

BARBARA STACHOWIAK, KACPER ZIEMBIKIEWICZ, ANNA KACZMAREK

**WYKORZYSTANIE DROŻDŻY PROBIOTYCZNYCH *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* VAR. *BOULARDII* DO REFERMENTACJI PIWA
PSZENICZNEGO**

Streszczenie

Wprowadzenie. Refermentacja piwa polega na przeprowadzeniu dodatkowej fermentacji w zamkniętym opakowaniu. Warunkiem refermentacji jest obecność cukrów fermentowalnych. Proces ten jest inicjowany poprzez drożdże obecne w piwie lub inne, wprowadzone celowo. Podczas refermentacji drożdże wykorzystują cukry fermentowalne, produkując alkohol i CO₂; jednocześnie zużywany jest tlen odpowiedzialny za niekorzystne zmiany oksydacyjne piwa. Celem niniejszej pracy była ocena przydatności drożdży *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* CNCM I-745 (*S. bouardii*) do refermentacji piwa pszenicznego. Piwo wytworzono z udziałem drożdży WB-06, które następnie odseparowano na drodze mikrofiltracji. Otrzymane piwo bazowe rozlano do butelek i zaszczepiono inokulum *S. bouardii* na trzech poziomach 0,1 %, 0,5 % i 1 %. Jako substrat do refermentacji zastosowano glukozę. Refermentację tak przygotowanych piw testowych prowadzono 12 dni w 22 °C, a następnie umieszczono je w chłodni na 90 dni. Kontrolę stanowiły piwa bez dodatku glukozy. Podczas refermentacji i przechowywania piw kontrolowano liczebność drożdży *S. bouardii* oraz parametry fizykochemiczne (alkohol, ekstrakt pozorny i rzeczywisty, pH, barwę, goryczkę, cukry redukujące).

Wyniki i wnioski. Otrzymane wyniki wskazują, że refermentacja piwa pszenicznego z udziałem drożdży *S. bouardii* – bez względu na wariant (kontrolny, testowy) – pozwala uzyskać produkt o parametrach fizykochemicznych typowych dla stylu. Ponadto wykorzystanie tych drożdży do procesu refermentacji umożliwiło otrzymanie produktu o charakterze probiotyku. Najlepszym wariantem piwa w kontekście przeżywalności *S. bouardii* okazał się B-0,1, tj. piwo szczepione 0,1-procentowym dodatkiem inokulum drożdży i z dodatkiem glukozy. W piwie tym liczebność drożdży pozostawała stabilna (w zakresie 5,8 ÷ 5,9 log kom./cm³) od 7. dnia refermentacji do 90. dnia przechowywania w warunkach chłodniczych.

Słowa kluczowe: *Saccharomyces bouardii*, drożdże probiotyczne, piwo funkcjonalne, piwo pszeniczne, refermentacja

Dr hab. B. Stachowiak, ORCID: 0000-0002-0172-8875; K. Ziembikiewicz, Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, dr inż. A. Kaczmarek ORCID: 0000-0001-7888-0026; Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31,60-637 Poznań.
Kontakt e-mail: barbara.stachowiak@up.poznan.pl

Wprowadzenie

Do najpopularniejszych metod utrwalenia piwa należą pasteryzacja (w przepływie, tunelowa) i mikrofiltracja. Metody te, choć dobrze poznane i wysoce skuteczne w stabilizacji mikrobiologicznej piwa, nie są pozbawione jednak pewnych wad. Pasteryzacja opracowana w XIX w. przez Ludwika Pasteura, pozwala na inaktywację komórek drożdży i drobnoustrojów „psujących piwo” dzięki zastosowaniu odpowiednio wysokiej temperatury (zwykle w zakresie $60 \div 70$ °C) w określonym czasie [6]. Prawidłowo przeprowadzona pasteryzacja nie ma wpływu na walory sensoryczne piwa, choć negatywnie oddziałuje na obecne w nim termowrażliwe składniki żywieniowe, np. witaminy z grupy B (kwas foliowy, pantotenowy, pirydoksyna). Badania wskazują również na niekorzystny wpływ pasteryzacji na jakość piwa podczas przechowywania, m.in. na jego barwę, goryczkę, zawartość polifenoli i związków lotnych. Z kolei tzw. przepasteryzowanie wnosi do piwa nuty związane z tworzeniem związków melanoidynowych, m.in. przypieczonej skórki chleba, tostowe [4].

Mikrofiltracja, czyli sterylizacja „na zimno”, wskazywana jest często jako metoda zapewniająca lepszą jakość produktu i oszczędność kosztów w porównaniu z pasteryzacją. Polega na odseparowaniu niepożądanych drobnoustrojów z piwa dzięki zastosowaniu membran o porowatości $0,2 \div 1,3$ μm [13]. Technika ta pozwala stosunkowo łatwo osiągnąć stabilność mikrobiologiczną piwa. Jednak podczas mikrofiltracji usuwane są z piwa duże cząsteczki, m.in. białka i produkty ich hydrolizy, zarówno te o charakterze hydrofobowym, jak i hydrofilowym, które są odpowiedzialne odpowiednio za stabilność piany i tworzenie zmętnień zimnych. Ponadto oddzielenie białek z piwa obniża jego wartość żywieniową i negatywnie wpływa na sensorykę (pełnię smakową). Podczas mikrofiltracji z piwa usuwane są również związki polifenolowe o potencjale prozdrowotnym, głównie antyoksydacyjnym [19]. Stąd do poważnych wad mikrofiltracji należą duże różnice w jakości pomiędzy różnymi markami piwa filtrowanego na jednym systemie membranowym [13].

Refermentacja (kondycjonowanie w butelce) to naturalna metoda utrwalenia piwa, która polega na przeprowadzeniu dodatkowej fermentacji w zamkniętym opakowaniu. Rozwój tej metody stał się możliwy dzięki wynalezieniu beczek, a następnie butelek i zamknięć do butelek, co miało miejsce odpowiednio w XVIII i XIX wieku. Pierwotnie proces ten był prowadzony celem wysycenia piwa dwutlenkiem węgla. Warunkiem refermentacji jest dostępność cukrów fermentowalnych, które są dodawane do piwa podczas rozlewu, np. w postaci syropu, czy opcjonalnie soków owocowych oraz obecność żywych i aktywnych metabolicznie komórek drożdży [31].

Refermentacja jest najczęściej inicjowana przez obecne już w piwie drożdże browarnicze lub inne szczepy wprowadzane celowo. Podczas pierwszej fazy refermentacji obecne w piwie drożdże namnażają się i zużywają dostępny tlen. Następnie prowadzą fermentację etanolową. W efekcie wzrasta stężenie alkoholu, piwo wysyca się dwu-

tlenkiem węgla, poprawia się profil smakowo-zapachowy produktu (m.in. obniża się poziom diketonów pokrewnych i aldehydów) [7, 31]. Zatem refermentacja jest również metodą stabilizacji, gdyż zapobiega niekorzystnym zmianom oksydacyjnym, określanym potocznie jako starzenie się piwa. Przejawia się ono zmianą smaku i zapachu, utratą goryczki, aromatu, a nawet destabilizacją koloidalną. Stąd użyty do refermentacji szczep drożdży, jego stan fizjologiczny, liczebność, a także wytwarzana ilość i profil związków lotnych determinują jakość finalnego produktu [16]. Należy podkreślić, że refermentowane piwa charakteryzują się unikalnymi walorami smakowo-zapachowymi oraz znacznie wyższą wartością żywieniową w porównaniu z piwami pasteryzowanymi czy utrwalonymi na drodze mikrofiltracji [6]. To tzw. piwa żywe, zawierające aktywne metabolicznie komórki drożdży odpowiedzialne za przeprowadzenie procesu.

Drożdże odpowiedzialne za refermentację muszą się charakteryzować dobrą przeżywalnością w środowisku piwa, gdyż nie sprzyja ono ich rozwojowi, co można częściowo wytłumaczyć trudnymi warunkami środowiskowymi tj. połączeniem małej dostępności składników odżywczych i tlenu, wahań temperatury, niskiego pH oraz wysokiego stężenia alkoholu i CO₂. Stąd podczas refermentacji liczebność drożdży obniża się, a ich autoliza prowadzi do zmian profilu sensorycznego piwa i stabilności piany [7]. Pewnym niebezpieczeństwem, jakie wiąże się z refermentacją, jest nadmierna produkcja CO₂ i możliwość „wybuchu” butelki na półkach sklepowych lub niedogazowanie piwa. Stąd istotny jest staranny dobór parametrów tego procesu, które obejmują podaż odpowiedniej ilości substratu cukrowego oraz ilości drożdży do jego przeprowadzenia.

W ostatnich latach coraz częściej prowadzone są badania dotyczące opracowania piw z udziałem probiotycznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* [1, 2, 5]. Opracowanie piwa zawierającego drobnoustroje probiotyczne wpisuje się w mocno zaznaczony na rynku nurt premiumizacji. Wynika on ze wzrostu zainteresowania zdrowym stylem życia i świadomą konsumpcją, również alkoholu. Konsumenty są bardziej wymagający i skłonni płacić więcej za piwo o wysokiej jakości i walorach prozdrowotnych. Korzystne oddziaływanie *S. bouardii* wiąże się z profilaktyką i leczeniem zaburzeń jelitowo-żołądkowych i biegunek o różnej etiologii zarówno u dzieci, jaki i u dorosłych (biegunki infekcyjne, poantybiotykowe, podróżne, i in.). Jednak w przeciwieństwie do innych probiotyków drożdże te nie występują naturalnie w układzie pokarmowym i nie są zdolne do adhezji i kolonizacji nabłonka jelitowego, a jedynie bytują tam czasowo zanim ulegną wydaleniu. Pomimo to spełniają szereg wymagań stawianych probiotykom, m.in. charakteryzują się bardzo dużą termoopornością, która pozwala im przeżyć w temperaturze ciała (37 °C), tolerują bardzo dobrze niskie pH żołądka i obecność soli kwasów żółciowych. Są naturalnie odporne na antybiotyki [14, 23].

Drożdże *S. boulardii*, w przeciwieństwie do innych probiotyków (bakterii z rodzajów *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), są wyjątkowo predysponowane do przetrwania w środowisku piwa. Charakteryzują się dobrą tolerancją na niskie pH i izo- α -kwasy ekstrahowane z chmielu. Stwierdzono również, że przy IBU 30 wpływ goryczy jest wciąż nieistotny dla ich wzrostu [21]. Należy również zaznaczyć, że *S. boulardii* są zdolne do przeprowadzenia fermentacji chmielonej brzezki piwnej, zarówno w temperaturze 30 °C, jak i w niskich temperaturach (2 °C). Istotny jest fakt, że piwo wyprodukowane z udziałem *S. boulardii* charakteryzuje się sensoryką zbliżoną do piw warzonych z użyciem drożdży piwnych [21, 23].

Celem niniejszych badań była ocena przydatności drożdży *Saccharomyces boulardii* do refermentacji piwa pszenicznego górnej fermentacji w stylu Weizen. Piwo to od szeregu lat cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem konsumentów.

Materialy i metody

Materialy

Wykorzystane w badaniach piwo wytworzono z gotowego zestawu surowców pn. „Prawdziwe Pszeniczne 12 °Blg” (Twój Browar S.C., Wrocław). Skład surowcowy w przeliczeniu na 40 l piwa był następujący: ześrutowane słydy: pszeniczny – 5 kg, pilzneński – 3 kg, karmelowy jasny – 0,4 kg; chmiel Lubelski (granulat) – 40 g. Do fermentacji brzezki użyto drożdże górnej fermentacji Fermentis Safbrew WB-06 (Lesaffre, Francja). Natomiast do refermentacji zastosowano *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* szczep CNCM I-745 (Bart sp. z o.o. spk. Słupno). Drożdże reaktywowano w następujący sposób: w kolbach Erlenmayera poj. 300 cm³ przygotowano 200 cm³ 5 % roztworu ekstraktu słodowego [w/v] (S-0005, BTL, sp. z o. o., Łódź), do którego wprowadzono 5 g suchych drożdży. Całość inkubowano w temperaturze 30 °C przez cztery godziny, w warunkach dynamicznych (120 obr./min.). Tak przygotowane drożdże stanowiły inokulum, które bezpośrednio wprowadzono do brzezki chmielonej i piwa rozlanego do butelek celem refermentacji. Wszystkie operacje wykonano w warunkach jałowych.

Do dezynfekcji i odkażania linii produkcyjnej wykorzystano preparaty: Star San (Five Star Chemicals® Supply Inc, USA) dedykowany do mycia i dezynfekcji urządzeń produkcyjnych ze stali nierdzewnej oraz Larasept Forte (HHS Chemicals sp. z o.o., Ryki) – 20-procentowy roztwór kwasu nadoctowego do dezynfekcji ogólnej układu zamkniętego (przewody transportowe).

Przebieg doświadczeń

Przygotowanie piwa

Do wytworzenia piwa wykorzystano urządzenia produkcyjne z linii Grainfather (Twój Browar S.C., Wrocław): kocioł zacierno-warzelny o objętości 70 dm³ (G70 v2), dwa fermentory stożkowe o objętości 30 dm³ (Grainfather GF30 Conical Fermenter Pro), chłodziarkę glikolową (Grainfather GC4Glycol Chiller) do kontroli temperatury fermentacji. Urządzenia produkcyjne przed warzeniem poddano procesom mycia i dezynfekcji.

Celem przygotowania brzezki w kotle zacierno-warzelnym podgrzano 32 dm³ wody bieżącej do temperatury 53 °C i wprowadzono ześrutowane słydy. Podczas zacierania zastosowano trzy przerwy temperaturowe, aby umożliwić aktywność odpowiednim grupom enzymów: 50 ÷ 52 °C przez 15 minut (przerwa białkowa); 62 °C przez 20 minut (przerwa maltozowa); 72 °C aż do negatywnego wyniku próby jodowej (przerwa dekstrynuująca – ok. 40 min.). Celem inaktywacji enzymów zacier podgrzano do temperatury 76 ÷ 78 °C. Wygrzew (*mash out*) prowadzono przez 5 minut.

W kolejnym etapie przeprowadzono filtrację zacieru systemem grawitacyjnym, połączoną z wysładzaniem młóta. Do wysładzania zużyto 20 dm³ wody o temperaturze 78 °C. Łączny czas operacji trwał 40 minut. Klarowną brzezkę odebrano do zbiornika buforowego, a następnie zawrócono do pustego kotła zacierno-warzelnego, zagotowano i dodano chmiel. Całość gotowano 60 minut. Po wybiciu brzezkę schłodzono i przetransportowano do dwóch fermentorów stożkowych (po ok. 20 dm³ do każdego) i zaszczerpiono drożdżami Fermentis Safbrew WB-06 w ilości 1 % obj., tj. do każdego fermentora wprowadzono po 200 cm³ inokulum. Fermentację prowadzono w 16 °C aż do momentu uzyskania założonego stopnia odfermentowania (70 %), codziennie kontrolując ekstrakt pozorny (E_p) (refraktometr HI 96803, Hanna Instruments, USA). Następnie podniesiono temperaturę do 18 °C i fermentację kontynuowano do momentu aż wartość E_p osiągnęła stały poziom. Następnie temperaturę piwa obniżono do 5 °C i na okres 11 dni pozostawiono celem dojrzewania i stabilizacji koloidalnej. W trakcie procesu ze stożka fermentora dwukrotnie w drugim i piątym dniu oddzielono osad drożdżowy. Piwo z fermentorów przefiltrowano przez filtr płytowy (PLF-SSP2020, Czech Brewery System, republika Czeska) do zbiornika buforowego. Do filtracji zastosowano płyty filtracyjne EUROPOR 400 × 400 K3 (Czech Brewery System, Republika Czeska). Po mikrofiltracji piwo rozlano po 500 cm³ do wysterylizowanych w autoklawie butelek. Do wariantów piw testowych (B) dodano glukozę (D-018, BTL sp. z o.o., Łódź) w ilości 2,5 g do każdej butelki, a następnie wprowadzono inokulum drożdży *S. boulardii* szczep CNCM I-745. Kontrolę stanowiły piwa bez dodatku glukozy.

Przygotowano sześć wariantów piw:

Piwa kontrolne (K)

- (1) K-0,1 – piwo kontrolne z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 0,1 % [v/v]
- (2) K-0,5 – piwo kontrolne z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 0,5 % [v/v]
- (3) K-1 – piwo kontrolne z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 1 % [v/v]

Piwa testowe (B):

- (4) B-0,1 – piwo z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 0,1 % [v/v] oraz z dodatkiem glukozy
- (5) B-0,5 – piwo z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 0,5 % [v/v] oraz z dodatkiem glukozy
- (6) B-1 – piwo z dodatkiem inokulum drożdży *S. boulardii* na poziomie 1 % [v/v] oraz z dodatkiem glukozy.

Proces refermentacji prowadzono w butelkach z zamknięciem pałkowym przez okres 12 dni w temperaturze pokojowej (22 °C). Następnie piwa przeniesiono do chłodni (4 °C) i przechowywano 90 dni. W badanych piwach kontrolowano liczebność drożdży *S. boulardii* CNCM I-745 oraz zmiany parametrów fizykochemicznych po 7 oraz 12 dniach refermentacji, a następnie podczas przechowywania w warunkach chłodniczych co 30 dni.

Analizy fizykochemiczne

Parametry fizykochemiczne piwa kontrolowano po jego odgazowaniu [10]. Zawartość alkoholu (% obj.) po destylacji (Gibertini Elettronica S.R.L., Italy) oraz ekstrakty pozorny i rzeczywisty mierzono wykorzystując automatyczny gęstościomierz (DDM-2910, Rudolph Research Analytical, USA) [9]. Kwasowość czynną oznaczano za pomocą pH-metru z automatycznym kompensorem temperatury (Elmetron, Poland) [8]. Barwę (C) i goryczkę wyznaczono spektrofotometrycznie (Halo SB-10, Dynamica Scientific Ltd, Wolfslabs, UK) po odwirowaniu próbki (4000 obr/min, 25 min). Barwę mierzono przy długości fali 430 nm (A_{430}) wobec wody destylowanej (próba zerowa). Wynik wyrażono w jednostkach EBC, korzystając ze wzoru: $C = 25 \times A_{430}$ [11]. Substancje goryczkowe (izo-kwasy) ekstrahowano z zakwaszonego piwa za pomocą izooktanu. Po odwirowaniu absorbancję warstwy izooktanowej mierzono przy długości fali 275 nm (A_{275}) (Cary 60 UV-VIS, Agilent Technologies, USA) wobec czystego izooktanu (próba zerowa). Wartość goryczki wyrażono w jednostkach goryczy (IBU) według wzoru: $IBU = 50 \times A_{275}$ [12]. Zawartość cukrów redukujących oznaczono metodą kolorymetryczną z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) według metody opisanej przez Millera [20].

Analizowano również przebieg procesu fermentacji brzeczki poprzez kontrolowanie ubytku masy prób (metoda grawimetryczna) [30]. Trzy butelki pojemności

1000 cm³ wyposażone w rurki fermentacyjne z gliceryną (10314830, Honeywell) napełniono 700 cm³ brzezki inokulowanej drożdżami Fermentis Safbrew WB-06. Fermentację w butelkach prowadzono równolegle z fermentacją w tankofermentorach, zachowując identyczne warunki temperaturowe i czasowe. Codziennie kontrolowano wagę butelek, aż do ustalenia się. Względną zawartość alkoholu (% obj.) wyliczano poprzez pomnożenie ubytku masy (wyrażony w gramach CO₂) przez współczynnik 1,25.

Analizy mikrobiologiczne

W próbach brzezki i piwa kontrolowano liczebność drożdży (YGC Agar, BTL, Łódź, Poland; 25 °C, 5 dni) [26], bakterii mezofilnych (agar odżywczy, BTL, Łódź, Poland; 30 °C, 3 dni) [24], bakterii kwasu mlekowego (agar MRS, Oxoid 30°C, 3 dni, warunki beztlenowe) [25]. Posiewy mikrobiologiczne wykonano metodą płytkową Kocha (posiew wgłębnny) w dwóch powtórzeniach. Wyniki liczebności mikroorganizmów wyrażono jako log kom/ml.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica (Wersja 13.3, StatSoft, USA). Dla określenia wpływu wariantu piwa oraz czasu na liczebność drożdży *S. bouldarii* i parametry fizykochemiczne piwa zastosowano analizę wariancji dla układów czynnikowych (ANOVA). Następnie, dla określenia, które z grup różnią się między sobą statystycznie istotnie, zastosowano test Tukeya (HSD). Weryfikację hipotez statystycznych przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Przeprowadzono dwie serie doświadczeń. Każdą analizę wykonano w dwóch powtórzeniach. Wyniki podane na wykresie i w tabeli są średnią z czterech oznaczeń.

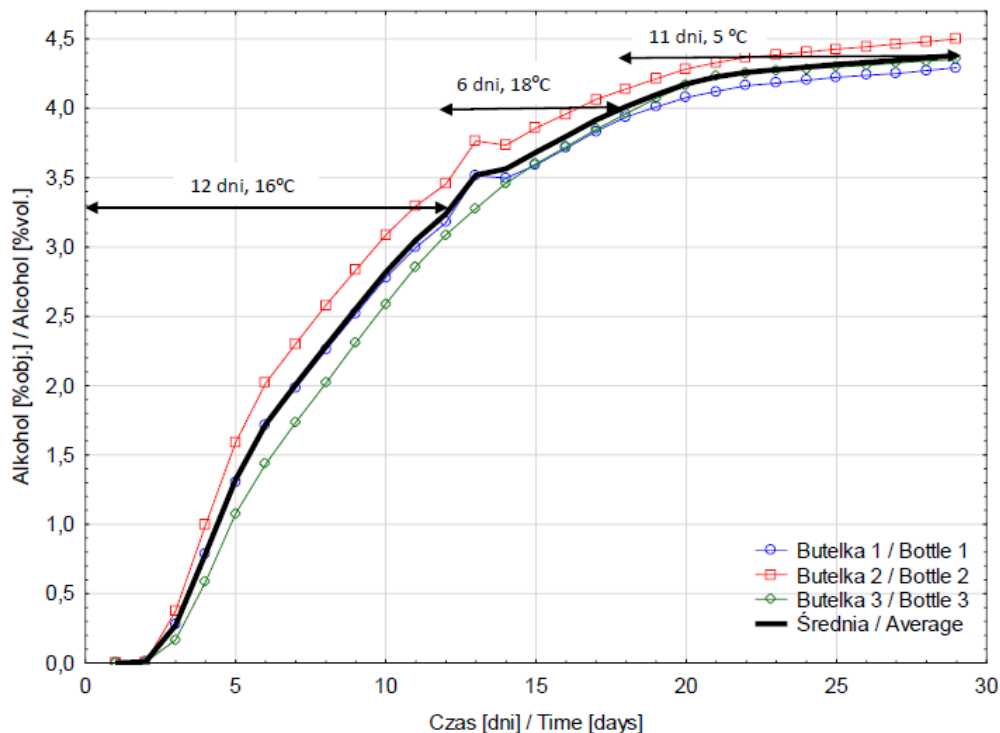
Wyniki i dyskusja

Charakterystyka brzezki podstawowej i przebieg fermentacji

Ekstrakt wyjściowy brzezki wynosił 11,8 °Blg, a zawartość cukrów redukujących: 73 g/dm³. Goryczkę odnotowano na poziomie 17 IBU, barwę – 14,3 EBC, a pH – 5,8. Brzezki w fermentorach stożkowych oraz w butelkach zaszczepiono inokulum drożdży Fermentis Safbrew WB-06, w którym liczebność komórek wynosiła 9,19 log/cm³. Fermentację prowadzono w 16 °C. W fermentorach stożkowych w 12 dniu procesu odnotowano 70-procentowe odfermentowanie i temperaturę fermentacji podniesiono do 18 °C celem dofermentowania, a po 6 dniach obniżono do 5 °C. W otrzymanym piwie bazowym (po mikrofiltracji) stężenie alkoholu było na poziomie 4,64 ± 0,02 % obj., wartość E_p była równa 1,81 ± 0,01 °Blg, a E_{tz} 3,67 ± 0,07 °Blg. Tak więc pozorny stopień odfermentowania wynosił 85 %, a rzeczywisty – 69 %. Cukry redukujące zostały wykorzystane w 89 %. Przebieg procesu fermentacji w butelkach

przedstawiono na ryc. 1. Po fazie adaptacyjnej trwającej 2 dni obserwowano intensywną produkcję etanolu. Tak jak w przypadku fermentacji prowadzonej w fermentorach, odfermentowanie na poziomie 70 % odnotowano w 12. dniu procesu – wówczas stężenie alkoholu w piwie wynosiło 3,05 % obj. Po 6 dniach fermentacji w 18 °C poziom alkoholu w piwie osiągnął wartość 3,89 % obj., co stanowiło 89 % uzyskanej wartości maksymalnej (4,38 % obj.).

Należy podkreślić niewielką różnicę pomiędzy stężeniem alkoholu w piwie fermentowanym w fermentorach stożkowych i fermentowanym w butelkach, która wynosiła 0,26 % obj., co pozostaje w granicach dopuszczalnego błędu pomiarowego [28]. Wskazuje to na wysoką przydatność metody grawimetrycznej do kontroli przebiegu fermentacji.



Rycina 1. Dynamika fermentacji brzezki (metoda grawimetryczna [30])

Figure 1. The wort fermentation dynamics (gravimetric method [30])

Charakterystyka piwa bazowego

Wartości parametrów fizykochemicznych piwa bazowego przedstawiono w tabelach 1 i 2 (dzień 0). Kwasowość czynna piwa bazowego była niższa w porównaniu

z brzeczka i wynosiła $4,33 \pm 0,2$. Wartość ta jest charakterystyczna dla typowego piwa pszenicznego i nadaje mu orzeźwiający charakter. Obserwowana zmiana świadczy o prawidłowej aktywności metabolicznej drożdży podczas fermentacji, związanej między innymi z tworzeniem kwasów organicznych wskutek deaminacji, pobieraniem jonów amonowych czy uwalnianiem jonów wodorowych do piwa [18].

Goryczka piwa była o 10 % niższa od goryczki brzeczki i wynosiła $15,22 \pm 0,03$ IBU. Podczas fermentacji obserwuje się niewielkie obniżenie goryczki spowodowane wytrąceniem niezizomeryzowanych podczas gotowania α -kwasów chmielowych przy pH poniżej 5,0 [3]. Zgodnie z klasyfikacją stylów piwnych opracowaną przez Polskie Stowarzyszenie Piwowarów Domowych [15], styl Weizen charakteryzuje się niską goryczką na poziomie $8 \div 15$ IBU.

Barwa piwa mieściła się w zakresie barwy określonej dla piw jasnych, to jest do 25 jednostek EBC i wynosiła $13,7 \pm 0,05$. Wartość ta jest o 2,5 jednostki EBC niższa w porównaniu z barwą brzeczki podstawowej. Rozjaśnienie barwy podczas fermentacji jest zjawiskiem typowym, związanym z adsorpcją barwnych składników brzeczki na komórkach drożdżowych, ich wytrącaniem i gromadzeniem w pianie lub na dnie naczyń fermentacyjnych [18]. Piwo Weizen charakteryzuje się barwą w zakresie $4 \div 16$ jednostek EBC [15].

Otrzymane po mikrofiltracji piwo bazowe charakteryzowało się wysoką czystością mikrobiologiczną. Stwierdzono w nim obecność drożdży na poziomie $1,6 \pm 0,09$ log kom/cm³, bakterii mezofilnych w ilości $1,4 \pm 0,01$ log kom/cm³ i bakterii kwasu mlekowego na poziomie $1,8 \pm 0,03$ log kom/cm³. Biorąc pod uwagę wytyczne Polskiego Komitetu Normalizacyjnego, które rekomendują, do odczytu liczebności badanych grup drobnoustrojów wybór płytek zawierających $15 \div 300$ wyrosłych kolonii [24, 25, 26], otrzymane piwo bazowe można uznać za mikrobiologicznie czyste.

*Zmiany liczebności *S. boulardii* w badanych piwach podczas refermentacji i przechowywania*

Zmiany liczebności drożdży *S. boulardii* podczas refermentacji (R) i przechowywania (S) przedstawiono w tabelach 1 i 2. Przebieg tych zmian miał taki sam trend dla wszystkich wariantów badanych piw. Piwo bazowe zaszczepiono dawką inokulum na trzech poziomach 0,1 %; 0,5 %; 1 % (dzień 0). Do wariantów testowych (B) dodano glukozę. Podczas refermentacji w temperaturze pokojowej (dzień 7 ÷ 12), liczebność drożdży wzrastała, przy czym zaobserwowano zależność, że wraz ze wzrostem dawki inokulum przyrost komórek *S. boulardii* w czasie był niższy bez względu na wariant piwa (kontrolne/testowe). W 12. dniu procesu, w piwach K-0,1 i B-0,1 koncentracja komórek drożdży wzrosła odpowiednio o 23 % i 28 % w porównaniu z dniem wyjściowym (dzień 0), w przypadku piw K-0,5 i B-0,5 wzrost ten wyniósł średnio 21 %,

a K-1 i B-1 – 13 %. Ostatecznie po refermentacji liczebność drożdży w badanych piwach pozostawała w zakresie $5,72 \div 5,96 \log \text{kom./cm}^3$.

Po umieszczeniu piw w warunkach chłodniczych (4 °C) w 30. dniu przechowywania odnotowano dalszy, choć niewielki przyrost liczebności komórek *S. bouldarii*. Badania innych autorów [20, 23] potwierdzają, że drożdże te są zdolne do rozwoju i metabolizowania cukrów fermentujących obecnych w środowisku do alkoholu i CO₂ również w warunkach chłodniczych. W 60. dniu przechowywania liczebność komórek *S. bouldarii* wyraźnie obniżyła się – w przypadku wszystkich wariantów piw kontrolnych w sposób bardzo radykalny, o około 40 % w porównaniu z dniem 30. Zdecydowanie łagodniejszą zmianę obserwowano dla piw testowych. W wariantach B-0,5 i B-1 liczebność drożdży obniżyła się o około 20 %, a w przypadku wariantu B-0,1 nie zmieniła się. W 90. dniu przechowywania, stężenie komórek drożdży w piwach nie różniło się istotnie w porównaniu z dniem 60. ($p < 0,05$).

Otrzymane wyniki wskazują, że najlepszym wariantem piwa w kontekście przeżywalności *S. bouldarii* okazał się B-0,1, tj. piwo szczepione najniższą dawką inokulum oraz z dodatkiem glukozy jako substratu do refermentacji. W piwie tym liczebność drożdży *S. bouldarii* była stabilna od 7. dnia refermentacji do końca czasu trwania doświadczenia i pozostawała w zakresie $5,6 \div 5,9 \log \text{kom./cm}^3$. W praktyce przemysłowej wyższa dawka drożdży inokulacyjnych stosowana jest celem skrócenia lag fazy i przyśpieszenia procesu zafermentowania, co skutkuje wykorzystaniem w krótkim czasie składników pokarmowych. Okazało się, że to rozwiązanie nie jest jednak właściwe w przypadku refermentacji, gdy istnieje potrzeba utrzymania komórek mikroorganizmów przy życiu w dłuższym okresie czasu. W naszym doświadczeniu dla piw kontrolnych, jak i testowych, przy tym samym wyjściowym stężeniu cukrów fermentujących w środowisku, korzystniejszym rozwiązaniem okazał się dodatek niższej dawki inokulum. Ponadto analiza wariancji wykazała istotny wpływ dodatku glukozy na liczebność komórek *S. bouldarii* dla badanych wariantów piw podczas przechowywania w warunkach chłodniczych ($p < 0,05$). W tym przypadku średnia liczebność drożdży była wyższa w przypadku wszystkich piw testowych w porównaniu z kontrolą, z wyjątkiem dnia 30.

Zmiany parametrów fizykochemicznych badanych piw podczas refermentacji i przechowywania

Zmiany badanych parametrów fizykochemicznych piw testowych i kontrolnych podczas refermentacji (R) i przechowywania (S) przedstawiono w tabelach 1 i 2. Parametry te zmieniały się zgodnie z trendem zaobserwowanym podczas fermentacji, choć były to zmiany minimalne. Zawartość alkoholu w piwach zwiększała się i w ostatnim dniu doświadczenia osiągnęła wartość na poziomie 5 % obj. dla wariantów kontrolnych, a dla testowych około 5,3 % obj., co pozostaje w granicach dopusz-

czalnego błędu pomiarowego [28]. Dla wszystkich wariantów piw odnotowany wzrost stężenia alkoholu był istotnie wyższy w odniesieniu do stężenia wyjściowego oznaczonego w piwie bazowym (4,64 % obj.) ($p < 0,05$).

Na początku refermentacji wartości ekstraktu pozornego i rzeczywistego piw testowych były o 1 °Błg wyższe w porównaniu z kontrolą, co było efektem dodatku glukozy. Zawartości ekstraktów w badanych piwach obniżały się w czasie, a ich końcowe poziomy były wyrównane. W 90. dniu przechowywania, ekstrakt pozorny dla wariantów kontrolnych i testowych pozostawał w zakresie $1,37 \div 1,44$ °Błg, a rzeczywisty w zakresie $3,28 \div 3,42$ °Błg.

Wyjściowa zawartość cukrów redukujących w piwach kontrolnych wynosiła $8,58 \text{ mg/cm}^3$, a w piwach testowych – $13,78 \text{ mg/cm}^3$. Końcowe stężenie cukrów było wyrównane we wszystkich badanych piwach i wynosiło $7,04 \div 7,37 \text{ mg/cm}^3$. Tak więc w przypadku piw testowych wykorzystanie cukrów redukujących było około 5-krotnie wyższe w porównaniu z kontrolą, a największe ich zużycie miało miejsce podczas refermentacji w temperaturze pokojowej. W tym czasie w piwach testowych obserwowano intensywną proliferację komórek (piwo zostało napowietrzone podczas rozlewu ręcznego do butelek), a od 7. dnia – również produkcję etanolu. Chociaż w doświadczeniu nie monitorowano zmian profilu cukrów redukujących, można przypuszczać, że za efekt ten odpowiedzialna była głównie obecna i wprowadzona do piw glukoza. Powszechnie znany jest fakt, że cukier ten jest preferencyjnie asymilowany przez gatunek *Saccharomyces*. Ponadto badania, które prowadzili Pereira de Paula i wsp. [23] nad otrzymywaniem piwa pszenicznego z udziałem *S. boulardii*, wykazały, że asymilacja maltozy jest represjonowana przy stężeniu glukozy powyżej poziomu 8 g/dm^3 . W piwach kontrolnych, do których nie dodano glukozy, odnotowano niewielkie zużycie cukrów redukujących podczas refermentacji. Jednak drożdże, podobnie jak w wariantach testowych, intensywnie namnażały się i produkowały alkohol. Można przypuszczać, że źródłem substratu węglowego w tym przypadku były nie tylko przyswajalne cukry redukujące obecne w piwie, ale drożdże *S. boulardii* mogły wykorzystać również zgromadzony glikogen. Kucharczyk i Tuszyński [17] podają, że w przypadku niedoboru składników odżywczych, wyższa temperatura pobudza przemiany biochemiczne i prowadzi do wzmożonego zużycia substancji zapasowych komórek drożdży, takich jak wspomniany glikogen, mannan, i lipidy. Osłabione komórki drożdży zaczynają rozkładać również inne grupy związków, przemiana materii staje się nieuporządkowana i biomasa ulega autolizie. Ściana komórkowa zostaje zniszczona i składniki cytoplazmy rozpuszczają się powoli w piwie. Zatem hydroliza glikogenu z udziałem enzymów drożdżowych i uwolnienie niewykorzystanej glukozy do środowiska po obumarciu komórek wyjaśniłaby, obserwowany w doświadczeniu, niewielki wzrost poziomu cukrów redukujących w piwach kontrolnych w 60. dniu przechowywania w warunkach chłodniczych (tab. 1).

Tabela 1. Zmiany badanych parametrów piw kontrolnych podczas refermentacji (R) i przechowywania (S)

Table 1. Changes in studied parameters of the control beers during refermentation (R) and storage (S)

Proces / Process	Czas [dzień] / Time [day]	<i>S. boulardii</i> [log kom./cm ³] <i>S. boulardii</i> [log cells/cm ³]	Alkohol [% obj.] / Alcohol [% vol]	Ekstrakt pozorny [°Blg] / Apparent extract [°Blg]	Ekstrakt rzeczywisty [°Blg] / Real extract [°Blg]	pH / pH	Barwa [EBC] / Color [EBC]	Goryczka [IBU] / Bitterness [IBU]	Cukry redukujące [mg/cm ³] / Reducing sugars [mg/cm ³]
K-0,1									
R (22 °C)	0	4,55 ^b ± 0,01	4,64 ^a ± 0,06	1,81 ⁱ ± 0,01	3,67 ^k ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcdefg} ± 0,03	8,58 ^{ef} ± 0,14
	7	4,58 ^b ± 0,03	4,66 ^a ± 0,01	1,86 ^j ± 0,01	3,56 ^l ± 0,01	4,28 ^{klm} ± 0,01	11,16 ^{bcdefg} ± 0,01	15,18 ^{abcdefg} ± 0,25	7,60 ^d ± 0,06
	12	5,72 ^{de} ± 0,05	4,82 ^{bc} ± 0,01	1,58 ^h ± 0,02	3,43 ^{defg} ± 0,02	4,28 ^{klm} ± 0,01	10,99 ^{abcd} ± 0,03	15,29 ^{abcdefg} ± 0,26	6,88 ^{abc} ± 0,00
S (4 °C)	30	5,8 ^{ijk} ± 0,08	4,89 ^{bcd} ± 0,02	1,57 ^h ± 0,01	3,40 ^{defg} ± 0,01	4,27 ^{ijklm} ± 0,01	10,88 ^{ab} ± 0,02	15,42 ^{cdefgh} ± 0,19	6,26 ^a ± 0,06
	60	3,75 ^a ± 0,03	4,95 ^{def} ± 0,00	1,52 ^{efg} ± 0,00	3,33 ^{abcd} ± 0,01	4,22 ^{def} ± 0,01	11,45 ^{gh} ± 0,02	15,42 ^{cdefgh} ± 0,23	7,62 ^d ± 0,10
	90	3,66 ^a ± 0,03	4,97 ^{def} ± 0,02	1,44 ^d ± 0,01	3,35 ^{bcde} ± 0,02	4,26 ^{hijkl} ± 0,01	11,45 ^{gh} ± 0,02	15,61 ^{fgh} ± 0,40	7,37 ^{bcd} ± 0,03
K-0,5									
R (22 °C)	0	4,81 ^{bc} ± 0,02	4,64 ^a ± 0,06	1,81 ⁱ ± 0,01	3,67 ^k ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcdefg} ± 0,03	8,58 ^{ef} ± 0,14
	7	5,22 ^{cde} ± 0,05	4,66 ^a ± 0,01	1,88 ^j ± 0,01	3,58 ^l ± 0,00	4,28 ^{hijkl} ± 0,01	11,19 ^{bcdefg} ± 0,13	15,81 ^{abcdegh} ± 0,10	7,54 ^{cd} ± 0,03
	12	5,84 ^{ijk} ± 0,04	4,79 ^b ± 0,02	1,58 ^h ± 0,01	3,41 ^{defg} ± 0,02	4,27 ^{klm} ± 0,01	11,05 ^{abcde} ± 0,02	15,64 ^f ± 0,40	6,84 ^{ab} ± 0,00
S (4 °C)	30	6,18 ^{lm} ± 0,02	4,82 ^{bc} ± 0,01	1,55 ^{gh} ± 0,01	3,39 ^{cdefg} ± 0,01	4,26 ^{hijkl} ± 0,01	10,88 ^{ab} ± 0,02	15,54 ^h ± 0,21	6,30 ^a ± 0,20
	60	3,65 ^a ± 0,02	4,91 ^{cde} ± 0,01	1,50 ^{ef} ± 0,01	3,32 ^{abcd} ± 0,01	4,21 ^{bcd} ± 0,01	11,33 ^{defgh} ± 0,02	15,68 ^{gh} ± 0,22	7,06 ^{bcd} ± 0,08
	90	3,60 ^a ± 0,03	4,98 ^{def} ± 0,04	1,42 ^{cd} ± 0,01	3,36 ^{bcde} ± 0,03	4,23 ^{cdefg} ± 0,01	11,33 ^{defgh} ± 0,02	15,49 ^{defgh} ± 0,31	7,35 ^{bcd} ± 0,11
K-1,0									
R (22 °C)	0	5,24 ^{cde} ± 0,04	4,64 ^a ± 0,06	1,81 ⁱ ± 0,01	3,67 ^k ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcdefg} ± 0,03	8,58 ^{ef} ± 0,14
	7	5,41 ^{de} ± 0,02	4,60 ^a ± 0,01	1,86 ^j ± 0,02	3,57 ^l ± 0,01	4,26 ^{hijkl} ± 0,01	11,08 ^{abcde} ± 0,02	15,27 ^{abcdefgh} ± 0,04	7,19 ^{bcd} ± 0,15
	12	5,96 ^{hij} ± 0,06	4,82 ^{bc} ± 0,02	1,59 ^h ± 0,00	3,49 ^{gh} ± 0,00	4,26 ^{hijkl} ± 0,01	11,00 ^{abcd} ± 0,02	15,29 ^{abcdefg} ± 0,31	6,88 ^{abc} ± 0,00
S (4 °C)	30	6,22 ^m ± 0,02	4,87 ^{bcd} ± 0,01	1,54 ^{gh} ± 0,01	3,46 ^{fgh} ± 0,01	4,25 ^{ghijk} ± 0,01	10,99 ^{abcd} ± 0,04	15,31 ^{abcdefg} ± 0,28	6,33 ^a ± 1,14
	60	3,56 ^a ± 0,03	4,90 ^{bcde} ± 0,01	1,50 ^{ef} ± 0,01	3,26 ^f ± 0,01	4,21 ^{bcde} ± 0,01	11,46 ^{gh} ± 0,03	14,72 ^{abc} ± 0,26	7,20 ^{bcd} ± 0,25
	90	3,46 ^a ± 0,02	4,97 ^{def} ± 0,03	1,40 ^{bcd} ± 0,00	3,33 ^{abcde} ± 0,02	4,20 ^{bc} ± 0,01	11,46 ^{gh} ± 0,03	14,78 ^a ± 0,41	7,26 ^{bcd} ± 0,04

Objaśnienia: wyniki w tabeli są średnią z czterech powtórzeń; a, b- wyniki różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$ w każdej kolumnie; a – wartość najmniejsza; warianty piw: K-0,1 – 0,1-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii*; K-0,5 – 0,5-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii*; K- 1,0 – 1-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii* / Explanatory notes: results in the table are means from four replications; a, b – represent significant differences at $p < 0.05$ for comparison in each column; a – the lowest value; varieties of beers: K-0.1 – 0.1 % *S. boulardii* inoculum addition; K-0.5 – 0.5 % *S. boulardii* inoculum addition; K-1 – 1 % *S. boulardii* inoculum addition

Tabela 2. Zmiany badanych parametrów piw testowych podczas refermentacji (R) i przechowywania (S)

Table 2. Changes in studied parameters of the tested beers during refermentation (R) and storage (S)

Proces / Process	Czas [dzień] / Time [day]	<i>S. bouldarii</i> [log kom./cm ³] / <i>S. bouldarii</i> [log cells/ml]	Alkohol [% obj.] / Alcohol [% vol.]	Ekstrakt pozorny [°Bgl] / Apparent extract [°Bgl]	Ekstrakt rzeczywisty [°Bgl] / Real extract [°Bgl]	pH / pH	Barwa [EBC] / Color [EBC]	Goryczka [IBU] / Bitterness [IBU]	Cukry redukujące [mg/cm ³] / Reducing sugars [mg/cm ³]
B-0,1									
R (22 °C)	0	4,55 ^b ± 0,01	4,64 ^a ± 0,06	2,81 ⁿ ± 0,00	4,67 ^m ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcde} ± 0,03	13,78 ^j ± 0,08
	7	5,62 ^{ghi} ± 0,05	4,79 ^b ± 0,00	2,36 ^k ± 0,02	4,10 ^l ± 0,02	4,32 ^{no} ± 0,01	11,29 ^{cdefgh} ± 0,07	15,43 ^{cde} ± 0,89	9,46 ⁱ ± 0,40
	12	5,84 ^k ± 0,05	5,32 ⁱ ± 0,03	1,50 ^{ef} ± 0,01	3,68 ^k ± 0,01	4,30 ^{lm} ± 0,00	11,28 ^{cdefg} ± 0,03	15,23 ^{bcd} ± 0,25	8,98 ^{efgh} ± 0,00
S (4 °C)	30	5,78 ^{ghj} ± 0,14	5,31 ⁱ ± 0,02	1,44 ^d ± 0,00	3,55 ^{ij} ± 0,00	4,29 ^{mn} ± 0,01	11,16 ^{bcd} ± 0,03	15,05 ^{bcd} ± 0,20	8,66 ^{ef} ± 0,05
	60	5,71 ^{ghj} ± 0,07	5,29 ^{hi} ± 0,13	1,43 ^d ± 0,01	3,37 ^{bcdef} ± 0,03	4,24 ^{defgh} ± 0,01	12,11 ⁱ ± 0,10	15,64 ^g ± 0,17	7,64 ^d ± 0,11
	90	5,87 ^{ijkl} ± 0,06	5,04 ^f ± 0,09	1,40 ^{bcd} ± 0,01	3,42 ^{efg} ± 0,03	4,09 ^a ± 0,01	12,13 ⁱ ± 0,05	15,45 ^{cde} ± 0,34	7,28 ^{bcd} ± 0,10
B-0,5									
R (22 °C)	0	4,81 ^{bc} ± 0,02	4,64 ^a ± 0,06	2,81 ⁿ ± 0,00	4,67 ^m ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcde} ± 0,03	13,78 ^j ± 0,08
	7	5,22 ^{cde} ± 0,04	4,63 ^a ± 0,03	2,43 ^l ± 0,06	4,13 ^l ± 0,04	4,27 ^{ijklm} ± 0,01	11,03 ^{abcde} ± 0,06	15,43 ^{cde} ± 0,22	9,46 ^{ghi} ± 0,14
	12	5,85 ^{ijk} ± 0,05	5,32 ⁱ ± 0,03	1,54 ^{gh} ± 0,01	3,68 ^k ± 0,01	4,24 ^{cdefgh} ± 0,01	11,00 ^{abcd} ± 0,03	15,22 ^{bcd} ± 0,29	8,64 ^{ef} ± 0,00
S (4 °C)	30	5,86 ^{ijk} ± 0,05	5,33 ⁱ ± 0,02	1,40 ^{bcd} ± 0,01	3,52 ^{hij} ± 0,01	4,29 ^{mn} ± 0,01	10,95 ^{abc} ± 0,02	15,05 ^{bcd} ± 0,33	8,50 ^e ± 0,10
	60	4,54 ^b ± 0,07	5,36 ⁱ ± 0,01	1,33 ^a ± 0,03	3,29 ^{ab} ± 0,01	4,24 ^{cdefgh} ± 0,01	11,61 ^b ± 0,08	15,54 ^{fg} ± 0,43	7,39 ^{bcd} ± 0,38
	90	4,52 ^b ± 0,05	5,02 ^f ± 0,05	1,39 ^{bc} ± 0,01	3,30 ^{abc} ± 0,01	4,10 ^a ± 0,01	11,94 ^{hi} ± 0,07	15,45 ^{cde} ± 0,48	7,04 ^{bcd} ± 0,07
B-1,0									
R (22 °C)	0	5,24 ^{cde} ± 0,04	4,64 ^a ± 0,06	2,81 ⁿ ± 0,00	4,67 ^m ± 0,07	4,33 ^o ± 0,02	13,68 ^j ± 0,05	15,22 ^{abcde} ± 0,13	13,78 ^j ± 0,08
	7	5,46 ^{efg} ± 0,04	4,60 ^a ± 0,01	2,47 ^m ± 0,02	4,16 ^l ± 0,01	4,25 ^{hijkl} ± 0,01	11,03 ^{abcde} ± 0,02	14,92 ^{bcd} ± 0,20	9,46 ^{ghi} ± 0,06
	12	5,90 ^{ijklm} ± 0,03	5,19 ^{gh} ± 0,02	1,52 ^{efg} ± 0,00	3,55 ^{ij} ± 0,01	4,24 ^{cdefgh} ± 0,01	10,98 ^{abcd} ± 0,04	14,92 ± 0,22	8,72 ^{efg} ± 0,00
S (4 °C)	30	6,12 ^{klm} ± 0,04	5,18 ^g ± 0,02	1,43 ^d ± 0,01	3,47 ^{gh} ± 0,00	4,24 ^{cdefgh} ± 0,01	10,72 ^a ± 0,02	14,92 ^b ± 0,42	8,45 ^e ± 0,12
	60	4,93 ^{cd} ± 0,02	5,25 ^{ghi} ± 0,04	1,37 ^{ab} ± 0,01	3,30 ^{abc} ± 0,01	4,19 ^b ± 0,01	11,36 ^{efgh} ± 0,08	14,59 ^{cde} ± 0,25	7,50 ^{cd} ± 0,31
	90	5,15 ^{cd} ± 0,02	5,01 ^{ef} ± 0,02	1,37 ^{ab} ± 0,01	3,28 ^{ab} ± 0,01	4,11 ^a ± 0,01	11,41 ^{fgh} ± 0,06	14,79 ^{bcd} ± 0,21	7,07 ^{bcd} ± 0,03

Objaśnienia: wyniki w tabeli są średnią z czterech powtórzeń; a, b- wyniki różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$ w każdej kolumnie; a – wartość najmniejsza; warianty piw: K-0,1 – 0,1-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii*; K-0,5 – 0,5-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii*; K- 1,0 – 1-procentowy dodatek inokulum *S. boulardii* /

Explanatory notes: results in the table are means from four replications; a, b – represent significant differences at $p < 0.05$ for comparison in each column; a – the lowest value; varieties of beers: K-0.1 – 0.1 % *S. boulardii* inoculum addition; K-0.5 – 0.5 % *S. boulardii* inoculum addition; K-1 – 1 % *S. boulardii* inoculum addition

Wyjściowe pH badanych piw wynosiło 4,33 i podczas refermentacji i przechowywania obniżyło się. Finalne wartości pH piw kontrolnych i testowych różniły się istotnie ($p < 0,05$). W przypadku wariantów kontrolnych wartości pH były na poziomie 4,0, a testowych – 4,2. Podczas refermentacji i przechowywania barwa badanych piw uległa dalszemu wyjaśnieniu i wyniosła $11 \div 12$ EBC. Goryczka piwa podczas refermentacji i przechowywania pozostawała stabilna. Jedynie dla wariantów K-1 i B-1 obniżyła się nieznacznie, choć statystycznie istotnie ($p < 0,05$) odpowiednio od 60. dnia przechowywania i 7 dnia refermentacji.

Wnioski

1. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wskazują, że refermentacja piwa pszenicznego z udziałem drożdży *S. boulardii* – bez względu na wariant (kontrolny, testowy) – pozwala uzyskać produkt o parametrach fizykochemicznych typowych dla stylu [15]. Ponadto wykorzystanie tych drożdży do procesu refermentacji umożliwiło otrzymanie produktu o charakterze probiotyku.
2. Najlepszym wariantem piwa w kontekście przeżywalności *S. boulardii* okazał się B-0,1, tj. piwo szczepione 0,1-procentowym dodatkiem inokulum oraz z dodatkiem glukozy. W piwie tym, liczebność drożdży pozostawała stabilna (w zakresie $5,8 \div 5,5 \log \text{kom./cm}^3$) od 7 dnia refermentacji do 90 dnia przechowywania w warunkach chłodniczych. Wyniki te wskazują, że spożycie $0,5 \text{ dm}^3$ piwa dostarczy do organizmu więcej niż wymagane 10^9 komórek/l drożdży *S. boulardii* [22].
3. Otrzymane piwo zawierające żywe komórki probiotycznych drożdży spełnia oczekiwania współczesnych konsumentów, którzy poszukują bezpiecznych produktów spożywczych o wysokiej jakości żywieniowej, niskim stopniu przetworzenia, utrwalonych w sposób maksymalnie naturalny, a jednocześnie posiadających wartość dodaną – walor prozdrowotny/funkcjonalny wpływający na dobrostan i jakość życia.

Finansowanie

Praca ta została współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich; IV nabór Działanie M16 Współpraca (2021-2023); umowa pomocy nr 00053.DDD.6509.00062.2019.15

Literatura

- [1] Barros B., Iwassa I., Reitenbach A.: Production of functional beer with the addition of probiotic: *Saccharomyces boulardii*. Res. Soc. Dev., 2021, 2(10), 1-12.

- [2] Bruner J., Fox G.: Novel non-*Cerevisiae Saccharomyces* yeast species used in beer and alcoholic beverage fermentations. *Fermentation*, 2020, 6 (116), 1-16.
- [3] Caballero I., Blanco C. A., Porras M.: Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends Food Sci. Technol.*, 2012, 26, 21-30.
- [4] Cao L., Zhou G., Guo, P., Li Y.: Influence of pasteurising intensity on beer flavour stability. *J. Inst. Brew.*, 2011, 117(4), 587-592.
- [5] Capece A., Romaniello R., Pietrafesa A., Siesto G., Pietrafesa R., Zambuto M., Romano P.: Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. *Int. J. Food Microbiol.*, 2018, 284, 22-30.
- [6] de Lima A.C., Brandao L.R., Botelho B.G., Rosa C.A., Aceña L., Mestres M., Boqué R.: Multivariate analysis of the influence of microfiltration and pasteurisation on the quality of beer during its shelf life. *Foods*, 2024, 13, #122.
- [7] Dilmetz B., Desire Ch.T., Meneses J., Klingler-Hoffmann M., Young C., Hoffmann P.: Impact of propagation time on yeast physiology during bottle conditioning of beer on an industrial scale. *Food Chem.*, 2024, 435, #137655.
- [8] EBC Analytica: 9.35:2004. pH of beer.
- [9] EBC Analytica: 9.4:2004. Original, real and apparent extract and original gravity of beer.
- [10] EBC Analytica: 9.46:2007. Decarbonation of beer.
- [11] EBC Analytica: 9.6:2000. Colour of beer: spectrophotometric method (IM).
- [12] EBC Analytica: 9.8: 2020. Bitterness units (BU) of beer (IM).
- [13] Gan Q., Howell J.A., Field R.W., England M.R., Bird M.R., O'Shaughnessy C.L., MeKechinie M.T.: Beer clarification by microfiltration — product quality control and fractionation of particles and macromolecules. *J. Membrane Sci.*, 2001, 194, 185-196.
- [14] Garrido-Mesa J., Algieri F., Rodriguez-Nogales A., Utila P., Rodriguez-Cabezas E., Zarzuelo A., Ocete A., Garrido-Mesa N., Galvez J.: A new therapeutic association to manage relapsing experimental colitis: Doxycycline plus *Saccharomyces boulardii*. *Pharmal. Res.*, 2015, 97, 48-63.
- [15] Kompendium Piwa – style piwne, cechy sensoryczne. Polskie Stowarzyszenie Piwowarów Domowych (PSPD), 2015, [on line], <https://kompendiumpiwa.pl/style-piwa/>
- [16] Kordialik-Bogacka E.: Refermentacja piwa w butelkach - niedoceniana technologia z wielkim potencjałem. *Przem. Ferment. Ow.-Warz.*, 2019, 1 (1-2), 32-34.
- [17] Kucharczyk K., Tuszyński T.: Regulacja temperatury w procesach fermentacji i dojrzewania piwa w tankofermentorze. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2017, 1, 121-127.
- [18] Kunze W.: *Technologia piwa i słodu*. Wyd. Piwochmiel Sp. z o.o., Warszawa 1999
- [19] Liu C., Shen Y., Yin X., Peng L., Li Q.: Influence of pasteurization and microfiltration on beer aging and anti-aging levels, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 72 (4), 285-295.
- [20] Miller L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 1959, 31, 3, 426-428.
- [21] Mulero-Cerezo J., Briz-Redón Á., Serrano-Aroca Á.: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Valuable probiotic starter for craft beer production. *Appl. Sci.*, 2019, 9 (16), #3250.
- [22] Nowak A., Ślizewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 4 (71), 5-19.
- [23] Pereira de Paula B., de Souza Lago H., Firmino L., Lemos Júnior W.J.F., Correa F.D.M, Guerra F.A, Pereira K.S., Coelho Z.M.A.: Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2021, 135, #110233.

- [24] PN-EN ISO 4833-1:2013-12 AP1:2016-11. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów – Część 1: Oznaczanie liczby metodą posiewu wgłębnego w temperaturze 30 °C.
- [25] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C.
- [26] PN-ISO 21527-1:2009. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni.
- [27] Puls Biznesu. 2018. Rośnie rynek żywności funkcjonalnej. Dostępne on-line: <https://www.pb.pl/rosnie-rynek-zywnosci-funkcjonalnej-936774>
- [28] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) NR 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, zmiany rozporządzeń Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1924/2006 i (WE) nr 1925/2006 oraz uchylenia dyrektywy Komisji 87/250/EWG, dyrektywy Rady 90/496/EWG, dyrektywy Komisji 1999/10/WE, dyrektywy 2000/13/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, dyrektyw Komisji 2002/67/WE i 2008/5/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 608/2004. Dz. Urz. UE., L 304/18 z 22.11.2011 r.
- [29] Senkarcinova B., Graa Dias I.A., Nesporek J., Branyik T.: Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. LWT – Food Sci. Technol., 2019, 100, 362-367.
- [30] Vaughan-Martini A., Martini A.: Determination of ethanol production. In.: The Yeast (Fourth Edition). A taxonomic study. Eds. C. P. Kurtzman, J. W. Fell. Elsevier, 1998, 14, pp. 107.
- [31] Wauters R., Herrera-Malaver B., Schreurs M., Bircham P., Cautereels Ch., Cortebeek J., Duffin P.M., Steensels J., Verstrepen K.J.: Novel *Saccharomyces cerevisiae* variants slow down the accumulation of staling aldehydes and improve beer shelf-life. Food Chem., 2023, 398, #133863.

THE USE OF PROBIOTIC YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. *BOULARDII* FOR THE REFERMENTATION OF WHEAT BEER

S u m m a r y

Background. Beer refermentation is a preservation method that involves additional fermentation in a closed container. The condition for refermentation is the presence of fermentable sugars. The process is initiated by brewer's yeast, which is present in beer or added intentionally to it. During refermentation, yeast uses sugars, producing alcohol, and CO₂, and at the same time, oxygen, which is responsible for adverse oxidation changes, is consumed. The aim of this study was to assess the usefulness of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii*) yeast for wheat beer refermentation. Beer was produced using WB-06 yeast, which was then separated by microfiltration. The obtained base beer was poured into bottles and inoculated with *S. boulardii* at three levels: 0.1 %, 0.5 %, 1 %. Glucose was used as substrate for refermentation. The refermentation of test beers prepared in the aforesaid manner was carried out for 12 days at 22 °C, and subsequently, the beers were placed in a cold room for 90 days. Beers without glucose were control. During the refermentation and storage of beers, *S. boulardii* number and physicochemical parameters (alcohol, apparent and real extract, pH, color, bitterness, reducing sugars) were controlled.

Results and conclusions. The results achieved indicate that refermentation of wheat beer with *S. boulardii* allows to obtain a product with physicochemical parameters typical of the style. Moreover, the use of this yeast in the refermentation process made it possible to obtain a product having probiotic characteristics. It was demonstrated that the best beer variant in terms of the survival of *S. boulardii* was B-0.1, i.e.

beer inoculated with 0.1 % yeast inoculum and a glucose addition. In this beer, the yeast number remained stable ($5.8 \div 5.9 \log \text{ cell/cm}^3$) from the 7th day of refermentation to the 90th day of cold storage.

Key words: *Saccharomyces boulardii*, probiotic yeast, functional beer, wheat beer, refermentation 