

METABOLITY FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ OSMOFILNYCH DROŻDŻY SACCHAROMYCES W ZALEŻNOŚCI OD SZCZEPU ORAZ ZAWARTOŚCI CUKRÓW W BRZECZCE

Dorota Zielińska, Elżbieta Baca, Krzysztof Baranowski, Agnieszka Salamon

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

Streszczenie

Celem pracy było badanie właściwości fizjologicznych osmofilnych szczepów drożdży *Saccharomyces* w zależności od stężenia cukrów w brzeczce.

Do badań wykorzystano 12 szczepów drożdży *Saccharomyces* z kolekcji IBPRS. Proces fermentacji alkoholowej brzeczki cukrowej o stężeniu sacharozy 25%, 30% i 35% prowadzono w warunkach laboratoryjnych. Stwierdzono znaczne różnice w fermentacji cukrów przez poszczególne szczepy drożdży, szczególnie wyraźnie widoczne przy wysokim początkowym stężeniu sacharozy w podłożu. Dziewięć szczepów drożdży dobrze fermentowało podłoża wysokocukrowe.

W podłożach o zawartości 35% cukrów, badane szczepy drożdży syntetyzowały więcej izobutanolu, alkoholi amylowych i aldehydu octowego niż w podłożu o zawartości 25% cukrów. W zebranych po fermentacji drożdżach nie stwierdzono obecności komórek martwych, co wskazywało na ich bardzo dobrą żywotność.

Słowa kluczowe: drożdże osmofilne, fermentacja, metabolity, *Saccharomyces*

METABOLITES OF ALCOHOLIC FERMENTATION OF THE YEAST SACCHAROMYCES OSMOPHILIC DEPENDING ON THE YEAST STRAIN AND CONTENT OF SUGAR IN WORT

Summary

The aim of the work was to examine the physiological properties of selected osmophilic *Saccharomyces* yeast strains depending on the concentration of sugars in the wort.

12 strains of *Saccharomyces* yeast from IBPRS collection were examined. The process of alcoholic fermentation of sugar wort at a sucrose concentration of 25%, 30% and 35% was carried out under laboratory conditions. It was found significant differences in the sugars fermentation by different yeast strains particularly evident at high initial concentration of sucrose in medium. Nine yeast strains fermented high-sugar media very well. These examined

yeast strains in medium about 35% produced more isobutanol, 2-methyl-butanol + 3-methylbutanol and acetaldehyde than in medium about 25% of sugars. Viability of yeast after fermentation was very good, no dead cells were observed.

Key words: osmophilic yeast, fermentation, metabolites, *Saccharomyces*

WPROWADZENIE

Szczepy drożdży winiarskich stosowane do procesu fermentacji brzeczek owocowych powinny charakteryzować się następującymi cechami: powodować szybkie wzbudzenie i intensywną fermentację, prowadzić prawidłowo jej przebieg, oprócz alkoholu etylowego wytwarzać uboczne produkty fermentacji mające dodatni wpływ na smakowe i aromatyczne właściwości win, a po fermentacji w krótkim czasie osadzać się, powodując szybkie klarowanie się wina. Ze względu na możliwość wytwarzania dużych ilości etanolu i tolerancję na etanol najczęściej stosuje się drożdże z rodzaju *Saccharomyces cerevisiae*.

Do prowadzenia fermentacji alkoholowej wysokocukrowych brzeczek miodowych wykorzystuje się między innymi osmofilne drożdże z rodzaju *Saccharomyces cerevisiae*. Główną ich zaletą jest zdolność wytwarzania dużej ilości alkoholu, nadawanie trwałości i odpowiedniej klarowności młodego wina oraz wytwarzanie substancji odpowiedzialnych za bukiet winny, który jest właściwy dla określonego rodzaju drożdży. Drożdże te stosowane są jako czysta kultura. W ostatnich latach w krajowym przemyśle winiarskim jedną z bardziej istotnych cech drożdży jest wytwarzanie możliwie wysokiej ilości etanolu. Hamujące działanie wysokiego stężenia alkoholu jest około 4,5 raza silniejsze niż wysokiego stężenia cukrów (Rose 1977, Wzorek, Pogorzelski 1998). W komórkach drożdży etanol wywołuje trzy główne zmiany, a mianowicie: hamuje ich wzrost, zdolność życiową i zdolność fermentacyjną. Toksyczne działanie etanolu polega na uszkodzeniu błony plazmatycznej przez wymywanie frakcji lipidowej podczas sekrecji etanolu na zewnątrz komórki, co wywołuje zakłócenia w strukturze molekularnej oraz przepuszczalności błon i w efekcie prowadzi do śmierci komórki. Wraz ze wzrostem długości łańcuchów kwasów tłuszczowych nienasyconych oraz zawartości steroli w błonie plazmatycznej wzrasta oporność komórek drożdży na etanol.

W trakcie fermentacji alkoholowej powstaje również szereg produktów ubocznych m.in. wyższe alkohole alifatyczne i aromatyczne, aldehydy, estry i ketony (Bardi i wsp. 1997, Bonin, Kur 2008). Ilości powstających w wyniku tego procesu produktów ubocznych zależą od: szczepu drożdży, warunków fermentacji (temperatury, pH i zawartości pożywek azotowych) (Wzorek, Pogorzelski 1998).

Za powstawanie estrów odpowiedzialne są głównie esterazy wytwarzane przez drożdże. Na skład jakościowy i ilościowy estrów w winie duży wpływ mają drożdże, ponieważ w zależności od rasy uzyskuje się produkt o różnej ilości tych związków (Cabredo-Pinillos i wsp. 2004, Sobczak, Konieczna 1981, Wzorek, Pogorzelski 1998).

Produktami ubocznymi fermentacji alkoholowej są również aldehydy. Wywierają one istotny wpływ na wrażenie smakowe i zapachowe (Wzorek, Pogorzelski 1998). Dominującym związkiem w tej grupie jest aldehyd octowy. Powstaje on głównie we wczesnych etapach fermentacji, a jego zawartość w dalszym przebiegu procesu zmniejsza się. Ilość powstającego aldehydu octowego zależna jest od temperatury fermentacji, im niższa ta temperatura tym więcej powstaje aldehydu. Ilość aldehydu octowego w winach waha się w granicach 13-40 mg·l⁻¹ (Bardi i wsp. 1997). Innym związkiem należącym do tej grupy jest diacetyl. W zależności od rodzaju napoju alkoholowego, jego próg wyczuwalności sensorycznej mieści się w przedziale 0,1-0,5 mg·l⁻¹.

Celem pracy było badanie właściwości fizjologicznych wybranych, osmofilnych szczepów drożdży z rodzaju *Saccharomyces* w zależności od stężenia cukrów w brzeczce. Badano zdolności fermentacyjne oraz oporność szczepów drożdży na wysokie stężenia cukru.

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Materiałem do badań było dwanaście szczepów drożdży z rodzaju *Saccharomyces* z kolekcji IBPRS oznaczone numerami od 1 do 12. Surowcem w doświadczeniach laboratoryjnych była brzeczka miodowo-cukrowa przygotowana z 25%, 30% i 35% sacharozy z dodatkiem soli amonowych w formie dwufosforanu (0,2%) i siarczanu (0,05%).

Drożdże do fermentacji brzeczki namnażano w podłożu zawierającym brzeczkę miodową z 10%-owym dodatkiem sacharozy i uzupełniono 0,2%-owym fosforanem dwuamonowym i 0,05 %-owym siarczanem amonu w temperaturze 23-25°C przez 48-72 godzin na wytrząsarce przy amplitudzie drgań 150·min⁻¹. Następnie dodawano je do wyjałowionej brzeczki w ilości 4%. Fermentacje w skali laboratoryjnej prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 300-500 ml. Podczas fermentacji kolby zamknięte były rurkami fermentacyjnymi. Fermentację brzeczki prowadzono przez 8-12 dni w temperaturze 25°C, na wytrząsarce przy amplitudzie drgań 80·min⁻¹. Po fermentacji wykonywano oznaczenia składu i ilości lotnych produktów fermentacji (aldehydu octowego, estrów, alkoholi alifatycznych i aromatycznych oraz diketonów) metodą chromatografii gazowej (Headspace-GC) oraz zawartości alkoholu etylowego metodą destylacyjną. Badania

prowadzono w dwóch równoległych powtórzeniach. Wyniki badań opracowano statystycznie przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji za pomocą programu Statistica wersja 6.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badane szczepy drożdży *Saccharomyces* charakteryzowały się różną zdolnością do wytwarzania ubocznych produktów fermentacji. Obserwowano znaczne różnice w szybkości fermentacji cukrów przez poszczególne szczepy drożdży, szczególnie widoczne przy wysokim początkowym stężeniu ekstraktu brzezki. W tabeli 1 zestawiono wyniki analizy zawartości alkoholu etylowego otrzymanego po fermentacji brzeczek o zawartości 25%, 30% i 35% cukru.

Tabela 1. Wpływ stężenia ekstraktu w podłożu i szczepu drożdży na zawartość alkoholu.
The effect of extract concentration in medium and the yeast strain on the alcohol content.

Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>	Zawartość alkoholu, % obj. Alcohol, % vol.		
	Stężenie ekstraktu w podłożu <i>The initial concentration of extract in the medium</i>		
	25 %	30 %	35 %
1	13,0±0,99 ^a	14,2±0,99 ^a	15,1±0,21 ^a
2	12,7±0,42 ^a	14,4±0,42 ^a	14,7±0,35 ^a
3	12,9±0,85 ^a	15,9±0,21 ^b	14,7±0,64 ^{a,b}
4	13,4±0,42 ^a	15,7±0,14 ^b	15,0±0,71 ^{a,b}
5	13,4±0,57 ^a	15,7±0,07 ^b	15,8±0,28 ^{b,c}
6	13,2±0,78 ^a	14,4±0,57 ^{a,b}	15,6±0,07 ^b
7	13,5±0,07 ^a	16,1±0,07 ^b	15,7±0,71 ^{b,c}
8	12,8±0,07 ^a	15,7±0,14 ^b	15,7±0,07 ^{a,b}
9	13,0±0,49 ^a	15,5±0,42 ^b	15,6±0,21 ^{b,c}
10	13,6±0,14 ^a	15,9±0,21 ^b	15,7±0,07 ^{b,c}
11	13,7±0,35 ^a	16,0±0,07 ^b	15,6±0,14 ^{b,c}
12	9,3±0,14 ^a	13,4±0,14 ^b	12,5±0,14 ^c
średnia±SD (n=12) mean±SD (n=12)	12,9±1,17 ^a	15,2±0,89 ^b	15,1±0,92 ^{b,c}

^{a,b,c} – różnica statystycznie istotna przy $\alpha \leq 0,05$.

^{a,b,c} – statistically significant differences at $\alpha \leq 0,05$.

Wielkości w wierszach oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie ufności 95 %.

Values in rows followed by the same letter are not significantly different at a confidence level of 95 %.

Przyjmując kryterium oceny drożdży jako zdolność do wytwarzania etanolu powyżej 13% obj. dla brzezki o ekstrakcie 25%, i powyżej 15% obj. dla brzeczek o ekstrakcie 30%

i 35%, po 8-10 dniach fermentacji zawartość alkoholu kształtowała się na poziomie 9,3-13,6% obj. dla brzezki o stężeniu 25% oraz 13,4-16,1% obj. dla brzezki 30%. W przypadku brzezki o ekstrakcie 35% zawartość alkoholu etylowego wynosiła od 12,5 do 15,8% obj. Podczas fermentacji brzezki o zawartości ekstraktu 30%, największe ilości etanolu produkowały szczepy drożdży oznaczone numerami 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 i 11. Sześć szczepów drożdży nr 3, 4, 7, 10, 11 i 12 wytworzyło mniej alkoholu w brzezce o zawartości sacharozy 35% niż w brzezce o zawartości sacharozy 30%. Najwyższą zawartość alkoholu etylowego 16,0-16,1% obj. Obserwowano przy dwóch szczepach drożdży oznaczonych numerami 7 i 11. Najmniej alkoholu podczas fermentacji brzeczek o trzech różnych stężeniach cukru wytwarzał szczep 12.

Osiem szczepów drożdży w wyniku fermentacji brzezki o zawartości ekstraktu 30% oraz siedem szczepów drożdży w wyniku fermentacji brzezki 35% uzyskiwały zawartość alkoholu etylowego powyżej 15,5 % obj.

Z przeprowadzonej analizy danych zawartych w tabeli 1 wynika, że istotne statystycznie różnice występują pomiędzy stężeniami alkoholu otrzymanymi podczas fermentacji cukrów w podłożu o ekstrakcie 25% i 30% prawie przy wszystkich badanych szczepach drożdży, z wyjątkiem szczepów numer 1, 2 i 6. Natomiast podczas fermentacji podłoża o stężeniu sacharozy 35%, przy zdecydowanej większości szczepów różnice nie były istotne statystycznie przy poziomie ufności 95%. Wydaje się zatem, że zawartość cukru 30% w podłożu stanowi najwłaściwsze środowisko do produkcji alkoholu etylowego przez badane szczepy drożdży (n=12). Potwierdzeniem tego wydają się być różnice statystycznie istotne dla analizowanych stężeń sacharozy w podłożu fermentacyjnym.

Wootten i wsp. 1983, w swoich doświadczeniach stwierdzili zasadniczą różnicę w przebiegu fermentacji prowadzonej przez drożdże winne i miodowe. W porównaniu do drożdży winnych te drugie fermentowały cukry znacznie szybciej, dając więcej alkoholu i mniej ekstraktu końcowego.

Bardzo istotne w fermentacji brzeczek są zawartości i rodzaj wytwarzanych ubocznych produktów fermentacji. Badania składu chemicznego płynu pofermentacyjnego wykazały, że podczas fermentacji brzeczek 30 % i 35% wszystkie dwanaście szczepów drożdży wytwarzało większe niż w brzezce 25% ilości aldehydu octowego, estrów i alkoholi alifatycznych (tabele 2-4).

Tabela 2. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji podłoża o zawartości sacharozy 25%.

Influence of yeast strain on the by-products content after fermentation of the medium with 25% sucrose.

Szczep drożdży Yeast strain	Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ Acetaldehyde, mg·l ⁻¹	Octan etylu, mg·l ⁻¹ Ethyl acetate, mg·l ⁻¹	n-propanol, mg·l ⁻¹ n-propanol, mg·l ⁻¹	Izobutanol, mg·l ⁻¹ Isobutanol, mg·l ⁻¹	Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ Isoamyl acetate, mg·l ⁻¹	2-Methyl-butanol + 3-Methyl-butanol, mg·l ⁻¹	Diacetyl, mg·l ⁻¹ Diacethyl, mg·l ⁻¹	Acetoina, mg·l ⁻¹ Acetoina, mg·l ⁻¹	2-Betafenyloetanol, mg·l ⁻¹ 2-Phenylethanol, mg·l ⁻¹
1	37,0	27,8	91,3	119,3	0,61	155,7	0,06	0,28	4,2
2	31,2	38,3	76,3	31,5	0,40	218,0	0,05	0,33	8,2
3	57,8	42,3	86,5	29,8	0,44	143,5	0,05	0,46	10,8
4	58,0	35,7	80,5	29,9	0,31	132,5	0,06	0,39	6,1
5	43,2	33,3	73,1	24,6	0,40	100,9	0,05	0,38	4,8
6	36,5	42,3	63,0	20,6	0,35	98,0	0,05	0,32	4,3
7	45,0	33,3	76,0	25,7	0,26	100,4	0,05	0,33	4,1
8	39,5	35,3	97,5	20,0	0,35	103,0	0,05	0,29	4,7
9	45,7	33,0	38,1	48,8	0,32	134,8	0,04	0,20	8,1
10	25,4	34,8	63,8	18,4	0,18	98,6	0,05	0,35	4,4
11	33,6	39,0	68,5	36,1	0,32	116,2	0,05	0,35	5,0
12	40,3	38,0	68,8	28,8	0,21	115,1	0,03	0,25	6,0

Analizując otrzymane wyniki (tab.2) dotyczące zawartości najistotniejszych produktów ubocznych w fermentowanej brzeczce o zawartości sacharozy 25% stwierdzono, że badane szczepy wytwarzały aldehyd octowy w ilościach 25,4 – 58,8 mg·l⁻¹ diacetyl w ilościach 0,03-0,06 mg·l⁻¹, izobutanol w ilościach 18,4-119,3 mg·l⁻¹ i alkohole amyłowe (suma 2-metylobutanolu i 3-metylobutanolu) w ilościach od 98,6 do 218 mg·l⁻¹. Szczególnie wysokie ilości alkoholi amyłowych syntetyzowały szczepy 1 i 2. U szczepu 1 obserwowano wysoką zdolność syntezy izobutanolu (119,3mg·l⁻¹).Zawartość 2-betafenyloetanolu w fermentowanych brzeczkiach wynosiła od 4,1 do 10, 8 mg·l⁻¹.

Tabela 3. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji podłoża o zawartości ekstraktu 30%.

Influence of yeast strain on the by-products content after fermentation of the medium with 30% sucrose.

Szczep drożdży Yeast strain	Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ Acetaldehyde, mg·l ⁻¹	Octan etylu, mg·l ⁻¹ Ethyl acetate, mg·l ⁻¹	n-propanol, mg·l ⁻¹ n-propanol, mg·l ⁻¹	Izobutanol, mg·l ⁻¹ Isobutanol, mg·l ⁻¹	Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ Isoamyl acetate, mg·l ⁻¹	2-Methyl-butanol + 3- Methyl-butanol, mg·l ⁻¹	Diacetyl, mg·l ⁻¹ Diacethyl, mg·l ⁻¹	Acetoina, mg·l ⁻¹ Acetoina, mg·l ⁻¹	2-Betafenyloetanol, mg·l ⁻¹ 2-Phenylethanol, mg·l ⁻¹
1	55,7	42,1	35,9	90,3	0,63	318,7	0,06	0,30	6,4
2	64,7	31,7	91,5	74,5	0,38	274,4	0,06	0,35	7,3
3	104,4	42,6	46,6	42,0	0,40	159,2	0,15	0,35	14,4
4	59,7	48,7	63,5	44,5	0,97	143,7	0,11	0,45	20,1
5	50,7	38,4	53,3	44,8	0,19	117,3	0,15	0,34	9,2
6	50,5	44,6	60,5	40,9	0,25	91,5	0,10	0,35	26,5
7	61,4	33,5	72,0	41,5	0,32	77,3	0,11	0,26	22,9
8	47,4	33,9	72,1	38,9	0,29	166,9	0,07	0,31	8,1
9	51,8	30,0	75,4	21,0	0,17	118,9	0,05	0,29	4,9
10	37,2	44,6	67,5	36,1	2,62	125,3	0,07	0,31	15,6
11	33,6	47,0	65,5	34,5	0,57	136,6	0,07	0,32	11,6
12	45,0	124,9	79,8	89,9	1,34	114,4	0,12	0,34	5,9

W wyniku fermentacji brzezki cukrowej o zawartości sacharozy 30% stwierdzono, że w porównaniu do brzezki o zawartości cukru 25% szczepy te wytwarzały 1,5-2 krotnie wyższe ilości aldehydu octowego i 2-4 krotnie wyższe ilości diacetylu. Obserwowano również 2-3 krotny wzrost ilości izobutanolu i 1,1-2 krotny wzrost zawartości alkoholi amyloowych (szczepy numer 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11) w porównaniu do brzezek 25%. Drożdże 3, 4, 6, 7 i 10 wytwarzały również zwiększone ilości 2-betafenyloetanolu (20,1-26,5 mg·l⁻¹), szczególnie szczepy 6, 7 i 4.

Tabela 4. Wpływ szczepu drożdży na zawartość ubocznych produktów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 35%.

Influence of yeast strain on the by-products contents after fermentation of the medium with 35% sucrose.

Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>	Aldehyd octowy, mg·l ⁻¹ <i>Acetaldehyde, mg·l⁻¹</i>	Octan etylu, mg·l ⁻¹ <i>Ethyl acetate, mg·l⁻¹</i>	n-propanol, mg·l ⁻¹ <i>n-propanol, mg·l⁻¹</i>	Izobutanol, mg·l ⁻¹ <i>Isobutanol, mg·l⁻¹</i>	Octan izoamylu, mg·l ⁻¹ <i>Isoamyl acetate, mg·l⁻¹</i>	2-Methyl-butanol + 3-Methyl-butanol, mg·l ⁻¹	Diacetyl, mg·l ⁻¹ <i>Diacethyl, mg·l⁻¹</i>	Acetoina, mg·l ⁻¹ <i>Acetoina, mg·l⁻¹</i>	2-Betafenyloetanol, mg·l ⁻¹ <i>2-Phenylethanol, mg·l⁻¹</i>
1	65,5	82,9	88,2	74,7	0,59	297,2	0,16	0,27	12,6
2	66,7	48,2	42,7	209,1	0,38	366,5	0,11	0,44	20,2
3	68,7	50,5	127,2	49,2	0,42	177,5	0,20	0,36	7,0
4	66,8	55,8	137,0	68,6	0,92	156,9	0,15	0,42	4,2
5	113,7	49,5	128,0	42,9	0,51	145,5	0,14	0,36	4,1
6	106,6	51,8	84,5	39,6	0,40	90,4	0,14	0,42	5,4
7	71,1	42,0	92,9	32,3	0,37	111,7	0,10	0,27	4,0
8	59,9	42,7	101,6	36,0	0,61	147,1	0,14	0,35	5,5
9	68,0	41,0	41,6	93,0	0,28	145,6	0,11	0,34	4,0
10	49,7	49,5	84,6	53,1	2,54	120,1	0,21	0,33	4,9
11	51,2	44,2	81,8	75,1	0,49	130,5	0,12	0,33	4,2
12	90,1	144,9	85,7	148,6	3,45	154,4	0,18	0,34	7,9

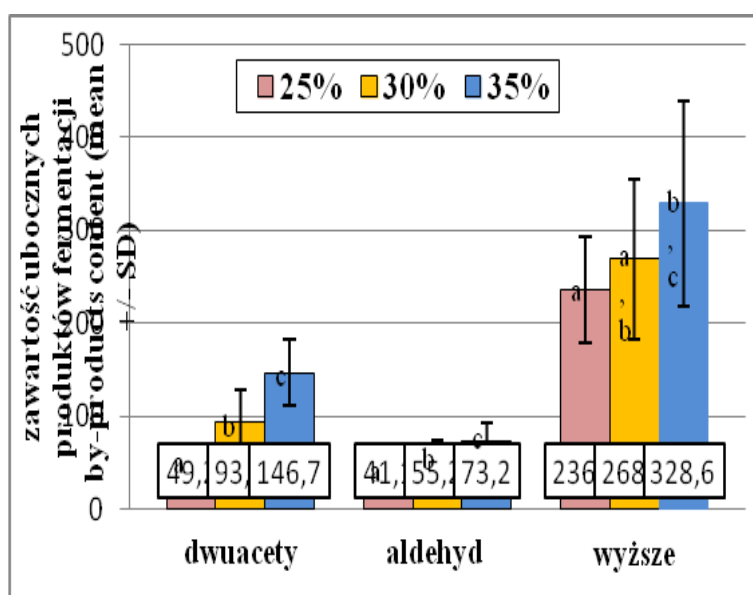
Analizując wyniki zawarte w tabeli 4 zaobserwowano, że szczepy drożdży fermentujące brzeczki o zawartości cukrów 35% w porównaniu do brzeczki 25% wytwarzały od ok. 1,5-3 krotnie wyższe ilości aldehydu octowego oraz ok. 1,5-2 krotnie wyższe ilości alkoholi amyloowych i n-propanolu. Zawartość izobutanolu i diacetylu wzrosła 2-6 krotnie w stosunku do brzeczki 25%, natomiast w porównaniu do brzeczki o zawartości ekstraktu 30% wzrost ten był ok. 1,5-4 krotny. Ponadto w przypadku wszystkich szczepów drożdży w brzeczce 35% w porównaniu do brzeczki 30% odnotowano nawet 2-krotny wzrost ilości aldehydu octowego, alkoholi amyloowych, n-propanolu.

Fermentacja brzeczki o zawartości cukru 35% stwarzała stresujące warunki dla metabolizmu drożdży, co było przyczyną intensywniejszej syntezy aldehydu octowego, wyższych alkoholi alifatycznych i diacetylu. Więcej 2-metylobutanolu i 3-metylobutanolu, w porównaniu do brzeczki 30% wytworzyły szczepy 2, 3, 4, 7, 9 i 12.

Wzorek, Pogorzelski 1998, podają, że ilość powstających wyższych alkoholi jest mniejsza, jeśli do brzeczki zostały dodane nieorganiczne związki azotowe, tak jak to

uczyniono niniejszej pracy. Przykładowo, zawartość alkoholi wyższych w winach stołowych wynosi zwykle 140-420 mg·l⁻¹, a w winach deserowych 160-900 mg·l⁻¹. Estry powstałe podczas fermentacji alkoholowej są przeważnie związkami kwasów organicznych i etanolu, w młodych winach znajduje się zwykle 25-300mg·l⁻¹ estrów. Zawartość aldehydów powstających wyniku fermentacji w winach młodych na ogół nie przekracza 75 mg·l⁻¹, zwykle ich zawartość wynosi kilkanaście do kilkudziesięciu miligramów w litrze.

Na rysunku 1 przedstawiono średnią zawartość aldehydu octowego, diacetylu i sumy wyższych alkoholi alifatycznych wytworzonych przez badane szczepy drożdży (n=12) podczas fermentacji podłoży wysokocukrowych o stężeniu sacharozy 25%, 30% i 35%.



Rysunek 1. Zawartość aldehydu octowego, diacetylu i sumy wyższych alkoholi w cieczy pofermentacyjnej brzeczek o zawartości sacharozy 25%, 30% i 35% (średnia dla 12 szczepów drożdży)

Acetaldehyde, diacetyl and total higher alcohols contents in fermented media containing initially 25%, 30% and 35% sugar (mean value for the 12 yeast)

a,b,c – różnica statystycznie istotna przy $\alpha \leq 0,05$.

a,b,c – statistically significant differences at $\alpha \leq 0,05$.

Wielkości oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie ufności 95%.

Values followed by the same letter are not significantly different at a confidence level of 95%.

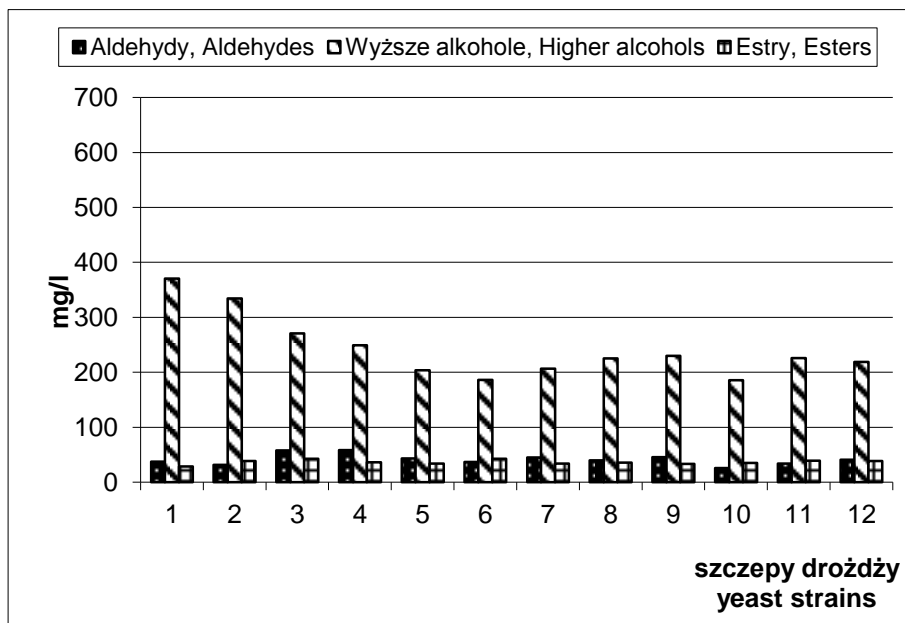
Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących szczepów drożdży (n=12) zaobserwowano wzrost zawartości wybranych lotnych składników aromatu przefermentowanej brzeczeki w miarę zwiększania się stężenia sacharozy w podłożu fermentacyjnym. Różnice statystycznie istotne stwierdzono pomiędzy wynikami zawartości

diacetylu i aldehydu octowego, natomiast w przypadku sumy zawartości wyższych alkoholi różniły się statystycznie jedynie wyniki otrzymane dla brzeczek cukrowych o ekstrakcie 25% i 35%.

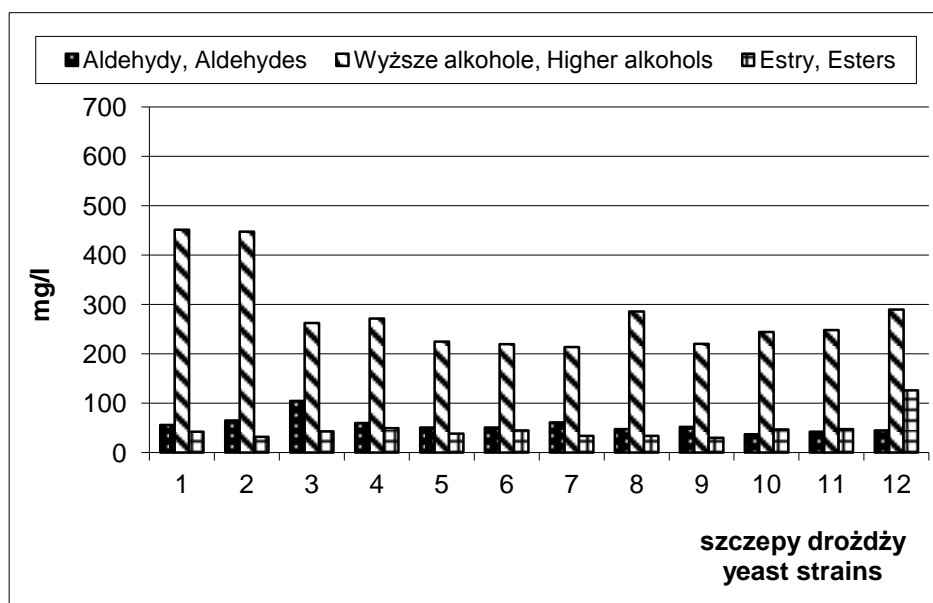
Analizując wyniki przedstawione na rysunkach 2-4 zaobserwowano, że w wyniku fermentacji brzeczek o zawartości sacharozy 25% suma zawartości wyższych alkoholi była najniższa i mieściła się w zakresie od ok. 185 do ok. 370 mg·l⁻¹, dla stężenia brzeczek 30% wyniosła od ok. 214 do ok. 448 mg·l⁻¹, a w przypadku brzeczek o zawartości sacharozy 35% była najwyższa i wynosiła od 220 do 639 mg·l⁻¹. Podczas fermentacji roztworów sacharozy o stężeniu 35%, szczep 2 wytworzył największe ilości wyższych alkoholi (639 mg·l⁻¹), a najmniejsze ilości przy tym stężeniu produkował szczep 6 (220 mg·l⁻¹). Przy stężeniu sacharozy 30% najmniejsze zawartości wyższych alkoholi zostały wytworzone przez szczep 7 (214 mg·l⁻¹), natomiast największe ilości wyprodukował szczep 1 (451 mg·l⁻¹). W brzeczkach o zawartości sacharozy 25% największy poziom sumy zawartości wyższych alkoholi osiągnął szczep 1 (371 mg·l⁻¹), a najmniejsze zawartości – szczep 10 (185 mg·l⁻¹).

Oznaczona zawartość sumy estrów syntetyzowanych przez 10 szczepów drożdży mieściła się w przedziale 18,4-56,7 mg·l⁻¹. Dwa szczepy drożdży (numer 1 i 12) cechowały się znacznie wyższą produkcją estrów (83,5-148,4 mg·l⁻¹) w porównaniu do pozostałych badanych szczepów.

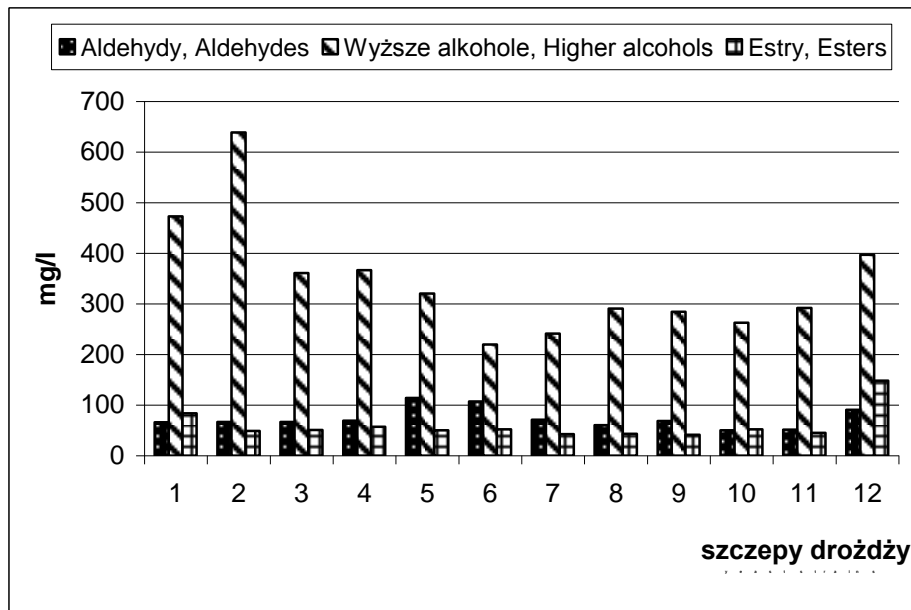
Największą ilość aldehydu octowego wytwarzały cztery szczepy drożdży, jeden podczas fermentacji brzeczek o ekstrakcie 30% tj. szczep numer 3 (104,6 mg·l⁻¹) oraz trzy szczepy 6, 5 i 12 (90,3-113,8 mg·l⁻¹) wyniku fermentacji brzeczek o zawartości sacharozy 35%. W przypadku pozostałych ośmiu szczepów drożdży, ilość wytworzonego aldehydu octowego mieściła się w przedziale 25,5-71,2 mg·l⁻¹. Najniższe ilości aldehydu octowego (25,5-58,1 mg·l⁻¹) wytwarzały wszystkie badane szczepy drożdży podczas fermentacji brzeczek o najmniejszym stężeniu ekstraktu (25%).



Rysunek 2. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydu octowego, sumy wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 25%.
Influence of yeast strain on the content of aldehyd, total higher alcohols and esters in fermented medium containing 25% extract before fermentation.



Rysunek 3. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydu octowego, sumy wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o zawartości ekstraktu 30%.
Influence of yeast strain on the content of acetaldehyd, total higher alcohols and esters in fermented medium containing 30% extract before fermentation.



Rysunek 4. Wpływ szczepu drożdży na zawartość aldehydu octowego, sumy wyższych alkoholi i estrów w cieczy po fermentacji podłoża o ekstrakcie 35%.
Influence of yeast strain on the content of acetaldehyd, total higher alcohols and esters in fermented medium containing 35% extract before fermentation.

O prawidłowości przebiegu procesu fermentacji i właściwościach fizjologicznych drożdży świadczy kilka istotnych parametrów, takich jak przyrost biomasy, wydajność syntezy etanolu i szybkość fermentacji (Wzorek i wsp. 1992). W pracy badano także zawartość biomasy drożdży w cieczy pofermentacyjnej. Największą zawartość biomasy uzyskano dla trzech stężeń brzeczki w hodowli szczepu 12 (1,40-1,70 g s.m.·100 g⁻¹), natomiast najmniejszy plon dała hodowla szczepu 1 na pożywce o zawartości cukru 25% (1,06 g s.m.·100 g⁻¹) – tabela 5

Tabela 5. Wpływ stężenia podłoża i szczepu drożdży na zawartość biomasy.

Influence of medium concentration and yeast strain on the biomass content.

Szczep drożdży <i>Yeast strain</i>	Plon drożdży, g s.m. · 100 g ⁻¹ cieczy pofermentacyjnej <i>Yeast crop, g d.m. · 100 g⁻¹ liquid fermented medium</i>		
	Stężenie ekstraktu w podłożu <i>The concentration of extract in the medium</i>		
	25 %	30 %	35 %
1	1,06±0,042 ^a	1,25±0,014 ^b	1,2±0,014 ^{b,c}
2	1,13±0,042 ^a	1,22±0,028 ^a	1,2±0,028 ^a
3	1,23±0,035 ^a	1,26±0,042 ^a	1,25±0,057 ^a
4	1,39±0,014 ^a	1,31±0,035 ^a	1,33±0,028 ^a
5	1,21±0,042 ^a	1,35±0,028 ^{a,b}	1,18±0,028 ^{a,c}
6	1,23±0,014 ^a	1,25±0,035 ^a	1,20±0,028 ^a
7	1,10±0,071 ^a	1,25±0,021 ^a	1,24±0,057 ^a
8	1,35±0,071 ^a	1,28±0,014 ^{a,b}	1,15±0,071 ^{a,c}
9	1,29±0,021 ^a	1,20±0,014 ^b	1,10±0,071 ^{b,a}
10	1,09±0,021 ^a	1,13±0,014 ^{a,b}	1,20±0,071 ^c
11	1,37±0,021 ^a	1,24±0,028 ^b	1,25±0,028 ^{b,c}
12	1,70±0,014 ^a	1,58±0,035 ^b	1,40±0,028 ^{a,b}
Wartość średnia ±SD (n=12) Mean value mean±SD (n=12)	1,26±0,178 ^a	1,28±0,110 ^a	1,23±0,079 ^a

^{a,b,c} – różnica statystycznie istotna przy $\alpha \leq 0,05$.

^{a,b,c} – statistically significant differences at $\alpha \leq 0,05$.

Wielkości w wierszach oznaczone tymi samymi indeksami nie różnią się istotnie statystycznie przy poziomie ufności 95%.

Values in rows followed by the same letter are not significantly different at a confidence level of 95%.

Z przeprowadzonych badań wynika także (tabela 5), że uzyskana ze 100 g cieczy pofermentacyjnej zawartość biomasy dla jedenastu szczepów drożdży była niższa w porównaniu do szczepu 12. Mniejszy plon drożdży ww. szczepów mógł świadczyć o tym, że wysokie ciśnienie osmotyczne wywołane wysokim stężeniem cukrów hamowało rozwój drożdży, ale nie hamowało procesu fermentacji. 11 szczep drożdży efektywniej przetwarzał sacharozę na alkohol etylowy niż szczep 12, który wykorzystywał ten cukier na produkcję biomasy. Oznaczało to, że etanol i wysokie stężenie cukru hamuje bardziej proces fermentacji prowadzony przez drożdże nr 12. W przypadku brzeczki zawierającej 25% sacharozy, najmniejsze ilości biomasy wytwarzały szczepy 1, 7 i 10 (odpowiednio 1,06; 1,10 i 1,09 g s.m. · 100 g⁻¹). Najniższy plon biomasy uzyskany na brzeczce 30% stwierdzono dla szczepu 10 (1,13 g s.m. · 100 g⁻¹). Przy najwyższym stężeniu brzeczki (35 %) najniższą zawartość biomasy obserwowano na szczepie 9 (1,10 g s.m. · 100 g⁻¹). W większości przypadków, analiza

danych plonu biomasy drożdży w zależności od stężenia cukru w podłożu nie wykazała różnic istotnych statystycznie dla poszczególnych szczepów drożdży. Ocena wpływu stężenia sacharozy zawartej w podłożu na plon biomasy badanych szczepów drożdży (n=12) okazała się statystycznie nieistotna przy poziomie ufności 95%.

Żywotność drożdży zebranych po fermentacji była bardzo dobra, komórek martwych nie stwierdzono.

WNIOSKI

1. Zdolność drożdży do syntezy etanolu i ubocznych produktów fermentacji zależy od szczepu drożdży *Saccharomyces* i stężenia cukru w brzeczce.
2. Największe ilości alkoholu etylowego wytworzyły drożdże w wyniku fermentacji brzeczki o zawartości ekstraktu 30%.
3. Warunki fermentacji brzeczki o zawartości ekstraktu 35% wywoływały stres w komórkach drożdży, który objawiał się wzrostem syntezy aldehydu octowego, wyższych alkoholi alifatycznych i diacetylu.
4. Najbardziej opornych na wysokie stężenia cukrów w podłożu fermentacyjnym było sześć szczepów drożdży (6, 7, 8, 9, 10 i 11).

PIŚMIENNICTWO

1. 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.
2. Bonin S., Kur M., (2008). Produkty uboczne fermentacji winiarskiej a cechy jakościowe wina. *Agro Przem.*, 5: 77-80.
3. 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.
4. Sobczak E., Konieczna E. (1981). Wpływ rasy drożdży na skład chemiczny i cechy organoleptyczne wina owocowego. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 4: 8-10. .
5. 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
6. Wzorek W., Bugajewska A., Żelakiewicz A. (1992). Wpływ ilości drożdży na wyniki fermentacji wysokocukrowych nastawów winiarskich. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 5: 10-13.
7. Wzorek W., Pogorzelski E. (1998). *Technologia winiarstwa owocowego i gronowego*. Wydawnictwo Sigma-Not, Warszawa.