

VPLIV DODATKA AROMAZYME NA GLUKOZIDAZNO AKTIVNOST

Gašper KORAT¹, Petra TERPINC², Iztok Jože KOŠIR³ in Miha OCVIRK⁴

Strokovni članek / Professional article

Prispelo / Arrived: 24. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 28. 11. 2024

Izvleček

Med fermentacijo piva ima uporabljen kvas sposobnost proizvajati encim glukozidazo, kot enega izmed stranskih produktov fermentacije. Encim glukozidaza iz glikozidno vezanih aromatičnih spojin v pivu lahko sprosti določene monoterpenke alkohole, kar vodi v spremembo arome piva. Količina proizvedenega encima glukozidaze se močno razlikuje glede na sev uporabljenih kvasovk, različne temperature fermentacije in druge variabilne parametre fermentacije. Namen raziskave je bil dobiti vpogled v glikozidazno aktivnost v pivu ob dodatku encima glukozidaze. Ugotovili smo, se ob dodatku ABV Aromazyme poveča glukozidazna aktivnost v pivu, kar lahko ima za posledico povišan izkoristek ekstrakcije aromatičnih spojin iz hmelja v pivo.

Ključne besede: fermentacija, ABV Aromazyme, beta-glukozidaza, Fluorescenčna spektroskopija

EFFECT OF AROMAZYME ADDITION ON GLUCOSIDASE ACTIVITY

Abstract

During beer fermentation, the yeast used itself has the ability to produce the enzyme glucosidase, as one of the fermentation byproducts. The enzyme glucosidase from the glycosidically bound in aromatic compounds in beer can release certain monoterpene alcohols, resulting in a change in beer aroma. The amount of glucosidase enzyme produced in fermentation varies greatly depending on the yeast strain used, different fermentation temperatures and other variable fermentation parameters. We found out, that the addition of ABV Aromazyme increases the glucosidase activity in beer, which can result in an increased efficiency of extraction yield of aromatic compounds from hops into beer.

Key words: fermentation, ABV Aromazyme, beta-glucosydase, Fluorescence Spectrophotometry

¹ Mag. inž. živil., Biotehniška Fakulteta (BF), Univerza v Ljubljani

² Doc.dr. univ. dipl. inž. živil., BF, e-pošta: petra.terpinc@bf.uni-lj.si

³ Dr. univ. dipl. kem. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

⁴ Dr. univ. dipl. inž. kem. tehnol., IHPS, e-pošta: miha.ocvirk@ihps.si

1 UVOD

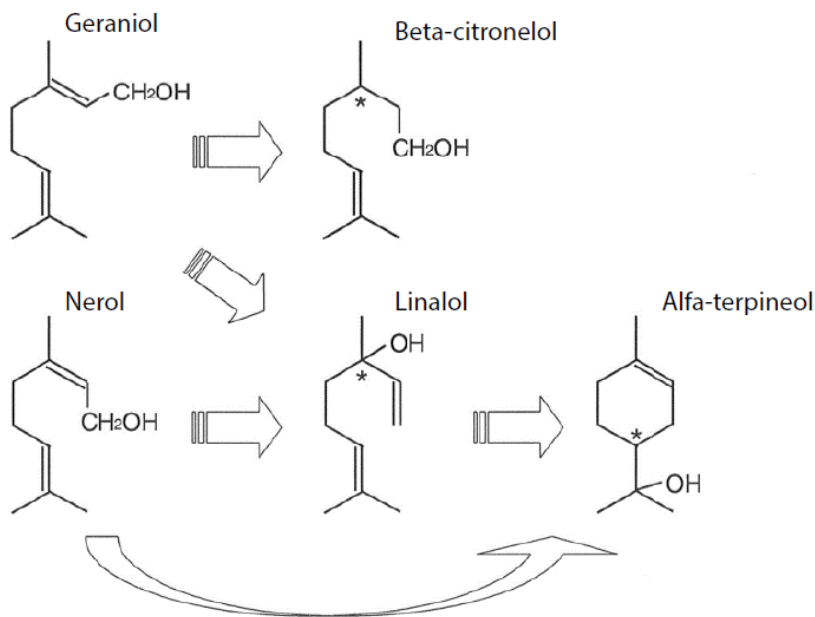
Hmeljna aroma velja za kompleksno aromo, ki jo predstavljajo majhne koncentracije več kot tisoč različnih aromatičnih spojin (Roberts in sod., 2004). Te spojine med sabo delujejo sinergistično, kar pomeni da morajo biti komponente eteričnega olja v določenih razmerjih ena proti drugi (Korat, 2024). Pivovar lahko na končno aromo piva vpliva tudi z različnimi tehnikami in režimi hmeljenja piva (Keukeleire in sod., 2000). Močno hmeljena piva zgornjega vrenja, kot sta npr. pale ale in indian pale ale, so v zadnjem desetletju postala med najbolj priljubljenimi pivi malih pivovarjev. V pivovarstvu se je ravno zaradi teh stilov piva uveljavila nova metoda hmeljenja piva, t.i. hladno hmeljenje, kjer gre za dodajanje hmelja med ali po fermentaciji, ne pa med varjenjem sladice (Cisowska in sod., 2019). To omogoča izločanje aromatičnih spojin na drugačen način in posledično prinaša edinstvene bolj poudarjene, aromatične značilnosti piva. Sorta hmelja in njen specifični aromatični profil pa ni edini dejavnik, ki vpliva na končno aromo piva (Roberts, 2016). Drugi ključni dejavniki, ki imajo vpliv na aromo piva so tudi izbira kvasa, temperatura fermentacije, čas hladnega hmeljenja, oblika hmeljnih pripravkov in souporaba novejših pripravkov oz. dodatkov, ki se uporabljajo z namenom izboljšanja arome.

Pripravek ABV Aromazyme, (Lallemand, Kanada) pridobljen iz izbranega seva glive *Aspergillus niger* vsebuje encim glukozidazo, ki ima pomembno vlogo v procesu hladnega hmeljenja (Technical data sheet, 2020). Pivovarski kvas je sicer sam sposoben med fermentacijo proizvajati encim glukozidaze, kot stranski produkt, vendar ker se količina encima razlikuje glede seva kvasovk, različne temperature fermentacije. Zato je otežen nadzor nad vsebnostjo encima in stopnjo biotransformacij aromatičnih spojin, kjer gre za kemijske spremembe spojin v njihove derivate, ki imajo drugačne lastnosti (Korat, 2024). Takšna tehnika izboljšanja arome, je že vrsto let običajna praksa vinarjev, kjer se dodaja encim pektinaze, z močno aktivnostjo beta-glukozidaze. Uporabljajo se pri vinih, za sproščanje vezanih arom (sekundarnih arom) v mladem vinu.

Biotransformacije so z vidika pivovarstva lahko zanimive iz več razlogov, eden najpomembnejših je povečanje koncentracije aromatičnih spojin v pivu. Te komponente se pred biotransformacijo največkrat pojavljajo vezane na osnovno surovino, torej hmelj. S sprostitvijo teh komponent preko biotransformacije dobimo nove arome in pa prekursorje za nadaljnjo biotransformacijo (Svedlund in sod., 2022). Ker predstavlja hmelj velik del stroška osnovnih surovin piva, so biotransformacije lahko zanimive tudi iz ekonomskega in ekološkega vidika (Korat, 2024).

Beta glukozidaza iz glikozidno vezanih aromatičnih spojin v pivu lahko sprosti določene monoterpenske alkohole, kar spremeni aromo piva, predvsem v smislu nesorazmerja med vsebnostjo in sestavo komponent eteričnega olja v hmelju in potem v končnem pivu, kar pomeni, da določeni monoterpenški alkoholi, ki so prisotni v pivu ne izvirajo iz hmelja uporabljenega v procesu varjenja piva, ampak so posledica biotransformacij med fermentacijo piva (Klimczak in Cioch-Skoneczny, 2022). Glikozid je komponenta, ki je kemijsko vezana z molekulo

sladkorja s t.i. glikozidno vezjo. V hmelju so hmeljne aromatične spojine z glikozidno vezjo vezane na proste sladkorje v pivu. Proces sprostitve teh spojin, ki v t.i. glikozidu niso hlapne se imenuje hidroliza. Med takšne monoterpenske alkohole spadajo linalol, geraniol, beta-citronelol in tudi alfa-terpineol (Xiayou in sod., 2023). Poleg encima beta-glukozidaze se v pivu pojavlja še veliko drugih encimov, katerih vir so večinoma metabolični produkti kvasovk. Ti encimi katalizirajo druge reakcije in biotransformacije, katerih vpliv na aromo piva še ni povsem raziskan. V zadnjem obdobju obstaja več raziskav, kjer so ugotovili, da se biotransformacije terpenov kot stranski produkt alkoholnega vrenja dogajajo v mitohondrijskih kvasovk in je tesno povezana s presnovo leucina. (Carrau in sodelavci, 2005, Forster in sodelavci, 2014, Haslbeck in sodelavci 2018). Ena bolj znanih takšnih biotransformacij je pretvorba geraniola v beta-citronelol in naprej v linalol ter alfa-terpineol (Slika 1) (King in Dickinson, 2000) s pomočjo encima geraniol dihidrogenaza (Singh-Sangwan in sodelavci, 1993). Biotransformacije so torej poleg izomerizacije alfa-kislin ena najpomembnejših kemijskih reakcij v pivovarstvu saj imajo odločujoč vpliv ne samo na končno aromo piva, ampak tudi na potrošnikovo sprejemanje določenega tipa piva



Slika 1: Biotransformacijske poti geraniola (Takoi in sod., 2016)

Namen raziskave je bil preveriti vpliv koncentracije encimskega pripravka na skupno beta-glukozidazno aktivnost vzorca piva in s tem ugotoviti smiselnost uporabe pripravka Aromazyme.

2 METODE DELA

Izvedli smo pet modelnih fermentacij, pri katerih smo preko fluorimetrične analize določali aktivnost encima beta-glukozidaze.

2.1 Priprava piva

Osnovno pivino smo zvarili v pivovarni Omnivar (Ljubljana, Slovenija) po njihovem receptu, zato zaradi zaščite interesov podjetja, posamezne podrobnosti v predstavljenem delu ne bodo predstavljene. Vsi poskusi in analize so bili izvedeni na isti šarži osnovne pivine. Pivina je bila odvzeta neposredno po hlajenju in zamrznjena do začetka eksperimenta. Pred začetkom poskusa smo jo odmrznili in shomogenizirali. Steklene fermentacijske posode (500 mL) smo pred uporabo razkužili z uporabo razkužila. V vsako fermentacijsko posodo smo z merilnim valjem odmerili 450 mL pivine in namestili vrelo veho, s čimer smo onemogočili vstop mikroorganizmom in omogočili prost izhod CO₂. V dve ločeni laboratorijski čaši smo na analitski tehtnici AB204-S (Mettler Toledo) zatehtali 11 g liofiliziranih kvasovk po navodilih proizvajalca. Uporabili smo liofilizirane kvasovke BRY-97™ (Lallemand, Kanada). Po 3 dneh fermentacije smo dodali encimski pripravek Aromazyme (Lallemand, Kanada). Slednjega smo najprej aktivirali tako, da smo ga razredčili v 10-kratni količini vnaprej pripravljene, prevrete in ohlajene vode in ga nato dodali v fermentacijske posode v štirih različnih koncentracijah: 0 g/hL, 2,5 g/hL, 5 g/hL, 7,5 g/hL oz 10 g/hL piva (priporočeno 5 g/hL). Med fermentacijo smo iz vsake vrele steklenice v treh rednih intervalih, takoj ob dodatku pripravka ter po 24 h in 48 h odvzeli 0,5 mL vzorca piva in ga shranili v zamrzovalniku do izvedbe analiz določanja beta-glukozidazne aktivnosti (Korat, 2024).

2.2 Določanje Beta-glukozidazne aktivnosti

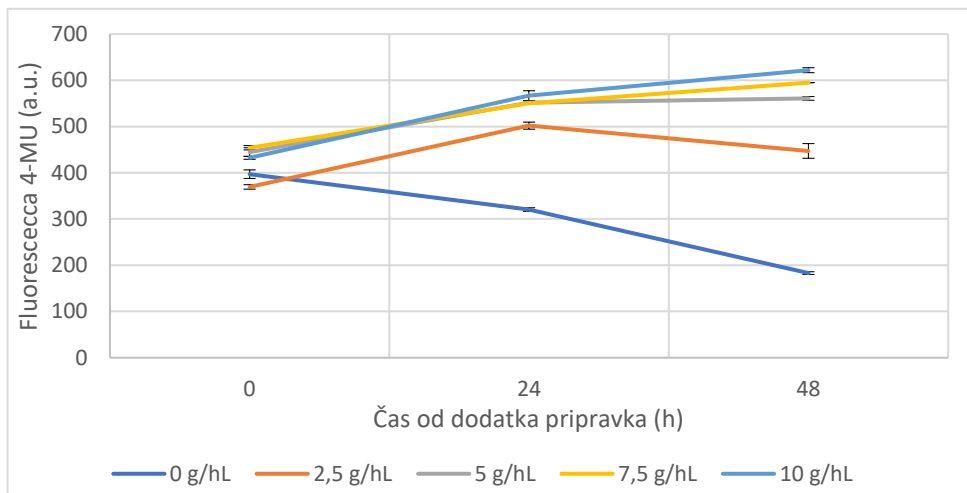
Pripravljene vzorce – skupaj 15, smo najprej temperirali na sobno temperaturo. Med tem smo pripravili reagent, 1 mM raztopino 4-metilumbeliferil β-D-glukopiranozid (4-MUG) (Sigma-Aldrich, Nemčija), ki je služil kot substrat za encim beta-glukozidazo. S pomočjo encima se 4-MUG pretvori v fluorescirajoč produkt 4-metilumbeliferil (4-MU), ki ga lahko detektiramo s fluorimetrom. Večja kot je beta-glukozidazna aktivnost, višja je fluorescenca vzorca, ker je nastalo več produkta (Caymanchem, 2024).

Za zaustavitev reakcije smo uporabili 0,5 M natrijev karbonat (Na₂CO₃, Merck, Nemčija). V vsako epico z 0,5 mL vzorca smo dodali 0,5 mL reagenta 4-MUG in reakcijsko zmes 1 h inkubirali pri 37 °C v vodni kopeli WB - 30 (Kambič, Slovenija). Po 1 h smo v vse epice dodali 0,5 mL Na₂CO₃, da smo zaustavili delovanje encima. Vzorec smo nato centrifugirali 5 min pri 15000 vrt./min. na centrifugi Eppendorf 5424 R (Eppendorf, Nemčija). Odpipetirali smo 1 mL supernatanta v fluorimeterske kivete, v katere smo pred meritvijo dodali še 1,5 mL miliQ vode.

Fluorescenca smo merili na fluorescenčnem spektrofotometru Cary Eclipse (Varian, ZDA). Meritve smo izvedli pri napetosti 500 V in vzbujevalni valovni dolžini 365 nm ter emisijski valovni dolžini 445 nm. Vsako meritev smo izvedli v 2 paralelkah.

3 REZULTATI

V poskusu smo želeli preveriti vpliv koncentracije encimskega pripravka na skupno beta-glukozidazno aktivnost vzorca, pri čemer je večja učinkovitost encima sovpadala z večjo fluorescenco vzorca. Vir encima so predstavljale tako kvasovke kot pripravek Aromazyme. Iz slike 2, lahko vidimo, da so si znotraj vzorcev, fermentiranih z istimi kvasovkami začetne vrednosti fluorescenc takoj ob dodatku encima podobne. Po 24h in 48h od začetka vzorčenja opazimo pri vzorcih brez dodatka encima padec glukozidazne aktivnosti. Razlog za takšno obliko diagrama je, da je fermentacija potekala že 3 dni pred vzorčenjem in se je ob prvem vzorčenju - točka 0h najverjetneje že začela upočasnjevati. Iz predstavljenega lahko sklepamo, da kvasovke več encima beta-glukozidaze izločajo v prvem delu fermentacije, tj. v fazi, ko se število kvasnih celic eksponentno povečuje, torej v tako imenovani log fazi, ko je njihova aktivnost na vrhuncu (Zhang in sod., 2021). Takrat je tudi poraba sladkorja in posledično tvorba etanola, CO₂ in aromatičnih (estri in ostali višji alkoholi) spojin najbolj intenzivna (Klimczak in Cioch, 2022).



Slika 2: Grafični prikaz časovne odvisnosti in koncentracije dodanega pripravka Aromazyme na intenziteto fluorescence 4-MU s standardnim odmikom.

Po 24 h od dodatka 2,5 g/hL encima, intenziteta izmerjene fluorescence (a.u. - arbitrary units) ne sledi trendu vzorcev z višjim dodatkom encima Aromazyme, ampak trendu vzorcev brez dodatka le tega, tako se glukozidazna aktivnost vzorcev z najnižjim dodatkom encima po 48h celo zniža v primerjavi z glukozidazno aktivnostjo izmerjeno po 24h. Polovičen dodatek priporočene količine pripravka ima torej manjšo vlogo kot lastna proizvodnja encima s strani kvasovk. Ob večjem dodatku pripravka se aktivnost čez 24 h poveča, vendar je

relativna razlika med dodatkom 5 g/hL ali 10 g/hL priprava le okoli 10 %. Nekoliko večji relativni porasti aktivnosti so opazni pri vzorcih, kjer je 1 hL piva vseboval 5 g Aromazyme-a je bila ta 70 % (primerjava 0 g/hL in 5 g/hL) (Korat, 2024).

Preglednica 1: Tabelarni prikaz spreminjanja fluorescence 4-MU v odvisnosti od količine ABV Aromazyme in časa izpostavljenosti.

	fluorescenca 4-MU (a.u.)		
količina encima	0h	24h	48h
0 g/hL	396,9 ± 9,1	320,4 ± 3,8	183,0 ± 2,9
2,5 g/hL	369,4 ± 4,7	502,1 ± 7,6	447,2 ± 15,8
5 g/hL	444,7 ± 9,4	551,4 ± 0,9	560,9 ± 3,9
7,5 g/hL	454,1 ± 4,9	550,6 ± 0,3	594,9 ± 0,6
10 g/hL	432,4 ± 3,3	566,7 ± 10,1	621,8 ± 5,4

Po 48 h se razlike med dodatkom različnih količin encima le opazijo. Večji dodatek vodi v nadaljnjo rast aktivnosti, medtem ko se pri manjšem dodatku aktivnost začne počasi nižati. Aktivnost pri BRV-97 kvasovkah po 48 h so bile pri vseh dodatkih nad 5 g/hL višje kot pri 24h. uporaba encimskega pripravka pri koncentraciji 10 g/hL ne nakazuje 2-krat večje aktivnosti kot 5 g/hL, porast je zgolj minimalen (Slika 2).

4 ZAKLJUČEK

Iz poskusa smo ugotovili, da dodatek pripravka ABV Aromazyme dejansko poveča glukozidazno aktivnost, vendar pa je aktivnost močno pogojena z vrsto kvasovk in samim potekom fermentacije Kumar in sod. (2023), kar ima lahko za posledico povečan izkoristek fermentacije in s tem tvorbo aromatičnih spojin, ki lahko imajo odločujoč vpliv na aromo piva. Iz predstavljenih rezultatov sledi, da višji kot je dodatek pripravka Aromazyme v pivo, višja je glukozidazna aktivnost. Kot nadaljevanje predstavljenega eksperimenta imamo v planu v obstoječih vzorcih piva posneti t.i. aromagrame z uporabo plinske kromatografije sklopljene z masno selektivnim detektorjem (GC-MS), z namenom ugotoviti ali višja vsebnost dodatka ABV Aromazyme vpliva na višje koncentracije hmeljnih eteričnih olj v pivu in posledično na aromo piva.

5 VIRI

- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., & Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 107–115
- Caymanchem. 2024. 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranoside, ZDA, Cayman chemicals
- Cisowska K. J., Powalowska D. S., Szczepaniak O., Kmiecki D., Przeor M., Michalowska A. G., Piontek J. C., Kogut M. S., Szulc P. (2019). Composition and in vitro effects of cultivars of *Humulus lupulus* L. hops on cholinesterase activity and microbial growth. *Nutrients*, 11, 1377

- Forster, A., Gahr, A., & Opstaele, F. (2014). On the transfer rate of geraniol with dry hopping. *BrewingScience*, 67, 60
- Haslbeck, K., Bub, S., von Kamp, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., & Coelhan, M. (2018). The influence of brewing yeast strains on monoterpene alcohols and esters contributing to the citrus flavour of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 403–415
- Keukeleire D. D. Fundamentals of beer and hop chemistry. Belgija, Fakulteta za farmacija. 2000
- King A. J., Dickinson R. (2003). Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Research*, vol 3, 53-62
- Klimczak K., Cioch S. M. (2022). Application of Kveik yeasts for beer production. *Advances in Food Processing Technology*: 200-206
- Klimczak K., Cioch S. M. (2022). Biotransformation of hops-derived compounds in beer – a review, *Acta universitatis cibiniensis series e: food technology 1*: Vol. 26, 1-13
- Kumar A., Warburton A., Silcock P., Bremer P. J., Eyres G. T. (2023). Yeast strain influences the hop-derived sensory properties and volatile composition of beer. *Foods*, 12, 5: 1064
- Pangzhen Z., Ruige Z., Sameera S., Renyou G., Zhongxiang F. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review, *Food Microbiology*, vol 100
- Roberts T.R. (2016). Hops. V: Brewing materials and processes. Bamforth C. W. ZDA. Academic Press, 47-75
- Roberts, M.T., Dufour J.P., Lewis A.C., (2004). Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC/GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *Journal of Separation Science*, 27, 473-478
- Svedlund N., Evering S., Gibson B., Krogerus K. (2022). Fruits of their labour: biotransformation reactions of yeasts during brewery fermentation. *Appl Microbio Biotechnol*, 106: 4929-4944
- Takoi K., Itoga Y., Takayanagi J., Matsumoto I. and Nakayama Y. (2016). Control of hop aroma impression of beer with blend-hopping using geraniol-rich hop and new hypothesis of synergy among hop-derived flavour compounds. *Brewing Science*, 69: 85-93
- Technical Data Sheet. ABV Aromazyme. Montreal, Lallemand Inc.: 2 str, 2020.
- Xiaoyu H., Qiuxing Q., Chenyu L., Xiaoxuan Z., Fangxu S., Mengjiao A., Ying C., Xiuqin W., Weidong H., Jicheng Z., Yilin Y. (2023). Application of non-Saccharomyces yeasts with high β -glucosidase activity to enhance terpene-related floral flavor in craft beer. *Food Chemistry*, 404, B: 134726