentacji – im niższa temperatura, tym więcej powstaje aldehydu [Lipińska i Bonin 2011]. Regodon Mateos i wsp. (2006) stwierdzili, że w zależności od zastosowanego szczepu drożdży zawartość aldehydu octowego w winach wynosiła 57,7–179,1 mg·l⁻¹. W winach stołowych, a szczególnie w winach musujących, wysoka zawartość aldehydów nie jest wskazana, natomiast w winach typu Sherry czy Madera odgrywają one bardzo ważną rolę w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych [Wzorek i Pogorzelski 1998]. Innym

związkiem należącym do produktów ubocznych fermentacji jest diacetyl, który powstaje z kwasu- α -acetylomlekowego i jest produktem pośrednim syntezy aminokwasów (leucyny i waliny). W zależności od rodzaju napoju alkoholowego jego próg wyczuwalności sensorycznej mieści się w przedziale 0,1–0,5 mg·l⁻¹ [Rose 1977].

Produktami ubocznymi fermentacji są także wyższe alkohole alifatyczne i aromatyczne. W grupie tej znajdują się alkohole amyłowe, izobutanol, n-propanol oraz β -fenyloetanol. Wyższe alkohole powstają w efekcie przemian aminokwasów lub jako produkty uboczne fermentacji cukrów. Ilość alkoholi wyższych w winach deserowych waha się w zakresie od 0,16 do 0,90%, a w stołowych od 0,14 do 0,42%. Niewielka ilość alkoholi wyższych odgrywa pozytywną rolę w kształtowaniu jakości sensorycznej, jednak większe stężenia wpływają negatywnie na aromat i smak napoju.

W przypadku n-propanolu i izobutanolu w winach gronowych występują one w ilościach odpowiednio 20–50 mg·l⁻¹ i 15–41 mg·l⁻¹. Z kolei stężenie alkoholi amyłowych mieści się w przedziale od 160 do 300 mg·l⁻¹ [Bardi i wsp. 1997].

Celem niniejszej pracy był dobór szczepu drożdży *Kluyveromyces* do fermentacji wysokocukrowych brzeczek miodowych. Przydatność drożdży do fermentacji brzeczek oceniono na podstawie szybkości wytwarzania etanolu oraz zdolności do syntezy ubocznych produktów fermentacji w zależności od stężenia cukru w brzeczce.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem do badań były cztery szczepy drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* z kolekcji ZP-IBPRS, oznaczone numerami od 1 do 4.

W doświadczeniach laboratoryjnych surowcem była brzeczka cukrowo-miodowa o zawartości ekstraktu 30%, 35% i 40%, przygotowana z miodu pszczelego wielokwiatowego, sacharozy, uzupełniona dodatkiem soli amonowych w formie dwufosforanu (0,2%) i siarczanu (0,05%).

Drożdże do fermentacji brzeczki inokulum namnażano w temperaturze 22–25°C w czasie 72 godzin, na wytrząsarce przy amplitudzie drgań 150·min⁻¹. Następnie dodawano je do wyjałowionej brzeczki w ilości 3,5%. Fermentacje w skali laboratoryjnej prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml. Podczas fermentacji kolby zamknięte były rurkami fermentacyjnymi. Fermentację brzeczki prowadzono przez 12 dni w temperaturze od 22 do 25°C, na wytrząsarce przy amplitudzie drgań 80·min⁻¹. Po fermentacji wykonywano

oznaczenia ilości lotnych produktów fermentacji (aldehid octowy, estry, alkohole alifatyczne i aromatyczne) oraz alkoholu etylowego.

Oznaczenie zawartości alkoholu etylowego wykonano odwoławczą metodą destylacyjną wg procedury badawczej PB-ZP13 opracowanej w ZP w IBPRS. Zawartość lotnych produktów fermentacji wykonywano metodą chromatografii gazowej (GC) wg MEBAK III 1996,1.1. Badania prowadzono w dwóch równoległych powtórzeniach.

WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że badane szczepy drożdży *Kluyveromyces* różniły się zdolnością fermentacyjną oraz zdolnością do wytwarzania ubocznych produktów fermentacji. Odnotowano znaczne różnice w szybkości fermentacji cukrów przez poszczególne szczepy drożdży i szybkości syntezy alkoholu etylowego. W tabeli 1 zestawiono wyniki analizy zawartości alkoholu etylowego otrzymanego po fermentacji brzeczek o zawartości ekstraktu 30%, 35% i 40%.

Tabela 1. Wpływ stężenia ekstraktu w brzeczce miodowej i szczepu drożdży na zawartość etanolu
The effect of concentration of extract in the honey medium and of the yeast strain on the ethanol content

Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>	Zawartość alkoholu, % obj. <i>Alcohol, % vol.</i>		
	Stężenie ekstraktu w podłożu <i>The concentration of extract in the medium</i>		
	30%	35%	40%
1	15,8	13,4	11,5
2	15,0	12,6	10,9
3	14,7	11,2	9,2
4	15,4	13,0	11,3
Wartość średnia <i>Mean value</i>	15,2	12,6	10,7

Z danych zawartych w tabeli 1 wynika, że wzrost stężenia ekstraktu brzeczki z 30% do 40% wpływał hamująco na ilość wytworzonego etanolu. Drożdże *Kluyveromyces* najszybciej przefermentowały brzeczki 30% i wytworzyły najwięcej etanolu, tj. 14,7–15,8% obj., średnio 15,2% obj. Wzrost zawartości ekstraktu brzeczki o 5% spowodował zmniejszenie szybkości fermentacji i wytworzona zawartość etanolu obniżyła się o od 2,4 do 4,6%, średnio o 2,6%. Średnia zawartość alkoholu etylowego w brzeczkiach 35% wynosiła 12,6%. Dalszy 5% wzrost

ilości ekstraktu w brzeczkach wpłynął na zmniejszenie ilości wytworzonego etanolu średnio o od 1,9 do 4,5%. Z rezultatów tych wynika, że badane szczepy drożdży *Kluyveromyces* są wrażliwe na podwyższone ciśnienie osmotyczne spowodowane stężeniem cukrów. We wszystkich trzech brzeczkach zawierających 30, 35 i 40% ekstraktu najwięcej alkoholu wytworzyły szczepy numer 1 i 4, a najmniej szczep numer 3. Zróżnicowaną zdolność wytwarzania etanolu i fermentacji wysokocukrowych brzeczek miodowych przez różne szczepy drożdży *Saccharomyces* stwierdzili wcześniej Wzorek i wsp. (1992).

Zawartość ekstraktu w brzeczkach nastawnych wpłynęła nie tylko na szybkość wytwarzania etanolu przez drożdże, lecz także na syntezę ubocznych produktów fermentacji (tabele 2, 3, 4). Wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu brzezki zwiększała się ilość wszystkich ubocznych produktów fermentacji. Najbardziej niekorzystny wpływ na właściwości sensoryczne napojów fermentowanych wywierają: izobutanol i alkohole arylowe (suma 2 i 3-metylobutanolu), które powodują nieprzyjemny rozpuszczalnikowy aromat i smak. Najmniej tych związków oraz β -fenyloetanolu, aldehydu octowego, estrów, octanu etylowego i izoamylowego oraz diacetylu wytwarzały drożdże *Kluyveromyces* po 12-dniowej fermentacji brzezki 30%.

Badania składu chemicznego cieczy pofermentacyjnych wykazały, że podczas fermentacji brzeczek o ekstrakcie 35% i 40% wszystkie cztery szczepy drożdży wytwarzały zwiększone ilości aldehydu octowego, estrów, alkoholi alifatycznych, aromatycznych oraz diketonów, w porównaniu z brzeczkami o stężeniu 30% ekstraktu. Zwiększona ilość aldehydu octowego po fermentacji alkoholowej była wynikiem stresu spowodowanego wysokim stężeniem cukrów i etanolu w fermentującej brzezce, o czym wzmiankowano w pracach. Fermentacja wysokocukrowych brzeczek z udziałem drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* generuje różnorodne stresy (m.in. osmotyczny, etanolowy oraz prawdopodobnie spowodowany niedoborem niektórych składników pokarmowych), wpływające negatywnie na metabolizm i wzrost drożdży. Odporność poszczególnych szczepów jest zróżnicowana [Grajek i Szymanowska 2008].

Tabela 2. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji brzezki o zawartości ekstraktu 30%

Influence of yeast strain on the by-products content after fermentation of medium containing 30% extract

Produkty uboczne fermentacji <i>Fermentation by-products</i>	Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>			
	1	2	3	4
Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ <i>Acetaldehyde, mg·l⁻¹</i>	43,6	54,8	53,3	62,9
Octan etylu, mg·l ⁻¹ <i>Ethyl acetate, mg·l⁻¹</i>	51,2	28,6	34,1	46,9
n-propanol, mg·l ⁻¹ <i>n-propanol, mg·l⁻¹</i>	53,9	18,0	21,9	19,1
Izobutanol, mg·l ⁻¹ <i>Isobutanol, mg·l⁻¹</i>	37,4	35,2	29,8	29,8
Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ <i>Isoamyl acetate, mg·l⁻¹</i>	0,15	0,16	0,15	0,16
2 i 3-metylobutanol, mg·l ⁻¹ <i>2 i 3-Methyl-butanol, mg·l⁻¹</i>	101,8	144,0	141,2	141,2
Diacetyl, mg·l ⁻¹ <i>Diacethyl, mg·l⁻¹</i>	0,08	0,05	0,07	0,06
Acetoina, mg·l ⁻¹ <i>Acetoin, mg·l⁻¹</i>	0,29	0,29	0,28	0,26
2-fenyletanol, mg·l ⁻¹ <i>2-Phenylethanol, mg·l⁻¹</i>	4,0	4,8	4,9	4,7
Całkowita zawartość produktów ubocznych	292,42	285,9	285,7	305,08

Tabela 3. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji brzezki o zawartości ekstraktu 35%
Influence of yeast strain on the by-products content after fermentation of medium containing 35% extract

Produkty uboczne fermentacji <i>Fermentation by-products</i>	Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>			
	1	2	3	4
Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ <i>Acetaldehyde, mg·l⁻¹</i>	67,4	80,8	90,3	90,0
Octan etylu, mg·l ⁻¹ <i>Ethyl acetate, mg·l⁻¹</i>	47,1	45,5	61,0	36,1
n-propanol, mg·l ⁻¹ <i>n-propanol, mg·l⁻¹</i>	98,6	72,2	115,2	88,4
Izo-butanol, mg·l ⁻¹ <i>Iso-butanol, mg·l⁻¹</i>	40,1	38,7	60,5	33,6
Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ <i>Isoamyl acetate, mg·l⁻¹</i>	0,18	0,18	0,16	0,18
2 i 3-metylobutanol, mg·l ⁻¹ <i>2,3-Methyl-butanol, mg·l⁻¹</i>	129,0	144,6	129,1	155,6
Diacetyl, mg·l ⁻¹ <i>Diacethyl, mg·l⁻¹</i>	0,09	0,08	0,10	0,11
Acetoina, mg·l ⁻¹ <i>Acetoin, mg·l⁻¹</i>	0,31	0,26	0,27	0,26
2-fenyletanol, mg·l ⁻¹ <i>2-Phenylethanol, mg·l⁻¹</i>	5,2	6,1	5,7	5,8
Całkowita zawartość produktów ubocznych	387,98	388,42	462,33	410,05

Tabela 4. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 40%
Influence of yeast strain on the by-products content after fermentation of medium containing 40 % extract

Produkty uboczne fermentacji <i>Fermentation by-products</i>	Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>			
	1	2	3	4
Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ <i>Acetaldehyde, mg·l⁻¹</i>	96,4	100,7	102,5	99,1
Octan etylu, mg·l ⁻¹ <i>Ethyl acetate, mg·l⁻¹</i>	58,8	45,9	110,3	61,5
n-propanol, mg·l ⁻¹ <i>n-propanol, mg·l⁻¹</i>	79,4	112,1	104,4	98,9
Izobutanol, mg·l ⁻¹ <i>Isobutanol, mg·l⁻¹</i>	115,0	48,3	55,4	64,0
Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ <i>Isoamyl acetate, mg·l⁻¹</i>	0,25	0,25	0,23	0,24
2 i 3-metylobutanol, mg·l ⁻¹ <i>2 i 3-Methyl-butanol, mg·l⁻¹</i>	237,7	148,5	160,5	263,3
Diacetyl, mg·l ⁻¹ <i>Diacethyl, mg·l⁻¹</i>	0,19	0,16	0,18	0,15
Acetoina, mg·l ⁻¹ <i>Acetoin, mg·l⁻¹</i>	0,29	0,30	0,31	0,26
2-fenyletanol, mg·l ⁻¹ <i>2-Phenylethanol, mg·l⁻¹</i>	9,5	8,2	10,0	9,0
Całkowita zawartość produktów ubocznych	597,53	464,41	543,82	596,45

Z danych zawartych w tabelach 2, 3 i 4 wynika, że najmniejsze ilości ubocznych produktów fermentacji wytwarzał szczep nr 1 po 12 dniach fermentacji brzeczek 30%, natomiast największe ilości ubocznych produktów fermentacji – po fermentacji brzeczek o zawartości ekstraktu 40%. W brzeczkach 30% najmniej izobutanolu i alkoholi amyłowych (suma 2 i 3-metylobutanolu) wytworzył także szczep nr 1 (139,2 mg·l⁻¹), dla pozostałych szczepów wartości te wahały się w zakresie od 171 do 179,2 mg·l⁻¹. Wzrost zawartości cukru w brzeczce z 30 do 35% spowodował zwiększenie syntezy ww. alkoholi przez szczep nr 1 o 30 mg·l⁻¹, natomiast przez pozostałe szczepy o 4,2–18,6 mg·l⁻¹. Najbardziej wzrosła synteza alkoholi amyłowych i izobutanolu przy szczepach nr 1 i 4 w brzeczkach o największym stężeniu ekstraktu (40%). W porównaniu z ilością uzyskaną w 30% brzeczkach zawartość tych związków zwiększyła się o 153,3% w przypadku szczepu nr 1 i 4 oraz do 55,1 i 113,2% w przypadku szczepu nr 3 i 2.

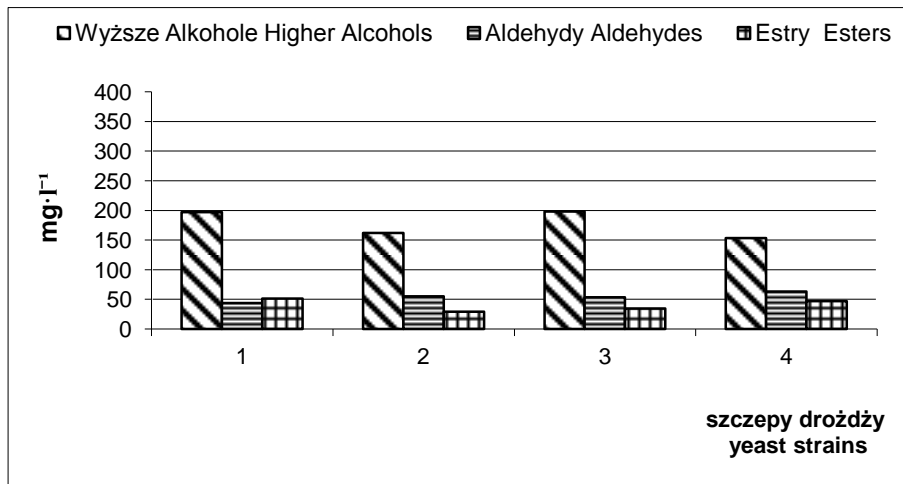
Zawartość aldehydu octowego i diacetylu po fermentacji wzrosła bardzo wyraźnie w brzeczkach zawierających 40% ekstraktu (o ok. 100%) i w porównaniu z brzeczka 30%

kształtowała się na poziomie odpowiednio 96,4–102,5 mg·l⁻¹ i 0,15–0,19 mg·l⁻¹.

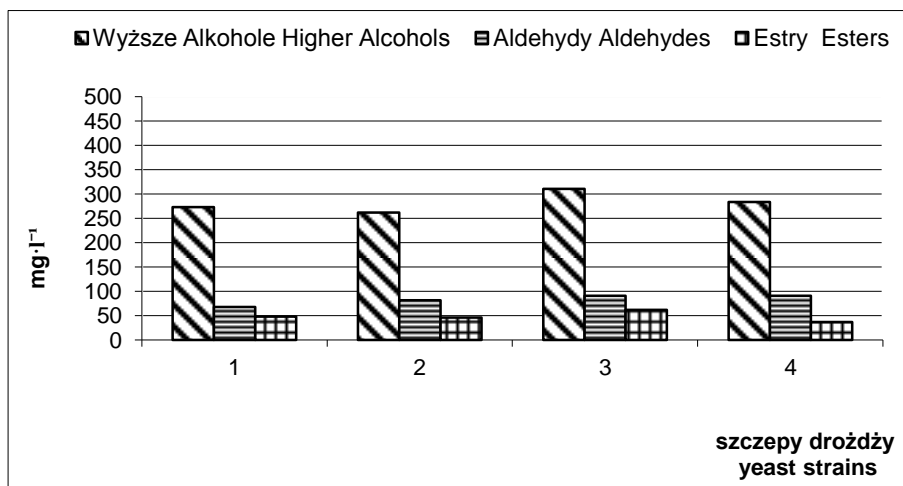
Całkowita zawartość ubocznych produktów fermentacji dla czterech szczepów kształtowała się w zbliżonym zakresie od 285,7 do 305,1 mg·l⁻¹. Wzrost stężenia cukrów w brzeczkiach miodowych do 35% wpłynął na duże zwiększenie wytwarzania ubocznych produktów fermentacji (od ok. 77 do 177 mg·l⁻¹) przez badane szczepy drożdży. Po 12 dniach fermentacji brzeczki miodowych 40% obserwowano dalszy wzrost stężenia lotnych produktów fermentacji, a jednocześnie wystąpiły znaczne różnice w zdolności ich wytwarzania przez poszczególne szczepy. W porównaniu z ilością ubocznych produktów po fermentacji brzeczki 30% całkowita zawartość tych związków po fermentacji brzeczki 40% szczepami nr 1, 2, 3 i 4 wzrosła odpowiednio o ok. 305, 178, 258 i 291 mg·l⁻¹. W porównaniu z całkowitą ilością lotnych produktów po fermentacji brzeczki 35% wzrost zawartości tych związków po fermentacji brzeczki 40% wynosił odpowiednio o 209, 76, 82 i 186 mg·l⁻¹. Z przedstawionych rezultatów badań wynika, że zróżnicowana jest zarówno zdolność wytwarzania etanolu, jak i oporność różnych szczepów drożdży na wysokie ciśnienie osmotyczne spowodowane dużym stężeniem cukrów. Spośród badanych czterech szczepów drożdży *Kluyveromyces* wyróżniają się szczepy nr 1 i 4.

Według Wzorka i Pogorzelskiego (1998) na ilość wytwarzanego w czasie fermentacji izobutanolu znaczący wpływ ma rasa drożdży, przy czym obniżenie ilości wyższych alkoholi można osiągnąć przez stosowanie pożywek azotowych do fermentacji brzeczki. Brzeczki miodowe cechuje mała ilość substancji azotowych.

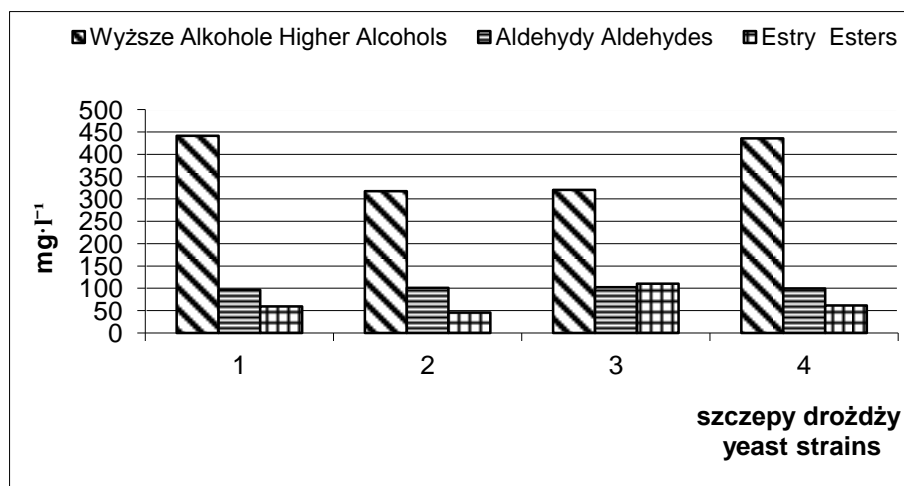
Analizując sumy zawartości poszczególnych grup produktów ubocznych fermentacji (rysunki 1–3), zaobserwowano, że wzrost ilości cukru w brzeczce z 30 do 35% spowodował wzrost średnio o ok. 160% zawartości sumy wyższych alkoholi, aldehydów u wszystkich czterech badanych szczepów drożdży, natomiast w przypadku estrów wzrost ten dotyczył tylko dwóch szczepów numer 2 i 3.



Rysunek 1. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydów, wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 30%
Influence of yeast strain on the content of aldehydes, higher alcohols and esters in fermented medium containing 30% extract before fermentation



Rysunek 2. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydów, wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o zawartości sacharozy 35%
Influence of yeast strain on the content of aldehydes, higher alcohols and esters in fermented medium containing 35% sucrose before fermentation



Rysunek 3. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydów, wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 40%
Influence of yeast strain on the content of aldehydes, higher alcohols and esters in fermented medium containing 40 % extract before fermentation

Wzrost zawartości ekstraktu do 40% spowodował zwiększenie zawartości sumy wyższych alkoholi od 163 do 320%, estrów od 141 do 221%, a w przypadku aldehydów od 115 do 320% w stosunku do brzeczek o ekstrakcie 30%.

Wybierając szczep drożdży do zastosowania w produkcji, kierowano się zawartością ubocznych produktów fermentacji oraz zdolnością syntezy alkoholu etylowego. Spośród czterech przebadanych szczepów drożdży *Kluyveromyces* wybrano dwa szczepy 1 i 4. W przypadku tych szczepów drożdży we wszystkich badanych stężeniach ekstraktów brzeczek odnotowano największe ilości alkoholu etylowego (11,3–15,8% objętościowych), wzrost ekstraktu brzeczeki o 5% powodował mniejszą syntezę estrów, wyższych alkoholi i aldehydów (rysunki 1–3) niż przy szczepach nr 2 i 3. Zawartość estrów (octanu etylu i octanu izoamylu) dla brzeczeki 35% mieściła się w przedziale 36,3–47,3 mg·l⁻¹, wyższych alkoholi (n-propanolu, izo-butanolu i alkoholi amyłowych) 272,9–283,4 mg·l⁻¹, a aldehydów wynosiła odpowiednio 67,5 mg·l⁻¹ i 90,1 mg·l⁻¹. Wyraźny wzrost ubocznych produktów fermentacji dla szczepów numer 1 i 4 widoczny był dopiero przy najwyższym stężeniu brzeczeki (40%). W tych warunkach ilości wyższych alkoholi (n-propanolu, izo-butanolu i alkoholi amyłowych) dla tych dwóch szczepów ukształtowała się na poziomie 435,2–441,6 mg·l⁻¹ (szczepy nr 4 i 1).

Najsłabszy okazał się szczep nr 3, który wytwarzał przy wszystkich stężeniach ekstraktu w brzeczce najmniejszą ilość alkoholu etylowego (tabela 1) oraz syntetyzował najwyższe ilości ubocznych produktów fermentacji w brzeczce o stężeniu ekstraktu 35 i 40% (tabele

3–4). Szczep ten cechował się ponadto znacznie wyższą produkcją estrów ($61,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $110,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) odpowiednio dla zawartości ekstraktu 35 i 40% i aldehydów ($90,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ i $102,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) w porównaniu z pozostałymi badanymi szczepami (rysunki 2 i 3).

WNIOSKI

1. Zdolność drożdży *Kluyveromyces* do wytwarzania etanolu i ubocznych produktów fermentacji zależy od szczepu drożdży i stężenia ekstraktu w brzeczce.
1. Spośród czterech badanych szczepów drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* najlepszą aktywność fermentacyjną i odporność na wysokie stężenie cukru i etanolu wykazały dwa szczepy o numerach 1 i 4.
2. Warunki fermentacji brzeczki o zawartości ekstraktu 35 i 40% były stresujące dla badanych szczepów drożdży *Kluyveromyces*, co skutkowało wzrostem syntezy aldehydu octowego, wyższych alkoholi alifatycznych i diacetylu.
3. Wybrane szczepy drożdży przy wszystkich stężeniach ekstraktu w brzeczce 30, 35 i 40% wytwarzały najwięcej alkoholu etylowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Brautechnische Analysenmethoden (MEBAK) Band III (1996), 2-5
2. Baca E. (2005). Technologia wytwarzania piwa bezalkoholowego. Seminarium ogólnopolskie, Warszawa, 6 kwietnia, 12-17
3. Bardi E., Koutinas A.A., Psarianos C., Kanellaki M. (1997). Volatile by-products formed in low-temperature wine-making using immobilized yeast cells. *Process Biochem.*, 32 (7), 579-584
4. Bonin S., Kur M., (2008). Produkty uboczne fermentacji winiarskiej a cechy jakościowe wina. *Agro Przem.*, 5, 77-80
5. Bonin S., Kolas M., (2009). Fermentacja nastawów wysokocukrowych z dodatkiem preparatu ścian komórkowych. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 5, 6-8
6. Cabredo-Pinillos S., Cedrón-Fernández T., Parra-Manzanares A., Sáenz-Barrio C. (2004). Determination of volatile compounds in wine by automated solid-phase microextraction and gas chromatography. *Chromatographia*, 59 (11/12), 733-738
7. Gogol D., Tuszyński T. (1996). Miody pitne – tradycje, surowce i technologie. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 8, 25-27
8. Kłosowski G., Czupryński B. (2006). Kinetics of acetals and ester formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Eng.*, 72, 242-246
9. Lipińska E., Bonin S. (2011). Związki kształtujące jakość napojów winiarskich i spirytusowych. W: *Jakość i bezpieczeństwo żywności – kształtowanie jakości żywieniowej w procesach technologicznych*, Warszawa: Wydawnictwo SGGW, 103-118

10. Popek S. (2001). Studium identyfikacji miodów odmianowych i metodologii oceny właściwości fizykochemicznych determinujących ich jakość. Zeszyty naukowe, Seria Specjalna, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Krakowie, Monografie (147), 7-21
11. Procedura badawcza PB-ZP 13. Oznaczanie zawartości alkoholu, ekstraktu pozornego, ekstraktu rzeczywistego, ekstraktu brzezki podstawowej w piwie metodą destylacyjną
12. Prabudzki J. (1998). Pszczelnictwo. Szczecin: Wydawnictwo Promocyjne Albatros, 555-566
13. Rose A.H. (1977). History and scientific basis of alcoholic beverage production. W: Alcoholic Beverages. Ed. Rose A.H. Academic Press, London, New York, San Francisco, 28-32
14. Regodon Mateos J.A., Perez-Nevaldo F., Ramirez Fernandez M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine, *Enzym. Microbiol Technol.*, 40, 151-157
15. Sawicka R. (1970). Selekcja i adaptacja drożdży do fermentacji miodów pitnych. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 20 (3), 411-424
16. Sobczak E., Konieczna E. (1981). Wpływ rasy drożdży na skład chemiczny i cechy organoleptyczne wina owocowego. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 4, 8-10
17. Wootten M., Weekes G.C., Lee T.H. (1983). Sugar utilisation and glycerol and ethanol production during mead fermentation. *Food Technol. Australia*, 35, 252-255
18. Wzorek W., Bugajewska A., Żelakiewicz A. (1992). Wpływ ilości drożdży na wyniki fermentacji wysokocukrowych nastawów winiarskich. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 5, 10-13
19. Wzorek W., Konieczna E., Szamańska K., Bugajewska A. (1993). Optimization of honey wort fermentation in double mead technology, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2/43 (1), 57-65
20. Wzorek W., Pogorzelski E. (1998). *Technologia winiarstwa owocowego i gronowego*. Warszawa: Wydawnictwo Sigma-Not, 307 ss.
21. Grajek W., Szymanowska D. (2008). Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, 3 (82), 46-63