



Politechnika Wroclawska

Produkcja piwa o obniżonej zawartości alkoholu

Autor: mgr inż. Mateusz Jackowski

Promotor: prof. dr hab. inż. Anna Trusek

Wrocław 2023

Spis treści

I Wstęp	3
II Przegląd Piśmiennictwa	5
1. Czym jest piwo?	5
1.1 Historia piwa	5
1.2 . Podstawowe surowce piwowarskie: woda, sód, drożdże, chmiel	11
1.3 . Proces produkcji piwa	27
2. Piwo w Polsce i na świecie	38
3. Walory zdrowotne piwa	45
4. Piwo bezalkoholowe i wymagania mu stawiane.....	49
5. Metody produkcji piwa bezalkoholowego	50
5.1 Metody fizyczne	50
5.2 Metody biologiczne	55
6. Podsumowanie wstępu teoretycznego.....	60
III Cel pracy.....	61
IV Materiały i metodyka.....	63
1. Materiały.....	63
2. Aparatura	63
3. Metody.....	65
4. Metody analityczne.....	74
V Wyniki	81
5.1. Metody biologiczne zmniejszające ilość alkoholu w piwie	81
5.1.1 Zmiana reżimu zacierania.....	81
5.1.2 Przerwana fermentacja	87
5.1.3 Proces zimnego kontaktu.....	89
5.1.4 Fermentacja brzezki o zmniejszonej ilości cukrów fermentowalnych metodą zimnego kontaktu	92
5.1.5 Fermentacja z wykorzystaniem szczepu <i>Monascus ruber</i>	94
5.1.6 Fermentacja z wykorzystaniem szczepu <i>Saccharomyces ludwigii</i>	98
5.1.7 Kofermentacja z wykorzystaniem szczepów <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i <i>Lactobacillus brevis</i>	102
5.1.8 Produkcja niefermentowanego substytutu piwa.....	105
5.2 Procesy separacji etanolu z piwa	106
5.2.1 Perwaporacja	106
5.2.2 Destylacja prosta.....	111
5.2.3 Rektyfikacja okresowa.....	113

5.2.4	Destylacja próżniowa.....	115
5.2.4.1	Destylacja prowadzona pod ciśnieniem 150 mbar.....	115
5.2.4.2	Destylacja prowadzona pod ciśnieniem 90 mbar.....	117
VI	Podsumowanie i wnioski.....	121
VII	Spis oznaczeń.....	125
VIII	Spis ilustracji.....	125
IX	Spis tabel.....	128
X	Literatura.....	129
X	Materiały dodatkowe.....	146

I Wstęp

Piwo jest napojem towarzyszącym ludzkości od tysięcy lat. Wraz z rozwojem cywilizacji doszło do licznych zmian w technologii produkcji piwa, jak i w oczekiwaniach konsumentów. Obecnie w Europie działa ponad 12000 browarów wytwarzających ponad 300 mln hl piwa rocznie. Statystyczny Europejczyk spożywa ponad 60 litrów piwa rocznie. Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat zaobserwowano zmianę w upodobaniu konsumentów do alkoholu.

W większości europejskich krajów mocne alkohole takie jak wódka i inne destylaty ustępują miejsca na rynku słabszym alkoholom takim jak wino i piwo. W przypadku piwa spożycie utrzymuje się na stałym poziomie choć zmieniają się rodzaje spożywanych napojów. Największy spadek w ostatnich latach odnotował segment piw mocnych, zaś największy wzrost zaobserwowano wśród piw bezalkoholowych [1]. Za tymi zmianami stoją liczne kampanie i akcje społeczne promujące zdrowy tryb życia. Branża piwowarska stanęła przed poważnym wyzwaniem związanym z produkcją piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Obecnie w większości krajów na świecie piwo bezalkoholowe to napój, w którym zawartość etanolu nie przekracza 0,5% obj. chociaż znane są kraje, w których dopuszczalna zawartość alkoholu wynosi 1% obj. czy nawet 1,2% obj.

Piwo bezalkoholowe to najtrudniejszy w produkcji gatunek piwa, na który zapotrzebowanie stale rośnie. Obecnie każdy duży browar stara się mieć w swoim portfolio przynajmniej jedno piwo bezalkoholowe. Dodatkowo liczne browary rzemieślnicze i regionalne starają się konkurować z dużymi graczami w segmencie piw bezalkoholowych. Piwo o obniżonej zawartości alkoholu może być wyprodukowane na dwa sposoby: poprzez usunięcie etanolu z gotowego piwa oraz prowadząc proces produkcji piwa tak aby nie dopuścić do wytworzenia alkoholu. Bez względu na obraną strategię produkcji piwa bezalkoholowego należy się liczyć z tym, że otrzymany produkt będzie różnił się pod względem organoleptycznym od swojego alkoholowego odpowiednika. W przypadku usuwania etanolu ciężko jest selektywnie usunąć wyłącznie etanol bez odbierania pozostałych związków lotnych odpowiadających za smak produktu. Natomiast ingerując w proces produkcji można spodziewać się, że bukiet smakowy piwa nie zostanie właściwie zbudowany. Przedstawiona praca podchodzi do tematu produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu w sposób interdyscyplinarny łącząc wiedzę z inżynierii chemicznej, biotechnologii, technologii żywności i mikrobiologii. Praca ma na celu dokonanie ewaluacji najbardziej popularnych metod produkcji omawianego napoju oraz zaproponowanie i porównanie nowatorskich sposobów z obecnie znanymi.

Pierwsza część pracy składa się ze wstępu teoretycznego opracowanego na podstawie dostępnego piśmiennictwa w omawianym temacie.

Na początku przybliżono w skrócie historię piwa, ze szczególnym uwzględnieniem technologii produkcji zmieniającej się na przestrzeni wieków. Następnie zdefiniowano czym jest piwo oraz omówiono podstawowe surowce browarnicze: wodę, sód, drożdże i chmiel. W dalszej części opisano proces produkcji piwa.

W kolejnym podrozdziale opisano jak kształtuje się rynek piwa w Polsce, w Europie i na świecie. Omówiono największych graczy na rynku piwa, podano jak w ostatnich latach zmieniała się ilość działających browarów, wielkość produkcji piwa oraz jego spożycie per capita.

Następnie przedstawiono walory zdrowotne piwa. Opisano wartość kaloryczną piwa, zawartość minerałów i witamin. Wskazano na liczne związki organiczne dodatkowo wpływające na zdrowie człowieka. Wśród nich skupiono się na witaminach (głównie z gr B) i polifenolach, które wykazują działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne. Znaczną część tego fragmentu poświęcono głównej toksynie obecnej w piwie, czyli alkoholowi etylowemu. Zwrócono uwagę na jego negatywny jak i pozytywny wpływ na organizm człowieka.

W dalszej części skupiono się na definicji piwa bezalkoholowego. Zwrócono uwagę na prawne obostrzenia dotyczące piw bezalkoholowych w Polsce i na świecie.

Na koniec wstępu teoretycznego omówiono obecnie stosowane metody produkcji piw bezalkoholowych z uwzględnieniem podziału na dwa rodzaje. Pierwszym są metody fizyczne polegające na usuwaniu alkoholu ze standardowego piwa. Drugim są metody biologiczne ingerujące w biochemię procesu tak, aby nie dopuścić do wytworzenia znacznych ilości etanolu.

W drugiej części pracy omówiono szczegółowo jej cel oraz opisano procedury wykonania eksperymentów. Scharakteryzowano metody ewaluacji jakości otrzymanych produktów. W celu oceny jakości posłużono się metodami instrumentalnymi, które miały na celu wyznaczenia parametrów próbek. Dodatkowo wykonano testy organoleptyczne mające na celu określić na ile dany produkt jest akceptowalny przez potencjalnych konsumentów.

W trzeciej części przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań. Wśród nich były metody fizyczne takie jak destylacja, rektyfikacja, destylacja pod obniżonym ciśnieniem oraz perwaporacja. Badane metody biologiczne to przerwana fermentacja, zmiany reżimu zacierania, proces zimnego kontaktu, użycie alternatywnych mikroorganizmów oraz produkcja niefermentowanego substytutu piwa.

Pracę zwięźcza podsumowanie zawierające porównanie badanych metod oraz dyskusję nad pozytywnymi i negatywnymi aspektami ich stosowania.

Praca może być wartościowa dla przemysłu browarniczego gdyż opisuje obecny stan badań i w jednolity sposób porównuje aktualne metody produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu z metodami nowatorskimi przedstawionymi w tej pracy. Podsumowanie i wnioski mogą być użyteczne dla browarów planujących wprowadzić do swojej oferty piwa o obniżonej zawartości alkoholu.

II Przegląd Piśmiennictwa

1. Czym jest piwo?

1.1 Historia piwa

Najstarsze ślady mogące świadczyć o produkcji piwa pochodzą z epoki neolitu. Odkryte zostały na stanowisku archeologicznym Göbekli Tepe znajdującym się w południowo - wschodniej Turcji w pobliżu granicy z Syrią [2]. Natrafiono tam na wapienne koryta o pojemności około 160 litrów, z których pobrano osad do analizy. Badania wykazały, że w skład osadu wchodziły szczawiany, czyli związki powstające między innymi podczas namaczania, zacierania i fermentacji zbóż [3], [4]. Ponadto naukowcom udało się odtworzyć, dzięki znaleziskom z wykopalisk, prawdopodobną technologię produkcji neolitycznego piwa [5]. Göbekli Tepe nie było typową osadą mieszkalną, lecz bardziej miejscem kultu odwiedzanym przez mieszkańców okolicznych osad. Badacze snują przypuszczenia, że w tym miejscu lokalne ludy między innymi przetwarzały zebrane zboża na napój - protoplastę współczesnego piwa [2].

W epoce brązu piwowarstwo stało się ważnym aspektem działalności człowieka. W szczególności na Bliskim Wschodzie i w delcie Nilu, gdzie potężne cywilizacje Mezopotamii i Egiptu rozwinęły browarnictwo do skali, jak na ówczesne standardy, przemysłowej [6]. Sumerowie wytwarzali piwo w wyspecjalizowanych zakładach, zaś produkcja była częściowo kontrolowana przez władzę [7]. W Babilonii omawiany napój był na tyle kluczowym produktem, że nawet w najbardziej znanym kodeksie prawa babilońskiego - kodeksie Hammurabiego - znalazły się paragrafy regulujące ceny i zasady wyszynku piwa oraz prowadzenia karczm [8]. Ponadto odkrycia archeologiczne wskazują na to, że nawet w Grecji epoki brązu piwo mogło być znane i wytwarzane [9]. Dzięki przekazom pisanim, malowidłom jak i odkryciom archeologicznym takim jak bogato zdobione i wyposażone groby czy ruiny zakładów produkcyjnych, najwięcej wiemy o piwowarstwie egipskim.

Piwo pełniło ważną rolę w starożytnym Egipcie, gdyż było pożywnym i orzeźwiającym napojem. Dodatkowo często piwem płacono za wykonywane prace, tak jak budowniczym piramid, którym przysługiwało kilka litrów piwa dziennie. Ponadto wspomniany napój odgrywał ważną rolę podczas celebracji religijnych, tak jak podczas celebracji bogini Hathor [10]. Sukcesywnie publikowane są informacje o kolejnych związanych z produkcją piwa znaleziskach z Egiptu. Jednym z niedawnych odkryć jest egipski browar w Abydos. Jego wiek szacuje się na około 5000 lat, co czyni z niego prawdopodobnie najstarszy znany browar pozwalający na masową produkcję piwa, ponieważ jego wydajność oszacowano na ponad 22 tys. litrów [11]. Równie istotnym stanowiskiem jest odkryty przez polskich archeologów w Tell el-Farcha browar, który również datowany jest na około 5000 lat. Mimo że nie jest

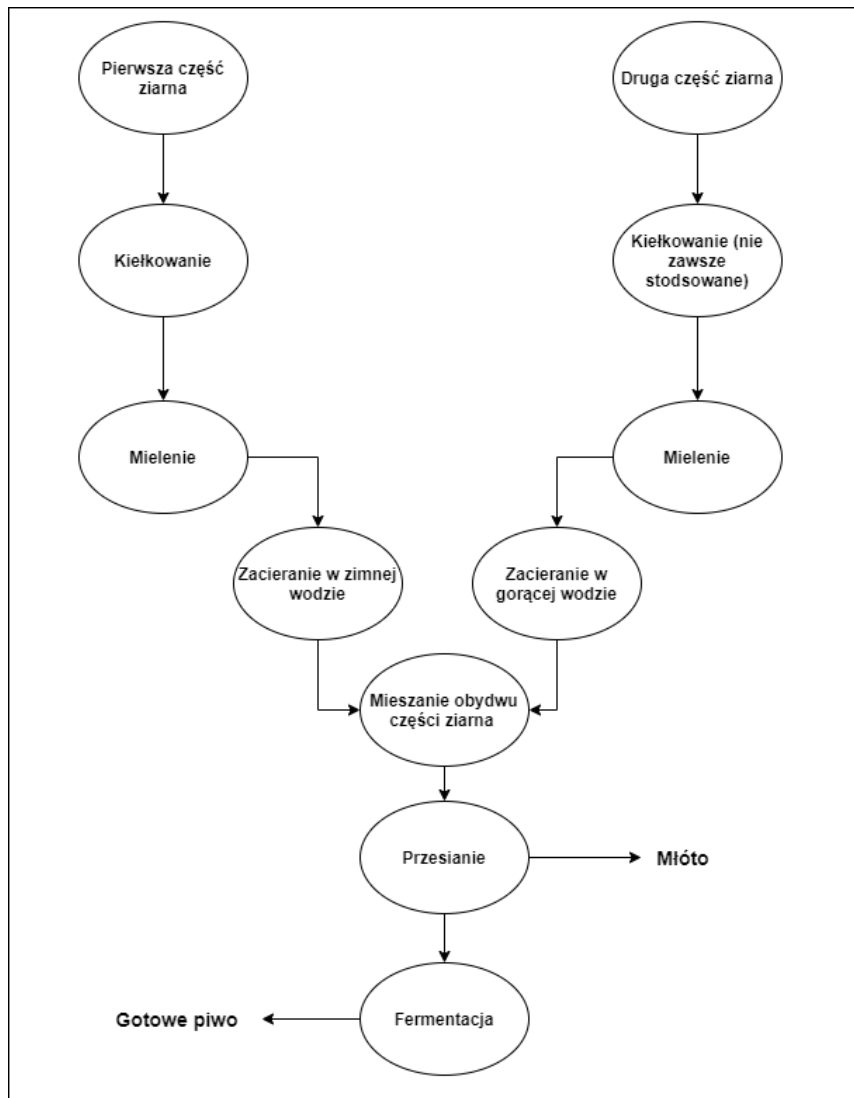
tak okazały jak ten z Abydos, to jego architektura i zastosowana technologia świadczą o tym, że w czasie eksploatacji był to zaawansowany zakład produkcyjny o wysokich standardach (Rysunek 1) [12].



Rysunek 1. Antyczny model egipskiego browaru. Ekspонат ze zbiorów Ermitażu.

Do produkcji piwa w starożytnym Egipcie wykorzystywano przede wszystkim pszenicę płaskurkę (*Triticum dicoccon*), rzadziej pszenicę zwyczajną (*Triticum aestivum*). Surowiec dzielono na dwie części, z czego jedną część doprowadzano do kiełkowania, a następnie mielono i mieszano z zimną wodą; druga część mogła (choć nie musiała) być poddawana kiełkowaniu. W następnym etapie drugą część surowca mieszano z gorącą wodą i utrzymywano wysoką temperaturę tej mieszaniny przez dłuższy czas, podczas gdy pierwsza z części pozostawała w chłodnej wodzie. Następnie surowiec zacierany w chłodnej wodzie był mieszany z tym zacieranym w wysokiej temperaturze. Po zakończeniu procesu zacierania odcedzano powstałą brzczkę i pozostawiano do spontanicznej fermentacji. Tak wytworzony produkt trafiał do odbiorców (Rysunek 2) [13].

Mimo że starożytni Egipcjanie nie znali biochemii, to intuicyjnie ją wykorzystywali, m.in. w etapie produkcji swego rodzaju „prekursora słodu”, w którym podczas kiełkowania zbóż aktywowane są enzymy niezbędne do przetworzenia skrobi na cukry fermentowalne. Moczenie w zimnej wodzie jednej z dwóch części ziarna miało na celu ekstrakcję enzymów do środowiska wodnego. Ziarno z porcji poddanej gotowaniu ulegało kleikowaniu, czyli rozpadowi łańcuchów skrobi na mniejsze odcinki, denaturacji białek i rozluźnieniu materiału, co z kolei ułatwiało późniejsze działanie enzymów. Zmieszanie dwóch jednakowych porcji zboża, zakładając wcześniejsze moczenie w takiej samej objętości wody, zapewniało podniesienie temperatury do około 62-67°C, co mieści się w optimum temperaturowym działania β -amylazy, czyli enzymu odpowiedzialnego za odcinanie reszt maltozy z łańcucha skrobi [14]. Następnie, po oddzieleniu młóta, brzczka poddawana była fermentacji. Najprawdopodobniej dochodziło do fermentacji spontanicznej z udziałem dzikich drożdży i bakterii kwasu mlekowego, niemniej nie można wykluczyć użycia części poprzedniej szarży produkcyjnej jako startera. Prawdopodobnym jest, że na ściankach naczyń używanych w procesie mogły być obecne żywe drożdże zimmobilizowane w postaci biofilmu lub zaadsorbowane w porach ceramicznych naczyń [15]. Dodatkowo istnieją ślady wskazujące na to, że Egipcjanie mogli wykorzystywać jako starter ciasto drożdżowe [13].



Rysunek 2. Schemat technologii produkcji piwa w starożytnym Egipcie. (na podstawie [13])

Aby uhonorować kierownika ekspedycji, podczas której znaleziono naczynie zawierające pozostałości piwa, wyizolowany w efekcie dalszych badań szczep drożdży został nazwany *Saccharomyces winlockii* [13].

Choć obecnie piwo kojarzy się głównie z chmielem, towszystkie dotychczasowe odkrycia sugerują, że roślina ta nie była wykorzystywana w staroegipskim piwowarstwie. Obecnie wiadomo, że w państwie faraonów dominowało nieprzyprawiane piwo, choćnane są odkrycia archeologiczne wskazujące, że niektóre gatunki mogły być dosmaczane owocami palmy (*Hyphaene thebaica*), figami, kolendrą oraz owocami dwukolczaka śródziemnomorskiego. Pozostałości piwa dosmaczanego figami znaleziono w grobowcu z miasta Deir el-Medina, które było osadą zamieszkiwaną przez najlepszych rzemieślników starożytnego Egiptu. Można zatem przypuszczać, iż piwo z dodatkiem fig było zarezerwowane niemal wyłącznie dla elit [13], [16]. Badania prowadzone w Nechen (Hierakonpolis) wykazały, że wytwarzane tam piwo było zaprawiane daktylami i winogronami [17]. Dzięki dodatkowi owoców bogatych w cukry, otrzymywane piwo mogło cechować się wyższą zawartością etanolu w porównaniu do piwa pozbawionego dodatków. Dodatkowo większe stężenie etanolu mogło zwiększyć trwałość piw z dodatkiem owoców.

Kolejnym składnikiem egipskiego piwa pojawiającym się w antycznych przekazach jest chleb. Znaleźiska archeologiczne świadczą o tym, że najprawdopodobniej na etapie zacierania do brzezki dodawano lekko wypieczone ciasto drożdżowe lub robione na zakwasie [13], które mogło pełnić funkcję startera fermentacji. Niemniej, aby poprzeć tę tezę, należałoby wykonać stosowne badania.

W starożytnej Grecji dominowało wino, które było napojem powszechnym i często wspominanym w antycznych źródłach. Wielu znanych myślicieli omawianej epoki, takich jak Platon, sugerowało że wino jest ważnym i zdrowym elementem diety [18]. Również odkrycia archeologiczne utwierdzają nas w przekonaniu, że Grecja była krainą wina [19]. Nie jest to jednoznaczne z nieznaną piwa w tamtych rejonach, istnieją bowiem zarówno pisane, jak i archeologiczne dowody świadczące o rozwiniętym greckim handlu w basenie Morza Śródziemnego [20], w efekcie którego Grecy mieli okazję zetknąć się z piwem. Najprawdopodobniej miało to miejsce w Egipcie, gdzie Grecy poznali, jak sami to określali, *napój robiony ze zboża*. Na egipski rodowód doświadczeń Greków z piwem wskazuje także greckie określenie tego napoju, które ma swoje korzenie właśnie w języku egipskim. Ponadto niektóre słowa określające piwo pochodzą najprawdopodobniej z języka trackiego. Te dwa tropy etymologiczne sugerują skąd Grecy znali piwo, ale bardziej jako egzotyczną ciekawostkę, a nie popularny napój dla mas [21].

Kultura starożytnego Rzymu, podobnie jak Grecji, kojarzona jest głównie z winem, gdyż był to napój szeroko rozpowszechniony i ceniony w rzymskim społeczeństwie [22]. W przeciwieństwie jednak do Greków, Rzymianie znali piwo - głównie za sprawą Galów, mieszkańców Półwyspu Iberyjskiego oraz Germanów. Dzięki wysoko rozwiniętemu rolnictwu i przetwórstwu zbóż byli również w stanie sami je produkować wykorzystując doświadczenie i wiedzę pozyskane od wspomnianych ludów [21]. Pliniusz Starszy w swoich dziełach wymienia takie nazwy piwa jak *cervesia* czy *caelia*, jednak warto odnotować, że nie wyraża się pochlebnie o tego typu trunkach [23]. Datowane na czasy Dioklecjana źródła dostarczają wiedzy na temat cen napojów – można z nich wywnioskować, że ówczesne piwo było raczej napojem biedoty, gdyż kosztowało czterokrotnie mniej niż wino [24]. Mimo niskiego statusu piwa jako napoju, Rzymianie dostrzegali jego prozdrowotne właściwości – na przykład Celsus twierdził, że piwo oraz mleko są najzdrowszymi napojami [25], [26]. Wykopaliska archeologiczne w rzymskim obozie wojskowym Vindolanda przyniosły jedno z najważniejszych źródeł dotyczących życia codziennego rzymskich żołnierzy – korpus tabliczek zawierających ich korespondencję. Z punktu widzenia tej pracy najbardziej wartościowe są tabliczki z zamówieniami składanymi przez mieszkańców garnizonu, a w szczególności te zawierające m.in. prośbę o przysłanie piwa [27], [28]. Dzięki wymienionym odkryciom wiemy, że Rzymianie znali piwo, a także potrafili je wyprodukować, ponieważ byli w stanie dostrzec jego prozdrowotne właściwości oraz popularność wśród niższych klas społecznych i ludów podbitych.

W średniowieczu funkcjonowały trzy główne obszary rozwoju browarnictwa. Pierwszym, najbardziej pierwotnym, bo ulokowanym najbliżej niezbędnych zasobów naturalnych, były tereny wiejskie. W tej epoce piwo było napojem powszednim, sporządzanym w wielu domach, a jego warzenie w warunkach domowych było równie powszechną czynnością jak np. gotowanie zupy. Z czasem niektóre gospodynie nabrały większej biegłości w produkcji piwa, przez co wzrósł popyt na ich produkty- w ten sposób powstały pierwsze karczmy oferujące jedzenie i piwo.. Wiejski aspekt piwowarstwa jest wciąż niedostatecznie przebadany [29].

Drugim miejscem rozwoju myśli piwowarskiej były klasztory, gdzie zakonnicy doskonalili sztukę warzenia piwa. Dodatkowo piwo jako napój postny był ważnym źródłem energii dla zakonników, którzy

wiedli skromne i rygorystyczne życie. Zakonami przodującymi w rozwijaniu sztuki warzenia piwa byli działający także w Polsce cystersi oraz trapiści, którzy do dziś kontynuują piwowarskie tradycje produkując cenione przez smakoszy piwa gatunki [30].

Ostatnim miejscem rozwoju browarnictwa były miasta, w których działały gildie browarników. Średniowieczni piwowarzy byli nierzadko ważnym elementem miejskiego społeczeństwa, gdyż poza zapewnianiem pożądanego trunku, dzięki swojemu bogactwu wpływali na rozwój i politykę miast. Znane są przypadki zakazu handlu obcym piwem lub nakładania na importowane piwa wysokich podatków, co było właśnie działaniem lokalnych gildii piwowarskich nakierowanym na ochronę własnych interesów [29], [31]. Technologia produkcji piwa była stosunkowo prosta i intuicyjna, gdyż nie znano nawet prostych urządzeń pomiarowych, takich jak termometry czy aerometry. Wiadomo, że piwo było warzone poprzez zacieranie infuzyjne w jednej temperaturze. Źródła mówią o ponownym zacieraniu wystodzin po odfiltrowaniu brzezki przedniej. Brzezka po procesie separacji młota nie zawsze była gotowana, natomiast fermentacja zachodziła spontanicznie lub poprzez drożdże obecne w osadach powstałych podczas fermentacji poprzednich szarż produkcyjnych [32], [33]. Do warzenia piwa używano najróżniejszych składników – poza słodem i wodą wykorzystywano liczne gatunki ziół i roślin polnych. Często piwo było niskiej jakości, czemu starano się przeciwdziałać poprzez stosowne akty prawne, takie jak bawarskie prawo czystości [34].

Od średniowiecza browarnictwo europejskie rozwijało się bardzo powoli, nabierając rozpędu dopiero w XIX wieku, kiedy dzięki odkryciom mikrobiologicznym i technicznym nastąpił gwałtowny rozwój tej gałęzi przemysłu. W pierwszej połowie XIX wieku Louis Pasteur opisał metabolizm drożdży i fermentację etanolową, natomiast pierwsze technologiczne metody produkcji piwa zebrał i opisał Benno Scharl [35]. W 1875 roku Jacob Jacobsen, właściciel browaru Carlsberg, założył pierwsze na świecie laboratorium badawcze poświęcone piwowarstwu, które działa do dziś (Rysunek 3). Kierownictwo laboratorium objął Emil Christian Hansen, który prowadził w nim badania nad mikrobiologią piwa, m.in. wyizolował pierwsze czyste kultury drożdży dolnej fermentacji, nazwane zresztą na cześć firmy *Saccharomyces carlsbergensis*. Swoją pracę Hansen opisał w książce pt. „Practical studies in fermentation”, która dała podwaliny pod mikrobiologię browarniczą [36].



Rysunek 3. Laboratorium browaru Carlsberg [źródło: https://www.carlsberggroup.com/media/21153/labfrontbygning_artikelspot.jpg]

W końcu XVIII wieku James Watt wynalazł maszynę parową, zapoczątkowując rewolucję przemysłową w Europie [37]. Gwałtowne zmiany, które nastąpiły w europejskim przemyśle nie ominęły zakładów produkujących piwo. W ten sposób browary stały się potężnymi fabrykami o niespotykanych dotąd możliwościach produkcyjnych. Przegrzana para wodna ogrzewała kadzie zacierne i warzelne, natomiast energia wytwarzana przez silniki parowe napędzała liczne urządzenia w browarze, takie jak przenośniki, mieszadła czy pompy, dzięki którym możliwe było produkowanie ogromnych ilości piwa.. Browary, w celu utrzymania temperatury w piwnicach fermentacyjnych, nierzadko musiały zaopatrywać się w zimowych miesiącach w lód, który był następnie przechowywany w lodowniach i wykorzystywany przez cały sezon.

W 1876 roku Carl von Linde wynalazł chłodziarkę sprężarkową [38]. Tym wynalazkiem, jako jedni z pierwszych, zaczęli się interesować piwowarzy, gdyż to urządzenie pozwoliło browarom uniezależnić się od zimowych dostaw lodu, redukując tym sposobem uzależnienie przemysłu od zmienności pogody. Dodatkowo zmieniła się architektura browarów, które z małych zakładów stawały się ogromnymi fabrykami o specyficznej zabudowie (Rysunek 4). Jej charakterystyczne elementy nadal są obecne w miejskim krajobrazie [39], na przykład we Wrocławiu, w którym wciąż można odnaleźć w tkance miejskiej pozostałości nowoczesnych jak na owe czasy lokalnych browarów, w tym: Lagerbier-Brauerei E. Haase (Rysunek 4; ul. Krakowska), Schultheiss Brauerei (po II wojnie światowej kontynuujący tradycję jako Browar Piastowski; ul. Jedności Narodowej), Carl Kipke Brauerei (ul. Długa) (czy Bürgerbräu Breslau (po II wojnie światowej znany jako Browar Mieszkański, ul. Hubska) [40].



Rysunek 4. Widokówka z browaru Haasego we Wrocławiu. Na uwagę zasługuje napis "Lagerbier Brauerei" czyli browar warzący piwa dolnej fermentacji. Ten napis świadczy o nowoczesności zakładu, który podążał z najnowszymi trendami w dziedzinie piwowarstwa. [źródło: <https://fotopolska.eu/70391,foto.html?o=b10407>]

Najnowsza historia browarnictwa, wciąż niedostatecznie opisana, to czasy od przełomu lat 80-90. XX wieku do dziś. W Europie, w tym w Polsce, obecnie trwa tak zwana „piwna rewolucja”, która spowodowała renesans małych browarów i browarnictwa rzemieślniczego, prowadząc do dywersyfikacji rynku i poszerzenia asortymentu piw dostępnych na rynku [41]. Dzięki temu zjawisku w sprzedaży pojawiły się zupełnie nowe gatunki piwa, a także te, które do niedawna były zapomniane [42]. Duże browary przeszły gruntowne modernizacje starając się utrzymać jak najwyższą jakość za jak najniższą cenę. W tym celu wykorzystano m.in. metody matematyczne dokładnie opisujące metabolizm drożdży i proces produkcji piwa [43]–[47] oraz metody informatyczne takie jak *machine learning* wykorzystywane do optymalizacji procesów. Dodatkowo większość współczesnych browarów jest w dużej mierze zautomatyzowana, co pozwoliło zmniejszyć liczbę pracowników potrzebnych do ich obsługi. Ponadto pojawiły się nowe wyzwania dla piwowarów, takie jak piwo bezglutenowe, piwa niskokaloryczne, czy piwa o obniżonej zawartości alkoholu [48]–[50]. Ta karta historii nie została jeszcze zamknięta i w najbliższej przyszłości można spodziewać się kolejnych przełomów w piwnym świecie. To zagadnienie obejmuje niniejsza praca doktorska.

1.2. Podstawowe surowce piwowarskie: woda, słód, drożdże, chmiel

Podstawowymi surowcami do produkcji piwa są woda, słód, drożdże i chmiel -po raz pierwszy w dokumentach państwowych w ten sposób zdefiniowano piwo w tzw. Bawarskim Prawie Czystości (niem. Reinheitsgebot) ustanowionym przez księcia Wilhelma IV w 1516 roku [6], [34]. Od tej pory powstały liczne prawne definicje piwa.

Obecnie w Polsce piwo definiowane jest w ustawie o podatku akcyzowym w następujący sposób: „Piwem w rozumieniu ustawy są wszelkie wyroby objęte pozycją CN 2203 00 oraz wszelkie wyroby zawierające mieszaninę piwa z napojami bezalkoholowymi” [51]. Pozycja CN 2203 00 podaje dokładniejszą definicję omawianego napoju: „Piwo jest napojem alkoholowym otrzymywanym w wyniku fermentacji roztworu (brzeczki) przygotowanego ze słodowanego jęczmienia lub pszenicy, wody i (zazwyczaj) chmielu. Do przygotowania roztworu (brzeczki) mogą być również używane pewne ilości niesłodowanych zbóż (np. ziarno kukurydzy lub ryż). Dodatek chmielu nadaje gorzki i aromatyczny smak oraz poprawia trwałość. Podczas fermentacji niekiedy dodawane są wiśnie lub inne substancje aromatyczne. Dodane mogą być także cukier (szczególnie glukoza), substancje barwiące, ditlenek węgla i inne substancje. W zależności od zastosowanego procesu fermentacji produktem może być piwo dolnej fermentacji, otrzymane w niskiej temperaturze z użyciem drożdży dolnej fermentacji lub piwo górnej fermentacji, otrzymywane w wyższej temperaturze z użyciem drożdży górnej fermentacji” [52].

Aby dobrze zrozumieć proces powstawania piwa należy na początku poznać surowce, z których jest wytwarzane.

1.2.1 Woda

Woda jest substancją niezbędną do życia, pokrywa ponad 70% powierzchni Ziemi. Wśród zasobów wodnych 97,4% stanowi woda słona, zaś pozostałe 2,6% - woda słodka, która może być spożywana przez człowieka. Niezbędną dla przemysłu spożywczego (w tym browarnictwa) słodką wodę można

pozyskiwać z trzech źródeł: z wód opadowych takich jak śnieg i deszcz, z wód powierzchniowych, do których zaliczamy rzeki i jeziora oraz z wód podziemnych. W przemyśle browarniczym najczęściej wykorzystuje się wody podziemne, chociaż nie jest to regułą [53].

W browarze woda wykorzystywana jest do produkcji piwa, w przypadku którego stanowi często ponad 90% masy, ponadto niezbędna jest w procesie słodowania, gdzie jest czynnikiem indukującym kiełkowanie ziaren zbóż. Poza bezpośrednim wykorzystaniem wody do produkcji piwa duża jej część jest zużywana do innych celów takich jak przemywanie drożdży, mycie instalacji browarniczej, mycie beczek i butelek, pasteryzacja, chłodzenie czy produkcja pary służącej do ogrzewania.

Zużycie wody w browarze szacuje się na 25-30 hl wody na hl piwa w przypadku przestarzałych instalacji. Typowe browary zużywają ok. 7 hl na hl piwa, natomiast najnowocześniejsze instalacje - 3-4,6 hl wody na hl produktu [54]. Najwięcej wody zużywa się w procesie warzenia oraz do czyszczenia instalacji i butelek. Szczegółowe zużycie wody podano poniżej (Tabela 1).

Tabela 1. Procentowe zużycie wody w browarze. Przy rozlewie założono, że 50% piwa trafia do kegow, zaś do puszek i butelek po 25%.

Operacja	% zużywanej wody
Warzenie, chłodzenie i CIP	45,5
Fermentacja i pielęgnacja drożdży	2,3
Dojrzewanie piwa i CIP	2,3
Filtracja	7,3
Mycie kegow	6,0
Mycie butelek	8,8
Pasteryzacja	4,2
Ogólne czyszczenie CIP	10,9
Produkcja pary i gorącej wody	9,4
Kompresory powietrza	1,6
Cele bytowe	1,8

Już dawno zauważono, że w różnych miejscach piwo zrobione według tego samego przepisu różni się smakiem. Poza oczywistymi różnicami wynikającymi z użytego sprzętu i personelu to duże znaczenie ma w tym wypadku woda. Z tego powodu czeski pilzner najlepiej smakował w Pilźnie, zaś najbardziej wyrazistego brytyjskiego bittera najlepiej było zasmakować w Burton on Trent [35]. Skład chemiczny wody warzelnianej zależy przede wszystkim od struktury geologicznej danego rejonu, co oznacza, że jej skład jest czynnikiem lokalnym. Składniki wody wpływające na jakość piwa to:

Jony H^+ i OH^- - zawsze obecne w wodzie. Stosunek ich zawartości oznaczany jest jako pH. Ten parametr wody browarniczej jest o tyle istotny, że większość reakcji zachodzących podczas warzenia piwa jest od niego zależna. Podczas warzenia piwa dąży się do osiągnięcia odczynu lekko kwaśnego, gdyż niesie ze sobą określone korzyści:

- zwiększa ilość rozpuszczonego azotu
- poprawia wydajność zacierania
- zwiększa odfermentowanie brzeczek
- zmniejsza ilość ekstrahowanych tanin i związków goryczkowych z chmielu.

Zalecane pH dla wody browarniczej to 6-7,5 [54].

Wapń - często występuje w wodzie w postaci kationów Ca^{2+} i jest współodpowiedzialny za twardość wody. Sole wapnia często redukują pH brzezki, a sam wapń w procesie zacierania:

- stabilizuje aktywność alfa-amylazy
- poprawia działanie enzymów proteolitycznych rozkładających białka i amylolitycznych odpowiedzialnych za rozkład cukrów
- pomaga w wytrącaniu szczawianów.

W zależności od rodzaju piwa zalecane ilości jonów wapnia wynoszą do 150 g/l [54].

Magnez - występuje w postaci jonów Mg^{2+} i wpływa na pH podobnie jak wapń. Sole magnezu mają gorzki smak, przez co ich nadmiar negatywnie wpływa na smak piwa. Magnez jest kofaktorem, czyli jonem niezbędnym do odpowiedniego działania enzymów zaangażowanych w rozkład cukrów. Z tego powodu brzezka o wysokim ekstrakcie będzie lepiej fermentowana przy wyższym stężeniu magnezu. Zazwyczaj większość magnezu dostarczana jest ze słodem i jego zawartość nie powinna przekraczać 30 mg/l w wodzie browarniczej [54]–[56].

Sód - występuje w roztworach wodnych w postaci jonu Na^+ . Sód przy niskim stężeniu (poniżej 150 mg/l) poprawia uczucie pełni piwa oraz uwypukla jego słodycz. W wyższych stężeniach sód nadaje piwu słony i kwaśny posmak. Najlepiej stosować sód pod postacią chlorku sodu NaCl, czyli zwykłej soli kuchennej. Dzięki temu zabiegowi jego walory smakowe będą uzupełniały się z właściwościami jonów chloru [54]. Chlorek sodu w stężeniach powyżej 500 mg/l NaCl hamuje aktywność drożdży, co może się przełożyć na problemy z fermentacją [35].

Chlor - występuje w wodzie w postaci jonów Cl^- . Jego wpływ na piwo jest pozytywny, gdyż nadaje mu słodki i delikatny smak oraz poprawia jego stabilność. W wyższych stężeniach może utrudniać flokulację drożdży. Ponadto obecność jonów chlorkowych zwiększa ryzyko korozji instalacji wykonanych ze stali nierdzewnej. Jego maksymalne zalecane stężenie to 150 mg/l [54], [55].

Żelazo - w środowisku wodnym występuje w postaci jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} . Żelazo może naturalnie występować w wodach gruntowych, ponadto jego zwiększony poziom można zaobserwować w przypadku złego stanu instalacji wodociągowej lub sporadycznie po pracach związanych z konserwacją sieci wodociągowej w okolicy browaru. Żelazo wpływa na proces produkcji piwa w następujący sposób:

- utrudnia całkowite scukrzenie skrobi podczas zacierania
- powoduje zmętnienie brzezki
- zaburza metabolizm drożdży
- jony Fe^{2+} przyspieszają utlenianie się piwa, czyli powodują między innymi szybsze starzenie
- zabarwia piwną pianę na kolor brązowy

Zalecana zawartość żelaza w wodzie to nie więcej niż 0,2 mg/l, chociaż niektóre źródła podają wartość 0,3 mg/l. W stężeniach powyżej 0,5 mg/l występują zaburzenia fermentacji burzliwej [35], [54], [55].

Mangan - występuje w wodzie pod postacią jonów Mn^{2+} . Mangan, podobnie jak żelazo, wpływa niekorzystnie na proces produkcji piwa, a jego działanie jest silniejsze niż w przypadku żelaza. Mimo że mangan jest kofaktorem niektórych enzymów drożdżowych i słodowych, to jego zawartość w wodzie browarniczej nie powinna przekraczać 0,05 mg/l [54], [55].

Cynk - w środowisku wodnym występuje w formie jonów Zn^{2+} . Dostarczany jest ze słodem, chociaż spora jego część zostaje na powierzchni wystódzin podczas filtracji brzezki. Jego obecność jest niezbędna dla prawidłowego wzrostu drożdży, jednak w nadmiarze może powodować szybsze utlenianie gotowego produktu. Jego zalecany poziom to od 0,15 mg/l do 0,5 mg/l [54], [57].

Miedź - występuje w wodzie w postaci jonów Cu^{2+} i jest niepożądana w produkcji piwa. Już w niskich stężeniach przyspiesza utlenianie piwa, zaś w wyższych stężeniach hamuje działanie enzymów i jest toksyczna dla drożdży. Ze względu na negatywny wpływ tego metalu na proces produkcji piwa jego stężenie nie powinno przekraczać 0,1 mg/l.

Siarczany - występują w wodzie w postaci jonów SO_4^{2-} . Ich obecność jest skutkiem rozpuszczonych w wodzie soli takich jak siarczany magnezu czy siarczany wapnia. Ich obecność może powodować:

- ostry smak
- skłonność do zmętnienia podczas oziębiania piwa
- mogą być przekształcane podczas fermentacji w SO_2 oraz H_2S , które dają piwu nieprzyjemny zapach

W zależności od stylu piwa rekomendowana zawartość siarczanów waha się między 10 mg/l a 250 mg/l [35], [54].

Azotany - jony NO_3^- pochodzą częściowo ze słodu, niemniej ich nadmiar jest niemiłe widziany w piwie, gdyż podczas fermentacji może być przekształcony przez mikroorganizmy w szkodliwe azotyny. W przypadku braku azotyn i amoniaku w wodzie zawartość jonów NO_3^- jest akceptowalna do stężenia 25 mg/l. W przypadku brzezki zaleca się aby poziom azotanów nie przekraczał 50 mg/l [35], [54], [57].

Azotyny – jony NO_2^- powstają wskutek rozkładu substancji pochodzenia organicznego i mogą świadczyć o zakażeniu wody. W przypadku wody pochodzenia bagiennego lub zawierającej dużo żelaza śladowe ilości azotynów nie muszą świadczyć o jej kontaminacji. Azotyny są toksyczne dla drożdży, przez co hamują ich wzrost, ponadto mogą być odpowiedzialne za odbarwienie gotowego piwa. Maksymalna zawartość azotyn w wodzie browarniczej to 0,1 mg/l [35], [54].

Amoniak - występuje w wodzie w postaci jonów amonowych NH_4^+ . Związek ten jest w piwie niedopuszczalny, zaś jego obecność najczęściej świadczy o zakażeniu wody fekaliami. Amoniak negatywnie wpływa na proces fermentacji, choć może pojawić się w żelazistych wodach, w których następuje redukcja azotanów i azotynów. Maksymalne stężenie jonów amonowych wynosi 0,5 mg/l [35], [54]

Krzemiany - występują w wodzie w postaci jonów SiO_3^{2-} . Zazwyczaj obecne są w wodzie wodociągowej w ilościach śladowych, zaś do wody browarniczej dostarczane są ze słodem. W stężeniach 10-30 mg/l zakłócają fermentację. Ponadto krzemiany mogą powodować zmętnienie w piwie [55].

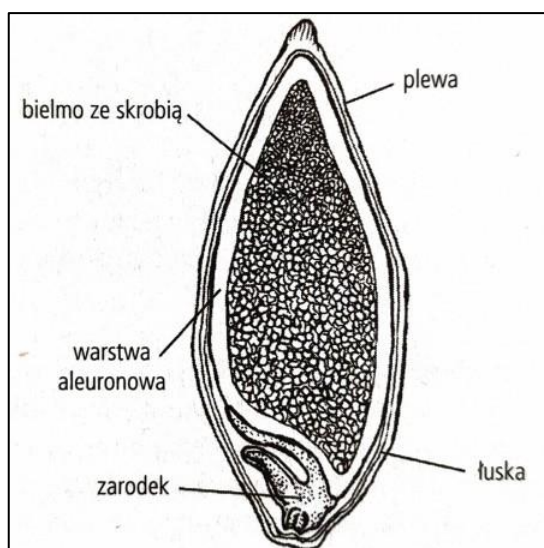
Wodorowęglany – jony HCO_3^- to główne związki wpływające na zasadowość wód. Wysoka alkaliczność wody zwiększa pH podczas warzenia, redukując korzystne efekty wynikające z niskiego pH procesu. Poza tym wodorowęglany nie są szkodliwe, jednak nie zaleca się stosować wody z zawartością wodorowęglanów powyżej 50 mg/l.

Ze względu na wymienione właściwości woda browarnicza często jest uzdatniana, czyli modyfikowana w celu dopasowania jej cech do wymogów produkowanego piwa, np. poprzez zwiększanie jej twardości do produkcji piw typu bitter lub zmiękczenie do produkcji piw typu pilzneńskiego.

1.2.2 Słód

Jęczmień to podstawowe zboże używane do produkcji słodu. Szacuje się, że nawet 1/3 światowej produkcji tego zboża jest zużywana do celów browarniczych [58]. Poza jęczmieniem słodowaniu poddaje się przede wszystkim pszenicę, rzadziej grykę [55], znane są także przypadki słodowania ryżu [59] czy nawet tak egzotycznych roślin jak rosplenica perłowa (*Pennisetum glaucum*) [60].

Jęczmień należy do rodziny traw o kwiatostanie w formie kłosa. W zależności od liczby ziaren w osadce kłosowej jęczmień browarny dzielimy na dwurzędowy lub sześćrzędowy, z czego ten pierwszy jest częściej wykorzystywany do celów browarniczych [35], [58]. Ziarno jęczmienia pokryte jest z zewnątrz plewą, która ma na celu ochronę przed uszkodzeniami mechanicznymi. Kolejną warstwę ochronną stanowi łuska. Pod nią znajduje się warstwa aleuronowa zbudowana z grubościennych komórek zawierających znaczne ilości białek i tłuszczu. Wspomniana warstwa otacza endospermę zwaną również bielmem. Bielmo pełni rolę tkanki spichrzowej szczególnie bogatej w skrobię i białka (Rysunek 5) [61].



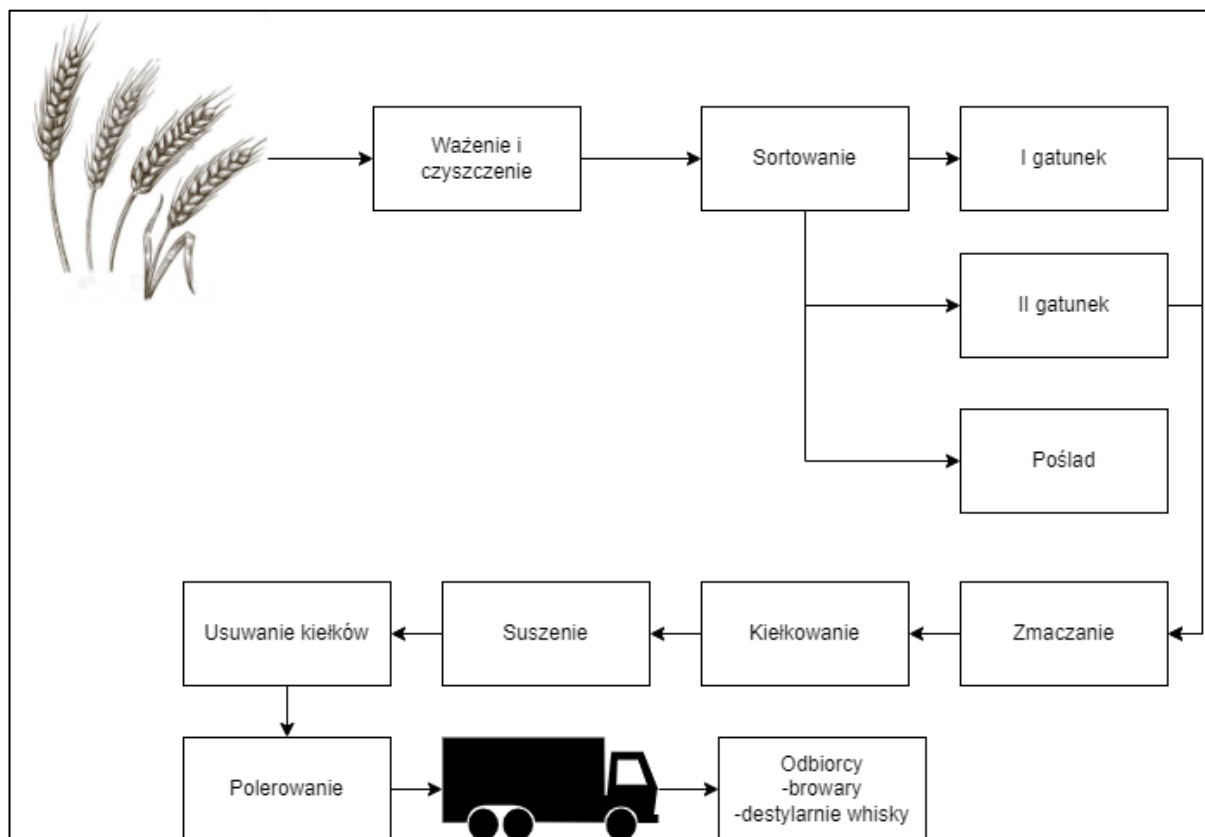
Rysunek 5. Schemat budowy ziarna jęczmienia [źródło <https://twojbrowar.pl/pl/blog/slodowanie-na-czym-polega-i-dlaczego-jest-konieczne->]

Skład chemiczny jęczmienia zależy od jego odmiany, warunków klimatycznych i technologii uprawy. Wilgotność jęczmienia waha się między 12 a 20%, z czego do celów słodowniczych wartość ta nie powinna przekraczać 15% oraz nie powinna być niższa niż 10%, bo może to skutkować uszkodzeniem ziarna i znacznie osłabić jego zdolności kiełkowania. Najważniejszym z technologicznego punktu widzenia składnikiem ziarna jest skrobię, której zawartość w jęczmieniu waha się od 44 do 67%. Kolejnym węglowodanem obecnym w jęczmieniu jest celuloza, której zawartość waha się w przedziale od 3,5 do 7%. Ponadto w ziarnach obecne są hemicelulozy, których zawartość może dochodzić do 11%. W jęczmieniu w małych ilościach obecne są również tłuszcze, których zawartość nie przekracza 3% [58].

W Polsce w drugiej połowie XX wieku najpopularniejszymi odmianami jęczmienia do celów słodowniczych były „Browarny PZHR” o wysokiej zawartości białka oraz dający plony o niskiej

zawartości białka „Skrzeszowicki” [35]. Obecnie w Polsce działają cztery duże słodownie: Malteurop, Globalmalt, Soufflet oraz Viking Malt, które skupują jęczmień jary odmian: Concerto, Propino, RGT Planet, Overture, Sebastian, Kangoo, Xanadu, Sunshine, KWS Iryna, Charles, Explorer oraz jęczmień ozimy odmian: Calypso, Hickory, Winntmalt, KWS Joy, Malwinta [62].

Słodowanie to złożony proces przetwórstwa zboża (Rysunek 6). Niegdyś większość browarów posiadała własne słodownie, obecnie nieliczne browary mogą się poszczycić piwem ze słodu własnej produkcji. Najczęściej zakłady wytwarzające piwo zaopatrują się w sód u zewnętrznych dostawców.



Rysunek 6. Schemat produkcji słodu

Zboże dostarczone do słodowni jest zanieczyszczone, dlatego na początku - po jego dostarczeniu, rozładunku i zważeniu - należy przystąpić do pierwszego etapu przeróbki, czyli oczyszczania. Rozpoczyna się je czyszczeniem wstępnym, gdzie surowiec trafia na grube sита mające na celu oddzielenie dużych zanieczyszczeń takich jak kamienie czy słoma. Następnie ziarna trafiają do wialni gdzie przedmucha się zboże przez zestaw sit. Na tym etapie można oddzielić lekkie zanieczyszczenia takie jak piasek, kawałki słomy, pyły czy resztki kłosów. Po przejściu przez wialnię surowiec oczyszczany jest z metalowych elementów, które mogły się do niego dostać szczególnie podczas żniw i transportu. W tym celu stosuje się aparaty magnetyczne, które usuwają z mieszaniny wszelkie elementy metalowe [35]. Tak oczyszczone zboże może być składowane lub poddawane dalszym etapom produkcji, przy czym badania pokazują, że im świeższy surowiec, tym lepsza jakość otrzymanego słodu [63].

Zanim zboże trafi do głównych etapów słodowania, czyli zmaczania i kiełkowania, należy je wcześniej posortować. Sortowanie jest istotne, gdyż pozwala na równomierne prowadzenie dalszych procesów ze względu na to, że ziarna o różnych rozmiarach będą namakały z różną szybkością, co może pogorszyć

wydajność procesu. Do sortowania surowca używa się urządzeń zwanych sortownikami. Najczęściej stosuje się sortowniki bębnowe lub sortowniki o sitach płaskich. Zasada działania obydwu urządzeń polega na przepuszczeniu przez sita ziaren w celu rozdzielenia ich na ziarna pierwszego i drugiego gatunku, które będą dalej słodowane, oraz na oddzieleniu pośladu, czyli ziaren za małych, pokruszonych i pozostałych zanieczyszczeń [35], [64].

Słodowanie ma na celu rozpoczęcie kiełkowania ziaren. W przyrodzie czynnikiem indukującym kiełkowanie jest wilgotność i temperatura oraz zawartość tlenu. Suche ziarno zawiera około 10% wody, co jest zwane wodą konstytucyjną. Dodatkowa porcja wody, niezbędna do wykiełkowania ziarna, zwana jest wodą wegetacyjną. Głównym celem zmaczania ziarna jest dostarczenie wody niezbędnej do rozpoczęcia kiełkowania. Podczas zmaczania ziarna pęcznieją zwiększając swoją objętość i uzyskując zawartość wody przekraczającą 40% [35]. Na proces wpływ ma również temperatura, dlatego w zależności od typu zboża stosuje się temperatury w przedziale 12-18 °C [65]. Wybrane sole wpływają na szybkość kiełkowania ziaren, m.in. chlorek żelaza (III), chlorek magnezu czy nadmanganian potasu [58]. Kolejnym medium, które jest niezbędne do właściwego kiełkowania, stanowi powietrze, a dokładniej tlen. W związku z tym namakające ziarno należy napowietrzać, na przykład poprzez wymianę wody używanej do zmaczania na napowietrzoną oraz poprzez przerwy w zmaczaniu. Ostatnim etapem procesu zmaczania jest wymycie części żywic i garbników, które mogą znajdować się na powierzchni ziarna [35]. Podczas zmaczania w zbożu uaktywniają się enzymy, które w naturze odpowiadałyby za przekształcenie złożonych substancji zapasowych obecnych w ziarnie w prostsze związki umożliwiające wzrost zarodka - ten etap słodowania nazywa się kiełkowaniem. Wśród enzymów powstających w kiełkującym ziarnie najliczniejszą grupę stanowią enzymy hydrolityczne, które rozkładają bardziej złożone związki na drodze hydrolizy: α - i β -amylazy zajmują się rozkładem skrobi, β -glukanazy rozkładają beta-glukany, zaś proteiny zajmują się rozkładem białek [65], [66]. Wymienione enzymy są kluczowe w procesie powstawania brzezki piwnej.

Kolejnym etapem procesu słodowania jest suszenie. Ten krok ma na celu zahamowanie procesów biochemicznych zachodzących w kiełkującym ziarnie oraz zwiększenie jego trwałości, gdyż mokre ziarna są bardzo podatne na zepsucie. Podczas suszenia wilgotność sodu spada z ok. 40% do poniżej 5% [35]. Proces suszenia, w zależności od typu słodu i stosowanej technologii, trwa od 16 do 60 godzin. Zazwyczaj do suszenia używa się gorącego powietrza w temperaturach 50-70 °C, natomiast po 10 godzinach zwiększa się temperaturę do 80 °C. W dawnych czasach lub w niektórych specjalistycznych słodowniach ziarna suszy się bezpośrednio nad ogniem, co skutkuje ciemniejszą barwą słodu oraz wędzonymi smakami otrzymanego produktu [67].

W przedostatnim etapie sód jest pozbawiany kiełków. Ten etap ma na celu poprawę właściwości technologicznych słodu, przez kiełki bowiem sód najszybciej pobiera wilgoć ze środowiska - co ujemnie wpływa na jego trwałość podczas magazynowania. Usunięcie kiełków jest ważne również z tego powodu, że ich obecność wpłynie niekorzystnie na smak gotowego piwa. Ze względów technologicznych proces ten odbywa się od razu po wysuszeniu słodu, gdyż suche kiełki oddziela się od ziaren dużo łatwiej niż wilgotne. Proces ten odbywa się w urządzeniu zwanym odkiełkownicą. Dodatkowo jako zabieg kończący stosuje się polerowanie słodu, które ma na celu zmniejszenie zapylenia podczas jego dalszego przerobu w browarze [35], [68]. Po tych zabiegach sód jest gotowy do wykorzystania w przemyśle. Do niedużych odbiorców sód ekspediuje się w workach o pojemności 25 kg, zaś do największych odbiorców sód bywa dostarczany za pomocą specjalnych wagonów kolejowych. Głównymi odbiorcami słodu są browary oraz destylarnie whisky.

1.2.3 Chmiel

Chmiel jednoznacznie kojarzy się z piwem i to do tego stopnia, że według laików bywa uznawany za główny składnik piwa. Oczywiście - chmiel nie jest głównym składnikiem piwa, ale jego obecność nadaje piwu charakterystyczną goryczkę i aromat [42].



Rysunek 7. Szyszki chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus*). Fot. Iwona Feier

Chmiel to wieloletnia, dwupienna roślina pnąca o pędach nadziemnych zamierających na zimę. Należy do grupy pokrzywowatych i rodziny konopiowatych (Rysunek 7). Łodyga pokryta jest haczykowatymi włoskami czepnymi. Chmiel łatwo rozmnaża się wegetatywnie z pędów podziemnych [69], [70]. W browarnictwie wykorzystuje się wyłącznie szyszki żeńskie, które w tarczках gruczołowych zawierają lupulinę (Rysunek 8), w której z kolei występują żywice chmielowe pożądane w produkcji piwa [69], [71].



Rysunek 8 Przekrój przez szyszkę chmielu. Widoczna lupulina w postaci żółtych granulek. Fot. Iwona Feier

Obecnie znane są trzy gatunki chmielu:

- Chmiel zwyczajny (*Humulus lupulus*) – gatunek wykorzystywany w browarnictwie [72]
- Chmiel japoński (*Humulus japonicus*) – gatunek nie mający zastosowania w browarnictwie ze względu na brak pożądanych żywic; wykorzystywany jako roślina ozdobna [73]
- *Humulus yunnanensis* – gatunek endemiczny występujący w prowincji Yunnan w Chinach [72].

Ponad 95% światowej uprawy chmielu wykorzystywane jest do celów browarniczych, natomiast pozostała część znajduje zastosowanie głównie w kosmetyce. Głównymi producentami chmielu na świecie są USA (stany Waszyngton i Idaho) i Niemcy (region Hallertau), gdzie hodzi się między 75 a 80% światowej produkcji [73]. Pozostałymi znaczącymi producentami chmielu są Czechy, Polska, Słowenia, Wielka Brytania, Ukraina, Chiny, Republika Południowej Afryki, Australia i Nowa Zelandia.

Uprawa chmielu wymaga odpowiednich warunków klimatycznych. Jeżeli w lecie jest gorąco i sucho, to uzyskuje się chmiel lepszej jakości i o większej zawartości alfa-kwasów. W plantacjach hodzi się wyłącznie kwiatostany żeńskie, zaś męskie rośliny są usuwane, aby nie dopuścić do utworzenia nasion. Zaobserwowano, że niezapylone szyszki, w których nie wytworzyły się nasiona, mają bogatszy aromat i lepiej wpływają na smak piwa, chociaż same nasiona nie mają znaczącego wpływu na jakość piwa [73], [74].

Szyszka chmielowa składa się w głównej mierze z celulozy, chociaż dla piwowarów najważniejsze są inne związki, które odpowiadają za cechy organoleptyczne wytworzonego produktu (Tabela 2). Wśród najważniejszych związków obecnych w chmielu są olejki eteryczne nadające piwu charakterystyczny, ziołowy aromat oraz α -kwas i β -kwas odpowiadające częściowo za aromat i głównie za goryczkę omawianego trunku [73], [75].

Tabela 2. Skład szyszki chmielowej. Opracowano na podstawie [75]

Skład szyszki chmielowej w %	
α -kwasy	2-12
β -kwasy	1-10
Olejki eteryczne	0,5-1,5
Polifenole	2-5
Kwasy tłuszczowe	Ilości śladowe - 25
Białka	15
Celuloza	40-50
Woda	8-12
Pektyny	2
Popiół (sole)	10

Podczas warzenia piwa dochodzi do ługowania olejków eterycznych oraz żywic chmielowych do brzezki. Dodatkowo wskutek podwyższonej temperatury α -kwasy oraz β -kwasy izomeryzują do izo- α -kwasów oraz izo- β -kwasów, które nadają piwu goryczkę. Wspomniane przemiany zostaną dokładniej opisane w rozdziale 1.3.

Zbiory chmielu odbywają się późnym latem lub wczesną jesienią, kiedy szyszki są dojrzałe i zawierają najwięcej pożądaných żywic. Świeżo po zbiorze szyszki chmielowe zawierają 75-80% wilgotności, co negatywnie wpływa na ich trwałość. W związku z tym pierwszym etapem przerobu chmielu jest jego suszenie, które odbywa się w temperaturach rzędu 65-70 °C aż do zredukowania wilgotności do poziomu 10%. Następnie chmiel może być wysyłany do odbiorców. Najczęściej chmiel wysyła się w formie pelletów (Rysunek 9) ze względów logistycznych, aczkolwiek zdarza się ekspediowanie całych szyszek chmielowych (Rysunek 9) lub ekstraktu chmielowego. Ekstrakt jest najkorzystniejszy pod względem zawartości pożądaných żywic w stosunku do objętości, w związku z czym duże browary często korzystają z tego typu produktów chmielowych [76].



Rysunek 9. Suszony chmiel w formie pelletu (po lewej) oraz suszone szyszki chmielowe (po prawej)

W Polsce zarejestrowanych jest ponad 1000 plantatorów chmielu. Prym w produkcji chmielu wie dzie województwo lubelskie, ale plantacje chmielu można również znaleźć w Wielkopolsce, na Dolnym

Śląsku czy w okolicach Wyżyny Krakowsko-Sandomierskiej [77]. W pierwszej dekadzie XXI wieku Polska była piątym na świecie producentem chmielu z areałem nieco większym niż 2100 ha. Odmiany chmielu dzieli się na dwa rodzaje: aromatyczne i goryczkowe. Chmiele goryczkowe wykazują dużą zawartość α -kwasów, przez co znacznie wpływają na goryczkę produkowanego piwa. Chmiele aromatyczne zawierają znacznie mniej α -kwasów niż chmiele goryczkowe, za to cechują się większą zawartością olejków eterycznych, a zatem mocniej wpływają na aromat przyrządzanego z nich piwa, a słabiej na jego goryczkę [76], [78]. W Polsce najczęściej hoduje się chmiele goryczkowe rodzimych odmian: Marynka, Magnum, lunga i Magnat. Największy areał, wynoszący 42% w 2008 roku, zajmuje chmiel goryczkowy Marynka. Z chmieli aromatycznych najpopularniejsze w naszym kraju są: Lubelski, Perle, Hallertau Tradition, Lomnik i Sybilla. Najchętniej wybieranym przez plantatorów chmielom aromatycznym jest Lubelski, którego areał wynosił 26% wszystkich plantacji chmielu [71], [78]. Największą w Polsce instytucją zajmującą się badaniem chmieli, tworzeniem nowych odmian oraz zaopatrującą plantatorów w sadzonki jest Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach [71].

1.2.4 Drożdże

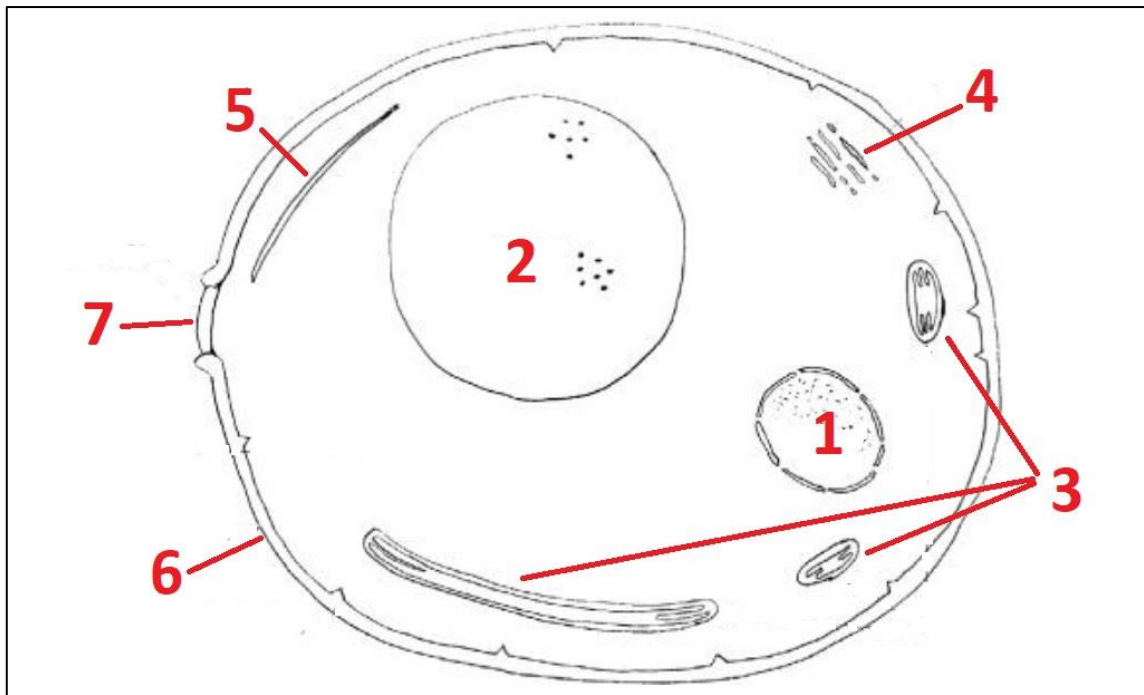
Drożdże to jednokomórkowe organizmy eukariotyczne zaliczane do królestwa grzybów. Rozmnażają się wegetatywnie przez pączkowanie. Obecnie wyróżniamy dziesięć gatunków drożdży: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces servazi* i *Saccharomyces unisporus*. W browarnictwie używa się głównie dwóch pierwszych wymienionych gatunków: *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*, zwane również *uvarum* lub *carlsbergensis* [79], [80]. Do produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu często wykorzystuje się takie organizmy jak *Saccharomycodes ludwigii*, który zostanie dokładniej opisany w dalszej części tej pracy. Ponadto, w piwie na drodze zakażenia mogą pojawić się bakterie fermentacji mlekowej, chociaż niektórzy piwowarzy wykorzystują wspomniane mikroorganizmy w celu produkcji kwaśnych piw [81]–[84]. Ciekawym ewenementem są również dzikie drożdże *Dekkera bruxellensis* lub *Brettanomyces bruxellensis*, w wielu przypadkach traktowane jako organizmy niepożądane w produkcji piwa jak i wina, jednak tradycyjnie wykorzystywane do produkcji belgijskich piw typu Lambic. Co więcej, w dobie piwnej rewolucji piwowarzy nierzadko sięgają po ten szczep w celu tworzenia nowych stylów piwa [85]–[87].

Komórki drożdżowe mają owalny kształt, ponadto można zaobserwować również komórki o bardziej eliptycznym kształcie. Wymiary drożdży plasują się w przedziałach: 5-10 μm średnicy, 3-10 μm szerokości, 4-14 μm długości. Jak większość żywych komórek, drożdże zbudowane są przede wszystkim z wody. Po wysuszeniu komórka drożdżowa składa się głównie z białek, węglowodanów, związków nieorganicznych i tłuszczu (Tabela 3) [88], [89].

Tabela 3. Skład komórki drożdżowej. Opracowano na podstawie [90]

Skład komórki drożdżowej	
Składnik	Zawartość (% suchej masy)
Białka	40 - 75
Węglowodany	12 - 27
RNA	1,9 - 7
Popiół (zw. nieorganiczne)	6 - 14
Tłuszcze	0,21 - 1,3

Drożdże zawierają organella typowe dla większości komórek eukariotycznych (Rysunek 10). Z zewnątrz otoczone są ścianą komórkową, która jest wytrzymałą powłoką zbudowaną głównie z węglowodanów takich jak chityna. Jej głównym celem jest zapewnienie ochrony przed uszkodzeniami mechanicznymi. Głębiej znajduje się błona komórkowa, którą tworzą lipidy, białka i sterole. Jej zadaniem jest ochrona wnętrza komórki przed czynnikami zewnętrznymi, a także odpowiada za to, co zostanie wchłonięte do wnętrza komórki oraz co zostanie z niej wydzielone. We wnętrzu komórki znajduje się cytoplazma będąca środowiskiem dla pozostałych organelli wewnątrzkomórkowych. Ponadto w cytoplazmie znajdują się liczne enzymy, w tym te odpowiedzialne za istotną z punktu widzenia browarników fermentację etanolową. Kolejnym elementem komórki drożdżowej są mitochondria, które odpowiadają za tworzenie energii podczas metabolizmu tlenowego drożdży. Duża część metabolitów drożdżowych gromadzona jest w wakuolach, czyli wewnętrznych przestrzeniach wydzielonych za pomocą błony komórkowej. Dodatkowo organy te uczestniczą w rozkładzie białek. Część białek i lipidów jest modyfikowana w kolejnym organellum zwanym aparatem Golgiego, który następnie zajmuje się ich dystrybucją wewnątrz komórki. Najbardziej rzucającym się w oczy elementem komórki drożdżowej jest jądro komórkowe, w którym przechowywane jest większość informacji genetycznej. Wszystkie wymienione części składowe komórki są utrzymywane na swoich miejscach przez retikulum endoplazmatyczne, które ponadto pełni funkcje metaboliczne takie jak synteza niektórych tłuszczów czy białek [91].



Rysunek 10. Schemat komórki drożdżowej. Na ilustracji oznaczono: 1- jądro komórkowe, 2 - wakuola, 3 - mitochondria, 4 - aparat Golgiego, 5 - retikulum endoplazmatyczne, 6 - ściana komórkowa, 7 - blizna po podziale komórkowym. Ilustracja wykonana na podstawie [92]

Drożdże do wzrostu i podtrzymania swoich funkcji życiowych potrzebują następujących składników:

Węglowodany i cukry fermentowalne – w brzeczce piwnej można znaleźć takie cukry jak: glukoza, fruktoza, maltoza, sacharoza, maltotriozy i dekstryny. Poza dekstrynami wszystkie z nich mogą być spożytkowane przez komórki drożdżowe do produkcji energii oraz do syntezy niezbędnych metabolitów, będąc jednocześnie głównym źródłem węgla. W pierwszej kolejności metabolizowane są monosacharydy oraz sacharoza, która rozkładana jest za pomocą oktamerycznego enzymu - inwertazy [93], [94]. Następnie, po zużyciu wymienionych cukrów, maltoza i maltotrioza są rozkładane do cząsteczek glukozy przez enzym zwany maltazą [95], [96]. Ich transport do wnętrza komórki jest energetycznie mniej korzystny niż prostszych cukrów, przez co zostają metabolizowane dopiero po zużyciu łatwiej dostępnego pożywienia. Dodatkowo kolejnym ważnym źródłem węglowodanów dla drożdży jest glikogen, czyli materiał zapasowy, szczególnie użyteczny na początku procesu fermentacji brzeczki piwnej [56], [88].

Źródła azotu – w brzeczce zapewniane są przez aminokwasy i peptydy dostarczane ze słodu. Aminokwasy z brzeczki są metabolizowane w określonej kolejności (**Błąd! Nieprawidłowy odsyłacz do zakładki: wskazuje na nią samą.**). Najłatwiej metabolizowane są: glutamina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, asparagina, seryna, treonina i lizyna. Następnie metabolizowane są: walina, metionina, leucyna, izoleucyna, histydyna. W kolejnym kroku wykorzystywane są: glicyna, alanina, fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan. Na końcu, z największą trudnością, drożdże wykorzystują prolinę. Pobierane aminokwasy są rozkładane przez transaminazę, która odcina grupy aminowe od reszty aminokwasu, dając tym samym materiał do budowy nowych peptydów [88]. Drożdże w toku ewolucji zminimalizowały niezbędną ilość aminokwasów potrzebną do syntezy białek [97].

Tabela 4. Kolejność metabolizowania aminokwasów przez drożdże. Opracowano na podstawie [88].

Kolejność metabolizowania aminokwasów przez drożdże browarnicze	
Kolejność	Aminokwasy
1	glutamina, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, asparagina, seryna, treonina, lizyna
2	walina, metionina, leucyna, izoleucyna, histydyna
3	glicyna, alanina, fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan
4	prolina

Tlen – mimo że przez większość czasu produkcji piwa drożdże funkcjonują w warunkach beztlenowych, omawiany składnik jest niezbędny do ich wzrostu i budowy biomasy po wprowadzeniu drożdży do fermentora. Tlen jest szczególnie potrzebny do budowy steroli i nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz do tworzenia się mitochondriów. Aby zapewnić odpowiednią ilość tlenu, brzeczkę napowietrza się przed zadaniem jej drożdżami. Wiele szlaków metabolizmu tlenowego drożdży w przypadku fermentacji breczki piwnej jest blokowanych przez efekt Crabtree, który występuje wskutek dużej zawartości glukozy w brzeczce i polega na zdolności do produkowania etanolu w warunkach tlenowych [98]–[100].

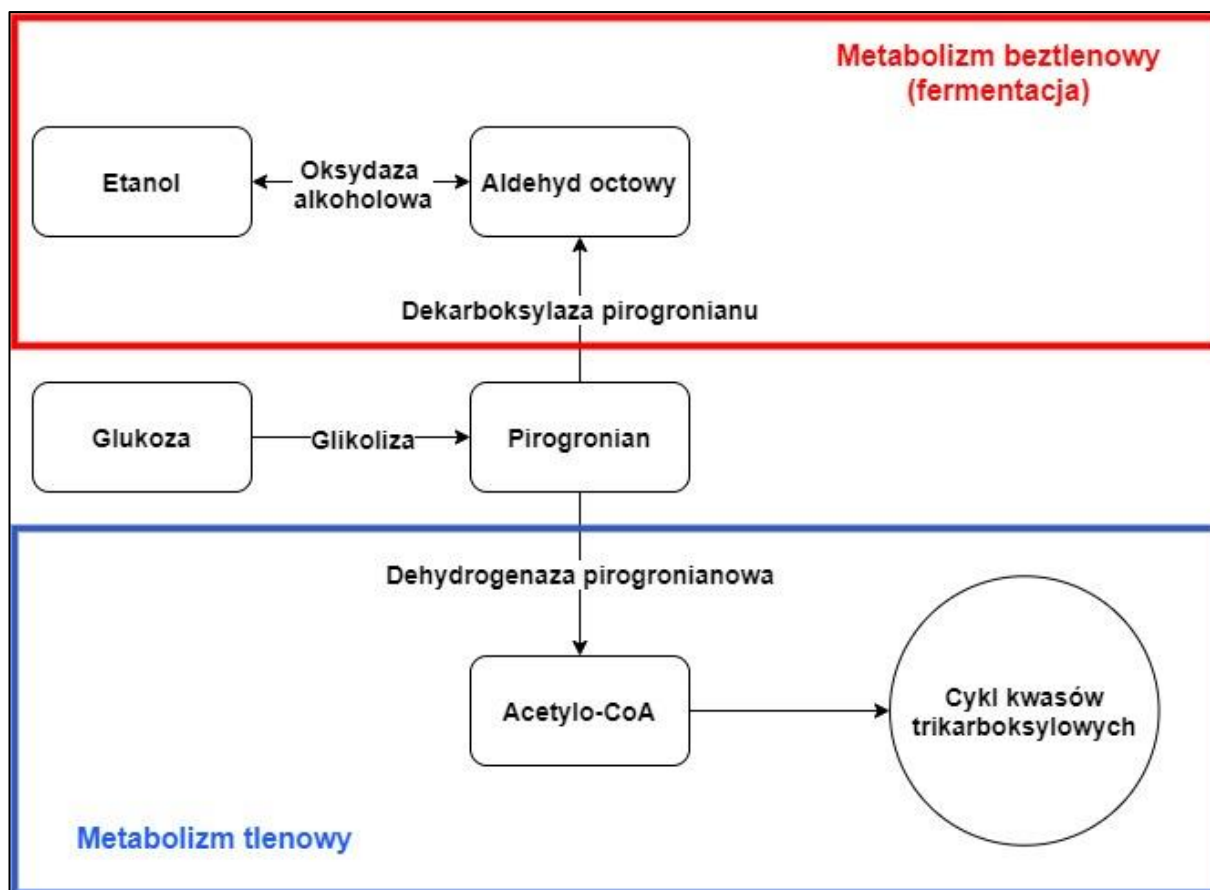
Minerały – mimo niewielkich ilości, które są potrzebne dla komórek drożdżowych, pełnią bardzo ważne funkcje w metabolizmie omawianych mikroorganizmów (Tabela 5). Ich głównym zadaniem jest poprawianie integralności komórki, zdolności flokulacji, ekspresji genów, podziałów komórkowych oraz regulacja aktywności enzymów. Metalami niezbędnymi dla drożdży do przeprowadzania fermentacji etanolowej są: potas, magnez, wapń, cynk, miedź, mangan i żelazo. Potas pomaga w regulacji osmotycznej oraz jest kofaktorem enzymów metabolizujących białka, cukry oraz biorących udział w fosforylacji oksydacyjnej [101], [102]. Magnez jest jednym z ważniejszych składników, gdyż pełni rolę kofaktora dla ponad 300 enzymów obecnych w komórce drożdżowej, w tym odpowiada za podziały komórkowe czy chroni przed stresem wywołanym przez duże stężenia etanolu [103], [104]. Wapń pełni ważną rolę we flokulacji drożdży, ponieważ wiąże się do ścian komórkowych drożdży. Jego nadmiar może skutkować hamowaniem enzymów zależnych od magnezu [105], [106]. Z punktu widzenia browarników cynk jest najważniejszym metalem w metabolizmie drożdży, bo, stymuluje wchłanianie maltozy i maltotriozy do wnętrza komórki, bierze udział w aktywności oksydazy alkoholowej, która jest niezbędnym enzymem do zajścia fermentacji etanolowej, oraz stabilizuje enzymy mające w swojej budowie motyw palca cynkowego. Dodatkowo zaangażowany jest w mechanizm obrony przed stresem wywołanym przez produkowany etanol. Zaobserwowano, że suplementacja medium hodowlanego cynkiem zmniejsza produkcję glicerolu, promując tworzenie etanolu. Cynk, ze względu na jego zapotrzebowanie, jest często magazynowany w wakuolach. Jego zawartość powinna mieścić się w przedziale od 0,05 do 0,5 mg/dm³ breczki [107]–[109].

Warto dodać, że mangan, miedź i żelazo pełnią rolę kofaktorów dla enzymów drożdżowych, choć ich znaczenie jest mniejsze niż w przypadku wymienionych wcześniej metali.

Tabela 5. Wpływ wybranych minerałów na metabolizm drożdży w aspekcie ich wykorzystania w browarnictwie

Wpływ wybranych minerałów na metabolizm drożdży	
Minerały	Wpływ na metabolizm
Potas	<ul style="list-style-type: none"> • regulacja osmotyczna • kofaktor enzymów fosforylacji oksydacyjnej • kofaktor enzymów odpowiedzialnych za metabolizm białek i cukrów
Magnez	<ul style="list-style-type: none"> • kofaktor licznych enzymów • umożliwia podziały komórkowe • pozwala przetrwać stres wywołany etanolem
Wapń	<ul style="list-style-type: none"> • bierze udział we flokulacji drożdży • w nadmiarze może hamować enzymy zależne od magnezu
Cynk	<ul style="list-style-type: none"> • pomaga w transporcie maltozy i maltotriozy do wnętrza komórki • kofaktor oksydazy etanolowej • zmniejsza produkcję glicerolu • pomaga przetrwać stres wywołany etanolem

Drożdże mogą prowadzić swój metabolizm na dwa sposoby. Pierwszy to metabolizm tlenowy, drugi to metabolizm beztlenowy zwany fermentacją (Rysunek 11). W procesie produkcji piwa na początku drożdże zużywają tlen obecny w brzeczce na drodze metabolizmu tlenowego, a następnie - po wyczerpaniu się tlenu - przestawiają swój metabolizm na fermentację.



Rysunek 11. Schemat metabolizmu drożdży w warunkach tlenowych oraz beztlenowych

Podczas metabolizmu tlenowego cząsteczka glukozy jest rozkładana na drodze glikolizy do pirogronianu, a w tym celu zużywana jest cząsteczka NAD^+ . Następnie pirogronian jest rozkładany przez dehydrogenazę pirogronianową do acetylo-CoA. W warunkach tlenowych acetylo-CoA transportowany jest do mitochondriów, gdzie trafia do cyklu kwasów trikarboksylowych (Rysunek 11). Akceptorem wodoru jest w tym wypadku tlen, zaś cały proces pozwala na wytworzenie 38 moli ATP z 1 mola glukozy [110], [111]. W praktyce, za sprawą efektu Crabtree, metabolizm tlenowy występuje w niewielkim stopniu podczas produkcji napojów alkoholowych [99].

W warunkach fermentacji drożdże rozkładają cząsteczkę glukozy na drodze glikolizy do pirogronianu, następnie pirogronian jest przetwarzany w aldehyd octowy poprzez jego dekarboksylazę. W kolejnym kroku aldehyd octowy przekształcany jest przez dehydrogenazę alkoholową do etanolu (Rysunek 11). W tym procesie aldehyd octowy jest akceptorem wodoru, zaś fermentacja pozwala na wytworzenie 2 moli ATP z 1 mola glukozy [88], [112]–[114].

Podczas fermentacji brzojki piwnej – poza etanolem – powstają wyższe alkohole odpowiedzialne za liczne aromaty, takie jak kwiatowe czy alkoholowe. Przykładem tego typu związków mogą być: izobutanol, alkohol izoamylowy czy 2-metylobutanol. Wyższe alkohole tworzone są na drodze metabolizmu aminokwasów: podczas ich rozkładu dochodzi do usunięcia grupy aminowej i dekarboksylacji. Następnie powstałe ketokwasy ulegają dekarboksylacji, w wyniku czego powstają aldehydy, które z kolei są redukowane do wyższych alkoholi. Podczas syntezy aminokwasów również

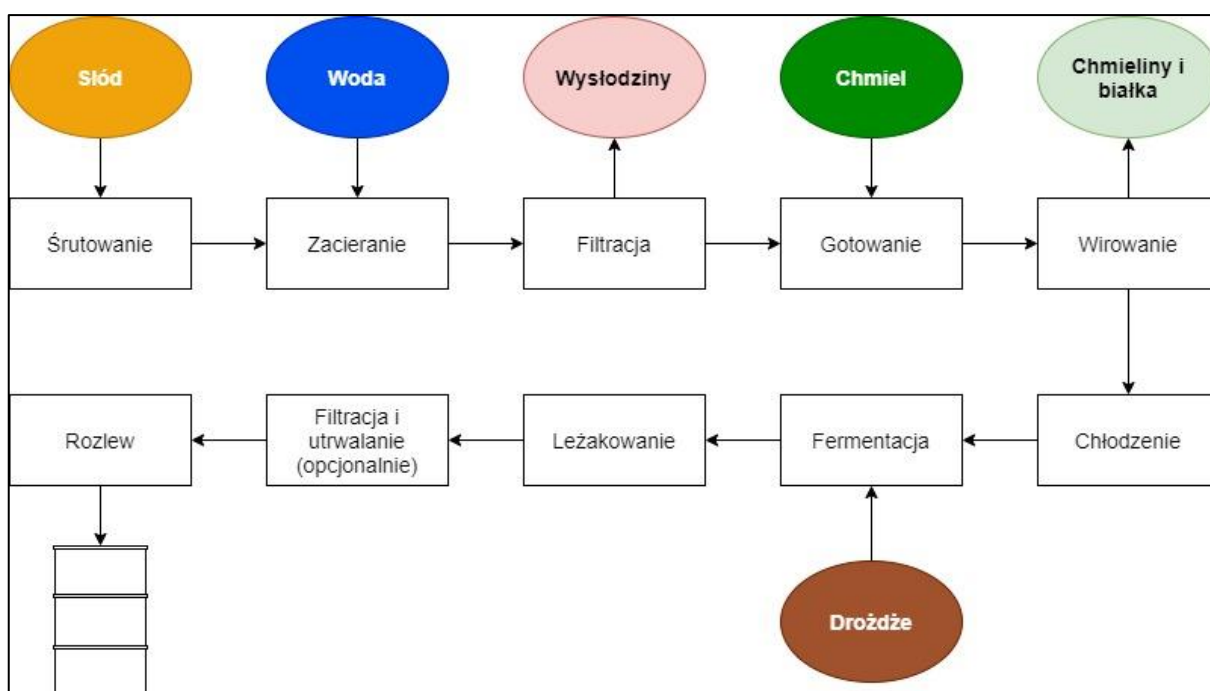
możliwe jest powstawanie produktów ubocznych w postaci ketokwasów, które mogą podlegać uprzednio opisanym przemianom [88].

Kolejnymi ważnymi związkami produkowanymi przez drożdże podczas fermentacji są estry, które nawet w niedużych stężeniach odpowiadają za bukiet aromatyczny piwa. Przykładem tego typu związków są odpowiadający za aromat owocowy octan etylu czy odpowiadający za aromat bananów w piwach pszenicznych octan izoamylu. Estry zbudowane są z alkoholi i kwasów organicznych, a ich powstawanie uwarunkowane jest aktywnością odpowiednich enzymów (takich jak acylotransferaza alkoholowa) oraz dostępnością acetylo-CoA. Wyższe temperatury fermentacji sprzyjają powstawaniu estrów, dlatego najwięcej można ich spotkać w piwach górnej fermentacji [115].

1.3. Proces produkcji piwa

Proces produkcji piwa to złożony proces składający się z wielu etapów (Rysunek 12). Wspomniane etapy można podzielić na trzy kategorie:

- 1) Produkcja brzezki czyli roztworu cukrów, który będzie wykorzystywany do produkcji piwa.
- 2) Fermentacja, czyli proces mikrobiologicznej konwersji cukrów na etanol, dwutlenek węgla, wyższe alkohole i estry.
- 3) Zabiegi kończące, czyli filtracja, utrwalenie i rozlew.



Rysunek 12. Schemat procesu produkcji piwa

Śrutowanie

Proces produkcji piwa zaczyna się od przygotowania surowców. Jednym z nich jest sól, który bezpośrednio przed warzeniem powinien zostać zmielony. Mielenie ma na celu rozkruszenie ziaren sółu w taki sposób, aby łuska była możliwie jak najmniej uszkodzona gdyż w dalszym etapie produkcji

piwa będzie istotnym elementem warstwy filtracyjnej. Z drugiej strony najlepiej aby bielmo obecne w ziarnie było jak najbardziej rozdrobnione w celu zwiększenia jego powierzchni, a co za tym idzie aby jak najlepiej zachodziło ługowanie cukrów do brzezki oraz aby ułatwić działanie enzymom. Ten cel osiąga się stosując różne sposoby śrutowania, które można podzielić na dwa rodzaje śrutowanie na sucho i śrutowanie na mokro. Podczas śrutowania na sucho sód śrutuje się bez żadnych dodatkowych operacji wstępnych. Taka metoda jest najprostsza i jednocześnie najczęściej wykorzystywana ale podczas śrutowania na sucho powstaje duże zapylenie, co w skrajnych wypadkach może być niebezpieczne, a nawet grozić wybuchem [116]. Drugą metodą jest śrutowanie na mokro. Polega ono na uprzednim namoczeniu ziaren siodu w celu ich zmiękczenia. Zmaczanie prowadzi się albo w specjalnych pojemnikach albo za pomocą pary wodnej o temperaturze 80 °C [67]. Do mielenia siodu stosuje się specjalne śrutowniki. Najprostszym typem śrutownika jest śrutownik dwuwalcowy. Urządzenie to zbudowane jest z dwóch walców obracających się przeciwbieżnie krusząc podawany siod. Bardziej zaawansowane śrutowniki zbudowane są z większej ilości walców, i tak mamy śrutowniki czterowalcowe, pięciowalcowe czy sześciowalcowe. W śrutownikach wielowalcowych po rozgnieceniu ziarna łuska jest separowana na sitach, zaś bielmo rozcierane jest na mąkę. Dzięki temu zabiegowi otrzymujemy nieuszkodzoną łuskę, która będzie pełniła rolę warstwy filtracyjnej oraz bielmo rozarte na mąkę, które będzie bardziej podatne na hydrolizę enzymatyczną. Dodatkowo czasem stosuje się śrutowniki młotkowe i dyskowe, które najczęściej wykorzystuje się do mielenia siodu na mąkę. Tego typu operacje stosuje się w browarach wyposażonych w filtry zacierowe, które nie wymagają nieuszkodzonej łuski ziarna jako pomocy filtracyjnej [35], [117]. W nowoczesnych browarach praca śrutowników może być kontrolowana i diagnozowana przez zaawansowane sterowniki elektroniczne, które na podstawie dźwięku pracy urządzenia potrafią określić w jakim stanie jest śrutownik i czy wymaga napraw lub regulacji [118], [119].

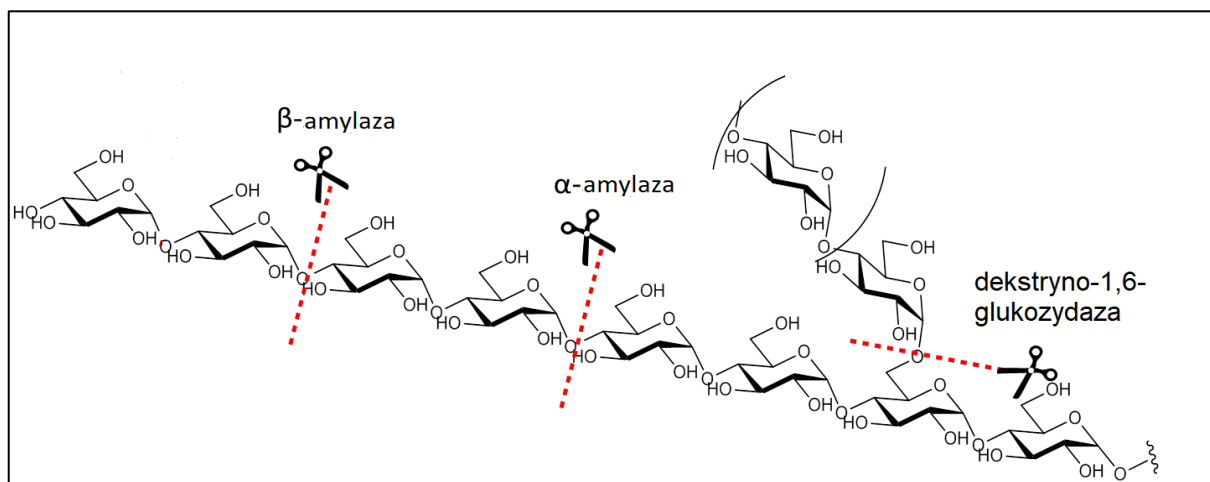
Zacieranie

Po ześrutowaniu siodu oraz ewentualnych surowców niesłodowanych następuje kolejny etap produkcji, czyli zacieranie. Na tym etapie ześrutowane surowce miesza się z uprzednio podgrzaną wodą w specjalnym zbiorniku zwanym kadzią zacierną. Kadź zacierna to zbiornik zaopatrzony w system grzewczy oraz mieszalnik. Podgrzewanie najczęściej odbywa się za pomocą przegrzanej pary wodnej, która trafia do kołnierza grzewczego. Inne metody dostarczania ciepła do omawianego zbiornika to ogrzewanie za pomocą oleju lub podgrzewanie za pomocą palników gazowych, chociaż ostatnia z omawianych metod jest obecnie przestarzała i spotyka się ją sporadycznie w starych, tradycyjnych warzelniach [58]. Aby zapewnić równomierne nagrzewanie zacieru stosuje się różnego typu mieszadła. Najczęściej są to mieszadła mechaniczne o różnej geometrii, sporadycznie można spotkać układy do mieszania zacieru wykorzystujące pompę zamiast mieszadeł mechanicznych. Po zmieszaniu śrutu z wodą następuje enzymatyczna hydroliza cukrów i białek obecnych w siodzie i surowcach niesłodowanych. Enzymy do tego procesu pochodzą ze siodu, chociaż część dużych browarów suplementuje brzezkę dodatkowymi enzymami w celu przyspieszenia procesu zacierania. Omawiane biokatalizatory mają swoje optymalne temperatury działania i pH, dlatego też zacier ogrzewa się do temperatur optymalnych do działania pożądaných enzymów oraz nierzadko koryguje pH za pomocą kwasu fosforowego (V) lub kwasu mlekowego aby mieć pewność, że enzymy działają w swoich optymalnych warunkach (Tabela 6).

Tabela 6. Wybrane enzymy aktywne podczas zacierania i optymalne warunki ich działania [120].

Enzym	Optymalna temperatura [°C]	Optymalne pH	Katalizowana reakcja
Endo-1,4- β -glukanaza	40-45	4,5-4,8	Rozkład wielocząsteczkowych β -glukanów
Egzo- β -glukanaza	< 40	4,5	Rozkład celbiozy
Endopeptydaza	45-50	3,9-5,5	Rozkład białek
Karboksypeptydaza	50	4,8-5,6	Rozkład białek i peptydów
α -amylaza	65-75	5,6-5,8	Rozkład α -glukanów
β -amylaza	60-65	5,4-5,6	Rozkład α -glukanów
Lipaza	55-65	6,8-7,0	Rozkład lipidów
Peroksydaza	>60	6,2	Rozkład substancji organicznych i nieorganicznych
Fosfataza	50-53	5,0	Rozkład związków fosforoorganicznych

Najczęstszym rodzajem zacierania jest tak zwane zacieranie infuzyjne. Polega ono na stopniowym podgrzewaniu całej mieszaniny z utrzymywaniem temperatur optymalnych do działania najważniejszych enzymów, czyli α i β amylazy albowiem są to enzymy odpowiedzialne za rozkład skrobi do prostszych cukrów, które będą mogły być metabolizowane przez drożdże (Rysunek 13).



Rysunek 13. Schemat działania enzymów hydrolizujących skrobię podczas zacierania

Zarówno α jak i β amylazy hydrolizują wiązania α -1,4-glikozydowe w łańcuchach skrobi. Różnica w ich działaniu polega na miejscu rozcinania wiązań. Enzym α -amylaza rozcina omawiane wiązania w losowych miejscach polimeru. Natomiast β -amylaza rozcina co drugie wiązanie α -1,4-glikozydowe licząc od nieredukującego końca łańcucha. W wyniku jej działania uwalniane są cząsteczki dwucukru – maltozy [65]. Niestety optima temperaturowe ich działania są różne, przez co trzeba odpowiednio podgrzewać zacier, aby każdy z enzymów zdążył wykonać swoje zadanie (Tabela 6). Istnieje wiele sposobów prowadzenia zacierania infuzyjnego. Jednym z najpopularniejszych jest reżim zwany z

niemieckiego hoch-kurz, czyli wysoki i krótki. Polega on na utrzymywaniu temperatury zacieru w granicach 60-64 °C przez 35 minut, następnie temperatura jest podnoszona do 70-73 °C i utrzymywana przez 40 minut. Na koniec zacier podgrzewa się do 78 °C i utrzymuje w tej temperaturze przez 5-10 minut aby zatrzymać aktywność pozostałych enzymów oraz aby zmniejszyć lepkość mieszaniny przed kolejnym etapem produkcyjnym.

Drugim sposobem prowadzenia zacierania jest metoda dekokcyjna. Polega ona na tym, że podczas zacierania część zacieru przetrzuca się do osobnego kotła, w którym podgrzewa się ją do niemal 100 °C, po czym podgrzaną mieszaninę zawraca się do reszty zacieru powodując wzrost temperatury całej zawartości kadzi. Ze względu na ilość tego typu operacji metody dekokcyjne dzieli się na jedno, dwu i trójwarową. Ze względu na bardziej rozbudowaną instalację browarniczą i dobrą jakość współczesnych sódów obecnie stosunkowo rzadko stosuje się zacieranie dekokcyjne [55]. Niewątpliwą zaletą omawianego sposobu prowadzenia procesu jest możliwość skutecznego przerabiania gorszej jakości sόδu jak i udział dwóch metod hydrolizy: enzymatycznej oraz termicznej. Tak, jak w przypadku zacierania infuzyjnego, w omawianej procedurze finalnie podgrzewa się zacier do 78 °C i utrzymuje w tej temperaturze przez 5-10 minut.

Poza wymienionymi metodami zacierania istnieją różne ich modyfikacje mające na celu stworzenie brzezki o zadanych właściwościach. Przykładowo zacierając sól w wysokich temperaturach z użyciem glukoamylazy można otrzymać brzezkę o niskiej zawartości węglowodanów [121]. Dodatkowo istnieją badania pokazujące, że za pomocą zmian w procesie zacierania można do pewnego stopnia modulować ilość polifenoli w brzezce [122], [123].

Filtracja

Po zakończonym zacieraniu należy oddzielić młóto od brzezki. W tym celu zacier przenosi się do kolejnego zbiornika zwanego kadzią filtracyjną lub używa się filtrów zaciernych.

Kadź filtracyjna to rozwiązanie stosowane w większości małych i średnich browarów. Omawiany element instalacji to zbiornik przedzielony w poprzek na dwie części za pomocą tak zwanego fałszywego dna (Rysunek 14). Dodatkowo kadź filtracyjna zaopatrzona jest w mieszađło mechaniczne. Fałszywe dno to przegroda, zaopatrzona w wąskie i podługne otwory, na której będzie utrzymywał się placek filtracyjny powstały z sedymentujących wysłodzin (Rysunek 15). Pod fałszywym dnem znajduje się przestrzeń do której zbierany jest filtrat. Następnie klarowny filtrat przepompowywany jest do kadzi warzelnej (często jest to jednocześnie omawiana wcześniej kadź zacierna). W przypadku mętnego filtratu zawracany jest on z powrotem do kadzi filtracyjnej. Podczas filtracji, gdy lustro cieczy niemal dosięgnie warstwy wysłodzin, zrasza się złoże za pomocą gorącej wody w celu wyługowania pozostałych cukrów. Dodatkowo w przypadku znacznego spowolnienia filtracji używa się wspomnianego wcześniej mieszađła mechanicznego, za pomocą którego wzrusza się złoże, po czym czeka się na ponowne uformowanie placka filtracyjnego [124].



Rysunek 14. Wnętrze kadzi filtracyjnej. Na ilustracji widać fałszywe dno, mieszalnik mechaniczny jak i zraszacz używane do wypłukiwania pozostałych cukrów z młota

Filtry zacierne to rozwiązania stosowane zazwyczaj w dużych browarach. Rozwiązanie to jest droższe od filtracji grawitacyjnej, niemniej nie wymaga łupin słodu jako warstwy filtracyjnej oraz znacznie przyspiesza proces filtracji. Filtry zacierne zbudowane są z ram i płyt. Ramy służą do przyjmowania wysłodzin i przekładane są płytami, na które naciągnięta jest przegroda filtracyjna. Taki układ jest ściskany aby zapewnić szczelność układu. Zacier dozowany jest górnym kanałem do ram, zaś brzezka (filtrat) odbierana jest z dołu przez otwory umieszczone w płytach. Następnie brzezka kierowana jest do kadzi warzelnej. Po odebraniu brzezki wysłodziny są ługowane w celu wymycia pozostałych cukrów. Na koniec procesu filtr jest otwierany, po czym usuwa się z niego wysłodziny oraz zdejmuje przegrodę filtracyjną, którą należy wyczyścić [64].

Odpadem po procesie filtracji są wysłodziny (Rysunek 15), które najczęściej wykorzystuje się jako nawóz lub paszę dla zwierząt [125], [126]. Dodatkowo istnieje możliwość stosowania wysłodzin w przemyśle spożywczym jako bogatego w błonnik dodatku do żywności [125], [127]–[129]. Ponadto wysłodziny znalazły zastosowanie jako dodatek do materiałów budowlanych [130], [131] oraz jako biopaliwo, które w dalszej perspektywie może zmniejszyć zapotrzebowanie energetyczne browarów [132]–[136]. Udało się również stworzyć z wysłodzin czynnik barwiący do piwa mogący zastępować ciemne słody [137]. Na koniec warto wspomnieć, że wysłodziny browarnicze mogą być źródłem wielu użytecznych substancji takich jak cukry, białka czy polifenole. Mogą służyć jako tani materiał sorpcyjny czy też jako wypełniacz lub materiał do produkcji biodegradowalnych produktów [138]–[143].

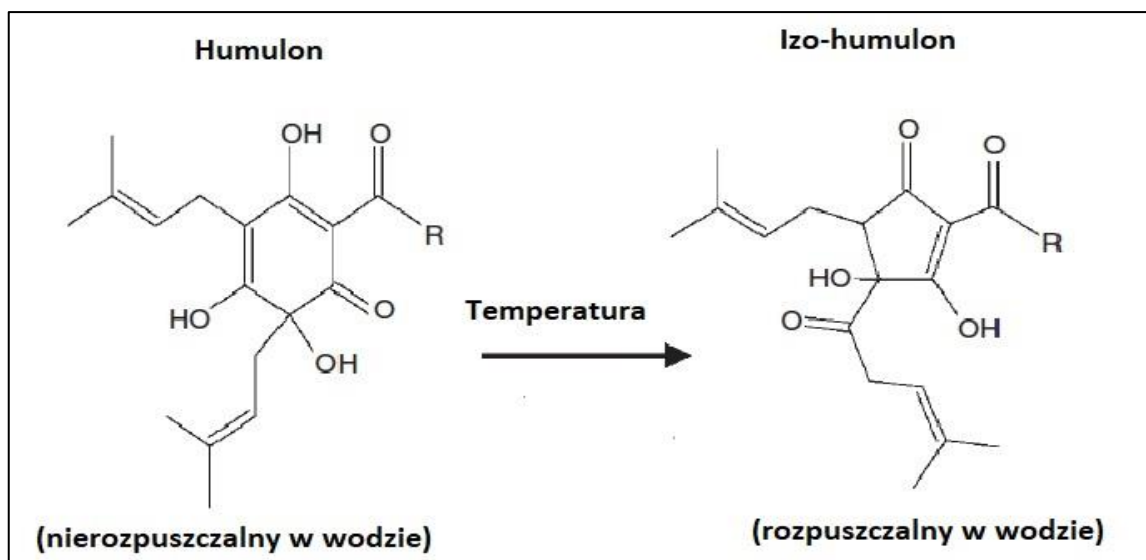


Rysunek 15. Wystodziny browarnicze w formie placka filtracyjnego na dnie kadzi filtracyjnej.

Gotowanie brzezki

Po filtracji brzezka zbierana jest w kadzi warzelnej, gdzie podgrzewa się ją do temperatury wrzenia. Gotowanie jest bardzo ważnym etapem produkcji piwa gdyż:

- Pozwala wysterylizować brzezkę zapewniając preferencyjne warunki dla wzrostu drożdży i minimalizując możliwość zakażenia przez niechciane mikroorganizmy.
- Powoduje odtlenienie brzezki, a co za tym idzie zwiększa jej trwałość oraz zapewnia lepsze warunki do chmielenia.
- W temperaturze wrzenia dochodzi do termicznej izomeryzacji żywic chmielowych, które dzięki temu zabiegowi stają się rozpuszczalne w brzezce (Rysunek 16). Ze względu na te właściwości chmiel dodaje się do brzezki w dwóch porcjach. Pierwsza na początku gotowania, aby wyekstrahować z niej jak najwięcej związków odpowiedzialnych za goryczkę. Druga pod koniec gotowania, aby wyekstrahować związki aromatyczne, które przy dłuższym gotowaniu odparowują, a co za tym idzie ich wpływ na aromat piwa jest znikomy.
- Podczas gotowania brzezki nierzadko dodaje się pozostałe przyprawy takie jak kolendra, trawę cytrynową itp.
- Podgrzewanie brzezki powoduje wytrącenie się białek i denaturację pozostałych enzymów, co zwiększa stabilność przygotowywanego piwa.
- Dodatkowo podczas gotowania można odparować nadmiar wody, a co za tym idzie zagęścić brzezkę i zwiększyć stężenie cukrów, które będą następnie fermentowane przez drożdże [14], [120].



Rysunek 16. Termiczna izomeryzacja żywic chmielowych na przykładzie humulonu. Opracowanie według [144]

Po gotowaniu brzezki odwirowuje się pozostałe chmieliny i wytrącone białka w specjalnej kadzi zaopatrzonej w pompę, która wprowadza brzezkę w ruch wirowy (Rysunek 17). Dzięki temu zabiegowi na środku kadzi formuje się stożek złożony z chmielin i wytrąconych białek, zaś klarowna brzezka odbierana jest poprzez otwór znajdujący się przy ścianie kadzi.



Rysunek 17. Osady powstałe po odwirowaniu gorącej brzezki w Browarze Jastrzębie. Fot. Mateusz Błatoń

Chłodzenie i napowietrzanie

Po gotowaniu brzezki trzeba ją schłodzić i delikatnie napowietrzyć, aby zapewnić jak najlepsze warunki do wzrostu drożdży. Starsze metody zakładały używanie tac chłodniczych, na których brzezka była chłodzona i napowietrzana. Tego typu proces chłodzenia mógł trwać do kilku godzin narażając brzezkę na zakażenie mikrobiologiczne [58], [145]. Obecnie to rozwiązanie jest stosowane w bardzo niewielkiej skali. Obecnie najczęściej stosuje się płytowe wymienniki ciepła pracujące w przepływie przeciwaprądowym, w których ciepło z brzezki jest odbierane przez uprzednio schłodzoną wodę. Następnie do przepływającej brzezki podawane jest sterylne powietrze po to, aby zapewnić tlen niezbędny na początku fermentacji do budowy biomasy drożdży [64].

Fermentacja

Po schłodzeniu i napowietrzeniu brzezki rozpoczyna się fermentację. W tym celu do uzyskanej mieszaniny wprowadza się inokulum złożone z drożdży. W zależności od stylu piwa można wybierać jakich typów drożdży użyje się do jego produkcji, warto jednak pamiętać aby zapewnić im odpowiednie warunki, w szczególności temperaturę. Fermentację można podzielić na kilka etapów:

- Lag faza (faza adaptacyjna), czyli okres, w którym gołym okiem nie widać żadnych zmian. W tym czasie drożdże przystosowują się do nowego środowiska i zaczynają budować swoją biomasę wykorzystując tlen rozpuszczony w brzezce. Ten etap trwa od kilku do 24 godzin

- Kolejny etap zwany fazą niskich krążków (faza wzrostu logarytmicznego) to etap kiedy drożdże przeprowadzają fermentację etanolową szybko zużywając cukier obecny w brzezce oraz budując swoją biomasę. Podczas tego etapu na powierzchni fermentora można zauważyć białą, drobnopęcherzykową, pianę przypominającą bitą śmietanę (Rysunek 18).

- W dalszym etapie zwanym fazą wysokich krążków (faza stacjonarna) piana zyskuje barwę brunatną i można w niej zauważyć duże bąble gazu. Wtedy też fermentacja osiąga swoje maksimum. Jednocześnie na tym etapie ilość żywych komórek drożdżowych jest w przybliżeniu stała.

- Ostatnią fazę, nazywaną fazą opadania krążków (faza obumierania), cechuje zanikanie piany na powierzchni młodego piwa. Wtedy drożdże zaczynają obumierać i opadać na dno fermentora, zaś piwo można przetaczać do kolejnego etapu, czyli leżakowania.

- Fermentacja leżakowa, zwana również cichą odbywa się po oddzieleniu większości drożdży od młodego piwa, które przenosi się do zbiorników leżakowych. Tam temperatura jest obniżana do 1-5 °C i piwo nasycza się dwutlenkiem węgla, powoli dokończa fermentować oraz buduje się i utrwała się jego bukiet aromatyczny.



Rysunek 18. Otwarta kadź fermentacyjna w Browarze Tenczynek. Na zdjęciu widać fermentujące piwo w fazie niskich krążków

Fermentację przeprowadza się w specjalnych kadziach fermentacyjnych. Jednym ze sposobów prowadzenia fermentacji jest wykorzystanie otwartych kadzi fermentacyjnych (Rysunek 18), w których piwo przebywa aż do fazy opadania krążków. Dzięki dużej ilości CO₂ produkowanego przez drożdże możliwe jest utrzymanie warunków beztlenowych. Następnie piwo jest przetłaczane do zbiornika leżakowego, w którym dojrzewa i nasycy się CO₂ (Rysunek 19). Ze względu na potrzebę utrzymania niskiej temperatury zbiorniki leżakowe najczęściej umieszcza się w piwnicy, gdzie łatwiej jest utrzymać niskie temperatury. Gdy piwo jest już gotowe zbiornik podłącza się do aparatury rozlewniczej [35], [64], [117].



Rysunek 19. Zbiorniki leżakowe znajdujące się w Browarze Tenczynek

Drugim typem przeprowadzania fermentacji jest użycie zbiorników cylindryczno-stożkowych zwanych skrótem CKT lub CCT (ang. Cylindrically-Conical Tank) (Rysunek 20). Tego typu zamknięte zbiorniki mają kształt walca ze stożkiem zwężającym się w kierunku dołu. W ściankach zainstalowane są płaszcze chłodzące, w których czynnikiem chłodzącym jest zazwyczaj mieszanina glikolu polietylenowego z wodą. Fermentory cylindryczno-stożkowe umożliwiają przeprowadzenie fermentacji piwa jak i jego leżakowanie w tym samym zbiorniku. Po zakończeniu fermentacji drożdże opadają na dno zbiornika, skąd odrzuca się je za pomocą zaworu spustowego, po czym zaczyna się leżakowanie. Obecnie większość browarów korzysta ze zbiorników CCT gdyż jest to rozwiązanie prostsze w obsłudze i zajmujące mniej miejsca, jednocześnie pozwalając na większą elastyczność produkcji [14].



Rysunek 20. Fermentory cylindryczno-stożkowe w Browarze Jastrzębie. Fot. Mateusz Błatoń

Filtracja

Filtracja to proces, który ma na celu usunięcie z piwa zmętnienia spowodowanego komórkami drożdżowymi lub zawieszonymi w piwie cząstkami stałymi. Proces ten nie jest stosowany we wszystkich typach piw. Przykładowo piwa pszeniczne cenione są za ich naturalną mętność, natomiast od piw typu lager oczekuje się, iż będą klarowne. Do klarowania piw najczęściej wykorzystuje się filtry świecowe lub płytowe (Rysunek 21), w których używa się ziemi okrzemkowej jako pomocy filtracyjnej. W niektórych małych browarach nieposiadających własnych filtrów sporadycznie stosuje się żelatynę lub karuk [14], [117], [146].

Utrwalanie

Utrwalanie to proces, który ma na celu zwiększenie stabilności mikrobiologicznej piwa. W tym celu można stosować mikrofiltrację w celu pozbycia się komórek drożdżowych. Drugim sposobem jest pasteryzacja, którą prowadzi się w pasteryzatorze przepływowym, gdzie piwo jest przetłaczane i ogrzewane zgodnie z zadanymi parametrami. Drugim sposobem prowadzenia pasteryzacji jest użycie

pasteryzatora tunelowego, gdzie piwo rozlane do opakowań jednostkowych jest podgrzewane zgodnie ze stosowanym programem pasteryzacji [64], [147].



Rysunek 21. Płytkowy filtr do piwa w Browarze Tenczynek

Rozlew

Gotowe piwo w celu ekspedycji do odbiorców powinno być rozlane do beczek lub opakowań jednostkowych. Do restauracji, barów i pubów wysyła się piwo w aluminiowych lub stalowych beczkach zwanych kegami. W niektórych przypadkach stosuje się również jednorazowe zbiorniki plastikowe. Objętość omawianych pojemników waha się w zakresie 10-50 dm³, z czego najczęściej spotyka się kegi o pojemności 30 lub 50 dm³. Ponadto piwo rozlewane jest do mniejszych pojemników, które mają trafić do odbiorców indywidualnych. W tym celu stosuje się plastikowe lub szklane butelki w kolorze brązowym lub rzadziej zielonym. Ciemna barwa ma na celu ochronę piwa przed światłem słonecznym, które powoduje fotolizę niektórych związków obecnych w piwie, wskutek czego powstają związki o nieprzyjemnym zapachu [148]. Drugim typem stosowanych pojemników są puszki stalowe lub aluminiowe.

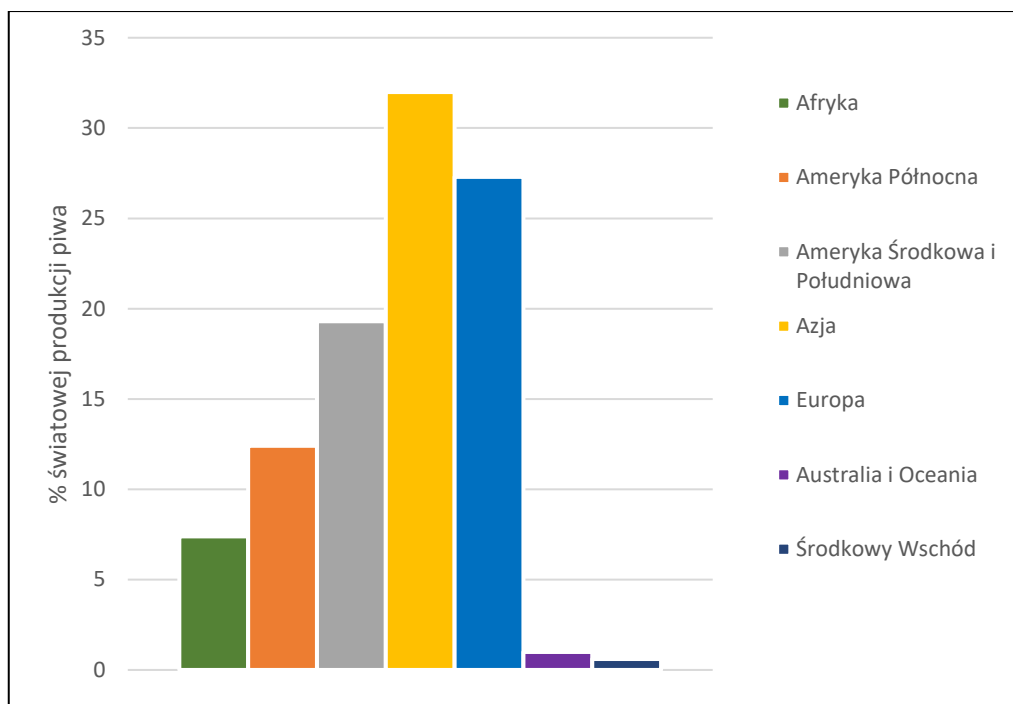
2. Piwo w Polsce i na świecie

Szacuje się, że obecnie piwo jest najpopularniejszym napojem po wodzie i herbacie. Zgodnie z raportem firmy Kirin w 2018 roku na świecie wyprodukowano 191 milionów kilolitrów piwa [149].

Obecnie dziesięcioma największymi graczami na rynku piwa są:

- Asahi Group Holdings Ltd. z siedzibą w Tokio
- Anheuser-Busch InBev NV/SA mieszczący się w Leuven w Belgii
- Beijing Yanjing Brewery Company Limited z główną siedzibą w Pekinie
- Carlsberg Group mieszczący się w Kopenhadze w Danii
- Diageo plc z siedzibą w Londynie
- Dogfish Head Craft Brewery Inc z siedzibą w Milton w stanie Delaware w USA
- Heineken N.V. ze swoją główną siedzibą w Amsterdamie
- Sierra Nevada Brewing Co. wywodząca się z Kalifornii w USA
- Grupo Modelo działająca w Meksyku
- United Breweries Holdings Limited mieszczący się w Bengaluru w Indiach
- Oettinger Brauerei GmbH wywodzący się z Bawarii
- Kirin Holdings Co. Ltd. Pochodzący, tak jak lider rankingu, z Tokio [150].

Wymienione przedsiębiorstwa posiadają w swoich rękach liczne browary rozsiane po całym świecie. Dodatkowo często dochodzi do wykupu lub fuzji mniejszych zakładów w ramach większego holdingu. Przykładowo w Polsce duże i znane browary należą do wymienionych firm, i tak Grupa Żywiec jest częścią Heinekena, zaś Kompania Piwowarska produkująca znane piwa takie jak Lech czy Tyskie należy do Asahi Group [151]. W związku z tym warto przyjrzeć się jak rynek piwowarski jest podzielony na regiony (Rysunek 22). Na wykresie widać, że najwięcej piwa produkuje się w najbardziej zaludnionym regionie świata, czyli w Azji. Powstaje tam niemal jedna trzecia światowej produkcji piwa. Drugim największym producentem omawianego trunku jest Europa, która odpowiada za 27% światowej produkcji piwa. Silna pozycja Europy spowodowana jest dużą ilością browarów, długoletnimi tradycjami piwowarskimi oraz wysoce rozwiniętą kulturą picia tego napoju [152]. Trzecim regionem pod względem produkcji piwa jest Ameryka Środkowa i Południowa, w której powstaje ponad 19% piwa na świecie. W Ameryce Północnej powstaje ponad 12% światowej produkcji piwa. Pozostałe regiony, czyli Afryka, Oceania i Środkowy Wschód produkują mniej niż 10% światowej produkcji piwa. Tutaj głównym czynnikiem hamującym branżę piwowarską mogą być względy religijno-kulturowe, przez co popyt na piwo jest w tych krajach stosunkowo mały, natomiast w przypadku Australii i oceanii niewielka populacja jest powodem niewielkiego popytu na piwo.



Rysunek 22. Podział światowej produkcji piwa w 2018 roku ze względu na regiony. Opracowanie według [149]

Pod względem krajów niekwestionowanym liderem produkcji piwa jest Chińska Republika Ludowa, w której w 2018 roku wyprodukowano niemal 39 mln kl piwa. W tym samym roku USA odpowiadało za wyprodukowanie 21 mln kl piwa. Kolejnymi największymi producentami były Brazylia i Meksyk, produkujące odpowiednio 14 mln kl i 12 mln kl omawianego napoju. Na piątym miejscu znalazł się największy europejski producent piwa, czyli Niemcy z wynikiem ponad 9 mln kl piwa. Polska w tym rankingu zajmowała miejsce 10 z produkcją wynoszącą 4 mln kl. Większą produkcją piwa niż Polska mogły się jeszcze pochwalić Rosja, Japonia, Wietnam i Wielka Brytania [149].

W Europie największymi producentem piwa są Niemcy, Wielka Brytania i Polska, co oznacza że Polska jest drugim największym w Unii Europejskiej producentem piwa (Tabela 7). W latach 2014-2018 Niemcy produkowały między 87 a 95 mln hl piwa rocznie. Najmniejszą produkcję odnotowano w roku 2020, co może być spowodowane pandemią wirusa SARS-CoV-2, która ograniczyła popyt na piwo. Najmniejszym producentem piwa w UE jest Malta, której produkcja waha się w przedziale 131-186 tys. hl. Produkcja piwa w krajach Unii Europejskiej w latach 2014-2020 utrzymuje się na stabilnym poziomie wahającym się między 341 a 363 mln hl, z czego najmniejsza produkcja była obserwowana w latach 2014 oraz 2020. Z danych liczbowych widać stabilny wzrost europejskiej branży piwowarskiej z przejściowym kryzysem w roku 2020 spowodowanym pandemią SARS-CoV-2 [153], [154].

W Polsce produkcja piwa utrzymuje się na poziomie wynoszącym 39-41 mln hl. Dane pokazują, że pandemia nie wpłynęła znacząco na polski przemysł piwowarski. Może to być spowodowane inną kulturą spożywania alkoholu. Polacy częściej piją piwo w domowym zaciszu, zamiast tak jak w wielu krajach zachodu w pubach i restauracjach. Warto dodać, że w Polsce produkcja piwa znacząco wzrosła w ciągu ostatnich 30 lat. W 1990 roku w Polsce wyprodukowano nieco ponad 11 mln hl piwa, w 2000 roku liczba ta wynosiła już ponad 25 mln hl. Ta zmiana spowodowana była przejęciem i modernizacją starych browarów przez większych graczy na rynku. W 2006 roku odnotowano 3 krotnie większą produkcję niż w 1990 roku. Po kilku latach stabilizacji w okresie 2007–2010, na początku drugiej dekady XXI wieku, a więc w okresie tak zwanej

„piwnej rewolucji”, notowano ponownie sukcesywny wzrost produkcji głównie przez browary średnie i duże do poziomu około 40 mln hektolitrów rocznie [41], [154]. Obecnie na polskim rynku za 78,2% produkcji piwa odpowiadają duże browary, z czego 33,3% całej produkcji powstaje w browarach Kompani Piwowarskiej, 27,4% w warzelniach Grupy Żywiec, 17,5% w zakładach należących do Carlsberg Polska. Browary średnie odpowiadają za 18,3% produkcji natomiast browary regionalne i rzemieślnicze produkują 3,5% krajowej produkcji piwa [155].

Tabela 7. Produkcja piwa w Europie w latach 2014-2020. Wielkości podane w tys. hl. Opracowano na podstawie [154]

Kraj	Lata						
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Austria	9001	9023	9227	9312	9472	9516	9149
Belgia	18207	19811	20616	b/d	b/d	b/d	b/d
Bułgaria	4890	4960	5180	5020	5070	4874	4570
Chorwacja	3405	3379	3348	3395	3434	3239	2344
Cypr	318	341	365	383	398	388	295
Czechy	19129	19530	20475	20322	21272	21604	20122
Dania	6110	5970	6200	6060	6040	5862	5874
Estonia	1608	1398	1416	1369	1287	1293	1291
Finlandia	4010	3970	4100	4036	3924	3814	3766
Francja	1985	2030	2065	2100	2200	2230	2160
Niemcy	95274	95623	94957	93013	93652	91610	87027
Grecja	3700	3820	3827	3800	3933	4075	3377
Węgry	6239	5965	6239	6279	6157	5994	5434
Irlandia	7288	7755	7680	8019	8322	8240	7100
Włochy	13521	14286	14516	157	16448	17288	15829
Łotwa	968	856	739	820	823	764	b/d
Litwa	3172	3108	2999	2727	2904	3124	b/d
Luksemburg	271	287	290	290	293	288	200
Malta	146	154	170	175	181	186	131
Holandia	23726	24012	24559	24313	24912	24128	22310
Polska	40075	40890	41369	40382	41482	40411	39066
Portugalia	7290	6465	6474	6994	6758	7103	6589
Rumunia	1475	1595	1578	1605	1660	1669	1663
Słowacja	2880	2864	3014	3103	2902	3195	3034
Słowenia	2098	2029	1696	1399	1973	2021	1960
Hiszpania	33614	34888	36344	37391	38134	39516	34692
Szwecja	4643	4689	4442	4421	4480	4395	4143
Razem UE	346183	352323	356672	356389	363467	362534	341037
Norwegia	2250	2290	2361	2199	2456	2377	2542
Szwajcaria	3432	3438	3422	3464	3659	3675	3404
Turcja	10252	9819	9567	9597	9700	8750	8662
Wielka Brytania	41204	41270	38084	40480	40885	39247	32217

Sprzedaż piwa w Unii Europejskiej w latach 2014-2020 utrzymuje się na w miarę stałym poziomie wynoszącym między 296 a 322 mln hl. W latach 2014-2019 można było zauważyć powolny wzrost w ilości sprzedawanego piwa, zaś w 2020 roku branża odnotowała spadek spowodowany pandemią (Tabela 8). Podobną zależność można zauważyć w całej Europie, gdzie sprzedaż piwa spadła między latami 2019 a 2020 o 31 mln hl. Najmniej piwa sprzedaje się na Malcie, w Luksemburgu oraz na Cyprze. Niekwestionowanym liderem w sprzedaży piwa w Europie są Niemcy, gdzie sprzedaje się między 78 a 86 mln hl piwa rocznie. Polska, pod względem sprzedaży piwa, znajduje się na podobnym poziomie co Hiszpania sprzedając między 34a 38 mln hl piwa.

Tabela 8. Sprzedaż piwa w Europie w latach 2014-2020. Wielkości podane w tys. hl Opracowano na podstawie [154]

Kraj	Lata						
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Austria	8885	8977	9030	8984	9190	9173	8637
Belgia	8095	7951	7689	7013	7022	7007	5704
Bułgaria	5230	5300	5500	5400	5500	5455	5220
Chorwacja	3218	3322	3292	3398	3611	3585	2808
Cypr	425	457	468	515	524	532	377
Czechy	15768	15703	15875	15518	15936	16084	b/d
Dania	3650	3430	3680	3580	3600	3588	3551
Estonia	931	900	888	905	935	892	896
Finlandia	4244	4209	4208	4132	4044	3976	3873
Francja	19956	20600	21190	21500	23500	23600	22000
Niemcy	86512	86018	85532	83582	84649	82933	78706
Grecja	3845	3825	3882	3801	3849	3942	3031
Węgry	5793	6541	6704	6757	6886	7124	6198
Irlandia	4481	4414	4576	4479	4630	4537	3748
Włochy	17755	18914	19029	19825	20462	21215	18784
Łotwa	1555	1523	1510	1604	b/d	b/d	b/d
Litwa	2784	2680	2532	2213	b/d	b/d	b/d
Luksemburg	308	300	312	340	362	370	260
Malta	211	218	231	247	270	268	199
Holandia	11326	11696	11871	11935	12269	12320	10600
Polska	37644	37706	37903	37223	38360	37949	34689
Portugalia	4764	4741	4891	5251	5271	5478	4688
Rumunia	1490	1580	1580	1611	1660	1670	1675
Słowacja	3720	3956	3708	3914	3963	3980	3788
Słowenia	1615	1583	1635	1608	1653	1623	1490
Hiszpania	36315	37456	38510	39373	39953	41289	36338
Szwecja	4399	4368	4454	4542	4646	4615	4638
Razem UE	308330	312588	314899	313748	321502	322052	296873
Norwegia	2504	2536	2666	2616	2845	2799	3039
Szwajcaria	4657	4624	4605	4623	4715	4736	4530
Turcja	9680	9082	9003	9151	b/d	b/d	b/d

Wielka Brytania	43752	43762	43731	45924	47772	47119	40883
Razem	368923	372592	374904	376062	385985	385857	354476

Statystyczny mieszkaniec Europy wypija rocznie między 65 a 71 litrów piwa rocznie (Tabela 9). Pod względem spożycia piwa per capita prym wiodą Czesi spożywając między 135 a 144 litry piwa na osobę rocznie. Niemcy i Austriacy spożywają nieco ponad 100 litrów piwa na osobę rocznie. Polska w tym zestawieniu znajduje się nieznacznie poniżej poziomu Austrii i Niemiec, ze spożyciem na granicy 100 l. piwa na osobę rocznie. Od końca lat 90-tych w Polsce zwiększa się udział piwa w ilości spożywanego alkoholu. Do 1997 roku dominowały alkohole mocne, które zaczęły ustępować na rzecz piwa, co poskutkowało tym, że w 2016 roku 56% wypijanego alkoholu w Polsce stanowiło piwo [156]. W Unii Europejskiej najmniej piwa spożywają Włosi nie przekraczając poziomu 35 l. na osobę rocznie. Może to być spowodowane większym upodobaniem do wina niż do piwa oraz podziałem Włoch na bardziej piwną północ i bardziej winne południe. Biorąc pod uwagę całą Europę najmniej piwa wypija statystyczny Turek, który konsumuje do 13 l. piwa na osobę rocznie. Niskie spożycie piwa w tym kraju jest uwarunkowane panującą religią i tradycją.

Tabela 9. Spożycie piwa w Europie per capita w latach 2014-2020. Opracowano na podstawie [154]

Kraj	Lata						
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Austria	107	107	106	105	107	107	100
Belgia	72	71	68	b/d	b/d	b/d	b/d
Bułgaria	72	74	76	74	75	74	75
Chorwacja	80	77	75	79	84	88	81
Cypr	49	54	55	58	59	59	43
Czechy	144	143	143	138	141	142	135
Dania	65	60	62	62	62	62	61
Estonia	84	82	80	82	80	81	81
Finlandia	78	77	77	75	73	72	70
Francja	30	31	32	33	33	33	33
Niemcy	107	106	104	101	102	100	95
Grecja	35	35	36	35	36	37	28
Węgry	59	65	66	67	68	71	62
Irlandia	81	80	81	79	80	77	64
Włochy	29	31	31	33	34	35	31
Łotwa	78	78	78	79	b/d	b/d	b/d
Litwa	95	92	88	b/d	b/d	b/d	b/d
Luksemburg	76	76	74	76	72	69	45
Malta	48	50	53	52	55	52	39
Holandia	68	68	69	70	71	71	61
Polska	98	98	98	97	100	98	93
Portugalia	46	46	47	51	51	53	46
Rumunia	74	80	80	82	85	86	87
Słowacja	69	73	68	72	74	75	70
Słowenia	78	77	79	78	80	82	75

Hiszpania	b/d	47	46	49	52	52	50
Szwecja	48	47	51	55	58	57	56
Norwegia	49	49	51	50	54	57	56
Szwajcaria	56	55	55	54	55	55	52
Turcja	13	12	12	11	11	b/d	b/d
Wielka Brytania	68	67	67	70	72	71	61
Średnia	69	68	68	68	69	71	65

Rozwój branży browarniczej poza wielkością produkcji oddaje również ilość browarów. W Europie można zauważyć stały wzrost ilości zakładów produkujących piwo. W 2014 roku w Europie działało 6855 browarów. W roku 2020 ilość ta niemal się podwoiła i wynosiła 12473 browary (Tabela 10). W niektórych krajach takich jak Hiszpania, Portugalia czy Niemcy widać że rynek się nasycił i nie widać znaczących zmian w ilości działających browarów w latach 2017-2020. Natomiast w części krajów takich jak Polska czy Szwajcaria widać znaczący wzrost ilości nowych browarów. Największy wzrost w ilości zakładów produkujących piwo odnotowano w Rumunii, gdzie w latach 2014-2020 liczba omawianych przedsiębiorstw wzrosła ponad czterokrotnie. Ten drastyczny wzrost związany jest z tzw. „Piwną Rewolucją”, która ogarnia dużą część Europy, w tym Polskę [41], [71].

Tabela 10. Ilość browarów w Europie. Opracowano na podstawie [154]

Kraj	Lata						
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Austria	198	214	235	273	298	311	309
Belgia	168	199	224	261	304	340	379
Bułgaria	16	18	17	25	29	33	37
Chorwacja	6	6	6	6	97	92	98
Cypr	4	4	3	3	4	4	4
Czechy	338	390	398	450	488	617	599
Dania	159	172	180	197	206	216	228
Estonia	15	20	33	43	53	36	40
Finlandia	49	59	82	94	105	113	118
Francja	663	793	950	1100	1600	2000	2300
Niemcy	1359	1392	1411	1500	1542	1552	1528
Grecja	20	28	43	43	46	57	62
Węgry	50	50	50	55	77	79	78
Irlandia	32	50	64	72	77	77	77
Włochy	599	688	757	868	874	853	769
Łotwa	29	37	41	45	64	b/d	b/d
Litwa	75	75	72	b/d	b/d	b/d	b/d
Luksemburg	7	7	30	32	34	33	18
Malta	1	2	2	2	2	2	2
Holandia	304	402	499	623	738	780	785
Polska	133	150	210	210	250	310	363

Portugalia	35	64	94	120	120	120	120
Rumunia	22	30	34	45	64	75	92
Słowacja	39	51	61	68	73	80	90
Słowenia	51	55	62	66	99	105	105
Hiszpania	332	427	483	521	538	519	503
Szwecja	154	219	283	338	375	400	400
Razem UE	4858	5602	6324	7132	8229	8940	9240
Norwegia	75	101	128	136	128	129	135
Szwajcaria	483	623	753	869	1021	1132	1212
Turcja	9	12	10	15	14	16	16
Wielka Brytania	143	158	187	193	196	203	187
Razem	6855	7918	9085	10082	11352	12247	12473

Branża piwowarska to stale rozwijająca się gałąź przemysłu. Rynek podzielony jest głównie między wielkie koncerny, niemniej nie brakuje na nim miejsca dla średnich i małych browarów oraz licznych mikrobrowarów i browarów restauracyjnych. W ostatnich latach można zaobserwować zmiany w upodobaniach konsumentów, którzy coraz częściej sięgają po trunki o mniejszej zawartości alkoholu, a co za tym idzie znaczna część osób zmienia swoje upodobania z alkoholi mocnych takich jak whisky czy wódka w kierunku alkoholi słabszych takich jak piwo [156]. W Europie wytwarza się ponad ¼ światowej produkcji piwa. Obecnie w Europie trwa tzw. „Piwna Rewolucja”, która skutkuje wzrostem ilości browarów regionalnych i rzemieślniczych, zaś konsument coraz częściej oczekuje od producentów produktu o nowych walorach smakowych. W związku z tym można spodziewać się dalszego wzrostu branży piwowarskiej na świecie jak i w Europie.

3. Walory zdrowotne piwa

Piwo od najdawniejszych lat kojarzone jest z napojem pozytywnie wpływającym na ludzkie zdrowie. Wraz z rozwojem nauki udało się odkryć związki chemiczne z piwa, które odpowiadają za jego prozdrowotne właściwości. Źródłem omawianych substancji są surowce piwowarskie, a w szczególności słód, chmiel i drożdże.

Piwo jest napojem, który ma dużą wartość energetyczną, albowiem spożycie 100 ml piwa dostarcza do organizmu ludzkiego około 43 kcal [14]. Wartość ta stanowi około 2% rekomendowanego dziennego zapotrzebowania na energię dla osoby dorosłej [157]. W przefermentowanej brzeczce piwnej zawartość cukrów jest stosunkowo niska w porównaniu do wartości wyjściowej. Głównymi cukrami obecnymi w gotowym piwie są dekstryny i inne bardziej złożone cukry. Kolejnym składnikiem obecnym w piwie są białka, których zawartość waha się w przedziale od 0,09 do 0,79 g/100 ml w zależności od rodzaju piwa [158]. Białka w piwie odpowiadają za jego mętność oraz za pianę [159], [160].

Ilość witamin w piwie różni się w zależności od stylu piwa, a co za tym idzie od użytych surowców. Najliczniej w omawianym napoju występują witaminy z grupy B, takie jak tiamina (0.06-0.09 mg/l), ryboflawina (0.26-0.3 mg/l), niacyna (3.91-4.54 mg/l), kwas pantotenowy (0.36-0.58 mg/l), pirydoksyna (0.34-0.5 mg/l), kwas foliowy (42.3-59.2 µg/l), kobalamina (0.11-0.2 µg/l) [161].

Ilość minerałów w piwie zależy od wielu czynników takich jak jakość użytej wody, gleba i warunki pogodowe podczas uprawy chmielu i zboża oraz od użytych drożdży. Piwo jest dobrym źródłem wapnia (40-140 mg/l), magnezu (60-200 mg/l), fosforu (90-400 mg/l), miedzi (0.09-0.24 mg/l), potasu (330-1100 mg/l), sodu (40-230 mg/l) i selenu (11.8 - 12.1 mg/l). Dodatkowo zauważono, że piwo jest dobrym źródłem biodostępnego krzemu występującego w formie rozpuszczalnego w wodzie kwasu ortokrzemowego [162], [163].

Kolejnym typem związków występującym w piwie są polifenole. Za ich obecność w piwie w największym stopniu odpowiada chmiel. Większość polifenoli występujących w piwie to te o wysokiej masie cząsteczkowej takie jak taniny. Szacuje się, że około 20% polifenoli z chmielu to związki o niskich masach cząsteczkowych, dobrze rozpuszczalne w wodzie. Wśród nich są flawonoidy czy katechiny [73], [159], [164]. Słód również dostarcza polifenoli do brzeczki, niestety te związki są często tracone podczas filtracji brzeczki, gdyż zatrzymują się na wystodzinach browarniczych. Te z nich, które zostaną wymyte do filtratu nierzadko wytrącają się w postaci kompleksów z białkami podczas gotowania brzeczki z chmielem [159], [164]–[167]. Z chmielu pochodzą również prenylowane polifenole. Najważniejszym z nich jest ksantohumol, który występuje w lupulinie. Jego zawartość w chmielu może się różnić w zależności od odmiany i osiągać do 1% suchej masy [168]. Podczas gotowania brzeczki z chmielem dochodzi do termicznej izomeryzacji ksantohumolu do izokszantohumolu, który lepiej rozpuszcza się w wodzie ale wykazuje mniejszą aktywność biologiczną. W większości piw zawartość ksantohumolu jest niska (do 15 mg/l), zaś izokszantohumol spotykany jest w wyższych stężeniach (do 3,44 mg/l) [169]. Z medycznego punktu widzenia ksantohumol korzystnie wpływa na skórę oraz może być przydatny do walki z nowotworem żołądka czy otyłością [170]–[173]. Ponadto jego właściwości mogą chronić przed starzeniem się układu sercowo-naczyniowego [171]. Fenole, które mają silniejsze właściwości antyoksydacyjne niż niektóre powszechne antyoksydanty takie jak witamina C czy E, pomagają utrzymać potencjał redoks w komórkach organizmu ludzkiego. Związki fenolowe zawdzięczają swoje zdolności antyoksydacyjne możliwości wyłapywania wolnych rodników jak i

chelatacja jonów metali [174]. Warto dodać, że kwasy fenolowe z piwa są szybko i skutecznie wchłaniane przez organizm ludzki [175]. Badania pokazały, że omawiane związki z piwa mogą mieć działanie przeciwko nowotworom piersi, prostaty czy okrężnicy [176]–[178].

Właściwości przeciwnowotworowe wykazują także flawonoidy. Przyjmowanie obecnych w piwie epikatechiny, katechiny, kwercetyny, kemferolu chroni m.in. przed rakiem płuc czy trzustki. Substancje te mogą także wspomagać działanie leków przeciwnowotworowych [179]. W badaniu nad wpływem prenylowanych i nieprenylowanych flawonoidów na peroksydację lipidów mikrosomalnej frakcji wątroby szczura, porównano prenylowane chalkony pochodzące z szyszek chmielu i piwa z nieprenylowanymi flawonoidami chalkonaringeniną, naringeniną, genisteiną i kwercetyną. Chalkony z obecną grupą prenylową (m.in. ksantohumol) okazały się być efektywniejszymi inhibitorami peroksydacji lipidów mikrosomalnych, a co za tym idzie, wykazywały lepszy potencjał chemoprewencyjny [169]. W innych badaniach pokazano, że kwercetyna i kemferol hamują działanie syntazy kwasów tłuszczowych (FAS), kluczowego lipogennego enzymu nadekspresjonowanego w komórkach wielu nowotworów [172], [180]. Kwercetyna, kemferol i mirycetyna hamują działanie enzymów DNA topoizomazy I i II, przez co działają jak niektórych stosowane leki przeciwnowotworowe. Ponadto kemferol wykazuje działanie antyzapalne [181]–[183].

Melanoidyny to polimery o brązowej barwie tworzone w wyniku reakcji Maillarda powstające nieenzymatycznie podczas prażenia słodu. Związki te wykazują potencjał wyłapywania rodników nadtlenkowych [184], [185]. W jęczmieniu występuje także polipeptyd - lunazyna o masie cząsteczkowej 5,5 kDa, który jest w stanie hamować proliferację i migrację komórek nowotworowych powstałych przez chemiczne czynniki onkogenne [186]. Kwas ferulowy jest kolejnym związkiem dostarczającym do piwa ze słodem i dodatkowo wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne [187]–[189]. Związek ten ma zdolność do wyłapywania wolnych rodników, stymuluje enzymy takie jak oksydaza hemu-1 (HMOX1), białka szoku cieplnego (HSP-70), czy kinazę białkową B [190]. Omawiany związek wykazuje również działanie hamujące rozwój bakterii *Listeria monocytogenes* odpowiadającej za chorobę listeriozę [191]. Powstawanie kwasu ferulowego w brzeczce można stymulować poprzez stosowanie przerwy temperaturowej w 45 °C [192]. Następnym wartym uwagi związkiem dostarczającym do piwa przez sład jest maltol. Związek ten ma zdolność ochrony wątroby przed uszkodzeniami wywołanymi przez lipopolisacharydy oraz do ochrony nerek przed cukrzycowym uszkodzeniem wywołanym streptozocyną. Dodatkowo działa ochronnie na układ nerwowy oraz indukuje apoptozę komórek dotkniętych neuroblastomą [193]–[196].

Piwo w swoim składzie zawiera etanol, który w standardowym piwie stanowi między 4 a 5% obj. chociaż niczym niezwykłym są piwa o zawartości etanolu sięgającej 8-10% obj. Czasem można spotkać również dużo mocniejsze piwa powstające na drodze zatężania roztworu poprzez jego wymrażanie [197]. Alkohol etylowy to jedyna toksyna obecna w piwie oraz jeden z powodów, dla którego ludzie często sięgają po omawiany napój. Niestety etanol ma negatywny wpływ na ludzkie zdrowie. W przypadku człowieka można zauważyć różnicę w metabolizmie etanolu w zależności od płci osobnika. Kobiety wydają się być bardziej podatne na etanol niż mężczyźni po wypiciu równoważnej ilości alkoholu, osiągając wyższe stężenie alkoholu we krwi, nawet jeśli dawki są dostosowane do masy ciała. Stwierdzenie to można częściowo przypisać różnicom w całkowitej zawartości wody w organizmie w zależności od płci. Badania pokazują, że mężczyźni i kobiety eliminują mniej więcej taką samą całkowitą ilość alkoholu na jednostkę masy ciała w ciągu godziny. Jednakże kobiety wydają się eliminować znacznie więcej alkoholu na jednostkę beztłuszczowej masy ciała w ciągu godziny niż mężczyźni.

Niektóre badania wskazują, że kobiety są bardziej niż mężczyźni podatne na związane z alkoholem pogorszenie sprawności poznawczej, zwłaszcza w zadaniach wymagających pamięci opóźnionej lub podzielności uwagi. W przypadku upośledzenia sprawności psychomotorycznej nie wydaje się jednak, aby płeć miała na nie wpływ [198]–[201].

Picie w nadmiernych ilościach ma znaczący wpływ na pamięć, zwłaszcza w odniesieniu do transferu informacji do pamięci długotrwałej. Częściowe lub całkowite zablokowanie tworzenia się pamięci nazywane jest z angielskiego *blackoutem*. Wiek nastoletni to krytyczny okres w rozwoju mózgu. Modele zwierzęce pokazują, że mózg nastolatków jest bardziej wrażliwy na ostre i przewlekłe skutki picia alkoholu niż u dorosłych osobników. Chociaż nie jest jasne, w jakim stopniu zmiany neurobiologiczne są wywołane alkoholem to jest prawdopodobne, że okazjonalne, powtarzające się upijanie alkoholem w młodości ma szkodliwy wpływ na funkcjonowanie poznawcze i społeczne. Ze względu na rolę, jaką hipokamp odgrywa w uczeniu się i zapamiętywaniu został on dokładniej przestudiowany. Badania neuroobrazowe wykonane na młodzieży wykazały istotne zmiany w tej strukturze u osób nadużywających alkoholu [202]–[205]. Przewlekłe spożywanie alkoholu może powodować zmiany w funkcjonowaniu i morfologii większości, jeśli nie wszystkich, układów mózgu i struktur mózgu. Wydaje się mało prawdopodobne, aby mechanizmy tolerancji przyczyniały się do zmian neuroadaptacyjnych związanych z uzależnieniem od etanolu, to poza tym jasne jest, że powtarzające się wysokie, odurzające dawki etanolu uruchamiają wspomniane procesy neuroadaptacyjne, które prowadzą do uzależnienia i przyczyniają się do wystąpienia zespołu abstynencyjnego po odstawieniu alkoholu [206], [207].

Spożycie alkoholu utrudnia krzepnięcie krwi. Badania pokazały, że jednym z czynników jest hamowanie krzepnięcia krwi zależne od ADP. Wykazano również, że krzepnięcie w urazach różni się w zależności od płci. Zauważono, że wyższy stosunek estrogenu do progesteronu powodował szybszy początek tworzenia się skrzepu i sieciowania fibryny. Inne badanie z zastosowaniem tromboelastografii (TEG) wykazało stan hipokoagulacyjny u mężczyzn w stanie odurzenia alkoholowego, natomiast nie poczyniono analogicznych obserwacji u kobiet będących w podobnym stanie [208]–[210].

Cholesterol HDL jest dobrze znany jako główny czynnik chroniący przed chorobą wieńcową serca. Umiarkowane spożycie alkoholu pozwala chronić organizm ludzki przed chorobą wieńcową. Omawiany efekt wydaje się być w dużej mierze spowodowany indukowanym przez alkohol zwiększeniem stężenia HDL-C. Zważając na złożony charakter zależności między chorobami alkoholowymi, spożywanie alkoholu nie powinno być traktowane jako podstawowa strategia profilaktyczna. Niemniej rozsądne spożycie alkoholu nie powinno być również postrzegane jako zachowanie niezdrowe. [211]–[213].

Podczas badań zauważono związek między spożywaniem alkoholu a nowotworami jamy ustnej, gardła, krtani, przełyku, wątroby, okrężnicy, odbytnicy, a u kobiet – piersi. Dodatkowo podejrzewa się związek spożywania etanolu z nowotworami trzustki i płuc. Istnieją dowody sugerujące, że działanie alkoholu jest modulowane przez polimorfizmy w genach kodujących enzymy metabolizmu etanolu (np. dehydrogenazy alkoholowe, dehydrogenazy aldehydowe i cytochrom P450), metabolizmu folianów i naprawy DNA. Mechanizmy, dzięki którym spożywanie alkoholu wywiera działanie rakotwórcze, nie zostały do końca poznane, choć najbardziej prawdopodobne wydają się: genotoksyczne działanie aldehydu octowego, głównego metabolitu rozkładu etanolu; zwiększone stężenie estrogenów, które odgrywają ważną rolę w kancerogenezie piersi; rolę rozpuszczalnika dla karcynogenów tytoniowych, wytwarzanie reaktywnych form tlenu i azotu oraz zmiany w metabolizmie folianów [214]–[216].

Kolejnym ciekawym aspektem jest wpływ spożywania etanolu na gęstość mineralną kości. Badania przeprowadzone na starszych ludziach w Korei pokazały, że mężczyźni spożywający alkohol mieli mniejszą gęstość kości od niepijących. Natomiast w przypadku kobiet zauważono odwrotną tendencję, która skutkowałą większą gęstością mineralną kości w przypadku osób spożywających etanol w stosunku do osób nie pijących. Niestety nie istnieje potwierdzone wytłumaczenie tego zjawiska. Obecnie tłumaczy się poczynioną obserwację tym, że lekkie lub umiarkowane spożycie alkoholu zwiększa stężenie estradiolu, który z kolei jest inhibitorem przebudowy kości, i zmniejsza tempo ich degradacji [217], [218].

Podsumowując piwo jest napojem o wysokiej wartości energetycznej dostarczającym znaczne ilości witamin i minerałów. Omawiany napój zawiera wymierne ilości związków biologicznie czynnych takich jak polifenole, flawonoidy czy melanoidyny, które mają dodatni wpływ na ludzkie zdrowie. Jedynym związkiem toksycznym obecnym w piwie jest etanol, który może wpływać na rozwój niektórych nowotworów, upośledzać pamięć, utrudniać proces krzepnięcia krwi. Z drugiej strony alkohol może pozytywnie wpływać na poziom cholesterolu, czy gęstość mineralną kości. Na podstawie powyższych obserwacji można wysunąć tezę, że piwo jest jednym z najzdrowszych napojów alkoholowych, zaś piwo bezalkoholowe można uznać za jeden z najbardziej odżywczych i prozdrowotnych napojów dostępnych na rynku.

4. Piwo bezalkoholowe i wymagania mu stawiane

Wiele produktów spożywanych codziennie zawiera śladowe ilości alkoholu, dobrym przykładem może być kapusta kiszona, kefir, czy niektóre jogurty [219]. Nie inaczej jest z piwem bezalkoholowym. Standardowe piwo zawiera około 4-5% obj. alkoholu etylowego. Niemniej istnieje wiele gatunków piw takich jak trippel, porter czy barley wine, które zawierają wyższe stężenia etanolu sięgające do ponad 10% obj [152], [220]. W Polsce zawartość etanolu w piwie bezalkoholowym reguluje ustawa o podatku akcyzowym, której punkt pierwszy brzmi „Piwem w rozumieniu ustawy są wszelkie wyroby objęte pozycją CN 2203 00 oraz wszelkie wyroby zawierające mieszaninę piwa z napojami bezalkoholowymi, objęte pozycją CN 2206 00, jeżeli rzeczywista objętościowa moc alkoholu w tych wyrobach przekracza 0,5 % objętości.” [51]. Dodatkowo ustawa o wychowaniu w trzeźwości definiuje napoje alkoholowe jako te, które posiadają w swoim składzie ponad 0,5 % obj. etanolu [221]. Oznacza to, że piwo o zawartości alkoholu poniżej 0,5% obj. można w Polsce klasyfikować jako piwo bezalkoholowe. Ponadto część piw zwyczajowo określa się mianem niskoalkoholowych. Niestety w tym wypadku nie ma prawnej klasyfikacji tego typu wyrobów [222]. Na świecie jak i w Unii Europejskiej również nie ma jednolitej definicji piwa bezalkoholowego. Przykładowo w Hiszpani piwo bezalkoholowe może mieć do 1% etanolu objętościowo, zaś we Francji nawet 1,2 % obj. alkoholu (Tabela 11) [223].

Tabela 11. Zestawienie maksymalnej zawartości etanolu w piwach bezalkoholowych w wybranych krajach świata. Opracowano na podstawie [51], [223]

Kraj	Maksymalna zawartość objętościowa alkoholu etylowego w piwie bezalkoholowym
Polska	0,5 %
Niemcy	0,5 %
Czechy	0,5 %
USA	0,5 %
Chiny	0,5 %
Hiszpania	1,0 %
Francja	1,2 %
Norwegia	0,7 %
Wielka Brytania	Alcohol free 0,5 % Non-alcoholic beer 0,05%

Obecnie rynek piw bezalkoholowych w Polsce jak i w Unii Europejskiej ciągle rośnie, zaś konsumenci poszukują piwa o obniżonej zawartości alkoholu, które będzie miało smak jak najbliższy standardowemu piwu alkoholowemu [224]. Głównym wyzwaniem dla piwowarów jest obecnie stworzenie piwa, które w smaku odpowiada gustom konsumentów, jednocześnie mieszcząc się w normach prawnych kraju, w którym produkt będzie dystrybuowany.

5. Metody produkcji piwa bezalkoholowego

Duża część ze składników piwa decydujących o jego właściwościach organoleptycznych i prozdrowotnych pochodzi z chmielu, słodu oraz z w wyniku metabolizmu drożdży. Największym wyzwaniem podczas produkcji piw bezalkoholowych jest pozbawienie napoju alkoholu bez utraty związków odpowiedzialnych za charakterystyczne cechy organoleptyczne piwa. Ten cel można osiągnąć na dwa sposoby. Pierwszym sposobem są metody biologiczne, czyli ingerencje w biochemię procesu produkcji piwa mające na celu wyprodukowanie napoju o zawartości alkoholu akceptowalnej przez prawodawcę. Drugim podejściem do omawianego problemu są metody fizyczne polegające na usunięciu etanolu z gotowego produktu.

5.1 Metody fizyczne

5.1.1 Destylacja

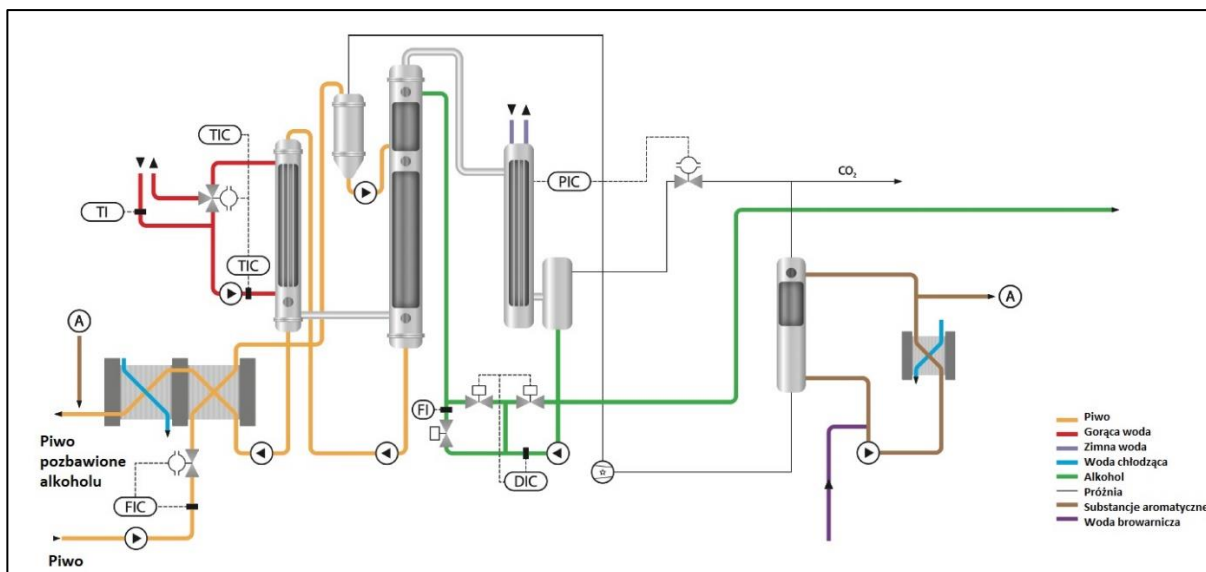
Odparowanie prowadzone jest w wyparkach z tzw. spadającym filmem. Im wyższa temperatura tym większy stopień redukcji alkoholu, ale jednocześnie większa strata cennych związków aromatycznych, np. przy redukcji zawartości etanolu z poziomu 5,0% do 0,5% v/v stężenie wyższych alifatycznych alkoholi stanowi jedyne 6% w stosunku do początkowej ilości, natomiast związki ogólnie niekorzystnie wpływające na smak produktu takie jak: siarczek dimetylu czy diacetyl są w pełni usuwane z gotowego piwa [225]. W praktyce tego typu wyparek się nie stosuje gdyż dużo bardziej efektywnymi urządzeniami są kolumny do rektyfikacji próżniowej.

Bardziej kontrolowane odparowanie piwa, prowadzące do pewnego rodzaju rozfrakcjonowania alkoholu i aromatów ma miejsce na kolumnach rektyfikacyjnych, na których dochodzi do wielokrotnego odparowania i skraplania. Niewątpliwą zaletą tego procesu jest możliwość odebrania jedynie frakcji alkoholowej oraz frakcji zawierającej tylko pewną grupę składników. Dodatkowo prowadząc proces pod obniżonym ciśnieniem można odseparować etanol od piwa w temperaturach rzędu 40°C [226], [227]. Niewątpliwą zaletą tej metody jest jej powszechne zastosowanie. W Europie od ponad 20 lat produkuje się piwo bezalkoholowe metodą rektyfikacji próżniowej. Obecnie w Europie działa kilkanaście tego typu instalacji, z czego pionierem w ich produkcji jest firma Schmidt (Rysunek 23). Obsługa tego typu urządzeń jest stosunkowo prosta, zaś piwo przed dealkoholizacją musi być wyłącznie odgazowane. Pewnym mankamentem tego typu rozwiązania mogą być znaczne koszty inwestycyjne w linię do dealkoholizacji piwa, niemniej otrzymywany produkt będzie się cechował parametrami bardzo zbliżonymi do standardowego piwa, zaś proces rektyfikacji próżniowej nie wpływa w znaczący sposób na jakość produktu [228].



Rysunek 23. Aparatura do rektyfikacji próżniowej firmy Schmidt znajdująca się w browarze Tenczynek

Dostępne źródła podają, że metodą rektyfikacji próżniowej można otrzymać piwo o zawartości alkoholu 0,0% obj. Niestety w takim przypadku związki takie jak octan etylu, 2-metylobutanol, 3-metylobutanol czy izobutanol są niemal całkowicie usuwane z piwa. Na szczęście istnieje kilka sposobów aby zniwelować tego typu niedoskonałości. Pierwsza to mieszanie koncentratu (piwa pozbawionego alkoholu) z uzyskanym destylatem do uzyskania stężenia etanolu na poziomie 0,5% obj. Drugi sposób polega na mieszanii dealkoholizowanego piwa z piwem alkoholowym do uzyskania zawartości etanolu na poziomie 0,5% obj [120]. W ten sposób otrzymuje się piwo o obniżonej zawartości alkoholu i dobrych parametrach organoleptycznych.



Rysunek 24. Schemat instalacji przemysłowej do rektyfikacji próżniowej piwa

Omawiana aparatura działa w następujący sposób: na początku piwo jest podgrzewane i odgazowywane. Następnie odgazowane piwo jest pozabawiane związków lotnych na drodze rektyfikacji próżniowej, a następnie schładzane i odbierane z instalacji. Związki lotne są skraplane, zaś za pomocą modułu odzysku aromatu, część związków aromatycznych jest odzyskiwana i zawracana do piwa pozabawionego alkoholu (Rysunek 24).

5.1.2 Dializa

Proces dializy jest jednym z najmniej skomplikowanych i polega na rozdzieleniu rozpuszczonych w piwie cząstek ze względu na ich rozmiar. Separacja odbywa się na półprzepuszczalnej membranie zaś siłą napędową procesu jest gradient stężeń rozpuszczonych składników w poprzek wspomnianej membrany [229], [230]. Mimo, że w dializie normalnie nie stosuje się podwyższonego ciśnienia to w przypadku piwa stosuje się drobne odstępstwo od tej zasady, a mianowicie wprowadza się dwutlenek węgla, który ma zapobiec wydzielaniu się tego związku zawartego w przerabianym piwie, co z kolei mogłoby niekorzystnie wpłynąć na proces dyfuzji składników rozpuszczonych w piwie przez membranę. Największą zaletą dializy jest niska temperatura stosowana w tej metodzie, co zapobiega rozkładowi termicznemu części związków odpowiadających za cechy organoleptyczne piwa. Niestety w toku procesu poza etanolem usuwane są również wyższe alkohole i estry mające wpływ na aromat piwa. Natomiast większość związków pochodzących z chmielu, w tym te odpowiedzialne za goryczkę i część aromatu zostaje w piwie i nie przekracza membrany ze względu na ich dużą masę cząsteczkową [225], [231]–[233]. Badania pokazały, że za pomocą dializy można uzyskać piwo o obniżonej zawartości alkoholu. Na proces wpływa zwiększenie przepływu piwa. W eksperymencie separacji dokonywano na piwie o zawartości etanolu 3,8 % obj. Przy zastosowaniu membrany o grubości 8 μm i przepływie 300 ml/min udało się uzyskać piwo o zawartości etanolu na poziomie 0,47 % obj. Dla membrany o grubości 11 μm uzyskano piwo bezalkoholowe o zawartości etanolu 0,42 % obj. już przy przepływie 100 ml/min. Niestety wraz z usuwaniem etanolu piwo było zubażane w pozostałe cukry, i tak dla cieńszej membrany ekstrakt piwa wynosił 0,15 °B lg , zaś dla drugiej membrany 0,41 °B lg . Niestety autorzy nie podali

wartości ekstraktu piwa przez rozpoczęciem separacji [234]. Głównym mankamentem dializy jest rozcieńczenie dealkoholizowanego piwa.

5.1.3 Odwrócona osmoza

Odwrócona osmoza jest procesem, w którym wymuszamy przepływ rozpuszczalnika ze środowiska mniej stężonego do bardziej stężonego. Wspomniane środowiska rozdzielone są selektywną membraną o porach średnicy kilku mikrometrów. Natomiast przepływ wbrew gradientowi stężeń wymusza się poprzez przyłożenie podwyższonego ciśnienia sięgającego nawet 60 barów od strony bardziej stężonego roztworu, czyli w omawianym przypadku piwa, zaś przepływ odbywa się w kierunku środowiska wodnego, czyli tego o mniejszym stężeniu etanolu. Stosowane membrany powinny wykazywać wysoką przepuszczalność dla etanolu i wody jednocześnie będąc nieprzepuszczalne dla reszty związków decydujących o cechach organoleptycznych piwa. Jak pokazały badania w procesie odwróconej osmozy z piwa usuwany jest etanol, woda oraz niektóre niekorzystne związki chemiczne takie jak siarczek dimetylu. Niestety poza wspomnianymi związkami w procesie odwróconej osmozy usunięciu ulegają również niektóre estry i wyższe alkohole. Po zakończonym procesie do retentatu trzeba dodać wodę, aby uzupełnić straty wynikające z mechanizmu odwróconej osmozy. Jedną z interesujących metod jest wykorzystanie do tego celu permeatu po odparowaniu etanolu. Wskutek tego zabiegu do retentatu wraca nie tylko woda ale również część związków, które zostały usunięte w toku trwania procesu [235], [236]. Technologia odwróconej osmozy jest znana od kilkudziesięciu lat i wykorzystywana z powodzeniem do odsalania wody morskiej [237]. Niestety obecnie proces odwróconej osmozy jest kosztowny ale już teraz obecne są na rynku instalacje do dealkoholizacji piwa tą metodą. Przykładem może być instalacja do odwróconej osmozy Aroma Plus firmy GEA (Rysunek 25).

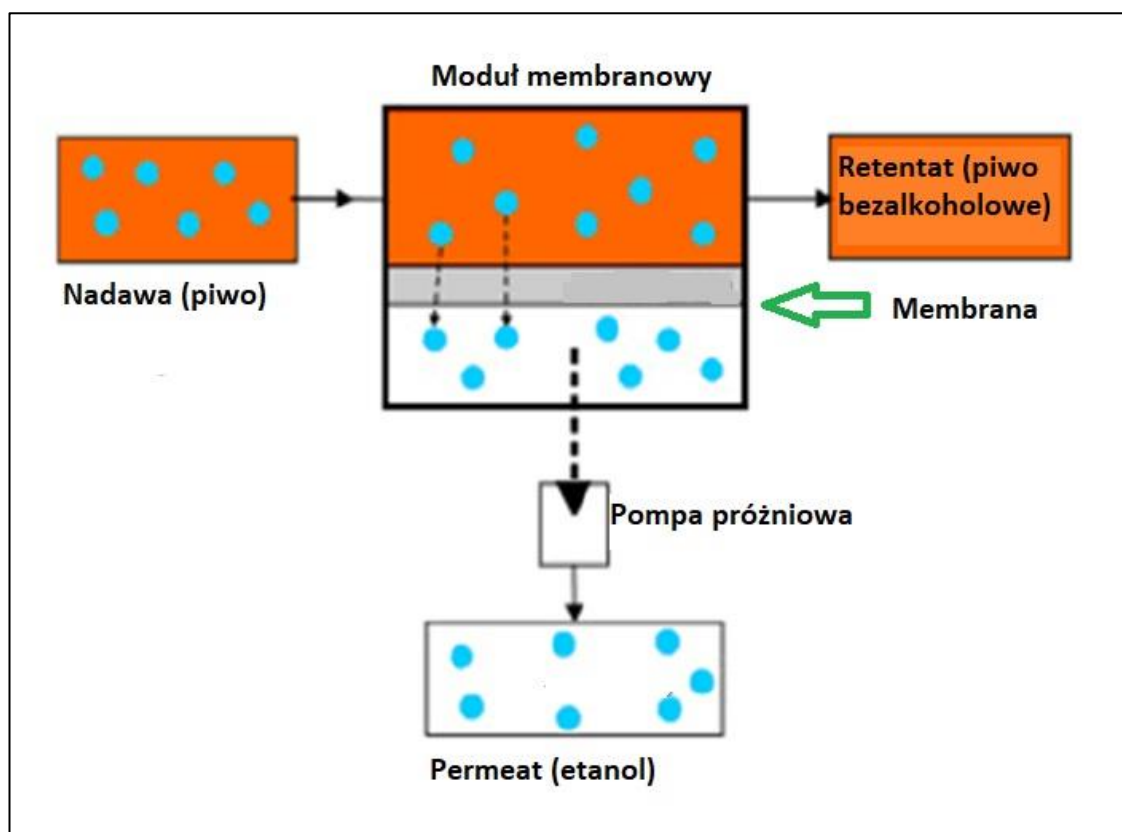


Rysunek 25. Instalacja do dealkoholizacji piwa na drodze odwróconej osmozy firmy GEA. Zdjęcie z materiałów promocyjnych firmy

5.1.4 Perwaporacja

Perwaporacja jest to technika, które wiąże ze sobą trzy mechanizmy separacji: adsorpcji separowanego składnika na membranie, jego dyfuzję przez materiał membrany oraz desorpcję po drugiej stronie membrany (Rysunek 26). Ostatni etap wiąże się z pracą pod obniżonym ciśnieniem, a tym samym odbiorem permeatu w formie gazowej. Zdolność danego składnika (w przypadku

dealkoholizacji piwa jest nim etanol) do przechodzenia przez membranę perwaporacyjną jest ściśle związana z jego ciśnieniem cząstkowym oraz selektywnością membrany [238]. Z racji faktu, że jest to proces wykorzystujący właściwości lotne separowanych składników, poza samym alkoholem do permeatu mogą przechodzić inne, związki odpowiadające za bukiet piwa. Do tej pory perwaporację najczęściej wykorzystywano do odsalania wody [239], [240]. Niemniej próbowano usuwać etanol z wina na drodze perwaporacji z zadowalającym efektem [241]. Badania prowadzone na piwie pokazały, że obniżenie poziomu etanolu z 5% obj. do 0,45% obj. wymagało trzykrotnego powtórzenia procesu. Bezalkoholowe piwo było nieco ciemniejsze od materiału wyjściowego, miało porównywalne pH, zawartość cukrów, polifenoli i antyoksydantów. Goryczka piwa nieco zmalała, zaś zawartość tlenu wzrosła, co jest zjawiskiem niekorzystnie wpływającym na stabilność produktu [236]. Inne badania pokazały, że poziom tyrozolu w piwie poddanym perwaporacji zmniejszył się do 25% początkowej zawartości [242]. Kolejną możliwością jest wykorzystanie perwaporacji jako procesu uzupełniającego inne metody. Omawiana technika idealnie nadaje się do odzysku aromatów z roztworu etanolu uzyskanego na drodze destylacji lub do tworzenia ekstraktów wzmacniających smak piwa bezalkoholowego [242], [243].

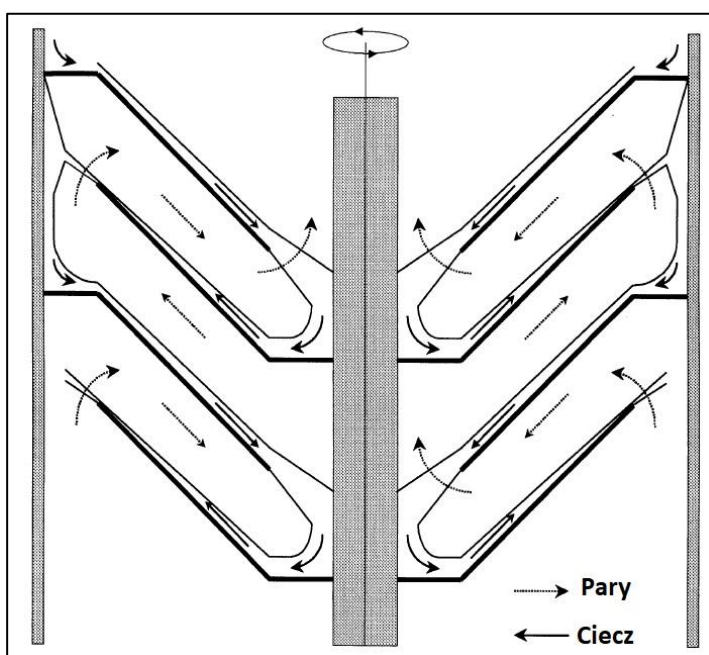


Rysunek 26. Schemat przedstawiający zasadę działania perwaporacji na przykładzie instalacji do dealkoholizacji piwa

5.1.5 Kolumna z wirującymi stożkami (ang. *spinning cone column*)

Kolumny z wirującymi elementami nazywane również kolumnami mechanicznymi mają na celu rozwinięcie powierzchni międzyfazowej za pomocą dostarczonej energii mechanicznej. Do dealkoholizacji napojów najczęściej wykorzystuje się kolumny z wirującymi stożkami. W tym przypadku rozwinięcie powierzchni międzyfazowej uzyskuje się poprzez rozprysk cieczy za pomocą wirnika składającego się ze stożków przymocowanych do obrotowego wału. Ciecz wypyływająca ze stożków

wirnika pod działaniem siły odśrodkowej uderza w ściany kolumny i spływa w kierunku osi obrotu wirnika po powierzchni przegród stożkowych przymocowanych do ścian kolumny. Następnie ciecz trafia na kolejny, niżej położony, obracający się stożek. Od dołu ku górze przepływa para powstała w kotle grzejnym umieszczonym na dole kolumny, która stykając się z cieczą na powierzchni stożków oraz rozpyloną między stożkami wzbogaca się w składnik bardziej lotny, w przypadku dealkoholizacji napojów jest to etanol (Rysunek 27). Para wzbogacona w składnik lotny trafia do deflegmatora i kondensatora, gdzie skroplona część wraca do kolumny, zaś reszta trafia do skraplacza [244]–[246]. W dostępnych pracach widać, że ta metoda skutecznie usuwa etanol [215], [247], jak i pozwala na izolację związków aromatycznych[248]. W przypadku dealkoholizacji wina badania pokazały, że omawiana metoda nie tylko usuwa etanol lecz również zataęza polifenole i inne korzystne związki w bezalkoholowym winie [249], [250]. Piwo otrzymane tą metodą również posiadało obniżoną zawartość etanolu jak i nie odnotowano dużych ubytków w jego profilu aromatycznym [251], [252].



Rysunek 27. Schemat kolumny z wirującymi stożkami. Opracowano na podstawie [244]

5.1.6 Metody sorpcyjne

Jedną z metod na usuwanie etanolu są metody sorpcyjne. W ostatnich latach prowadzono badania nad adsorpcją etanolu na licznych materiałach. Między innymi badano biowęgiel uzyskany wskutek pirolizy drewna z orzecha białego, którego pojemność sorpcyjna wobec etanolu wynosiła ponad 60 mg/g [253]. Kolejnym badanym materiałem był amberlit, którego pojemność sorpcyjna etanolu wynosiła 4,2 mg/g [254]. Ponadto badano sorpcję etanolu na węglu aktywnym [255], nanorurkach wykonanych z dwutlenku tytanu [256] czy na płytkach wykonanych z glinu [257]. Niestety nie wiadomo czy w kompleksowej mieszaninie jaką jest piwo etanol będzie sorbowany preferencyjnie. Dodatkowo w przypadku zastosowania przemysłowego ważne jest aby sorbent był tani, prosty w regeneracji oraz aby był jak najbardziej selektywny wobec usuwanego składnika.

5.2 Metody biologiczne

5.2.1 Przerwana fermentacja

Przerwana fermentacja to obecnie najczęściej wykorzystywana metoda produkcji piwa bezalkoholowego. Idea tego procesu polega na tym, żeby zatrzymać proces fermentacji alkoholowej

zanim drożdże piwowarskie zaczną produkować etanol. W tym celu fermentujące piwo można poddać pasteryzacji, można je również szybko ochłodzić do temperatury 0 °C albo odwirować drożdże. Niestety przez to, że część cukrów nie uległa fermentacji w tak otrzymanym produkcie można wyczuć charakterystyczny słodowy smak. Częściowo można poprawić walory smakowe tak uzyskanego produktu poprzez leżakowanie w kadzi przez około 10 dni [232], [258].

Kolejnym podobnym podejściem do problemu jest stworzenie takich warunków, w których drożdże będą wytwarzały etanol w mniejszych ilościach. Najpopularniejszą metodą na stworzenie takich warunków jest tak zwany proces zimnego kontaktu (cold contact process - proces zwany w skrócie jako CCP). CCP polega na tym, że fermentację prowadzi się w temperaturze 1°C przy zakwaszeniu brzezki do pH 4 za pomocą kwasu mlekowego. W takich warunkach fermentacja alkoholowa zachodzi wolniej, zaś proces tworzenia wyższych alkoholi jak i estrów ulega znacznie mniejszemu spowolnieniu niż wytwarzanie etanolu. Mimo wytwarzania większej ilości związków aromatycznych piwo uzyskane w procesie zimnego kontaktu posiada analogiczny słodowy smak jak piwo wytworzone przez zatrzymanie fermentacji.

Istnieje kilka sposobów polepszania walorów smakowych takiego produktu. Jednym z nich jest zwiększenie udziału ciemnych słodów w zasypie, które maskują słodowy smak. Podobny efekt w postaci maskowania niepożądanego smaku daje użycie około 5% siodu zakwaszającego (obniżającego pH brzezki) w zasypie podczas zacierania. Kolejnym sposobem jest rozcieńczenie brzezki po procesie gotowania zamiast przed gotowaniem, jak to robi się tradycyjnie. Skutkuje to uzyskaniem bogatszego bukietu estrów i wyższych alkoholi. Zaletą obydwu omawianych metod jest to, że można je stosować w tradycyjnych browarach i nie trzeba rozbudowywać już istniejących instalacji o dodatkowe komponenty.

5.2.2 Zmiany w reżimie zacierania

Najprostszym sposobem zmniejszenia ilości alkoholu w piwie jest zmiana sposobu zacierania. Podczas tego procesu enzymy zawarte w siodzie rozkładają skrobię do prostszych cukrów fermentowanych przez drożdże takich jak maltoza. Standardowo proces przeprowadza się dokonując zmian temperatury zacieru, aby zapewnić odpowiednie warunki dla pracy poszczególnych enzymów amylolitycznych. Przykładowo dla beta amylazy optymalna temperatura wynosi 62-65°C, zaś dla alfa amylazy 71-75°C. Niemniej proces można prowadzić w warunkach nieoptymalnych dla wymienionych enzymów, co skutkuje gorszym scukrzeniem skrobi, a co za tym idzie mniejszą zawartością cukrów fermentowalnych [258].

Jedną z metod obniżania poziomu alkoholu jest zacieranie w wysokiej temperaturze 75-80°C. Wtedy beta amylazy ulegają dezaktywacji, zaś alfa amylazy nadal wykazują część swojej aktywności. Dzięki takiemu zabiegowi ilość cukrów fermentowalnych przez drożdże spada do około 25% w porównaniu do tradycyjnego zacierania [259].

Drugie podejście do zmniejszenia ilości cukru w brzezce wynika także z obniżenia aktywności enzymatycznej, ale z kolei poprzez obniżenie temperatury poniżej 60°C. Niższa aktywność enzymów skutkuje niewielką zawartością fermentowalnych cukrów w brzezce. W literaturze anglojęzycznej proces ten można spotkać pod nazwą cold water malt extraction [232], [260].

Kolejną metodą polegającą na zmianach w procesie zacierania jest ponowne zacieranie wysłodzin nierzadko poprzedzone kwaśną hydrolizą w celu uwolnienia pozostałych cukrów, głównie niefermentowalnych pentoz [258], [261].

Zmiany w zacieraniu to prosta metoda produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu, która nie wymaga dodatkowych inwestycji. Niestety nie jest ona idealna, gdyż pozwala tworzyć głównie lekkie i delikatne piwa. Dodatkowo możliwe jest pojawienie się słodkiego posmaku piw uwarzonych tą metodą, głównie za sprawą cukrów, które nie mogły być zmetabolizowane przez drożdże. W praktyce często łączy się tą metodę z innymi metodami, na przykład dobierając odpowiedni szczep drożdży produkujący mniej etanolu lub dla bezpieczeństwa przerywając fermentację.

5.2.3 Zastosowanie alternatywnych mikroorganizmów

Jednym z biologicznych podejść do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu jest ingerencja w sam biokatalizator. Proces taki jest prosty do wykonania, gdyż wszystkie procedury są takie same jak w przypadku tradycyjnego piwa z tym, że do fermentora wprowadza się inny typ mikroorganizmów produkujących mniejsze ilości etanolu. Niestety ze względu na tą właściwość w tak prowadzonym procesie może łatwiej dojść do zakażenia mikrobiologicznego fermentującego piwa dlatego też trzeba zachować bardziej restrykcyjne normy sanitarne.

Jednym ze stosowanych gatunków drożdży są *Saccharomyces ludwigii*, które nie potrafią fermentować maltozy ani maltotrioz. Jednym z mankamentów piwa o obniżonej zawartości alkoholu otrzymywanego przy użyciu wspomnianego szczepu jest słodkawy smak otrzymanego produktu wynikający z nieprzefermentowanych cukrów obecnych w piwie [262]–[264].

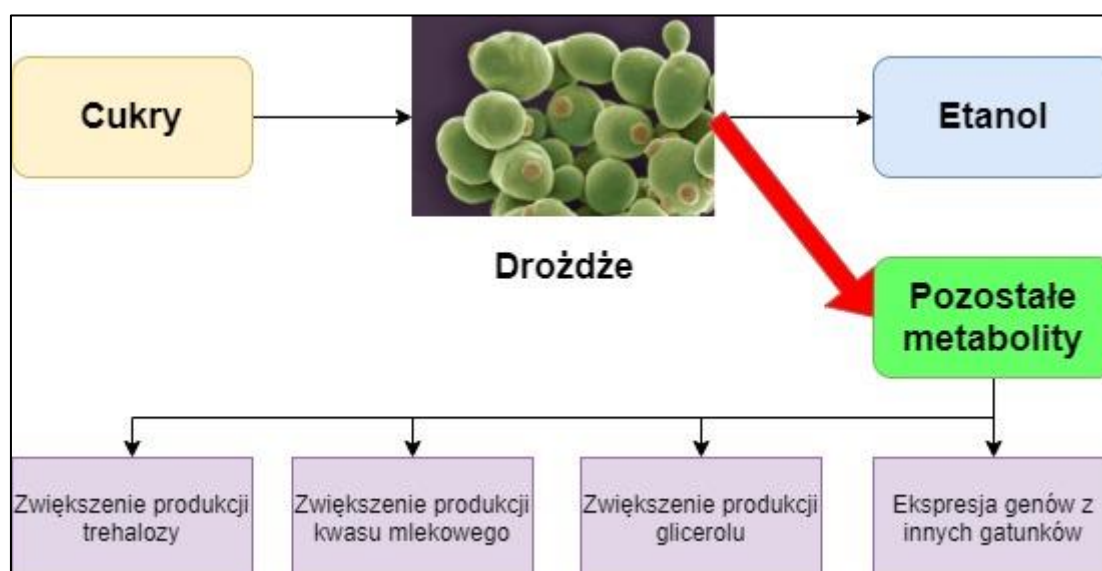
Kolejnym rozpatrywanym szczepem pod kątem produkcji piw bezalkoholowych jest *Saccharomyces rouxii*. Ten mikroorganizm ma interesującą cechę polegającą na rozkładaniu etanolu w warunkach tlenowych [263], [265]. Badania pokazały, że przy wykorzystaniu podwójnej fermentacji. Pierwszej prowadzonej z wykorzystaniem *Saccharomyces cerevisiae* i później ze zmianą mikroorganizmu na *Saccharomyces rouxii* udało się uzyskać piwo zawartości alkoholu wynoszącej 0,36% obj [265]. Niestety napowietrzanie może negatywnie wpłynąć na pozostałe substancje odpowiadające na cechy organoleptyczne piwa jak i zwiększyć ryzyko zakażenia brzcзки.

Torulaspora delbrueckii to szczep, który podobnie jak *Saccharomyces ludwigii* nie fermentuje maltozy. Optymalnie działa w temperaturze pokojowej i produkuje piwo o bogatym aromacie. Niestety obecne badania pokazały, że omawiany mikroorganizm wytwarza piwo o obniżonej zawartości alkoholu w porównaniu do standardowych drożdży górnej fermentacji lecz poziom etanolu był zbyt wysoki aby tego typu piwo można było nazwać bezalkoholowym [266]. W przypadku stosowania tego szczepu może pomóc przerwanie fermentacji zanim wytworzą się znaczne ilości etanolu, zaś dzięki dodatkowym produktom metabolizmu tego szczepu niepożądane aromaty tradycyjnie występujące w piwach bezalkoholowych uzyskanych za pomocą przerwanej fermentacji będą mogły być zniwelowane.

Candidia tropicalis to kolejny mikroorganizm rozpatrywany pod kątem wykorzystania do produkcji piw niskoalkoholowych ze względu na niezdolność do fermentacji maltozy. Dotychczas odnotowano ich naturalną obecność między innymi w fermentującym winie czy cydrze [267]. Badania pokazały, że z wykorzystaniem omawianego szczepu można uzyskać piwo bezalkoholowe o zawartości

etanolu na poziomie 0,2% obj. niestety otrzymany produkt cechował się ubogim aromatem [268], [269]. W przypadku normalnej fermentacji szczep *Candidia tropicalis* wykazał większe stężenie wyższych alkoholi i estrów w gotowym produkcie [270].

Poza naturalnie występującymi mikroorganizmami uwaga piwowarów skierowała się w kierunku organizmów modyfikowanych genetycznie (Rysunek 28). Najczęściej drożdże *Saccharomyces cerevisiae* poddaje się ekspozycji na światło ultrafioletowe a następnie selekcjonuje się mutanty z nieaktywnymi genami kodującymi dehydrogenazę 2-ketoglutaranu oraz fumarazę. Enzymy te wchodzące w skład cyklu Krebsa mają pośredni wpływ na tworzenie etanolu w toku fermentacji. Dodatkowo można promować ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję niektórych metabolitów pobocznych takich jak trehaloza czy glicerol albo wprowadzić geny z innych mikroorganizmów, które nadekspresjonowane przyczynią się do zmniejszenia produkcji etanolu [268]. Mutacje w drożdżach można też wprowadzić metodami inżynierii genetycznej niemniej mimo podobnych efektów do promieniowania UV tego typu sposób jest mniej akceptowany przez potencjalnego konsumenta [271].

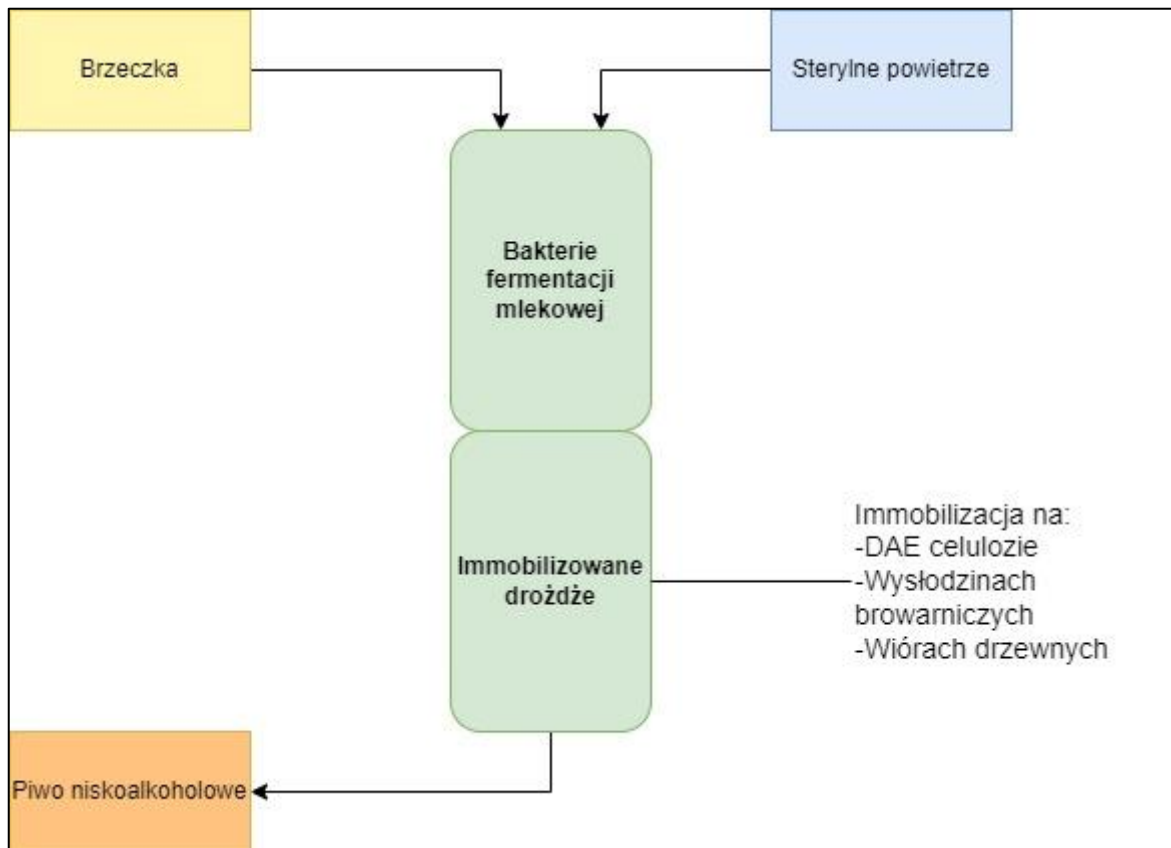


Rysunek 28. Wybrane strategie modyfikacji drożdży w celu redukcji wytwarzania etanolu. Opracowano na podstawie [268]

5.2.4 Ciągła fermentacja

Ciągła fermentacja to proces polegający na przepływie brzezki przez złożę z immobilizowanymi drożdżami. Immobilizacji najczęściej dokonuje się na DEAE-celulozie, wiórach drzewnych jak i na wysłodzinach przede wszystkim ze względu na ich niską cenę [272], [273]. Drożdże nośniki takie jak alginian czy chitozan, mimo że lepsze od wymienionych stosuje się głównie w skali laboratoryjnej [274]. Sam proces niesie ze sobą pewne trudności, gdyż trzeba dobrać nośnik do immobilizacji, jak i dobrać parametry przepływu brzezki. Zazwyczaj zakładają one kontakt brzezki z immobilizowanym złożem w przedziale od 1 do 12 godzin. Ponadto w celu właściwego tworzenia się estrów i wyższych alkoholi należy zadbać o delikatne napowietrzanie złoża. Dodatkowo pozytywnie na proces wpływa immobilizowanie bakterii kwasu mlekowego przed immobilizowanymi drożdżami, co zapewnia delikatne zakwaszenie brzezki, co z kolei powoduje zwiększone tworzenie wyższych alkoholi i estrów odpowiadających za aromat gotowego piwa bezalkoholowego (Rysunek 29). Badania

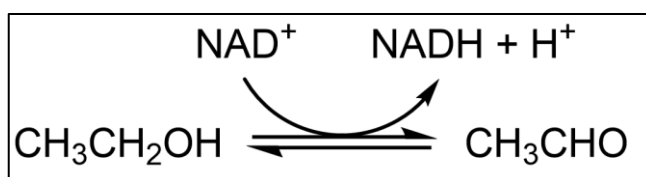
wykazały, że piwo bezalkoholowe uzyskiwane metodą ciągłej fermentacji nie odstaje pod względem walorów smakowych od komercyjnie produkowanych piw bezalkoholowych. Na chwilę obecną funkcjonują dwa browary, które wykorzystują metodę ciągłej fermentacji, pierwszy to browar Kirin w Japonii, drugi to browar Bavaria w Holandii [275], [276].



Rysunek 29. Schemat instalacji do ciągłej fermentacji brzezki piwnej

5.2.5 Metody enzymatyczne

Etanol produkowany jest przez drożdże dzięki enzymom. Jednym z tych enzymów jest dehydrogenaza alkoholowa (YADH), która katalizuje reakcję redukcji aldehydu octowego do etanolu z udziałem NADH (Rysunek 30). Biokatalizator jest tetramerem posiadającym swoim miejscu aktywnym jon cynku związany z dwoma resztami histydyny [56], [277]. W klasyfikacji enzymów nosi oznaczenie EC 1.1.1.1. [278]. Niemniej enzym ten może przeprowadzić reakcję odwrotną, w której wyniku z etanolu powstanie aldehyd octowy. Przykładowo taka reakcja zachodzi podczas metabolizmu etanolu w organizmie ludzkim [279], [280]. Omawiany enzym jest powszechny wśród organizmów żywych i można znaleźć go w licznych mikroorganizmach takich jak *Thermoanaerobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* i wiele innych [277].



Rysunek 30. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę alkoholową

Wykorzystując omawiany enzym w celu rozkładu etanolu w piwie do aldehydu octowego można teoretycznie usunąć z piwa etanol. Niestety powstający aldehyd octowy jest dla człowieka szkodliwy, zaś jego obecność w piwie jest utożsamiana z wadą produktu [124]. Dzięki niskiej temperaturze wrzenia [281] aldehyd octowy mógłby być łatwo oddestylowany pod zmniejszonym ciśnieniem i w niskiej temperaturze nie powodując pogorszenia walorów produktu. Niestety połączenie procesu destylacji z metodami enzymatycznymi jest na tyle kosztowne, że prawdopodobnie nie znajdzie zastosowania w komercyjnym browarnictwie.

6. Podsumowanie wstępu teoretycznego

Piwo to napój znany ludzkości od tysiącleci, do którego wytwarzania stosuje się wodę, słód, drożdże i chmiel. Przez cały czas rozwoju piwowarstwa technologia stojąca za omawianym napojem była zmieniana i udoskonalana. Od prostego rzemiosła mającego na celu napoić i nasyścić rozwijającą się cywilizację ludzką, piwowarstwo urosło do potężnej gałęzi przemysłu spożywczego. Rozwój ten został napędzony poprzez rewolucję przemysłową i rozwój nauki na przełomie XVIII i XIX wieku, kiedy maszyny parowe i mechanizacja połączone z rozwojem biologii i chemii pozwoliły na stworzenie majestatycznych fabryk piwa, które nowoczesnością nie ustępowały innym zakładom produkcyjnym tamtej epoki. W wiekach XX i XXI rozwój browarnictwa doprowadził do powstania ogromnych przedsiębiorstw produkujących piwo o najwyższym standardzie na całym globie.

W 2018 roku na świecie wyprodukowano 191 milionów kilolitrów piwa, z czego największa produkcja odnotowana w Azji i Europie. W Europie rynek piwowarski ciągle rośnie i z roku na rok otwierane są nowe browary. W Europie w 2020 roku powstało 341 ml litrów piwa, zaś Polska odpowiadała za produkcję niemal 40 ml litrów piwa. W tym samym roku przeciętny Europejczyk wypijał 65 litrów piwa rocznie, natomiast statystyczny Polak spożył 93 litry piwa w ciągu roku.

Piwo jest często wybierane przez konsumentów ze względu na swój niepowtarzalny smak i niedużą zawartość alkoholu w porównaniu do innych napojów alkoholowych. Warto dodać, że piwo jest napojem zdrowym gdyż posiada wysoką wartość odżywczą, zawiera wiele witamin i minerałów jak i jest napojem izotonicznym. Dodatkowo chmiel i słód dostarczają do piwa polifenoli, czyli antyoksydantów które mają dodatni wpływ na zdrowie człowieka. Jedyną znaczącą toksyną obecną w piwie jest alkohol etylowy.

Rynek piwa bezalkoholowego notuje z roku na rok ciągły wzrost. To zjawisko jest podyktowane zmianami preferencji konsumentów spowodowanych większą świadomością odnośnie wpływu etanolu na człowieka jak i modzie na zdrowy tryb życia. W większości krajów świata za piwo bezalkoholowe uważa się trunk, który zawiera mniej niż 0,5% etanolu objętościowo. Niemniej warto pamiętać, że są kraje, w których zawartość etanolu w piwie może sięgać do 1 % lub nawet 1,2% objętościowych.

Obecnie istnieje wiele metod produkcji piwa bezalkoholowego. Można je podzielić na dwa rodzaje: biologiczne i chemiczne. W metodach biologicznych dąży się do tego aby w piwie nie doszło do wyprodukowania etanolu natomiast metody fizyczne opierają się na usunięciu alkoholu z gotowego produktu

III Cel pracy

Celem pracy było porównanie, sklasyfikowanie oraz optymalizacja powszechnie stosowanych oraz nowatorskich technologii produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. W pracy przeanalizowano zarówno metody fizyczne polegające na usunięciu alkoholu z gotowego produktu jak i metody biologiczne polegające na ingerencji w biochemię procesu w celu niedopuszczenia do wytworzenia etanolu w ilościach przekraczających normy dla tego produktu. Schemat badań zestawiono w poniżej (Tabela 12).

Tabela 12. Schemat pracy badawczej wykonanej w ramach doktoratu.

1. Analiza dostępnych technologii	2. Opracowanie metodyki analizy walorów konsumenckich piwa	3. Optymalizacja procesów otrzymywania piwa oraz napojów piwopodobnych	4. Aplikacja metodyki na wybranych technologiach dealkoholizacji piwa	5. Ocena przydatności oraz efektywności danej techniki
-----------------------------------	--	--	---	--

W punkcie 1 wykonano wstępną analizę rynku oraz przygotowano wstępny plan komercjalizacji wybranych metod; przerwanej fermentacji, metody zimnego kontaktu, fermentacji z wykorzystaniem szczepów *Saccharomyces ludwigii* oraz *Monascus ruber*, destylacji próżniowej, destylacji z deflegmacją oraz metod membranowych.

W punkcie 2 wybrano cechy produktu, które zostały poddane badaniu w celu scharakteryzowania piwa pod kątem ewentualnego wprowadzenia na rynek.

Cele szczegółowe punktu 3

- Optymalizacja procesu przerwanej fermentacji w celu produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu;
- Usprawnienie procesu zimnego kontaktu w celu produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu;
- Optymalizacja reżimu zacierania w celu zmniejszenia ilości cukrów fermentowalnych
- Optymalizacja warunków fermentacji brzeczki piwnej przez szczepy *Saccharomyces ludwigii* oraz *Monascus ruber* pod kątem otrzymania produktu o obniżonej zawartości etanolu;
- Dobór korzystnych warunków procesu destylacji próżniowej w celu usuwania alkoholu;
- Optymalizacja destylacji z deflegmacją w celu dealkoholizacji piwa
- Dobór najefektywniejszych warunków perwaporacji i mikrofiltracji w celu usuwania etanolu;
- Wyprodukowanie i zbadanie chmielowego substytutu piwa jako alternatywy dla piwa alkoholowego;

Dodatkowym celem pracy było porównanie walorów otrzymanych produktów takich jak barwa, goryczka, ekstrakt, zawartość alfa kwasów oraz izo-alfa kwasów oraz w przypadku dealkoholizacji oznaczenia wybranych związków lotnych współodpowiedzialnych za aromat gotowego

produktu. Ponadto sprawdzono, jak charakteryzuje się chmielowy substytut piwa w stosunku do otrzymanych piw o obniżonej zawartości alkoholu.

W punkcie 4 dokonano pomiarów wybranych parametrów piw o obniżonej zawartości alkoholu.

Końcowym etapem pracy (punkt 5) byłoby zaproponowanie najkorzystniejszych rozwiązań pozwalających na produkcję piwa o obniżonej zawartości alkoholu i wybranych cechach organoleptycznych jak najbliższych do standardowego odpowiednika.

Cel pracy został zrealizowany poprzez przeprowadzenie dealkoholizacji piwa metodami termicznymi i membranowymi oraz poprzez wyprodukowanie piw metodami biologicznymi. Właściwe badania poprzedziło opracowanie i wdrożenie metodyki pozwalającej na ocenę otrzymanych produktów.

IV Materiały i metodyka

1. Materiały

W celu wykonania badań zaprezentowanych w pracy wykorzystano wiele materiałów, które podzielono na trzy kategorie. Pierwsza to odczynniki chemiczne użyte do analiz jak i kompozycji mediów hodowlanych, druga to surowce browarnicze wykorzystane do produkcji brzeczek i badanych piw. Trzecia to mikroorganizmy, z pomocą których przeprowadzono eksperymenty.

Odczynniki chemiczne:

Etanol (Eurochem), metanol (Chempur), kwas ferulowy (Sigma-Aldrich), 4-winylogwajakol (Sigma-Aldrich), ekstrakt drożdżowy (Sigma-Aldrich), skrobia rozpuszczalna (Sigma-Aldrich), K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich), $MgSO_4$ (Sigma-Aldrich), ekstrakt słodowy (Sigma-Aldrich), pepton (Sigma-Aldrich), glukoza (POCH), kwas cytrynowy (POCH), kwas mlekowy (POCH), izooktan (Chempur), kwas galusowy (Sigma-Aldrich), HCl (Chempur), NaOH (POCH), Odczynnik Folina (Sigma-Aldrich), Na_2CO_3 (POCH), $FeCl_3$ (POCH), izobutanol (Warchem), mleczan etylu (Sigma-Aldrich), alkohol fenyletylowy (Sigma-Aldrich), acetonitryl (Macron), H_3PO_4 (Chempur)

Surowce browarnicze:

- Woda wodociągowa (MPWiK Wrocław)
- Surowce skrobiowe: Pilzneński (Viking malt), Pszeniczny (Viking malt), Monahijski typ I (Viking malt), Ciemny (Viking malt), Carahell (Weyermann), Jęczmień niesłodowany, Ekstrakt słodowy jasny (Wytwórnia Ekstraktów Słodowych Wolsztyn)
- Chmiele: Hallertau Tradition (Browamator), Hallertau Mittelfruh (Browamator), Oktawia (Browamator), Marynka (Browamator), Sybilla (Twój Browar)

Mikroorganizmy:

- Drożdże: Lager 497 (Mauribrew), WB-06 (Fermentis), S-33 (Fermentis), US-05 (Fermentis), Voss Kveik (Fermentum Mobile), London Ale 1318 (Wyeast) *Saccharomyces ludwigii* FM 58 (Fermentum Mobile)
- Grzyby strzępkowe: *Monascus ruber* DSM 62748
- Bakterie fermentacji mlekowej: *Lactobacillus brevis* NCTC 13386

2. Aparatura

W toku badań korzystano z licznych egzemplarzy aparatury badawczej, na którą składał się sprzęt produkcyjny w postaci browaru jak i aparatura laboratoryjna.

- Piwa, brzeczek i napoje niefermentowane wykorzystane do badań powstały z wykorzystaniem instalacji browarniczej znajdującej się na Politechnice Wrocławskiej (producent Destila). Wykorzystywana instalacja pozwala na produkcję do 100 dm³ piwa w jednej szarży

produkcyjnej. Browar wyposażony jest w kadź zacierno-warzelną ogrzewaną za pomocą olejowego płaszcza grzejnego (Rysunek 31). Dodatkowo instalacja wyposażona jest w kadź filtracyjną. Gorąca woda niezbędna w procesie jest dostarczana z kotła elektrycznego. Medium chłodzące jest przygotowywane w specjalnej stacji chłodzenia, w której czynnik chłodzący w postaci glikolu jest schładzany i ekspediowany do chłodzenia fermentorów lub do produkcji wody lodowej. Fermentacja może być przeprowadzana w termostatowanych kadziach fermentacyjnych, jednej otwartej i trzech zbiornikach cylindryczno-stożkowych.



Rysunek 31 Warzelnia browaru Politechniki Wrocławskiej.

- Destylację pod zmniejszonym ciśnieniem wykonywano z użyciem wyparki rotacyjnej Rotavapor R-100 wyposażonej w pompę próżniową V-100, kontroler I-100 oraz termostatowaną łaźnię wodną B-100 (Buchi)
- Hodowle mikroorganizmów prowadzono z wykorzystaniem termostatowanej wytrząsarki typu 357 (Elpin)
- Destylację pod ciśnieniem atmosferycznym oraz rektyfikację prowadzono na kolumnie rektyfikacyjnej wyprodukowanej na Politechnice Wrocławskiej
- Do pomiarów gęstości wykorzystywano gęstościomierz DMA-38 (Anton Paar)
- Do bieżących pomiarów podczas prowadzenia fermentacji użyto analizator Fermento Flash (Funke Gerber)
- pH mierzono z wykorzystaniem pH metru Crison basic 20+ (Crison)
- Wysokosprawną chromatografię cieczową prowadzono na HPLC Waters LC module plus (Waters)

- Chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas wykonano na urządzeniu GCMS Agilent 7820 wyposażonym w spektrometr mas MSD 5977B (Agilent)
- Chromatografię gazową sprzężoną z detektorem jonizacji płomieniowej wykonano na aparacie GC2014 (Shimadzu)
- Do pomiarów spektrofotometrycznych służył spektrofotometr U-1900 (Shimadzu)
- Mikrofiltrację przeprowadzono z użyciem membrany TAMI industries ZrO₂ (TAMI)
- W badaniach nad perwaporacją użyto membranę perwaporacyjną Pervap 4510 (Sulzer)

3. Metody

Dealkoholizacja piwa na drodze perwaporacji

Jako surowiec do procesu perwaporacji służyło piwo typu lager, które ze względu na swoją niską mętność powoduje mniejsze trudności przy jego zastosowaniu do procesów membranowych. Do produkcji piwa użyto 8 kg słoju pilzneńskiego i 2 kg jęczmienia niesłodowanego. Wymienione materiały ześrutowano i zmieszano z 50 litrami wody wodociągowej. Zacieranie odbywało się w następującym dwuetapowym reżimie temperaturowym; 60 °C przez 30 min i kolejno 70 °C przez 20 min. Na koniec podniesiono temperaturę zacieru do 78 °C aby zatrzymać aktywność enzymatyczną słoju. Następnie po odfiltrowaniu wysłodzin w kadzi filtracyjnej brzezka była gotowana z chmielem przez godzinę w temperaturze 98-100 °C. Chmiel w formie granulatu dodano w dwóch porcjach: pierwsza 30 g chmielu hallertau i 30 g chmielu oktavia na godzinę przed końcem gotowania, następnie również 30 g chmielu hallertau i 30 g chmielu oktavia 15 minut przed końcem gotowania. Po tym etapie odwirowano chmieliny, zaś brzeczkę schłodzono do 12 °C i dodano 25 g drożdży dolnej fermentacji (Mauribrew lager 497). Schłodzona brzezka charakteryzowała się zawartością cukrów na poziomie 10,57 +/-0,2 Brix. Piwo fermentowało przez 2 tygodnie w temperaturze 12 °C, a następnie leżakowało w temperaturze 5 °C przez kolejne 3 tygodnie. Gotowe piwo miało 3,62 +/-0,6% alkoholu i zawartość cukrów na poziomie 2,7 +/-0,2 Brix.

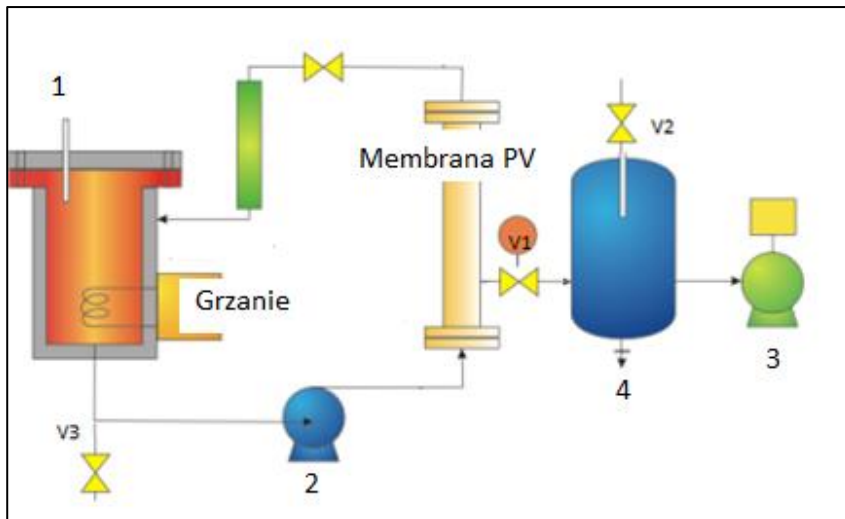
Przed przystąpieniem do perwaporacji piwo w ilości 30,45 litrów poddano mikrofiltracji (membrana TAMI industries ZrO₂). Wskutek mikrofiltracji badane parametry piwa takie jak kwas ferulowy, etanol jak i barwa nie zmieniły się w sposób znaczący. Parametry procesu zestawiono w poniższej tabeli (Tabela 13):

Tabela 13. Warunki przeprowadzonej mikrofiltracji surowca do perwaporacji

	Δp [bar]	V_{nad} [L]	V_{per} [L]	V_{ret} [L]
Mikrofiltracja	2.2	30.45	18.30	12.15

Po mikrofiltracji piwo miało następujące parametry: zawartość cukrów 2,6 +/-0,2 Brix, alkohol 3,53 +/-0,06 % obj. oraz barwę 7 +/-1 EBC. Permeat z mikrofiltracji posłużył jako nadawa do procesu perwaporacji.

Perwaporację przeprowadzono na membranie PERVAP 4510 firmy Sulzer (średnica 16 cm, grubość 5 μ m) w temperaturze 50 °C przez 5 godzin pod ciśnieniem 40 mbar (Rysunek 32).



Rysunek 32. Schemat instalacji laboratoryjnej z membraną perwaporacyjną. 1 – zbiornik nadawy, 2 – pompa cyrkulująca, 3 – pompa próżniowa, 4 – zbiornik permeatu

Dealkoholizacja piwa za pomocą destylacji



Rysunek 33. Kolumna do destylacji z deflegmacją. 1 - zbiornik nadawy z płaszczem grzewczym, 2 - kolumna z wypełnieniem, 3- chłodnica, 4 - komora zaworowa, 5 - wężyk odprowadzający destylat

Destylację oraz destylację z deflegmacją przeprowadzono na kolumnie destylacyjnej przedstawionej na rysunku (Rysunek 33). Instalacja używana w eksperymencie działa w trybie okresowym pod ciśnieniem atmosferycznym i pozwala na przeprowadzenie destylacji prostej lub destylacji z deflegmacją (rektyfikacji). Nadawę wprowadza się do zbiornika, umieszczonego w dolnej części aparatury, wyposażonego w elektryczny płaszcz grzewczy. Podczas trwania procesu destylat trafia do kolumny o długości 150 cm wypełnionej szklanymi cylindrami. Powyżej kolumny umieszczona jest chłodnica wodna, w której destylat ulega skropleniu. Między kolumną z wypełnieniem, a chłodnicą umieszczona jest termopara umożliwiająca pomiar temperatury par. Następnie skroplony destylat trafia do komory zaworowej, w której można ustawić stopień deflegmacji poprzez zmianę nastawy zaworów. Na koniec destylat odprowadzany jest za pomocą wężyka do naczynia odbierającego. Po procesie ciecz wyczerpana jest odbierana poprzez boczny zawór w zbiorniku nadawy.

Dealkoholizacja piwa metodą destylacji próżniowej

Destylację próżniową przeprowadzono na wyparce rotacyjnej Rotavapor R-100 firmy Büchi (Rysunek 34). Próżnię zapewniała membranowa pompa próżniowa V-100 z kontrolerem I-100 umożliwiającym kontrolę próżni z dokładnością do ± 10 mBar. Ogrzewanie odparowywanej próbki było prowadzone z wykorzystaniem łaźni wodnej B-100 z możliwością regulacji temperatury do ± 1 °C. Instalacja używana w eksperymencie działa w trybie okresowym. Na początku eksperymentu łaźnia wodna jest nagrzewana do ustalonej temperatury. Następnie podłącza się kolbę ze 150 ml piwa poddawanego destylacji, uruchamia obroty kolby i ustawia parametry pracy pompy próżniowej, po czym czeka się dwie minuty w celu odgazowania próbki i ustabilizowania próżni. W kolejnym etapie zanurza się kolbę w uprzednio rozgrzanej łaźni wodnej i od tego momentu liczonego czas trwania procesu. Po zakończeniu procesu wyciągano kolbę z łaźni wodnej i odczekiwano pięć minut w celu skroplenia pozostałych w chłodnicy par. Na koniec odbierano destylat oraz ciecz wyczerpaną w celu wykonania analiz. Separacje prowadzono w zakresie temperatur od 40 °C do 60 °C. Przy ciśnieniu 90 mbar i 150 mbar.



Rysunek 34. Zestaw do destylacji próżniowej firmy Büchi

Produkcja piwa bezalkoholowego metodą przerwanej fermentacji

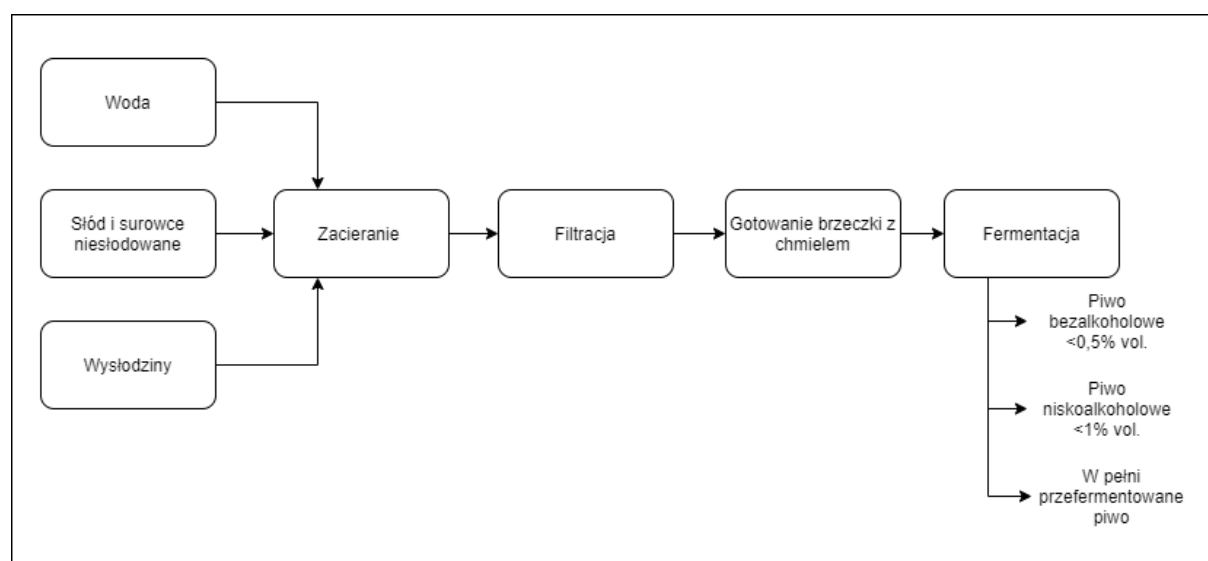
Do wykonania 50 litrów brzezki służącej do testów przerwanej fermentacji użyto uprzednio ześrutowanych: 5,3 kg słołu pilzneńskiego, 5,3 kg słołu pszenicznego oraz 0,5 kg słołu Carahell. Do produkcji wykorzystano wodę wodociągową.

Zacieranie odbywało się w następującym reżimie temperaturowym: 44 °C przez 30 minut, 63 °C przez 45 minut oraz 72 °C przez 20 minut. Następnie po odfiltrowaniu wysłodzin w kadzi filtracyjnej brzezka była gotowana z chmielem przez 60 minut w temperaturze 98-100 °C. Chmiel w formie granulatu dodano w dwóch porcjach: pierwsza 30 g chmielu hallertau godzinę przed końcem gotowania, następnie 30 g tego samego chmielu 15 minut przed końcem gotowania. Po gotowaniu odwirowano chmieliny, zaś brzezkę schłodzono do 16 °C i dodano 23 g drożdży dolnej fermentacji (Fermentis WB-06). Schłodzona brzezka charakteryzowała się zawartością cukrów na poziomie 12,54 +/-0,01 °Blg. Fermentację przeprowadzono w termostatowanym fermentorze w temperaturze 16-18 °C.

Produkcja piwa bezalkoholowego metodą zimnego kontaktu (ang. Cold Contact Process)

Do wykonania 50 litrów brzezki w procesie zimnego kontaktu użyto uprzednio ześrutowanych: 4 kg słołu pilzneńskiego, 2 kg jęczmienia niesłodowanego oraz 3 kg wysłodzin po produkcji piwa ciemnego. Do produkcji wykorzystano wodę wodociągową. Wysłodziny z piwa ciemnego użyto jako środka barwiącego mającego poprawić barwę piwa.

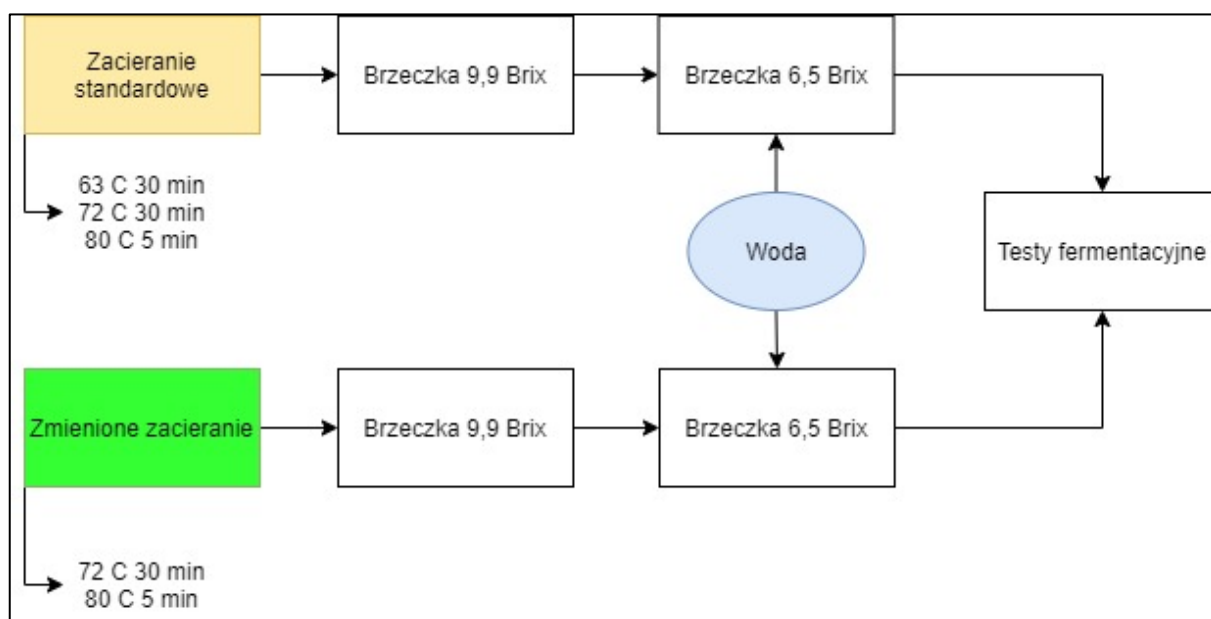
Eksperyment przeprowadzono według następującego schematu (Rysunek 35). Zacieranie odbywało się w następującym dwuetapowym reżimie temperaturowym; 65 °C przez 60 min i kolejno 75 °C przez 60 min. Następnie po odfiltrowaniu wysłodzin w kadzi filtracyjnej brzezka była gotowana z chmielem przez godzinę w temperaturze 98-100 °C. Chmiel w formie granulatu dodano w dwóch porcjach: pierwsza 30 g chmielu hallertau godzinę przed końcem gotowania, następnie 30 g chmielu oktavia 15 minut przed końcem gotowania. Po tym etapie odwirowano chmieliny, zaś brzezkę schłodzono do 7 °C i dodano 25 g drożdży dolnej fermentacji (Mauribrew lager 497). Schłodzona brzezka charakteryzowała się zawartością cukrów na poziomie 7,60 +/-0,01 Blg.



Rysunek 35. Schemat przeprowadzenia eksperymentu z procesem zimnego kontaktu

Produkcja brzezki o obniżonej zawartości cukrów fermentowalnych

Do sporządzenia brzezki użyto: 5,5 kg słoju pilzneńskiego (producent Viking Malt), 8,5 kg słoju monachijskiego typu I (producent Viking Malt) oraz 1 kg pszenicy niesłodowanej. Wszystkie słoje oraz surowce niesłodowane użyte do zacierania zostały uprzednio ześrutowane. Do kadzi zaciernej wypełnionej 70 l wody o temperaturze 76 °C wsypano surowce i po ustaleniu się temperatury na poziomie 72 °C utrzymywano ją przez 30 minut. Po zakończeniu tego etapu zacier podgrzano do temp 80 °C w celu inaktywacji enzymów obecnych w sładzie i przetłoczono do kadzi filtracyjnej. Następnie przeprowadzono filtrację grawitacyjną zacieru oraz wyflukano cukry pozostałe w młócie za pomocą wody o temperaturze 80 °C. Otrzymaną brzezkę gotowano przez 60 minut. Po wyłączeniu ogrzewania do brzezki dodano 60g chmielu Galaxy i schłodzono do temperatury 20 °C. Otrzymano w ten sposób 100 l brzezki o zawartości cukrów na poziomie 9,9 °Brix. Następnie brzezkę rozlano do 25-litrowych fermentorów do każdego wprowadzając 6,5 l brzezki oraz 3,5 l wody w celu rozcieńczenia brzezki do poziomu 6,5 °Brix. Następnie do każdego fermentora wprowadzono inny szczep drożdży. Użyte drożdże to komercyjne szczepy S-33 firmy Fermentis, 1318 London Ale firmy Wyeast oraz Voss Kveik firmy Fermentum Mobile (Rysunek 36). Każdy z wymienionych szczepów pracuje w warunkach górnej fermentacji, czyli w temperaturze pokojowej. Jako próbę kontrolną przygotowano taką samą brzezkę, z tym że reżim zacierania był następujący: 63 °C przez 30 minut, a następnie podniesiono temperaturę do 72 °C i również utrzymywano przez 30 minut. Dzięki temu zabiegowi podczas zacierania aktywne były zarówno α -amylazy jak i β -amylazy obecne w sładzie. Na koniec brzezkę podgrzano do 80 °C i przefiltrowano. Brzezkę kontrolną również rozcieńczono i zadano drożdżami tak samo jak próby badawcze.



Rysunek 36. Schemat eksperymentu ze zmienionym reżimem zacierania w celu osiągnięcia brzezki o mniejszej ilości cukrów fermentowalnych

Produkcja piwa bezalkoholowego metodą zimnego kontaktu przy zmianie reżimu zacierania

Do sporządzenia brzezki użyto 4,2 kg słołu pilzneńskiego, 2 kg słołu monachijskiego, 1 kg słołu Carawheat oraz 1 kg słołu red X oraz 70 dm³ wody wodociągowej. Zacieranie prowadzono w temperaturze 72 °C przez 30 minut, po czym podniesiono temperaturę do 78 °C i utrzymywano ją przez 10 minut. Następnie po odfiltrowaniu wysłodzin brzezkę gotowano przez godzinę dodając 30 g chmielu marynka na 1 godzinę przed końcem gotowania oraz 30 g chmielu sybilla i 50 g chmielu styrian 15 minut przed końcem gotowania. Na koniec otrzymano 60 dm³ brzezki o ekstrakcie 8,0 +/- 0,2 °Brix. 1 dm³ brzezki umieszczono w kolbie stożkowej zaopatrzonej w rurkę fermentacyjną i zadano 0,5 g suszonych drożdży dolnej fermentacji (Mauribrew lager 497). Eksperyment prowadzono w temperaturze 3 °C przez 124 dni.

Fermentacja z wykorzystaniem szczepu *Monascus ruber*

W celu wykonania eksperymentu przygotowano hodowlę *Monascus ruber* DSM 62748. Zarodniki sterylnie wprowadzono do uprzednio wysterylizowanej pożywki (Medium nr 190 YpSs) o składzie:

ekstrakt drożdżowy - 0,8g (Sigma-Aldrich)

skrobia rozpuszczalna – 3,0g (Sigma-Aldrich)

K₂HPO₄ – 0,2g (Sigma-Aldrich)

MgSO₄ – 0,1g (Sigma-Aldrich)

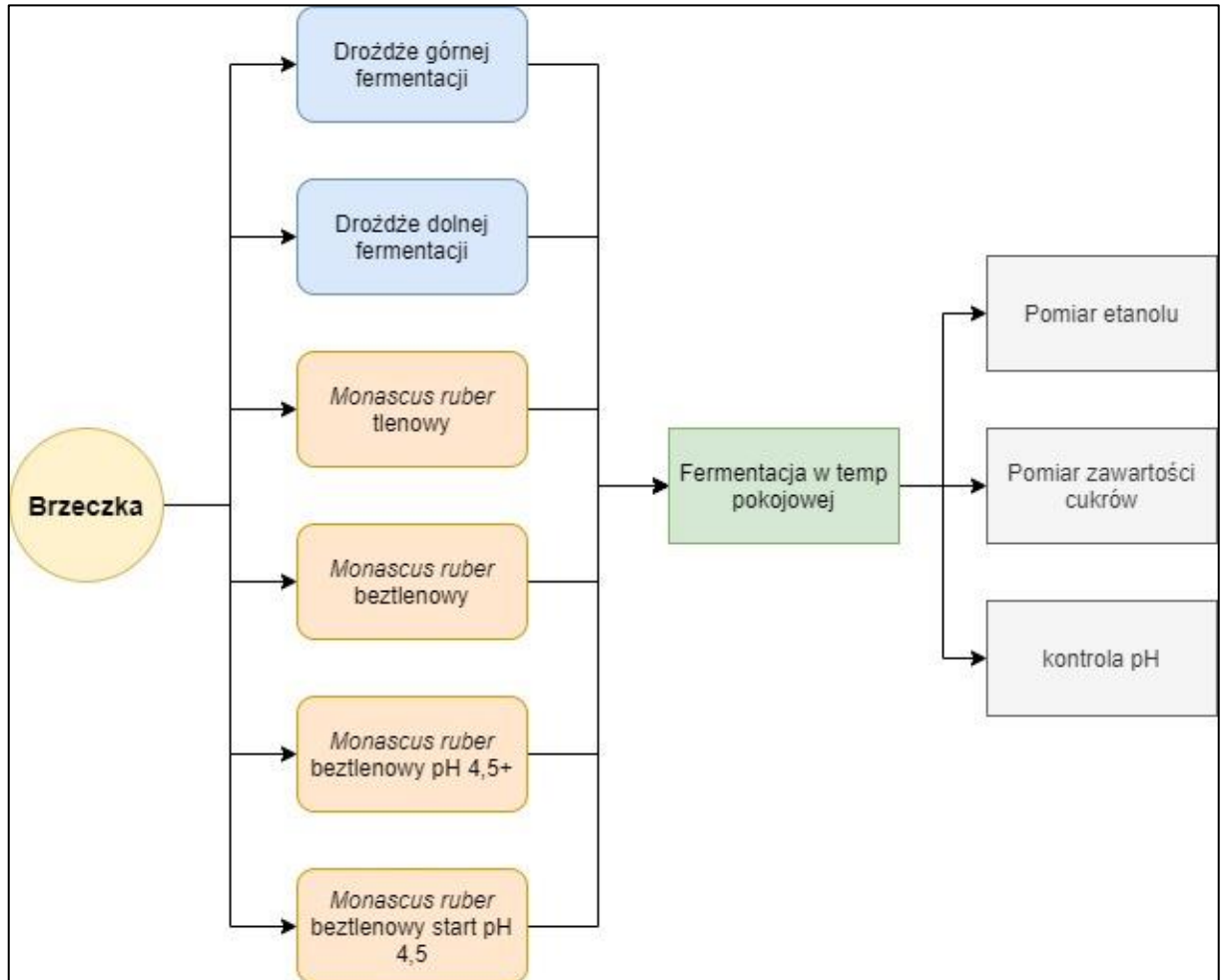
woda dejonizowana – dopełniono do objętości 200 ml.

Następnie inkubowano hodowlę przez 3 dni w warunkach tlenowych w temperaturze 30 °C i przy obrotach wytrząsarki ustawionych na 200 rpm

Do wykonania eksperymentu sporządzono brzezkę według następującego przepisu: 20 kg uprzednio ześrutowanego słołu pilzneńskiego (producent Viking Malt) zmieszano z 80 dm³ wody o temperaturze 65 °C. Temperaturę zacieru utrzymywano przez 30 minut, następnie podniesiono temperaturę do 72 °C i utrzymywano przez 20 minut. Na koniec zacierania podniesiono temperaturę do 78 °C i utrzymywano przez 10 minut. Następnie przeprowadzono filtrację grawitacyjną zacieru oraz wypłukano cukry pozostałe w młócie za pomocą wody o temperaturze 80 °C. Otrzymaną brzezkę gotowano przez 60 minut. Chmiel dodawano w dwóch partiach. Pierwszą w postaci chmielu Marynka w ilości 60g oraz chmielu Hallertau Tradition w ilości 30g dodano 60 minut przed końcem gotowania, zaś drugą partię składającą się z 60g chmielu Hallertau Mittelfruh dodano 15 minut przed końcem gotowania. Następnie brzezkę schłodzono do temperatury 25 °C. Otrzymano w ten sposób 100 l brzezki o zawartości cukrów na poziomie 12,4 +/- 0,2 °Brix.

Brzezkę rozlano do 5 litrowych kolb, z których każdą zaszczepiono 10 ml hodowli płynnej badanego szczepu. Poza tym przygotowano dwie hodowle referencyjne. Jedną z drożdżami górnej fermentacji Fermentis SafAle™ WB-06 i drugą z drożdżami dolnej fermentacji Mauribrew Lager Y497. Obydwie również dodane w ilości 10 ml. Fermentacja z wykorzystaniem szczepu *Monascus ruber* była prowadzona na kilka sposobów: w warunkach tlenowych, w warunkach beztlenowych, w warunkach beztlenowych z obniżeniem pH brzezki do 4,5 oraz w warunkach beztlenowych z utrzymywaniem pH hodowli powyżej 4,5. Fermentację prowadzono w temperaturze pokojowej. Badania wstępne

pokazały, że szczep *Monascus ruber* nie fermentuje brzeczki piwnej w warunkach dolnej fermentacji. Do regulacji pH przyczyniła się kolejna obserwacja z badań wstępnych, a mianowicie zauważono, że badany szczep przed rozpoczęciem fermentacji obniża pH do poziomu poniżej 4,5 a następnie zaczyna produkować etanol i szybciej metabolizować cukry obecne w brzeczce. Podczas badań mierzono zawartość cukrów, etanol oraz kontrolowano pH (Rysunek 37).



Rysunek 37. Schemat eksperymentu fermentacji brzeczki piwnej z wykorzystaniem szczepu *Monascus ruber*

Fermentacja z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii*

W celu wykonania eksperymentu przygotowano hodowlę *Saccharomyces ludwigii* pozyskaną z firmy Fermentum Mobile (FM58). Zarodniki sterylnie wprowadzono do uprzednio wysterylizowanej pożywki (Medium nr 186 YM) o składzie:

ekstrakt drożdżowy - 0,6 g (Sigma-Aldrich)

ekstrakt słodowy – 0,6 g (Sigma-Aldrich)

pepton – 1 g (Sigma-Aldrich)

glukoza – 2 g (POCH)

woda dejonizowana – dopełniono do objętości 200 ml.

Następnie inkubowano hodowlę przez 3 dni w warunkach tlenowych w temperaturze 25 °C i przy obrotach wytrząsarki ustawionych na 200 rpm

Do wykonania eksperymentu sporządzono brzeczki według następującego przepisu: 10 kg uprzednio ześrutowanego słoju pilzneńskiego (producent Viking Malt) zmieszano z 40 dm³ wody o temperaturze 72 °C. Temperaturę zacieru utrzymywano przez 20 minut. Na koniec zacierania podniesiono temperaturę do 78 °C i utrzymywano przez 10 minut. Następnie przeprowadzono filtrację grawitacyjną zacieru oraz wyptukano cukry pozostałe w młócie za pomocą wody o temperaturze 80 °C. Otrzymaną brzeczki gotowano przez 60 minut. Chmiel dodawano w dwóch partiach. Pierwszą w postaci chmielu Marynka w ilości 30g oraz chmielu Hallertau Tradition w ilości 15g dodano 60 minut przed końcem gotowania, zaś drugą partię składającą się z 30g chmielu Hallertau Mittelfruh dodano 15 minut przed końcem gotowania. Następnie brzeczki schłodzono do temperatury 25 °C. Otrzymano w ten sposób 50 l brzeczki o zawartości cukrów na poziomie 10,0 °Brix.

Brzeczki rozlano do 5 litrowych kolb, z których każdą zaszczepiono 10 ml hodowli płynnej badanego szczepu. Poza tym przygotowano dwie hodowle referencyjne. Jedną z drożdżami górnej fermentacji Fermentis SafAle™ WB-06 i drugą z drożdżami dolnej fermentacji Mauribrew Lager Y497. Fermentację prowadzono w temperaturze pokojowej.

Kofermentacja brzeczki piwnej z wykorzystaniem *S. cerevisiae* i *L. brevis*

Założeniem eksperymentu było przeprowadzenie fermentacji kilku brzeczek piwnych z użyciem dwóch szczepów mikroorganizmów: *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis US-05), który jest standardowo wykorzystywany do produkcji piwa oraz *Lactobacillus brevis*, będącym bakterią fermentacji mlekowej wykorzystywaną w przemyśle spożywczym, w tym do produkcji piw kwaśnych. Kofermentacja miała na celu wywołanie konkurencji między użytymi mikroorganizmami, które walcząc o niszę ekologiczną jaką jest brzeczka będą produkowały napój o właściwościach zmienionych w stosunku do procesu prowadzonego przez wyłącznie jeden szczep. W celu stworzenia płaszczyzny odpowiedzi posłużono się metodą Boxa-Benkheba badając wpływ trzech zmiennych. Pierwsza to początkowe stężenie cukrów. W tym celu przygotowano brzeczki o ekstraktach 6 Brix, 10 Brix oraz 14 Brix. Stężenie cukrów wpływa zarówno na ilość powstającego etanolu jak i kwasu mlekowego. Drugą zmienną była goryczka wynosząca 10 IBU, 30 IBU oraz 40 IBU. Wiadomo, że chmiel ma działanie bakteriostatyczne w związku z czym wpływ chmielu, wyrażany przez ilość substancji goryczkowych, może mieć znaczący wpływ na zachowanie bakterii fermentacji mlekowej. Trzecią zmienną był moment zaszczepienia hodowli. W jednej wersji pierwszego dnia wprowadzono do kolb po 5 ml płynnej hodowli drożdży oraz bakterii. W drugiej wersji wprowadzano najpierw bakterie fermentacji mlekowej, zaś drożdże trzy dni później. W ostatniej wersji najpierw wprowadzono drożdże, zaś bakterie fermentacji mlekowej dodano trzy dni później. Taki zabieg miał na celu namnożenie się jednego mikroorganizmu, przez co stawał się on organizmem dominującym w momencie wprowadzenia drugiego szczepu.

Eksperyment przeprowadzono w litrowych kolbach zaopatrzonych w korki z rurkami fermentacyjnymi przygotowując odpowiednie warunki założone w planie eksperymentu (Tabela 14). Stężenie cukrów nastawiano za pomocą płynnego ekstraktu słodowego (Wytwórnia Ekstraktów Słodowych Wolsztyn), który był rozcieńczany do odpowiednich wartości. Goryczkę ustalano za pomocą uprzednio przygotowanego wodnego ekstraktu z chmielu Marynka. Mikroorganizmy wprowadzano w formie płynnej hodowli. Eksperyment prowadzony był przez 13 dni. Dodatkowo przygotowano dwie próby

kontrolne, w których brzeczka o zawartości cukrów 10 Brix i goryczce 10 IBU była fermentowana przez sam szczep *S. cerevisiae* oraz przez sam szczep *L. brevis*

Tabela 14. Schemat eksperymentu z wykorzystaniem kofermentacji *S. cerevisiae* z *L. brevis*

Numer próbki	Zawartość cukrów [Brix]	Goryczka [IBU]	Mikroorganizmy zaszczipiane pierwszego dnia	Mikroorganizmy zaszczipiane trzeciego dnia
1	6	10	<i>L. brevis, S. cerevisiae</i>	-
2	6	40	<i>L. brevis, S. cerevisiae</i>	-
3	14	10	<i>L. brevis, S. cerevisiae</i>	-
4	14	40	<i>L. brevis, S. cerevisiae</i>	-
5	6	30	<i>L. brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
6	6	30	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. brevis</i>
7	14	30	<i>L. brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
8	14	30	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. brevis</i>
9	10	10	<i>L. brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
10	10	10	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. brevis</i>
11	10	40	<i>L. brevis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
12	10	40	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. brevis</i>
13	10	30	<i>L. brevis, S. cerevisiae</i>	-
Próby kontrolne				
14	10	10	<i>L. brevis</i>	-
15	10	10	<i>S. cerevisiae</i>	-

W celu optymalizacji eksperymentu metodą Boxa-Benkheana ustalono następujące wartości dla parametrów -1, 0, 1: Dla stężenia cukrów było to odpowiednio 6, 10 i 14 °Brix. Dla goryczki wartości te wynosiły 10, 30 i 40 IBU. Natomiast dla mikroorganizmów *Lactobacillus brevis* pierwszego dnia i *Saccharomyces cerevisiae* trzeciego dnia, obydwa mikroorganizmy pierwszego dnia oraz *Saccharomyces cerevisiae* pierwszego dnia i *Lactobacillus brevis* dnia trzeciego.

Produkcja niefermentowanego substytutu piwa

W celu wykonania eksperymentu wyprodukowano napój, który nie został poddany fermentacji. Aby to osiągnąć stworzono dwie receptury:

- 1) Do kadzi zaciernej wprowadzono 100 dm³ wody oraz 600 g ciemnego słoðu. Mieszaninę utrzymywano w temperaturze 70 °C przez 30 minut w celu nadania napojowi barwy. Następnie odfiltrowano ciemny słoð i doprowadzono mieszaninę do wrzenia. W kolejnym etapie dodano chmielu w dwóch transzach: pierwsza 30 g chmielu Oktawia 1 godzinę przed końcem gotowania, druga 30 g chmielu Hallertau 15 minut przed końcem gotowania. Po tej procedurze odwirowano chmieliny, zaś napój schłodzono do temperatury 10 °C i nasycono CO₂
- 2) Do kadzi zaciernej wprowadzono 100 dm³ wody i doprowadzono do temperatury 80 °C. Następnie wodę przepompowano do kadzi filtracyjnej wyłożonej 1 kg świeżej mięty i pozostawiono do ługowania przez 10 minut. Po tym czasie mieszaninę przepompowano do kadzi zaciernej gdzie doprowadzono ją do wrzenia. Godzinę przed końcem gotowania wprowadzono chmiel Oktawia w ilości 30 g. Następnie 15 minut przed końcem gotowania wprowadzono 50 g chmielu Sybilla oraz 100 g kwasu cytrynowego. Po tej procedurze odwirowano chmieliny, zaś napój schłodzono do temperatury 10 °C i nasycono CO₂

Obydwa substytuty piwa poddano analizie pod kątem barwy, zawartości polifenoli, goryczki, pH, stężenia etanolu, stężenia α -kwasów oraz izo- α -kwasów.

4. Metody analityczne

Pomiar barwy

Barwę piwa oznaczano spektrofotometrycznie zgodnie z metodyką EBC 2.12.2. W tym celu piwo po odgazowaniu poddano wirowaniu z szybkością 3000 obr./min przez 3 minuty w celu pozbycia się mętności. Następnie próbkę przeniesiono do kuwety kwarcowej o długości drogi optycznej 10 mm i zmierzono absorbancję przy długości fali 430 nm. Jako odnośnik stosowano wodę destylowaną. Wyniki przeliczono na jednostki EBC zgodnie ze wzorem (1):

$$(1) EBC = A_{430} * f * 25,$$

Gdzie:

EBC – jednostka barwy określona w normie EBC 2.12.2

A₄₃₀ – absorbancja przy długości fali 430 nm

f – współczynnik rozcieńczenia

Pomiar stężenia maltolu

Stężenie maltolu było oznaczane za pomocą chromatografu gazowego Agilent 7820 wyposażonego w spektrometr masowy MSD Agilent 5977B. Próbkę w ilości 0,5 µl były wstrzykiwane do portu nastrzykowego rozgrzanego do 200 °C (dzielenie strumienia gazu 2:1). Jako gazu nośnego używano helu w ilości 2 ml/min. Rozdziału dokonywano na kolumnie Stabilwax-DA (30m x 0,32 mm x 0,25 µm). Program temperaturowy wyglądał następująco 50 °C przez 5 minut, następnie wzrost w tempie 10 °C/min do 200 °C. Ostateczna temperatura była utrzymywana przez 5 minut. Temperatura detektora była ustawiona na 230 °C, natomiast temperatura kwadrupola na 150 °C. Związki były oznaczane za

pomocą bazy spektr masowych NIST-14. Krzywa standardowa została przygotowana dla stężeń maltolu od 0 do 5 mg/l

Oznaczanie kwasu ferulowego i 4-winylogwajakolu

Stężenie kwasu ferulowego, jak i 4-winylogwajakolu badano za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Próbki rozmrożono, a następnie kolejno każdą odwirowano w wirówce z szybkością 5000 obr./min przez 5 minut. Próbki przefiltrowano przez filtr o średnicy porów 0,25 µm wykonanym z regenerowanej celulozy. Badania wykonano na chromatografie HPLC Waters LC Module I plus z kolumną XTerra C18 i odwróconym układem faz. Średnica wewnętrzna kolumny wynosiła 5 µm, zaś jej długość 150 mm. Jako eluent posłużyła mieszanina H₂O/CH₃OH/H₃PO₄ (540:450:10). Przepływ przez kolumnę wynosił 0,5 ml/min. Na końcu kolumny znajdował się detektor UV-VIS mierzący absorbancję w świetle o długości fali 280 nm. Powyższa metoda chromatografii HPLC została również wykorzystana do sporządzenia krzywej wzorcowej zarówno dla kwasu ferulowego, jak i 4-winylogwajakolu. Dla kwasu ferulowego przygotowano roztwory o stężeniach: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 i 100,0 mg/dm³, natomiast dla 4-winylogwajakolu: 0,625; 2,5; 10,0; 20,0 oraz 100,0 mg/dm³.

Pomiar goryczki

Goryczkę piwa zmierzono zgodnie z metodyką EBC 2.17.1. Za goryczkę odpowiadają związki zawarte w chmielu, a w szczególności izohumulon. Przyjmuje się, że 1ppm izohumulonu jest równy 1IBU, czyli międzynarodowej jednostce goryczki (international bitterness unit). Stężenie izohumulonu zgodnie z metodyką mierzy się w fazie organicznej po ekstrakcji izooktanem. W celu wykonania analiz przygotowano 10 ml odgazowanego piwa, dodano 0,5 ml 6M HCl, następnie dolano 20 ml izooktanu. Mieszaninę mieszano przez 10 minut, a następnie odwirowano (3 min, 3000 rpm). Następnie zmierzono absorbancję fazy organicznej przy długości fali 275 nm stosując czysty izooktan jako odnośnik. Goryczkę obliczono według następującego wzoru (2):

$$(2) IBU = A_{275} * 50$$

Gdzie:

IBU – goryczka piwa w międzynarodowej jednostce goryczki

A₂₇₅ – absorbancja przy długości fali 275 nm

Pomiar pH

Pomiary pH wykonywane były przy użyciu pH metru Crison basic 20+

Pomiar gęstości

Pomiar gęstości wykonywany był przy użyciu gęstościomierza Anton Paar DMA 38. Używany gęstościomierz działa na zasadzie oscylującej U-rurki, co jest metodą standardowo wykorzystywaną w branży browarniczej.

Pomiar stężenia α-kwasów oraz izo-α-kwasów

Zawartość α-kwasów oraz izo-α-kwasów zmierzono zgodnie z metodyką EBC 2.17.2.

Przygotowanie odczynników:

Kwaśny roztwór metanolu – zmieszano 64ml metanolu z 36ml 4M kwasu solnego.

Alkaliczny roztwór metanolu – do kolby miarowej wprowadzono 0,2ml 6M NaOH i uzupełniono metanolem do uzyskania objętości 100ml.

Wykonanie:

Odgazowano piwo (w przypadku piwa mętneho dodatkowo odwirowano przez 15 min, 3000 rpm). Do 50 ml odgazowanej próbki dodano 3ml 6M kwasu solnego i 25ml izooktanu, po czym mieszano przez 30 minut. Następnie odwirowano próbkę w celu oddzielenia faz i pozbycia się emulsji (5 min, 3000 rpm). Usunięto fazę wodną, zaś do pozostałej fazy organicznej dodano siarczan sodu i wymieszano w celu sklarowania. Przeniesiono do próbki wirówkowej 10 ml fazy organicznej i dodano 10 ml kwaśnego roztworu metanolu, następnie wytrząsano mieszaninę przez 3 minuty, po czym przeniesiono za pomocą pipety 5 ml supernatantu do 25 ml naczynia miarowego i uzupełniono alkalicznym roztworem metanolu do objętości 25 ml. Zmierzono absorbancję otrzymanego roztworu jako odnośnik stosując roztwór 5ml izooktanu i 20 ml alkalicznego roztworu metanolu, pomiary wykonano przy długości fali 255 nm i 360 nm. Wyniki obliczono stosując wzory (3 i 4):

Obliczenia:

$$(3) C_{IA} = (A_{255} * 48,5) - (A_{360} * 26,5)$$

gdzie:

C_{IA} – stężenie izo- α -kwasów w mg/dm³

A_{255} – absorbancja przy długości fali 255 nm

A_{360} – absorbancja przy długości fali 360 nm

$$(4) C_A = A_{360} * 80$$

gdzie:

C_A – stężenie α -kwasów w mg/dm³

A_{360} – absorbancja przy długości fali 360 nm

Pomiar stężenia etanolu

Stężenie etanolu badano z użyciem chromatografu gazowego Shimadzu GC2014 wyposażonego w detektor jonizacji płomieniowej oraz zautomatyzowany port nastrzykowy AOC-20i. Do zbierania danych posłużył program ChromaX1 2007 ver. 1,0b, natomiast do obróbki otrzymanych wyników posłużył program Chr-mod1 2007 ver 1,0. Rozdziału dokonywano na kolumnie Zebron ZB-WAX plus (długość 30 m., średnica 0,25 μ m) Parametry pracy urządzenia były następujące: temperatura portu nastrzykowego 250 °C, temperatura detektora 250 °C, objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 1 μ l, dzielenie strumienia gazu (ang. Split) wynosiło 20:1. Przepływ gazu przez kolumnę wynosił 0,98 ml/min. Jako gaz nośny posłużył Hel. Program temperaturowy wyglądał następująco: początkowa temperatura kolumny wynosiła 55 °C, następnie po wykonaniu nastrzyku temperatura wzrastała do 100 °C z

szybkością 20 °C/min. Następnie podnoszono temperaturę do 240 °C w tempie 25 °C/min. Czas retencji etanolu wynosił 2,77 minuty.

Pomiar stężenia polifenoli

Stężenie polifenoli oznaczano metodą Folina-Ciocolteu zmodyfikowaną przez Singleton i Rossi. Użyta metoda jest metodą kolorymetryczną polegającą na reakcji odczynnika Folina z grupami hydroksylowymi polifenoli dając produkt o niebieskim zabarwieniu. Oznaczenie przeprowadzono zgodnie z następującą procedurą. Do próbek wprowadzano 20 µl badanej próbki oraz 100 µl odczynnika Folina. Reagenty mieszano i inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do próbek dodawano 300 µl 20% węglanu sodu oraz 1580 µl wody destylowanej. Dodatkowo przygotowano próbkę zerową, w której zamiast badanej substancji wprowadzono 20 µl wody destylowanej. Po wymieszaniu próbki inkubowano w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie mierzono absorbancje próbek przy długości fali 756 nm. Stężenie polifenoli oznaczano na podstawie krzywej standardowej wyznaczonej dla kwasu galusowego. Stężenie oznaczano na podstawie poniższego wzoru (5)

$$(5) C = 0,1319 * A_{765}$$

Gdzie:

C – stężenie w mg/g

A₇₆₅ – absorbancja przy długości fali 765 nm

Pomiar stężenia związków lotnych odpowiedzialnych za aromat piwa

Stężenie etanolu badano z użyciem chromatografu gazowego Shimadzu GC2014 wyposażonego w detektor jonizacji płomieniowej oraz zautomatyzowany port nastrzykowy AOC-20i. Do zbierania danych posłużył program ChromaX1 2007 ver. 1,0b, natomiast do obróbki otrzymanych wyników posłużył program Chr-mod1 2007 ver 1,0. Rozdziału dokonywano na kolumnie Zebron ZB-WAX plus (długość 30 m., średnica 0,25 µm) Parametry pracy urządzenia były następujące: temperatura portu nastrzykowego 250 °C, temperatura detektora 250 °C, objętość nastrzykiwanej próbki wynosiła 1 µl, dzielenie strumienia gazu (ang. Split) wynosiło 2:1. Przepływ gazu przez kolumnę wynosił 2 ml/min. Jako gaz nośny posłużył Hel. Program temperaturowy wyglądał następująco: początkowa temperatura kolumny wynosiła 40 °C i była utrzymywana przez 2 minuty od czasu nastrzyku, następnie temperatura rosła do 60 °C w tempie 5 °C/min. W dalszym etapie podnoszono temperaturę do 240 °C w tempie 15 °C/min, po czym przetrzymywano kolumnę w końcowej temperaturze przez 5 minut. Na podstawie artykułu Callejo i wsp. [282] wybrano trzy związki do oznaczania: izobutanol, mleczan etylu i alkohol fenyletylowy (Tabela 15). Przy wyborze kierowano się ich częstym występowaniem w piwie, różnymi masami molowymi oraz możliwościami używanego sprzętu.

Tabela 15. Właściwości analizowanych związków aromatycznych

Nazwa związku	Masa molowa [g/mol]	Czas retencji [min]	Aromat
Izobutanol	74,122	5,85	Słodki, stęchły
Mleczan etylu	118,131	10,15	Owocowy, maślany

Alkohol fenyloetylowy	122,16	15,21	Roślinny
--------------------------	--------	-------	----------

Pomiar stężenia kwasu mlekowego

Kwas mlekowy zmierzono za pomocą metody zaproponowanej przez Borshchevską i wsp. [283]. Oznaczenie polega na reakcji pomarańczowego roztworu chlorku żelaza (III) z kwasem mlekowym, w wyniku czego powstaje zielonkawy mleczan żelaza (III). Do oznaczenia wykorzystano 0,2% wodny roztwór chlorku żelaza (III), do 2 ml roztworu wprowadzano 50 µl badanej próbki, po czym reagenty mieszano i po 5 minutach mierzono absorbancję przy długości fali 390 nm. Krzywa standardowa wykonana dla tego oznaczenia miała równanie (6)

$$(6) C_{LA} = 8,4752 * A_{390}$$

Gdzie:

C_{LA} - stężenie kwasu mlekowego [g/L]

A_{390} – absorbancja przy długości fali 390 nm

Obliczenia strumienia permeatu

Strumień permeatu obliczono z wykorzystaniem poniższego wzoru (7)

$$(7) J = \frac{Q}{A * t}$$

Gdzie:

J – strumień permeatu (g/cm²·h)

Q – masa zebranego permeatu (g)

A – powierzchnia membrany perwaporacyjnej (cm²)

t – czas trwania procesu (h)

Obliczenia współczynnika rozdziálu

Współczynnik rozdziálu podczas perwaporacji obliczono według następującego wzoru (8)

$$(8) \beta = \frac{W_p/E_p}{W_f/E_f}$$

Gdzie:

W_p – ułamek wagowy wody w permeacie

E_p – ułamek wagowy etanolu w permeacie

W_f – ułamek wagowy wody w nadawie

E_f – ułamek wagowy etanolu w nadawie

Obliczenia stopnia odfermentowania

Stopień odfermentowania obliczano z wykorzystaniem poniższego wzoru (9)

$$(9) O = \frac{(E_p - E_k)}{E_p} * 100\%$$

Gdzie:

O – odfermentowanie

E_p – ekstrakt początkowy (°Brix)

E_k – ekstrakt końcowy (°Brix)

Obliczenia współczynnika wydajności produktu

Współczynnik wydajności produktu, w badanych przypadkach etanolu, obliczono z wykorzystaniem poniższego wzoru (10)

$$(10) Y_{p/s} = \frac{dc_p}{dc_s}$$

Gdzie:

$Y_{p/s}$ – współczynnik wydajności produktu

c_p – stężenie produktu [g/l]

c_s – stężenie substratu [g/l]

Zmniejszenie poziomu etanolu

Do celów porównawczych obliczono jak bardzo udało się zmniejszyć poziom etanolu w badanych procesach korzystając ze wzoru (11)

$$(11) Z = \frac{(A_p - A_k)}{A_p} * 100\%$$

Gdzie:

Z – zmniejszenie poziomu etanolu w stosunku do poziomu wyjściowego [%]

A_p – zawartość alkoholu przed procesie lub w przypadku metod biologicznych w próbie odniesienia [% obj.]

A_k – zawartość alkoholu po zastosowanym procesie [% obj.]

Testy organoleptyczne

Testy organoleptyczne zostały wykonane z wykorzystaniem 10 respondentów, w przypadku eksperymentów z perwaporacji i destylacji próżniowej ilość respondentów musiała zostać zmniejszona do 3 ze względu na niewielką objętość otrzymanych próbek. Wszystkie próbki przed testami zostały odgazowane i ogrzane do temperatury pokojowej. Respondenci przed testem zostali poinstruowani

jak mają wykonywać testy oraz jak pracować z kartą testów (załączoną w materiałach dodatkowych). Następnie testerzy otrzymywali, oznaczone numerami, próbki o objętości 20 ml w naczyniach z ciemnego szkła w celu wykluczenia wrażeń związanych z barwą napoju. Po każdym teście respondenci otrzymywali szklanekę wody wodociągowej do przepłukania ust w celu pozbycia się smaku poprzedniej próbki. W trakcie wykonywania testu ochotnicy nie mogli się komunikować. Mimo licznych wzorów i wytycznych odnośnie testów organoleptycznych, ze względu na specyfikę otrzymywanego produktu zdecydowano się na stworzenie autorskiej ankiety bazującej na powszechnie stosowanych formularzach. Podczas testów ocenie podlegały następujące parametry:

- Goryczka, która pochodzi przede wszystkim od związków pochodzących z chmielu. Wskutek procesów separacji związki odpowiadające za odczucie goryczy mogą ulec rozkładowi lub zatężeniu bądź usunięciu [124].
- Słodycz to parametr za który odpowiadają cukry resztkowe obecne w piwie jak i nieprzefermentowane cukry proste, które mogą być obecne po zastosowaniu niektórych procesów [124].
- Kwaśność to parametr pojawiający się w piwie wskutek zakażenia, jak i dodatku cytrusów lub niektórych rodzajów chmielu. Najczęściej za kwaśny smak odpowiadają drożdże *Brettanomyces bruxellensis* lub bakterie fermentacji mlekowej takie jak *Lactobacillus brevis* [82], [85], [86]
- Aromat roślinny jest obecny w piwie dzięki lotnym związkom obecnym w chmielu oraz w postaci produktów ubocznych metabolizmu drożdży. Niestety omawiane składowe piwa mogą ulec odparowaniu wskutek stosowania procesów termicznych [76].
- Aromat alkoholowy jest wywołany przede wszystkim przez etanol powstający w procesie fermentacji. Niemniej drożdże potrafią produkować inne, wyższe alkohole, których aromat jest wyczuwalny w piwie [92], [124].
- Aromat słodki pochodzi zarówno od chmielu i słodu jak i wskutek starzenia i utleniania się piwa. Taki sam efekt może być spowodowany reakcjami Maillarda zachodzącymi po ekspozycji produktu na wysokie temperatury [284], [285].
- Aromat drożdżowy to określenie aromatu panującego w niedofermentowanym piwie lub w przypadku źle prowadzonej fermentacji, kiedy to wskutek autolizy drożdży powstają związki odpowiadające, w większych stężeniach, za nieprzyjemny aromat [124].
- Uczucie orzeźwienia to parametr opisujący jak bardzo piwo gasi pragnienie i powoduje przyjemne uczucie świeżości.

V Wyniki

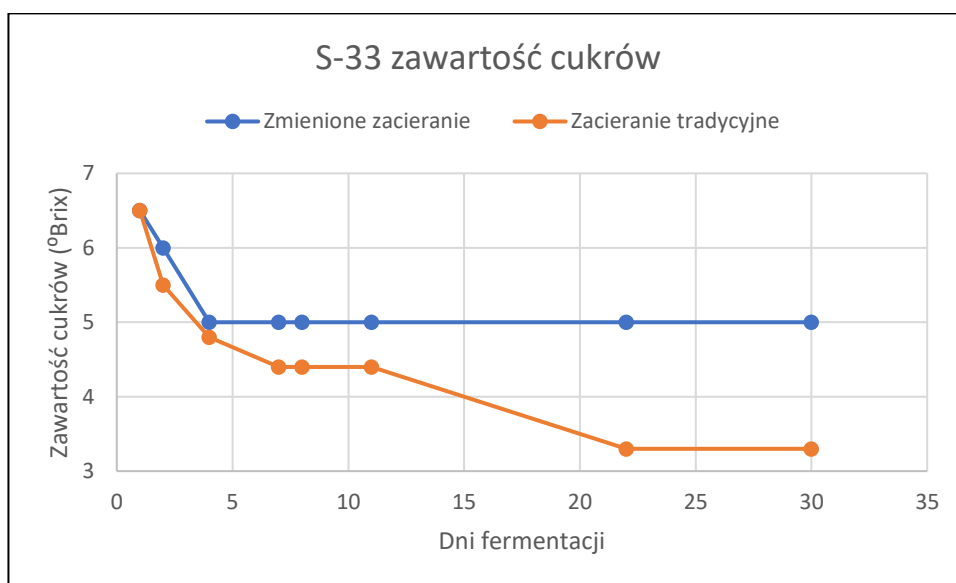
5.1. Metody biologiczne zmniejszające ilość alkoholu w piwie

Metody biologiczne polegają na ingerencji w proces produkcji piwa poprzez manipulację warunkami prowadzenia procesu jak i stosowanie różnych mikroorganizmów mających przeprowadzać fermentację brzeczki piwnej.

5.1.1 Zmiana reżimu zacierania

Fermentację przygotowanej brzeczki o mniejszej zawartości cukrów fermentowalnych jak i standardowej brzeczki prowadzono w temperaturze pokojowej. Na podstawie pomiaru zawartości cukrów jak i etanolu w próbkach udało się wykreślić krzywe fermentacji dla badanych szczepów.

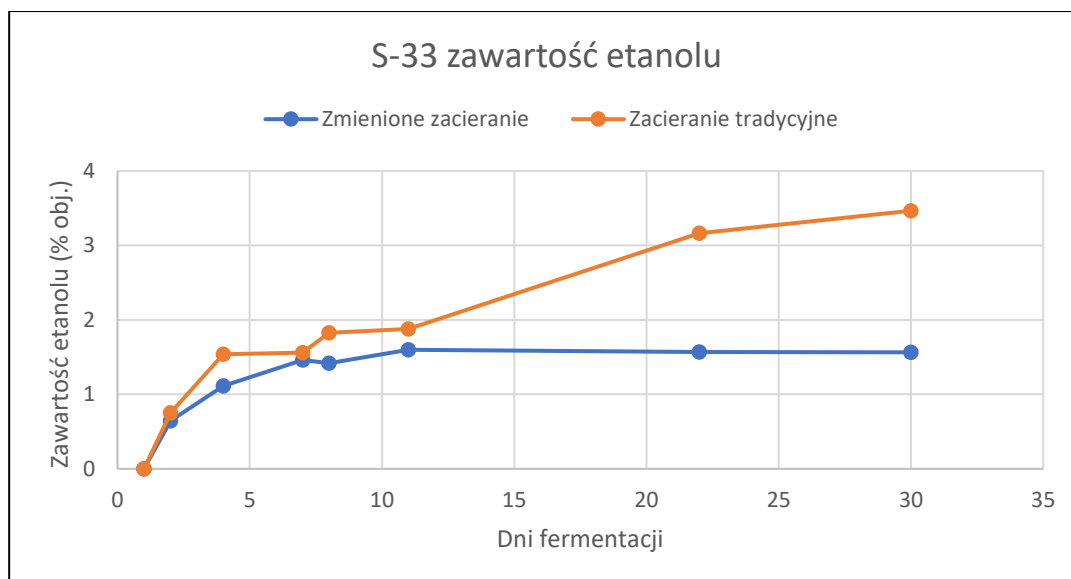
Szczep S-33 w warce kontrolnej przefermentował brzeczkę redukując zawartość cukrów do poziomu $3,3 \pm 0,2$ °Brix, natomiast w przypadku warki powstałej wskutek zmian w reżimie zacierania poziom cukrów spadł co poziomu $5 \pm 0,2$ °Brix (Rysunek 38).



Rysunek 38. Wykres przedstawiający zmianę zawartości cukrów w brzeczce podczas fermentacji z użyciem szczepu S-33

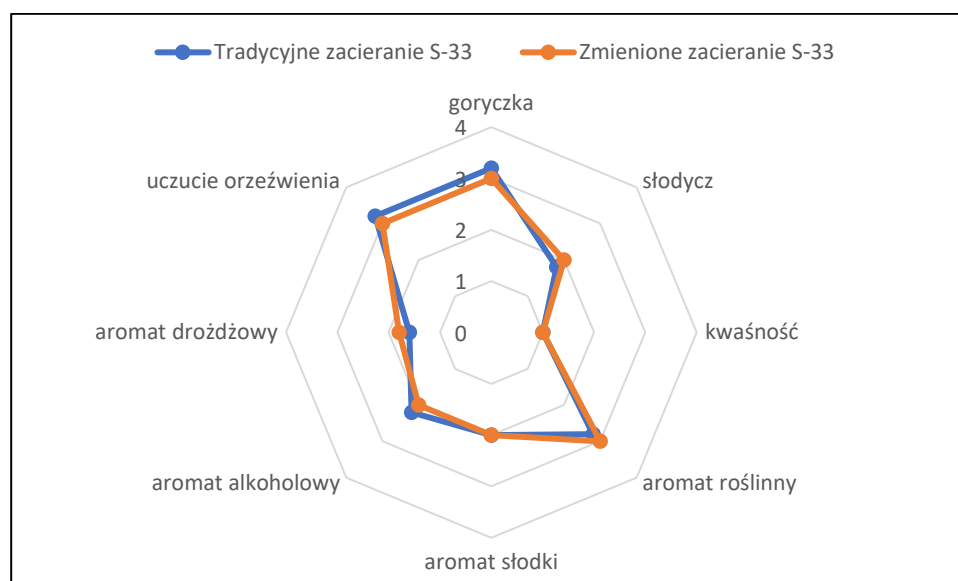
Stopień odfermentowania dla zmienionego zacierania wyniósł 23%, zaś dla tradycyjnego zacierania 49%, co oznacza, że udało się zredukować ilość cukrów, które mogą być zmetabolizowane przez szczep drożdży S-33.

Fermentacja etanolowa w obydwu przypadkach przebiegała z różną wydajnością, co widać na wykresie (Rysunek 39). W przypadku tradycyjnego zacierania uzyskano zawartość etanolu na poziomie $3,49 \pm 0,06$ % obj. W brzeczce uwarzonej ze zmienionym reżimem zacierania zawartość etanolu wynosiła $1,56 \pm 0,06$ % obj. co pozwala to piwo scharakteryzować jako niskoalkoholowe.



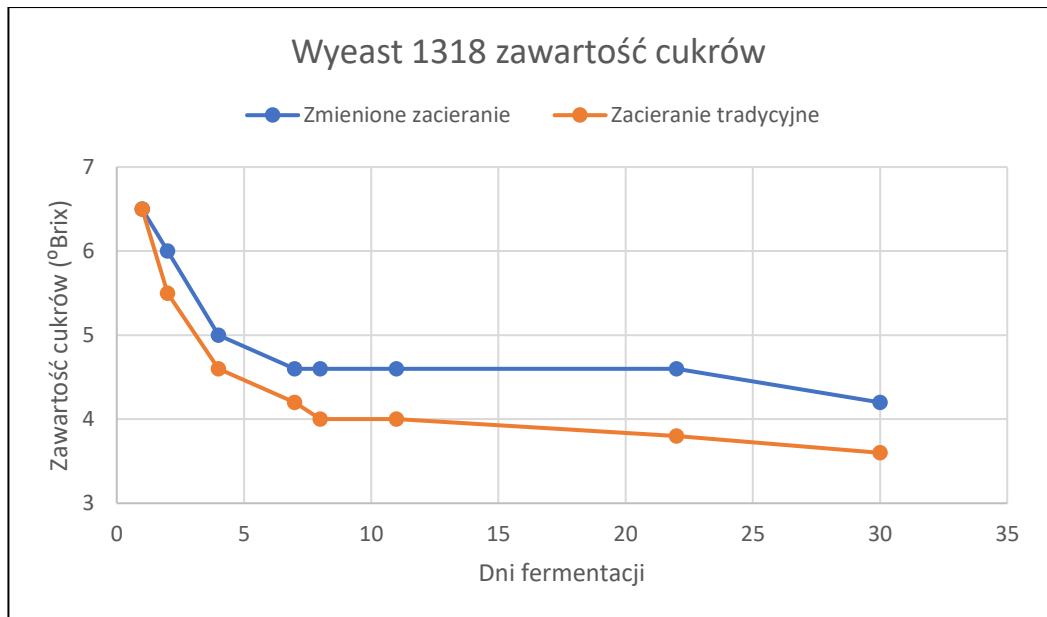
Rysunek 39. Wykres stężenia etanolu podczas fermentacji z użyciem szczepu S-33

Testy organoleptyczne wykazały, że obydwa piwa są bardzo zbliżone do siebie w odbiorze, zaś respondenci nie wskazali znaczących różnic w smaku. Ciekawym zjawiskiem jest niezauważalne zwiększenie poziomu słodyczy mimo większej ilości cukrów w piwie powstałym wskutek zmienionego zacierania. Może to świadczyć o fakcie, że uzyskano większą ilość dekstryn, które nie są odbierane jako słodki smak (Rysunek 40).



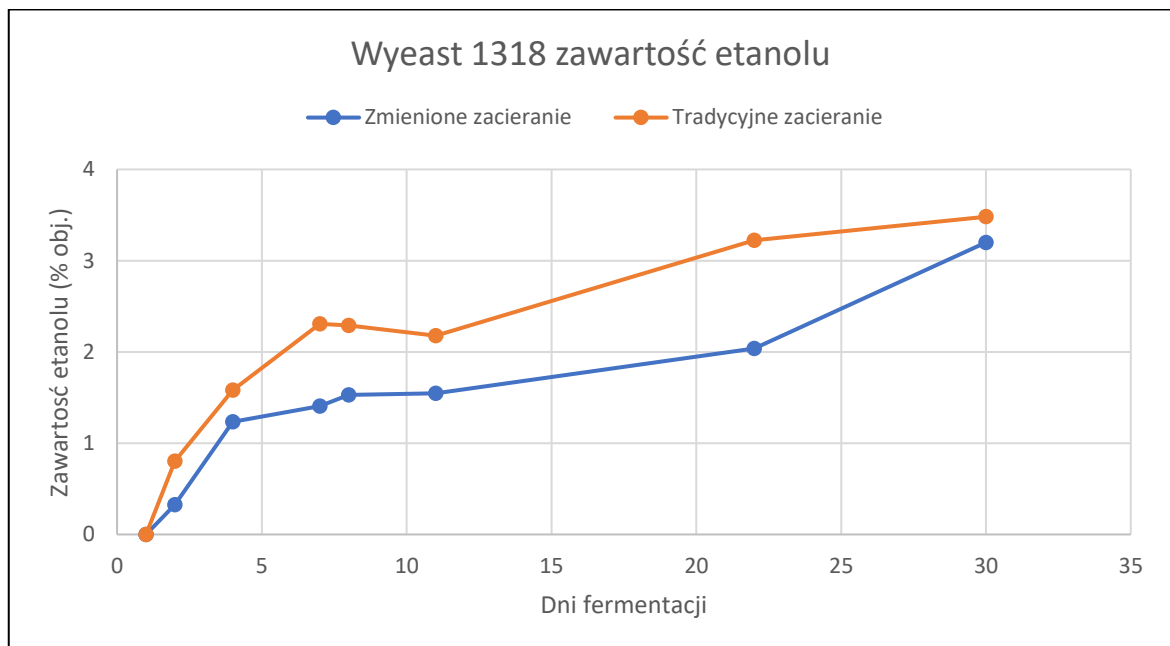
Rysunek 40. Wyniki testów organoleptycznych dla zmienionego zacierania i fermentacji z użyciem szczepu S-33

Szczep Wyeast 1318 w warce kontrolnej przefermentował brzeczkę redukując zawartość cukrów do poziomu 3,6 +/-0,2 °Brix, natomiast w przypadku warcki powstałej wskutek zmian w reżimie zacierania poziom cukrów spadł co poziomu 4,2 +/-0,2 °Brix (Rysunek 41).



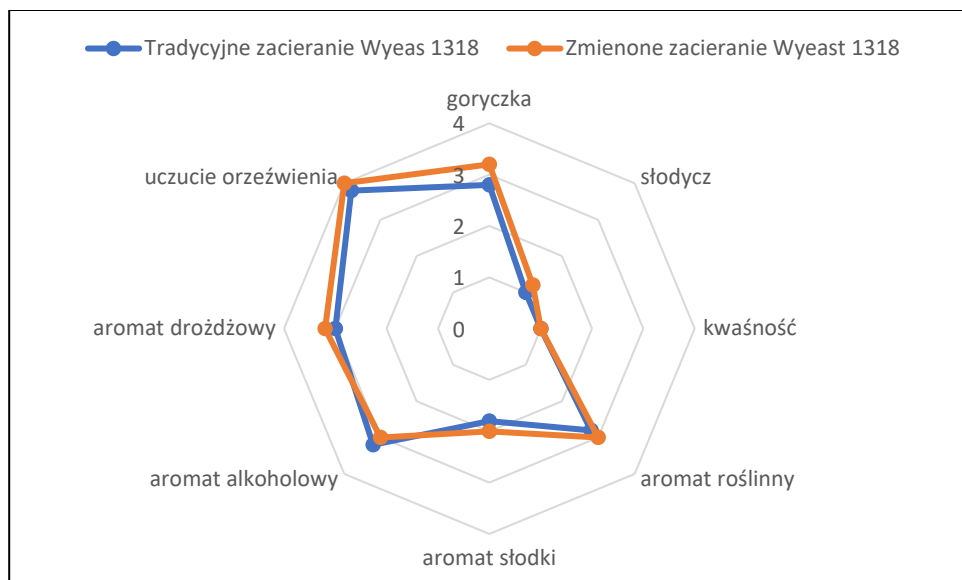
Rysunek 41 Wykres zawartości cukrów podczas fermentacji z wykorzystaniem szczepu Wyeast 1318. Stopień odfermentowania dla zmienionego zacierania wyniósł 35%, zaś dla tradycyjnego zacierania 45%. Wynik ten pokazał, że badany szczep lepiej fermentuje złożone cukry obecne w brzeczce, przez co różnice w stopniu odfermentowania brzeczki tradycyjnej jak i tej powstałej wskutek zmian w reżimie zacierania były niższe niż w przypadku szczepów S-33 i Voss Kveik.

Fermentacja etanolowa również miała miejsce w badanej warce. Niemniej różnica w zawartości etanolu w obydwu przypadkach była bardzo niewielka. W przypadku tradycyjnego zacierania osiągnięto stężenie etanolu na poziomie 3,48 +/-0,06 % obj. natomiast przy zmianie zacierania uzyskano piwo o stężeniu etanolu 3,20 +/-0,06 % obj. (Rysunek 42).



Rysunek 42. Zawartość etanolu w trakcie fermentacji z użyciem drożdży Wyeast 1318

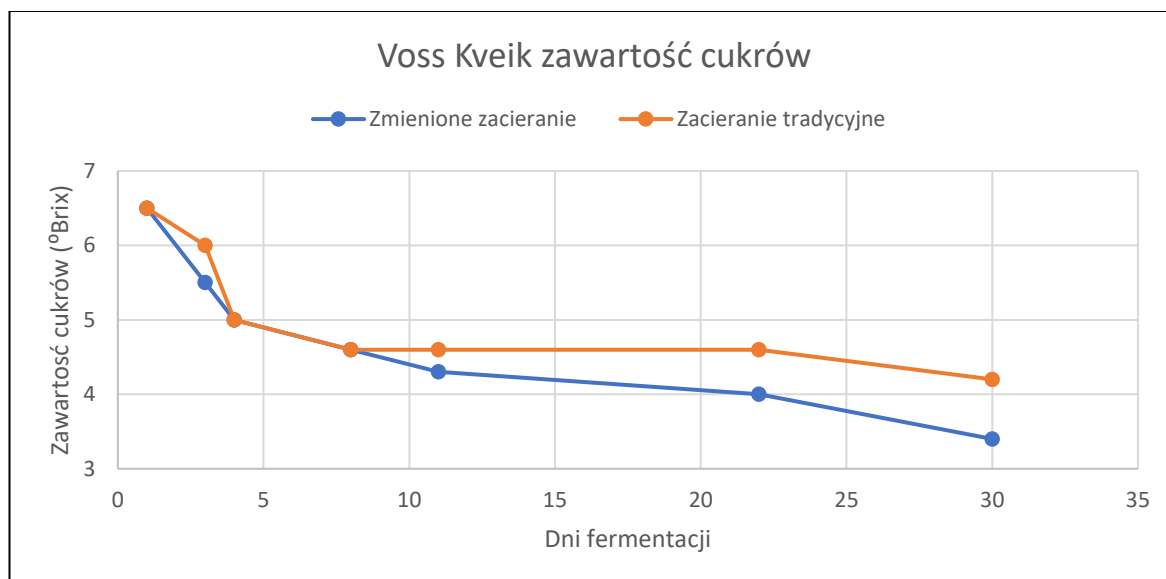
W przypadku szczepu Wyeast 1318 zmiana reżimu zacierania nie pozwoliła na znaczące zredukowanie stężenia etanolu. Może to oznaczać, że badany szczep ma zdolność do fermentowania bardziej złożonych sacharydów takich jak dekstryny



Rysunek 43. Wyniki testów organoleptycznych dla zmienionego zacierania i fermentacji z użyciem szczepu Wyeast 1318

Testy organoleptyczne pokazały, że obydwie piwa wytworzone z użyciem szczepu Wyeast 1318 były niemal identyczne w smaku (Rysunek 43). Biorąc pod uwagę zbliżony poziom odfermentowania tego typu obserwacja nie powinna dziwić.

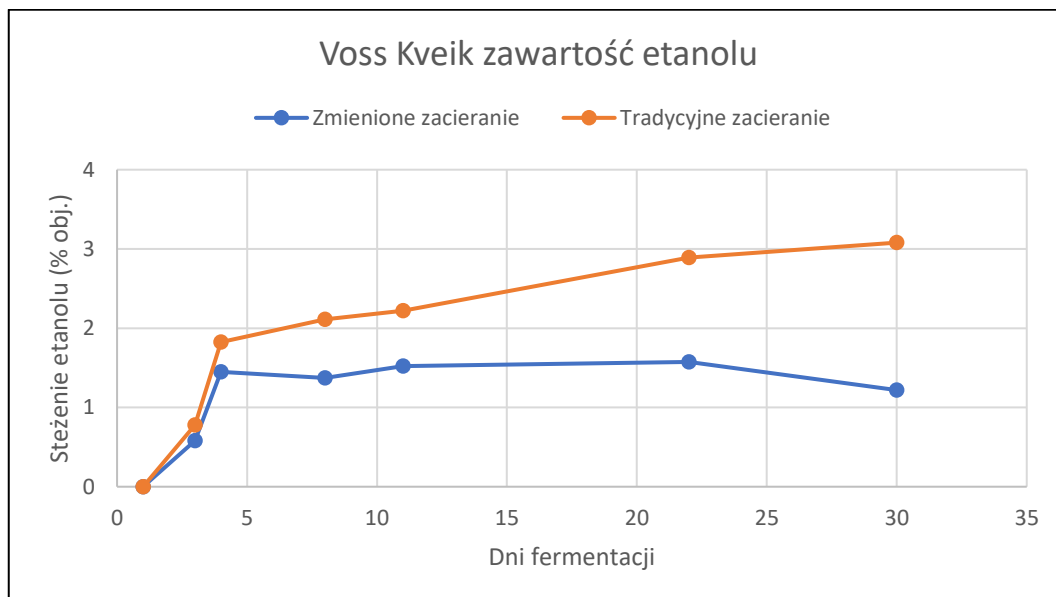
Szczep Voss Kveik w warce kontrolnej przefermentował brzeczki do poziomu 3,4 +/-0,2 °Brix. W przypadku brzeczki eksperymentalnej osiągnięto końcową zawartość cukrów na poziomie 4,2 +/-0,2 °Brix (Rysunek 44).



Rysunek 44. Wykres zawartości cukrów podczas fermentacji z wykorzystaniem szczepu Voss Kveik

Stopień odfermentowania dla brzezki tradycyjnej wyniósł 48% natomiast brzezka testowa pozwoliła na osiągnięcie stopnia odfermentowania na poziomie 35%.

Zawartość etanolu w obydwu warkach różniła się. Piwo powstałe w wyniku fermentacji tradycyjnie zacieranej brzezki miało stężenie etanolu na poziomie 3,08 +/- 0,06% obj. Fermentacja brzezki eksperymentalnej poskutkowała wytworzeniem etanolu na poziomie 1,22 +/- 0,06% obj. (Rysunek 45).



Rysunek 45. Zawartość etanolu w trakcie fermentacji z użyciem drożdży Voss Kveik

Zmiana zacierania spowodowała mniejsze odfermentowanie brzezki przez drożdże Voss Kveik niż w przypadku brzezki zacieranej w tradycyjny sposób. Mniejsze odfermentowanie skutkowało również mniejszą zawartością etanolu w finalnym produkcie, która była ponad dwukrotnie mniejsza niż w próbie kontrolnej.



Rysunek 46. Wyniki testów organoleptycznych dla zmienionego zacierania i fermentacji z użyciem szczepu Voss Kveik

Wyniki testów organoleptycznych pokazały, że piwo o obniżonej zawartości alkoholu ma cechy zbliżone do tradycyjnego odpowiednika. Zaobserwowano, że aromat roślinny jak i alkoholowy były bardziej wyczuwalne w piwie mniej alkoholowym (Rysunek 57). Może to być spowodowane zmianami w metabolizmie drożdży przy mniejszej zawartości dostępnych cukrów jak i mniejszą zawartością etanolu, który mógł służyć aromatu roślinnego i wyższych alkoholi.

We wszystkich próbach kontrolnych otrzymano piwo o porównywalnej zawartości etanolu wynoszącej niemal 3,5% obj. Szczep Wyeast 1318 osiągnął stężenie etanolu 3,48 % obj. zaś szczep S-33 przefermentował brzeczki wytwarzając 3,49 % obj. etanolu. Wyjątek stanowił szczep Voss Kveik, który wytworzył produkt o niższej zawartości alkoholu na poziomie 3,08% obj.

Tabela 16. Porównanie parametrów piwa otrzymanego poprzez zmiany w procesie zacierania z wykorzystaniem trzech komercyjnie dostępnych szczepów drożdży browarniczych.

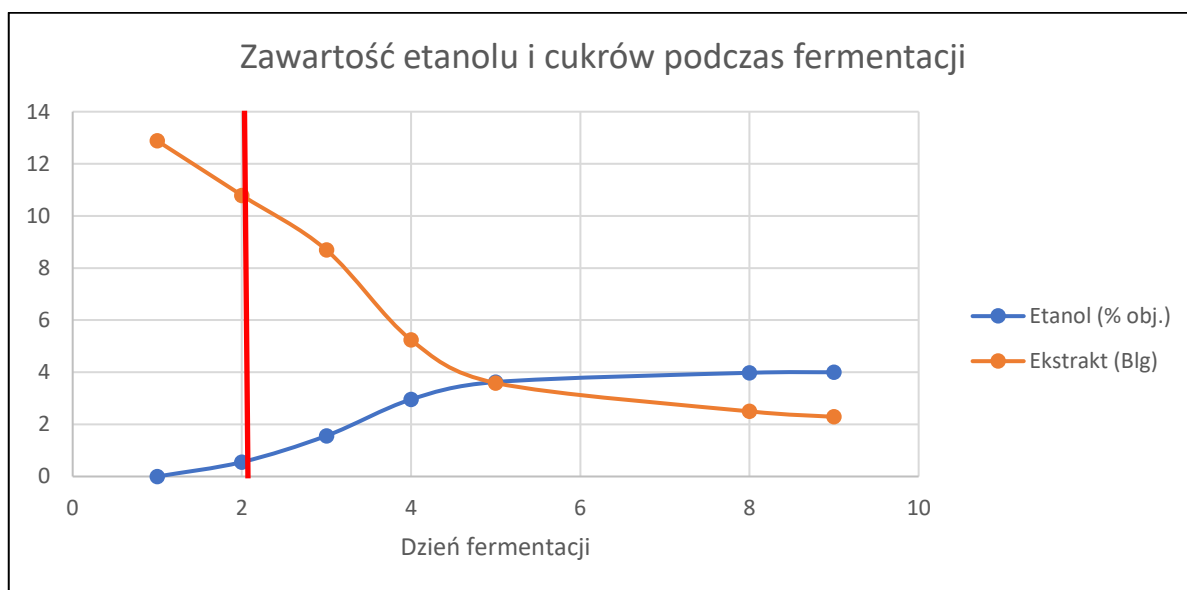
Szczep	S-33		Voss Kveik		Wyeast 1318	
	T	M	T	M	T	M
Typ zacierania tradycyjne/zmodyfikowane (T/M)						
Odfementowanie (%)	49	23	48	35	45	35
Zawartość etanolu (% obj.)	3,49 +/- 0,06	1,56 +/- 0,06	3,08 +/- 0,06	1,22 +/- 0,06	3,48 +/- 0,06	3,20 +/- 0,06
Zawartość cukrów (°Brix)	3,3 +/- 0,2	5,0 +/- 0,2	3,4 +/- 0,2	4,2 +/- 0,2	3,6 +/- 0,2	4,4 +/- 0,2
Współczynnik wydajności produktu	0,84	0,73	0,84	0,50	0,89	0,87

Odfementowanie jak i współczynnik wydajności produktu były porównywalne we wszystkich warunkach kontrolnych. Spośród trzech badanych szczepów drożdży w przypadku dwóch, czyli S-33 i Voss Kveik zauważono znaczną zmianę w ilości wytworzonego etanolu podczas fermentacji brzeczki testowej, dzięki czemu otrzymano dwa piwa niskoalkoholowe. Szczep S-33 wyprodukował 1,56 +/- 0,06 % obj. etanolu natomiast szczep Voss Kveik wytworzył 1,22 +/- 0,06 % obj. etanolu. Szczep S-33 odfementował brzeczki ubogą w cukry proste w mniejszym stopniu niż szczep Voss Kveik. Mimo większego odfementowania brzeczki szczep Voss Kveik wyprodukował mniej etanolu niż reszta badanych szczepów. Może to być skutkiem powstawania większej ilości wyższych alkoholi lub związków aromatycznych podczas fermentacji, co można zaobserwować w wynikach testów organoleptycznych (Rysunek 40, Rysunek 43, Rysunek 46). Omawiany szczep wykazał się najmniejszą wydajnością produktu (na poziomie 0,50) spośród badanych mikroorganizmów podczas fermentacji brzeczki ubogiej w cukry proste, co oznacza że najbardziej nadaje się do produkcji piw niskoalkoholowych. Szczep Wyeast 1318 wytworzył podobną ilość etanolu podczas fermentacji obydwu brzeczek. Dodatkowo jego współczynnik wydajności produktu w obydwu eksperymentach był niemal taki sam i wynosił 0,87 dla brzeczki testowej oraz 0,89 dla brzeczki tradycyjnej. Przeprowadzony eksperyment pokazał, że zmiana w poziomie zacierania zmniejsza ilość cukrów prostych w brzeczce, a co za tym idzie pozwala znacznie zmniejszyć ilość etanolu wytwarzanego przez drożdże (Tabela 16). Niestety nie wszystkie z testowanych komercyjnych szczepów drożdży okazały się tak samo podatne na redukcję ilości cukrów prostych. W związku z tym w przypadku komercyjnego zastosowania zmian

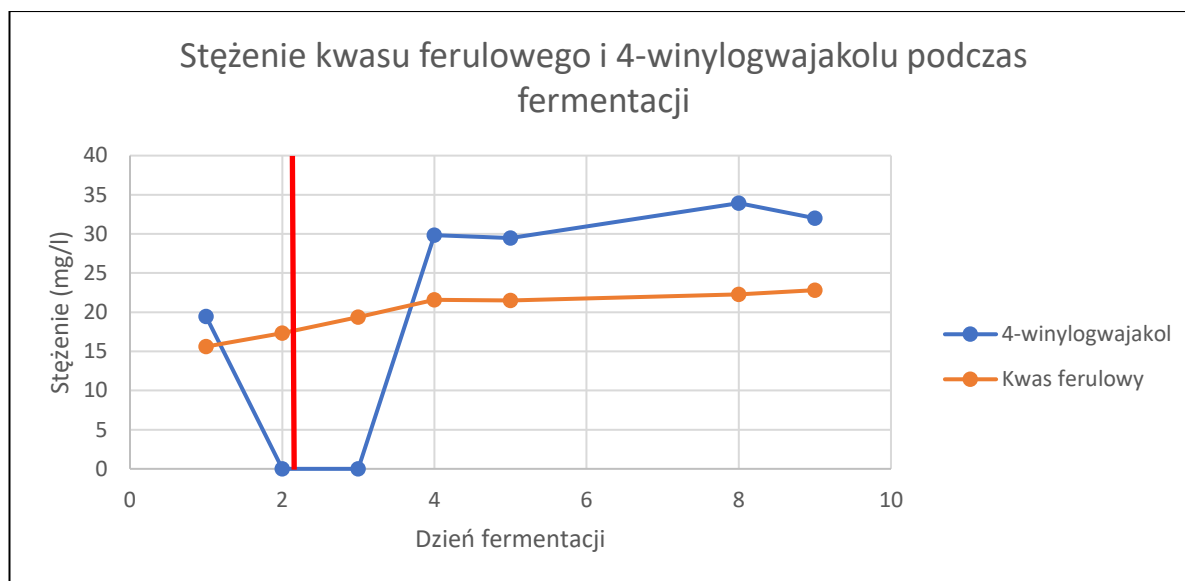
w zacieraniu w celu otrzymywania piwa o obniżonej zawartości etanolu warto przetestować wykorzystywany szczep drożdży pod kątem wykorzystania go do fermentacji brzezki uboższej w cukry proste, gdyż jak pokazały badania nie wszystkie szczepy zachowują się tak samo w przypadku fermentacji brzezki powstałej wskutek zmian w procesie zacierania.

5.1.2 Przerwana fermentacja

Proces fermentacji prowadzono do momentu niemal całkowitego zatrzymania obserwowanego metabolizmu drożdży. Dziewiątego dnia osiągnięto stan, w którym zawartość cukrów jak i etanolu nie zmieniały się w istotny sposób (Rysunek 47). Tak przefermentowane piwo było punktem odniesienia dla produktu otrzymanego metodą przerwanej fermentacji. Podczas fermentacji gdy poziom etanolu wyniósł 0,5%, czyli maksymalną dopuszczalną wartość według polskiego prawodawstwa [51] odebrano część piwa i zatrzymano jego aktywność biologiczną poprzez zamrożenie. Tak przygotowana partia czekała do dalszych analiz. W pełni przefermentowane piwo również zamrożono przed wykonaniem analiz w celu wyeliminowania ewentualnych różnic wynikających z mrożenia próbki.



Rysunek 47. Wykres zawartości etanolu i cukrów (ekstraktu) podczas fermentacji. Czerwoną linią oznaczono moment zatrzymania fermentacji w celu otrzymania piwa bezalkoholowego.

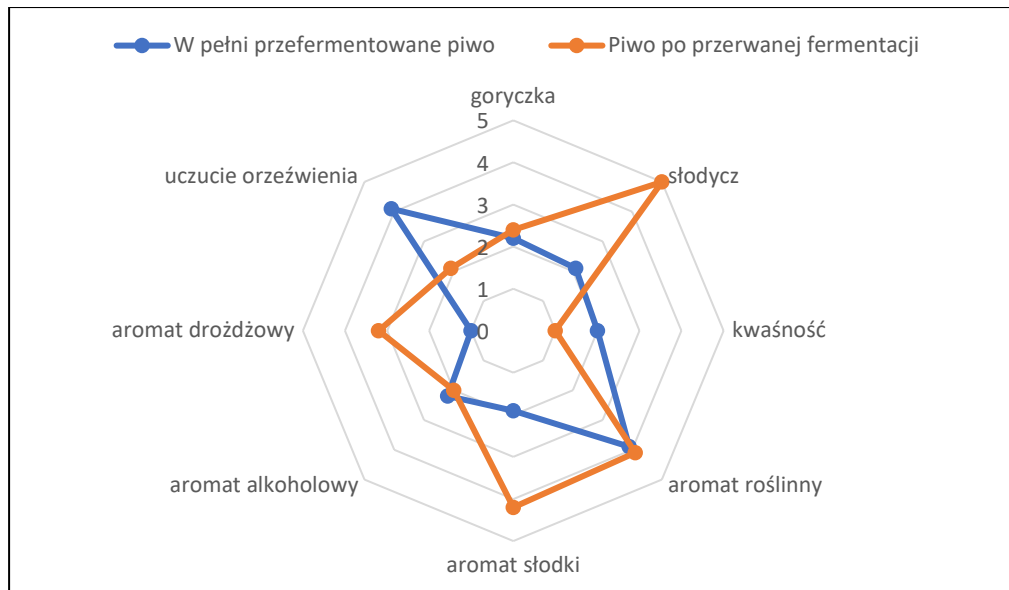


Rysunek 48. Wykres stężenia 4-winylogwajakolu i kwasu ferulowego podczas fermentacji. Czerwoną linią zaznaczono moment zatrzymania fermentacji w celu otrzymania piwa bezalkoholowego.

Poza alkoholem badano poziom ekstraktu, który po przerwaniu fermentacji wyniósł $14,4 \pm 0,2$ °Błg (Rysunek 47). Wysokie stężenie cukrów spowodowało słodki, brzczkowy smak otrzymanego produktu. Poza podstawowymi parametrami piwa badano także zawartość kwasu ferulowego będącego antyoksydantem powszechnie występującym w piwach pszenicznych [286] oraz stężenie 4-winylogwajakolu, związku odpowiedzialnego za goździkowy aromat piw pszenicznych. Powstaje on na drodze termicznej bądź enzymatycznej dekarboksylacji kwasu ferulowego [192], [287] (Rysunek 48). Zawartość kwasu ferulowego była nieznacznie niższa od tej w pełni przefermentowanym piwie i wynosiła 19 mg/l. wobec 22 mg/l. dla w pełni przefermentowanego piwa. W przypadku 4-winylogwajakolu ta różnica była znacznie większa i w standardowym piwie jego stężenie wynosiło 32 mg/l., zaś w piwie po przerwanej fermentacji 4-winylogwajakol nie został wykryty, co widać w (Tabela 17). Może to świadczyć o tym, że drożdże nie zdążyły wytworzyć tego związku ze względu na krótki czas fermentacji, co skutkowało brakiem pełnego bukietu smakowego podczas przerwanej fermentacji w potencjalnych aplikacjach konsumenckich.

Tabela 17. Zestawienie parametrów standardowego piwa pszenicznego z piwem o obniżonej zawartości alkoholu otrzymanym metodą przerwanej fermentacji.

Badane piwa	Ekstrakt pozorny [°Błg]	Alkohol [% obj.]	Kwas ferulowy [mg/dm ³]	4-winylogwajakol [mg/dm ³]	Odfementowanie [%]
Piwo standardowe	$2,94 \pm 0,2$	$4,03 \pm 0,06$	22 ± 1	32 ± 1	79,3
Piwo po przerwanej fermentacji	$14,4 \pm 0,2$	$0,54 \pm 0,06$	19 ± 1	0 ± 1	13,8



Rysunek 49. Porównanie wyników testów organoleptycznych piwa powstałego na drodze przerwanej fermentacji w porównaniu z w pełni przefermentowanym odpowiednikiem

Testy organoleptyczne pokazały znaczne różnice w parametrach badanych piw. Najbardziej zauważalną zmianą jest wyczuwalna słodycz dominująca smak jak i aromat otrzymanego piwa bezalkoholowego. Jest to niewątpliwie związane z dużą ilością nieprzefermentowanych cukrów obecnych w piwie. Goryczka, aromat roślinny jak i alkoholowy nie uległy istotnym zmianom. Natomiast aromat drożdżowy był dużo bardziej wyczuwalny w piwie bezalkoholowym. Może to być spowodowane dużą ilością komórek drożdżowych, które nie zdążyły naturalnie zsedymetować na dno fermentora (Rysunek 49).

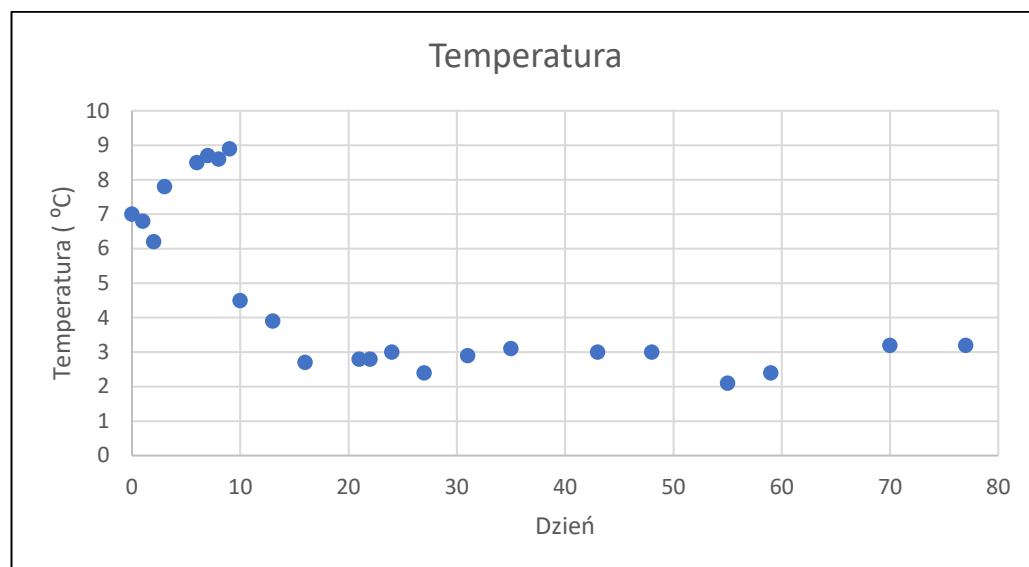
Metoda przerwanej fermentacji okazała się niedostateczną metodą produkcji piwa bezalkoholowego. Mimo otrzymania zadowalającego poziomu alkoholu poziom cukrów był na tyle wysoki, że psuł smak produktu, zaś profil aromatyczny był niepełny. Zaletą tej metody jest prostota wykonania jak i możliwość produkcji piwa bezalkoholowego w standardowym browarze bez konieczności rozbudowy instalacji.

5.1.3 Proces zimnego kontaktu

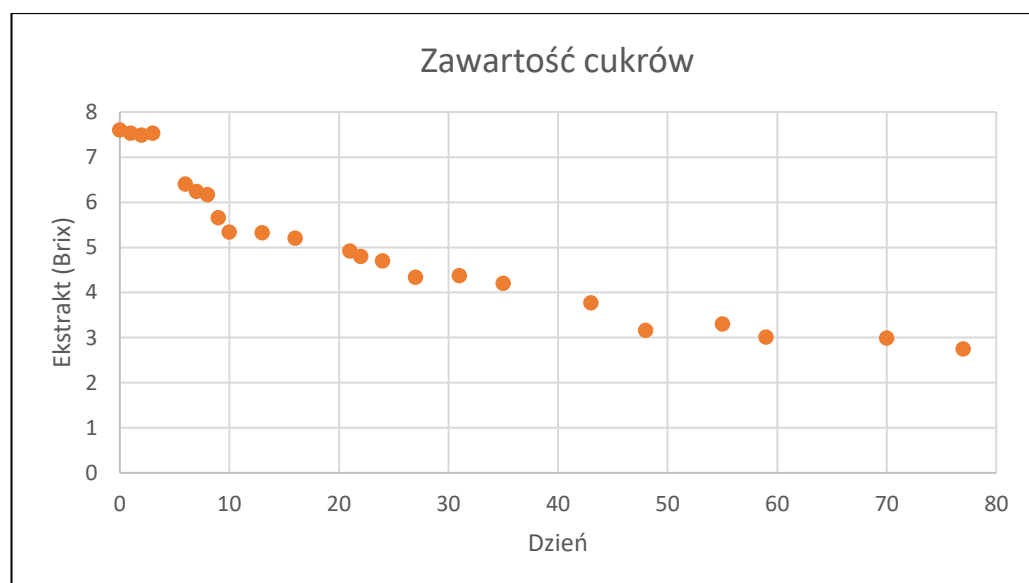
Istotą procesu zimnego kontaktu jest obniżenie temperatury fermentacji tak, aby spowolnić metabolizm drożdży. Takie warunki mają na celu zmusić drożdże do produkcji mniejszej ilości etanolu w celu odpowiedzi na szok termiczny.

Fermentację (Rysunek 50, Rysunek 51) zaczęto od temperatury 7 ± 1 °C i podwyższono do 9 ± 1 °C aby przyspieszyć czas namnażania drożdży. Następnie 9 dnia, gdy poziom alkoholu osiągnął 0,43 % obj. obniżono temperaturę w fermentorze do 3 ± 1 °C aby spowolnić proces fermentacji. 13 dnia procesu osiągnięto stężenie alkoholu na poziomie 0,42 % obj. (Rysunek 52), czyli w granicach akceptowanych przez prawodawstwo polskie [51]. Otrzymany produkt miał barwę wynoszącą 9 ± 1 EBC, co jest typową barwą dla piw jasnych typu lager. pH wynosiło 4,7 co jest wartością poprawną dla

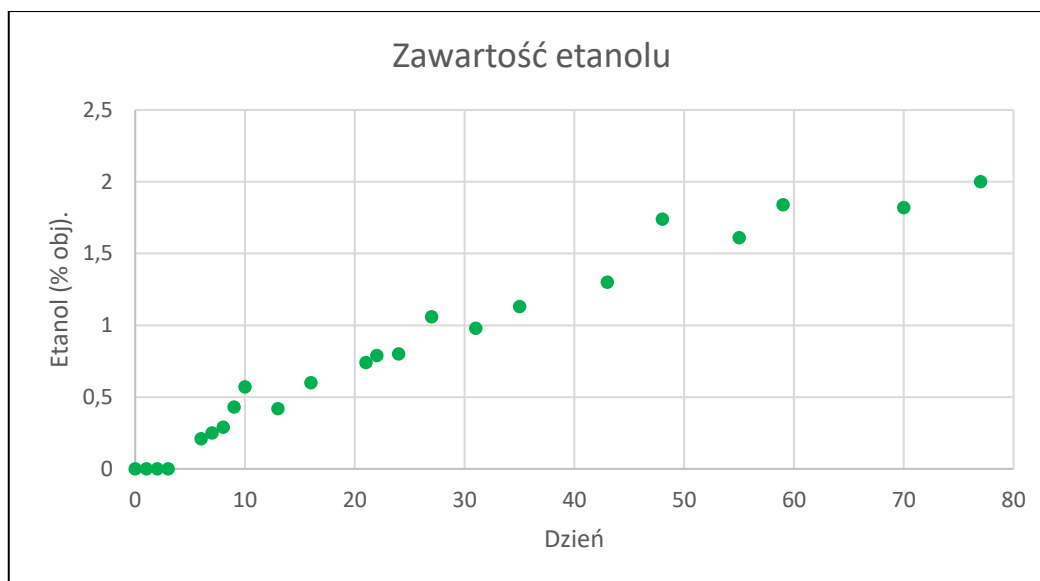
piw typu lager. Zmierzona goryczka piwa wyniosła 20 +/-1 IBU. Ekstrakt piwa wynosił 5,32 Błg przez co w smaku można było wyczuć słodycz pochodzącą z nieprzefermentowanych cukrów.



Rysunek 50. Kontrolowany przebieg temperatury podczas fermentacji w procesie zimnego kontaktu. W pierwszych dniach widać wzrost temperatury w celu ułatwienia drożdżom budowy biomasy.



Rysunek 51. Wykres zawartości cukrów podczas fermentacji w reżimie zimnego kontaktu. Od 10 dnia widać bardzo powolny spadek spowodowany obniżeniem temperatury.



Rysunek 52. Wykres zawartości etanolu w trakcie fermentacji. Na uwagę zasługuje długi okres, w którym etanol nie był wytwarzany (tzw. lag faza), następnie można zaobserwować powolny wzrost stężenia etanolu w piwie.

Mimo otrzymania piwa bezalkoholowego kontynuowano fermentację w dalszym ciągu w celu otrzymania piwa niskoalkoholowego o mniejszej zawartości cukrów resztkowych. 35 dnia fermentacji otrzymano produkt o zawartości etanolu $1,13 \pm 0,06$ % obj., co jest najwyższą dopuszczalną wartością dla piw bezalkoholowych w niektórych krajach Unii Europejskiej [223]. Ekstrakt wynosił $4,20 \pm 0,05$ Bg, dzięki czemu pozbyto się z piwa słodkiego smaku nieprzefermentowanych cukrów. Pozostałe parametry takie jak barwa, goryczka i pH nie uległy zauważalnym zmianom.

W 77 dniu procesu, piwo osiągnęło $2,00 \pm 0,06$ % obj. etanolu. Ta wartość nie pozwala na zaklasyfikowanie produktu jako piwa bezalkoholowego, niemniej jest to piwo o obniżonej zawartości alkoholu w stosunku do typowych produktów. Ekstrakt dla tego produktu wyniósł $2,75 \pm 0,05$ Bg. pH nieznacznie zmalało do wartości 4,5 która jest jak najbardziej akceptowalna dla piw typu lager. Barwa oraz goryczka pozostały bez większych zmian i wynosiły odpowiednio 9 ± 1 EBC oraz 20 ± 1 IBU. Podczas fermentacji współczynnik wydajności produktu wyniósł 0,33. W przypadku klasycznej fermentacji współczynnik ten waha się między 0,7 a 0,9.

Proces zimnego kontaktu dał produkt o parametrach bardzo podobnych do piwa w pełni przefermentowanego w tych samych warunkach. Nieznaczne różnice zaobserwowano w przypadku aromatu drożdżowego, słodkiego oraz słodkiego smaku. Przy czym piwo bezalkoholowe posiadało wymienione parametry na bardziej wyczuwalnym poziomie niż w pełni przefermentowany produkt (Rysunek 53).



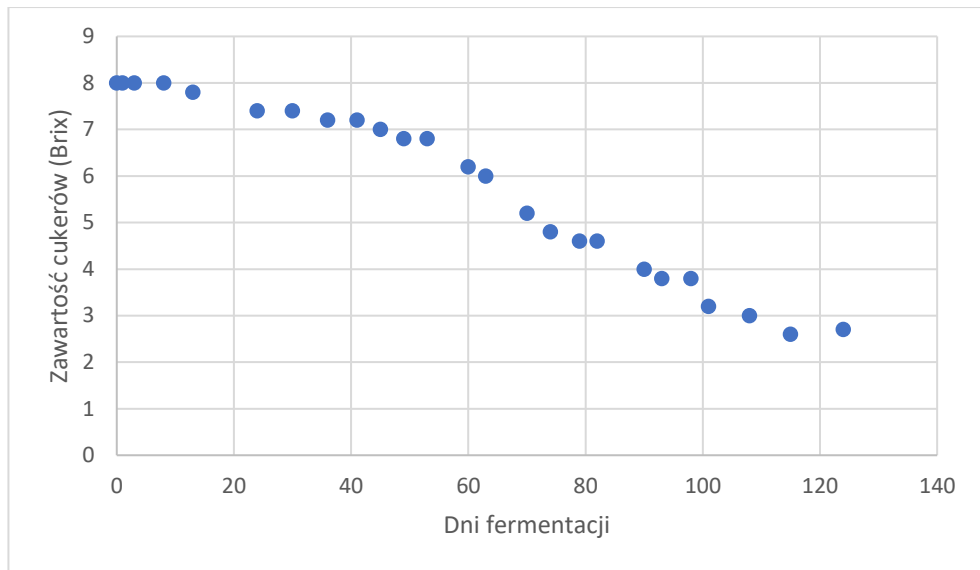
Rysunek 53. Wyniki testów organoleptycznych dla piwa bezalkoholowego uzyskanego za pomocą procesu zimnego kontaktu

Fermentacja prowadzona sposobem zimnego kontaktu dała stosunkowo dobry produkt o parametrach zgodnych z wymaganiami stawianymi dla piw typu lager. Istotną wadą tego typu procesu był długi czas fermentacji co stanowi ekonomiczne przeciwwskazanie do zastosowania tej techniki na dużą skalę.

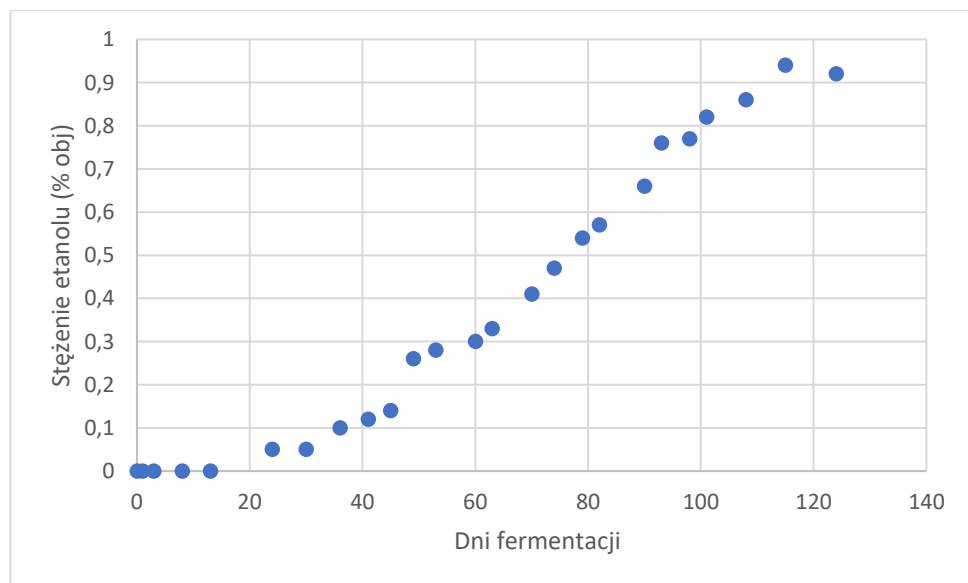
Dostępne źródła literaturowe wskazują, że w procesie zimnego kontaktu osiągnięto zawartość etanolu na poziomie 0,2 % obj. po 48 godzinach trwania procesu [288]. Niestety autorzy nie podali informacji odnośnie składu brzezki, przez co ciężko odnieść te wyniki do przeprowadzonego eksperymentu.

5.1.4 Fermentacja brzezki o zmniejszonej ilości cukrów fermentowalnych metodą zimnego kontaktu

Fermentację brzezki powstałej wskutek zmienionego zacierania fermentowano w temperaturze 3 °C przez 124 dni. Badany szczep drożdży przefermentował brzezkę redukując poziom cukrów z 8 +/- 0,2 °Brix do 2,7 +/- 0,2 °Brix (Rysunek 54) jednocześnie osiągając stężenie etanolu na poziomie 0,94 +/- 0,06 % obj. (Rysunek 55) Podczas fermentacji nie zaobserwowano zmian w goryczce, która wynosiła 9 +/- 1 IBU. Odfermentowanie wyniosło 66,2 %, zaś współczynnik wydajności produktu wyniósł 0,14 i był to najniższy wynik zaobserwowany w przeprowadzonych eksperymentach.



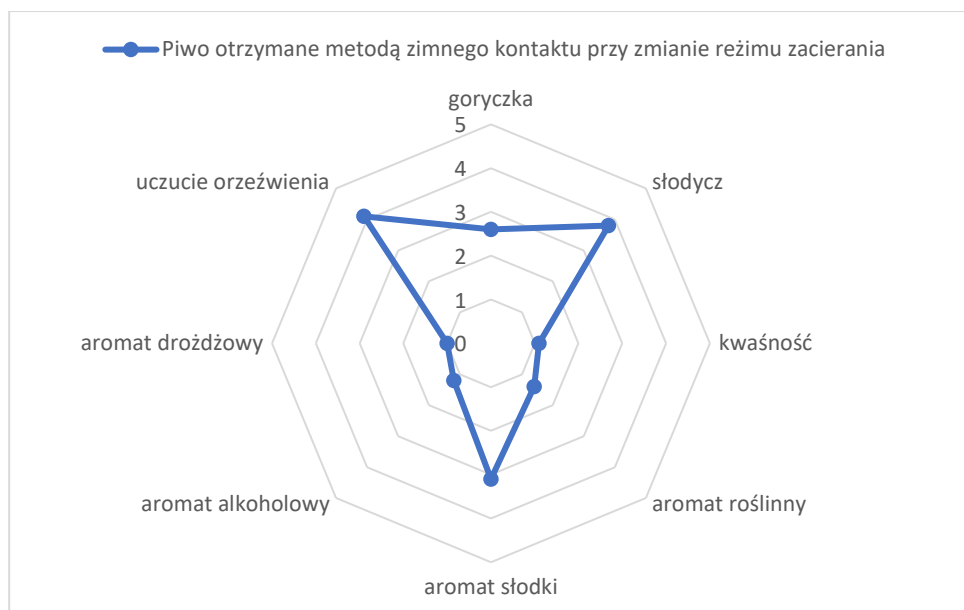
Rysunek 54 Wykres zmian stężenia cukrów w brzeczce powstałej wskutek zmienionego zacierania i fermentowanej metodą zimnego kontaktu



Rysunek 55 Wykres zmian stężenia etanolu w brzeczce powstałej wskutek zmienionego zacierania i fermentowanej metodą zimnego kontaktu

Piwo 79 dnia fermentacji przekroczyło stężenie etanolu dopuszczalne w piwach bezalkoholowych. W procesie uzyskano produkt, który może być uznany za piwo bezalkoholowe tylko w niektórych europejskich krajach.

Wyniki testów organoleptycznych pokazały, że otrzymane piwo było orzeźwiające mimo, słodkiego smaku i aromatu. Pozostałe aromaty były ledwo wyczuwalne.



Rysunek 56 Wyniki testów organoleptycznych dla piwa o obniżonej zawarości alkoholu uzyskanego za pomocą procesu zimnego kontaktu i przy zmienionym reżimie zacierania

Zoptymalizowana metoda pozwoliła na znaczną redukcję wytwarzanego etanolu przy zachowaniu zadowalających walorów smakowych. Niski współczynnik wydajności produktu pokazał, że w badanych warunkach tylko niewielka część cukrów jest metabolizowana w kierunku produkcji etanolu. Może to być spowodowane ukierunkowaniem drożdży na produkcję białek szoku termicznego wytwarzanych przy niskich temperaturach rzędu kilku stopni, zamiast enzymów pomocnych przy rozkładzie złożonych cukrów obecnych w brzeczce wskutek zmian w procesie zacierania [289]. Niestety czas produkcji jak i niska temperatura procesu powodują, że w warunkach przemysłowych badane rozwiązanie byłoby nierentowne.

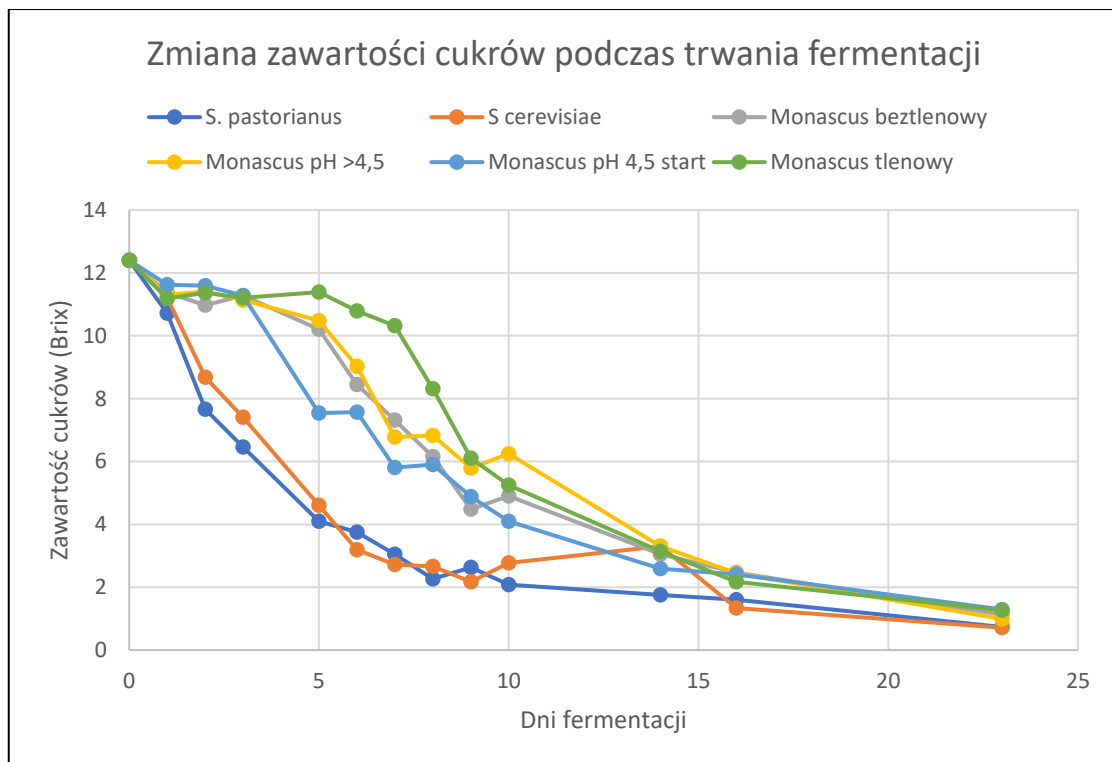
5.1.5 Fermentacja z wykorzystaniem szczepu *Monascus ruber*

Szczep *Monascus ruber* to gatunek pleśni wykorzystywany w kuchni azjatyckiej między innymi ze względu na wytwarzane barwniki. W produkcji piwa opisany szczep nie jest wykorzystywany lecz podobny szczep *Monascus purpureus* został wykorzystany w opisie patentowym dotyczącym produkcji piwa bezalkoholowego [290].

Fermentację w temperaturze pokojowej prowadzono przez 23 dni. Brzeczka na początku miała zawartość cukrów na poziomie $12,4 \pm 0,2$ °Brix. Jako punkt odniesienia wykorzystano komercyjne szczepy dolnej jak i górnej fermentacji: *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*. Grzyby *Monascus ruber* DSM 62748 w porównaniu do komercyjnych szczepów drożdży piwowskich wykazują dłuższą fazę zastoju niż szczepy referencyjne, o czym świadczą minimalne zmiany w stężeniu cukrów w pierwszych trzech dniach fermentacji. W przypadku próby fermentacyjnej badanego szczepu w warunkach tlenowych, fazę zastoju zaobserwowano aż do szóstego dnia testów. Warunki tlenowe powinny promować szybki metabolizm cukrów w medium hodowlanym, czego nie zaobserwowano w przeprowadzonym eksperymencie [291]. Podczas eksperymentu zaobserwowano zależność pomiędzy wartością pH medium, w którym znajdowały się grzyby *Monascus ruber*, a szybkością metabolizowania cukrów podczas fermentacji burzliwej. Próba, w której szczep miał na początku doprowadzone pH do

wartości równej 4,5 wykazywała większe nachylenie krzywej po fazie zastoju, w porównaniu do prób niedostosowanych początkowo do pH równego 4,5 .

Szczepy referencyjne, czyli komercyjne drożdże dolnej fermentacji *Saccharomyces pastorianus* (Mauribrew Lager Y497) wraz z drożdżami górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis SafAle™ WB-06) nie wykazały fazy zastoju. Wymienione szczepy wykazują największe nachylenie krzywej ubytku cukrów oraz najszybciej kończą proces fermentacji odfermentowując brzeczkę do poziomu 0,7 +/- 0,2 °Brix. Dodatkowo zauważono, że badany szczep w warunkach beztlenowych, jak i w warunkach beztlenowych z utrzymywaniem pH powyżej 4,5 fermentował brzeczkę w podobnym tempie (Rysunek 57).

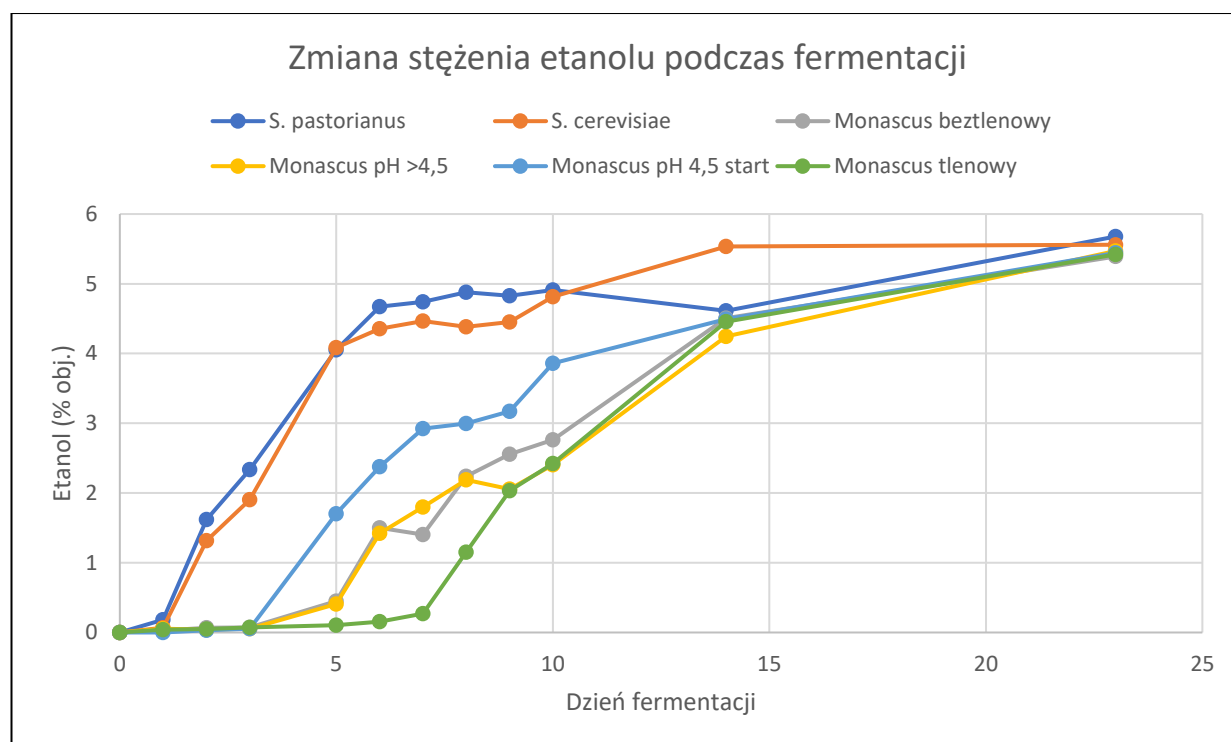


Rysunek 57. Zmiany zawartości cukrów w brzeczce podczas testów fermentacyjnych z wykorzystaniem szczepów *Monascus ruber*. *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* to szczepy referencyjne oznaczone skrótami S. *cerevisiae* i S. *pastorianus*. Szczep *Monascus ruber* badany był w warunkach tlenowych i beztlenowych. W warunkach beztlenowych przeprowadzono fermentację z pH ustawionym na 4,5 (oznaczenie pH 4,5 start) oraz z pH utrzymywanym stale powyżej wartości 4,5 (oznaczenie pH > 4,5).

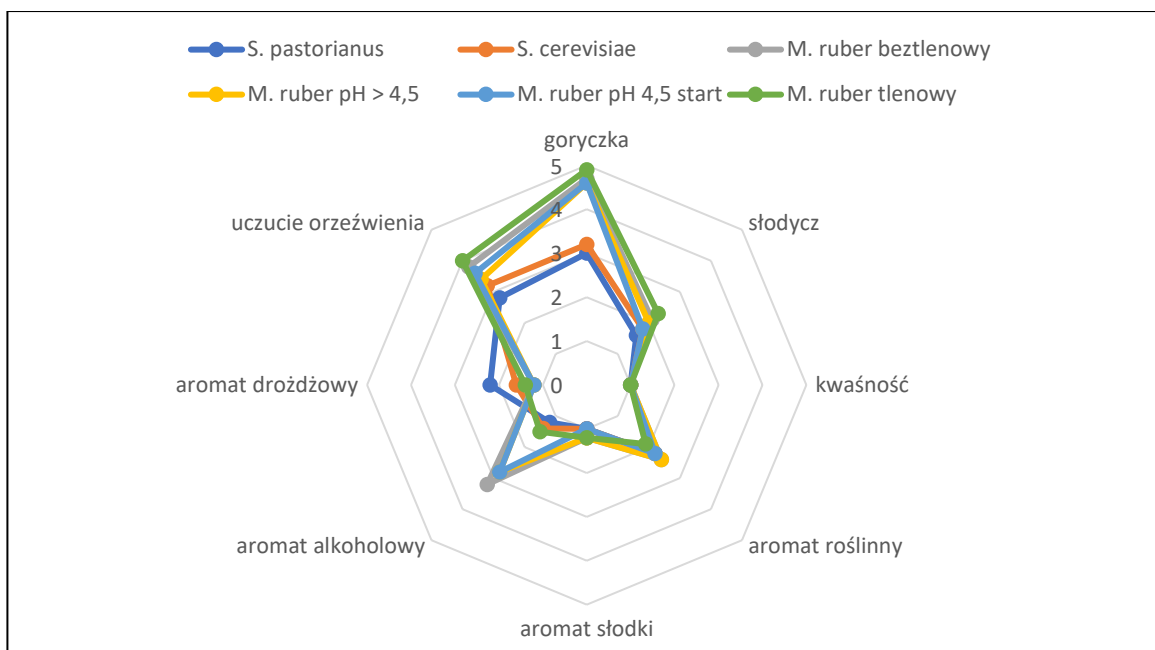
Podczas fermentacji wszystkie badane szczepy wytworzyły piwo o zawartości etanolu na poziomie 5,5% obj. Najszybciej fermentację etanolową przeprowadziły szczepy referencyjne. *Monascus ruber* z początkowo zmodyfikowanym pH również gwałtownie przeprowadził fermentację, co widać w dużym nachyleniu krzywej wzrostu stężenia etanolu od 3 do 7 dnia fermentacji. Szczepy w warunkach beztlenowych i w warunkach beztlenowych z podwyższonym pH fermentowały brzeczkę wolniej i piątego dnia fermentacji uzyskały stężenie etanolu na poziomie 0,40 +/- 0,06 % obj., co w przypadku zatrzymania fermentacji tego dnia pozwoliłoby uzyskać piwo bezalkoholowe (Rysunek 58). Hodowla

prowadzona w warunkach tlenowych siódmego dnia procesu osiągnęła stężenie etanolu na poziomie 0,27 +/-0,06% obj. Ósmego dnia stężenie alkoholu wyniosło 1,15 +/-0,06% obj. (Rysunek 58). co jest najwyższą wartością akceptowalną w niektórych krajach Unii Europejskiej.

Współczynniki wydajności produktu były bardzo zbliżone dla wszystkich eksperymentów. *Monascus ruber* w warunkach tlenowych, beztlenowych i po obniżeniu pH do 4,5 osiągnęły wartość współczynnika na poziomie 0,39, co było wartością taką samą jak ta uzyskana przez *Saccharomyces pastorianus*. Drugi organizm referencyjny, czyli *Saccharomyces cerevisiae* jak i badany szczep prowadzony w pH powyżej 4,5 osiągnęły nieznacznie niższe współczynniki wydajności produktu i wynosiły one 0,38.



Rysunek 58. Wykres zmian stężenia etanolu w trakcie fermentacji z wykorzystaniem szczepu *Monascus ruber*. *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* to szczepy referencyjne oznaczone skrótami *S. cerevisiae* i *S. pastorianus*. Szczep *Monascus ruber* badany był w warunkach tlenowych i beztlenowych. W warunkach beztlenowych przeprowadzono fermentacje z pH ustawionym na 4,5 (oznaczenie pH 4,5 start) oraz z pH utrzymywanym stale powyżej wartości 4,5 (oznaczenie pH > 4,5).



Rysunek 59. Wyniki testów organoleptycznych dla fermentacji przeprowadzonych z użyciem *Monascus ruber*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* to szczepy referencyjne oznaczone skrótami *S. cerevisiae* i *S. pastorianus*. Szczep *Monascus ruber* oznaczony skrótowo *M. ruber* badany był w warunkach tlenowych i beztlenowych. W warunkach beztlenowych przeprowadzono fermentację z pH ustawionym na 4,5 (oznaczenie *ph 4,5 start*) oraz z pH utrzymywanym stale powyżej wartości 4,5 (oznaczenie *pH > 4,5*).

Wyniki testów organoleptycznych pokazały, że wszystkie badane piwa miały aromat słodki jak i kwaśność na bardzo zbliżonym poziomie. Najbardziej zauważalną różnicą jest znacząco wyższa goryczka wyczuwalna w piwach fermentowanych przez szczep *Monascus ruber* bez względu na warunki procesu. Dodatkowo badany szczep w warunkach beztlenowych wytworzył wyczuwalne aromaty alkoholowe, które były wyższe niż w przypadku tego samego mikroorganizmu w warunkach tlenowych jak i próbach odniesienia w postaci *S. cerevisiae* oraz *S. pastorianus*. Kolejną poczynioną obserwacją jest wyższe uczucie orzeźwienia zgłaszane przez respondentów testujących produkt powstały z wykorzystaniem *Monascus ruber* (Rysunek 59).

Przesłanką do rozpoczęcia badań była informacja o wykorzystaniu szczepu *Monascus purpureus* do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu [232]. Niestety badany szczep *Monascus ruber* DSM 62748, mimo że należy do tej samej rodziny co raportowany szczep, nie okazał się dobrym kandydatem do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Jego wolniejszy niż w przypadku drożdży metabolizm może potencjalnie ułatwić produkcję piwa o obniżonej zawartości etanolu na drodze przerwanej fermentacji. Niewykluczone, że badany mikroorganizm okaże się dobrym kandydatem do produkcji funkcjonalnego piwa ze względu na prozdrowotne związki, do których produkcji jest zdolny [292], [293].

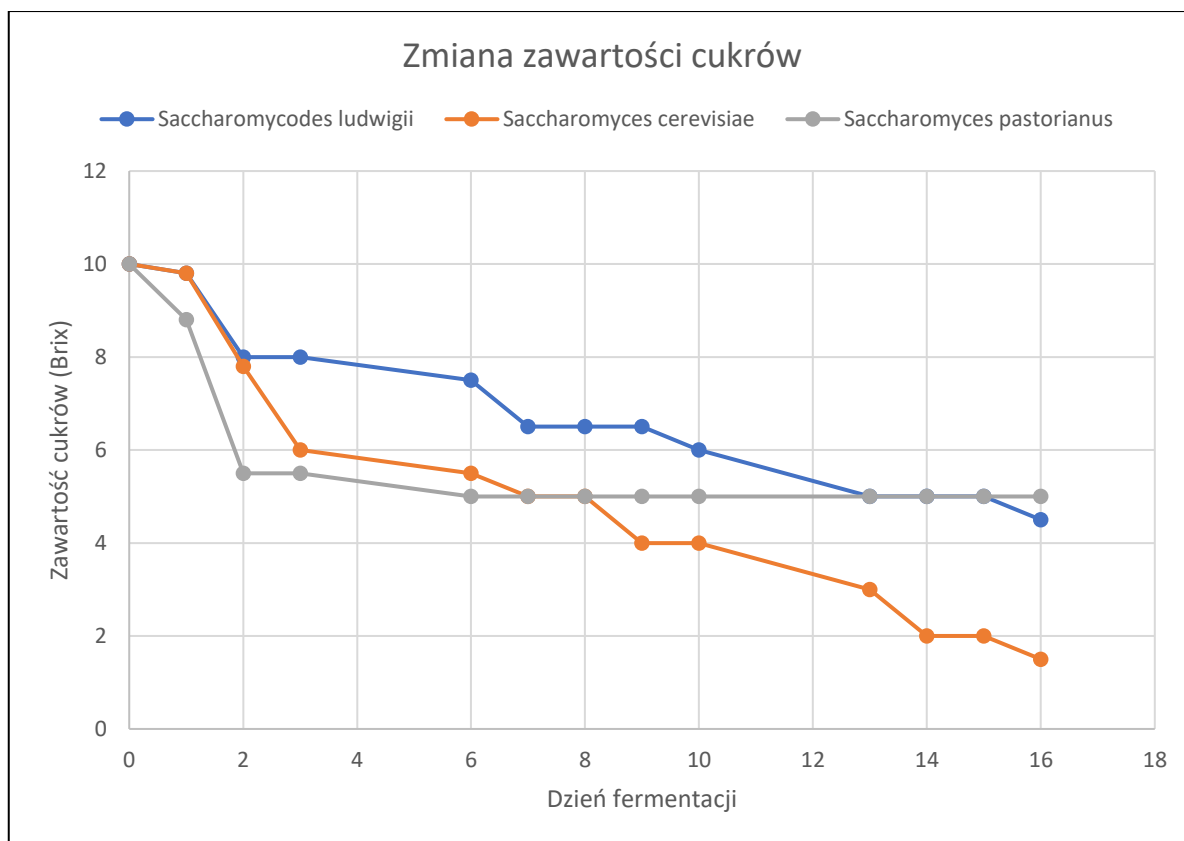
5.1.6 Fermentacja z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii*

Szczep *Saccharomyces ludwigii* został wybrany do eksperymentu ze względu na jego trudności z metabolizowaniem maltozy i maltotrioz, które są głównymi cukrami obecnymi w brzeczce [294].

Fermentację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 16 dni. Brzeczka przed zadaniem mikroorganizmów miała zawartość cukrów na poziomie 10,0 +/- 0,2 °Brix. Do badań użyto szczepu *Saccharomyces ludwigii* jako szczepu badanego oraz szczepów *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces pastorianus* w roli szczepów referencyjnych.

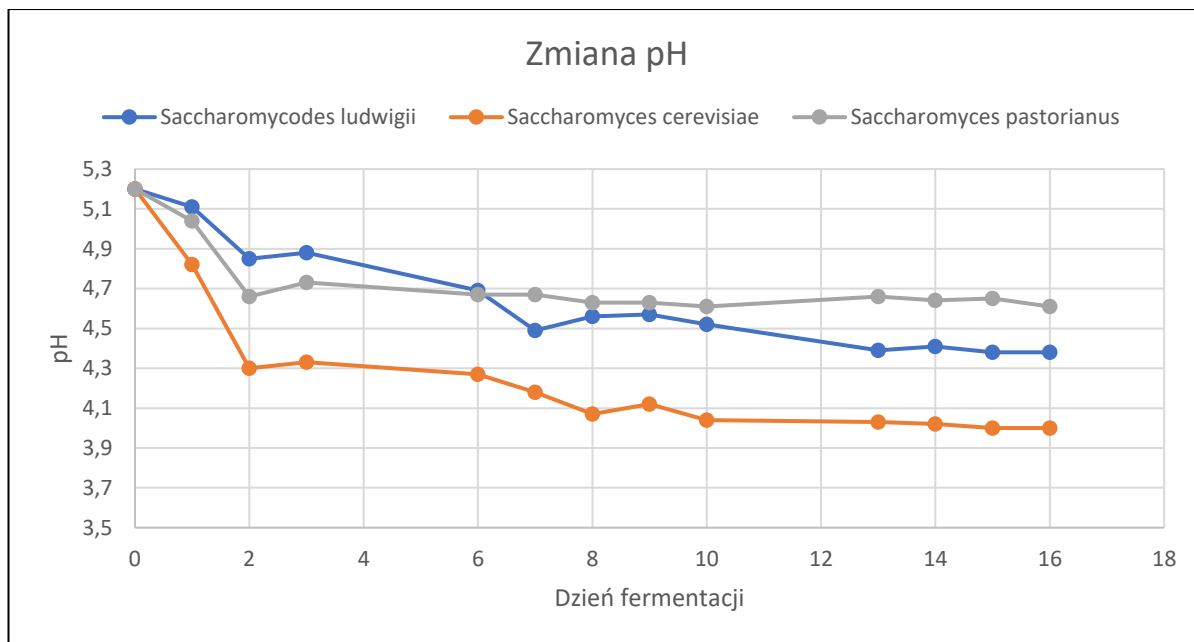
W pierwszych dwóch dniach fermentacji z wykorzystaniem *Saccharomyces ludwigii* widać gwałtowny spadek zawartości cukrów z poziomu 10,0 +/- 0,2 °Brix do 8,0 +/- 0,2 °Brix. Przez ten czas badany szczep najprawdopodobniej fermentował proste cukry takie jak glukoza i fruktoza. Następnie spadek poziomu cukrów jest powolny i trwa do 7 dnia fermentacji. Wtedy badany szczep metabolizował sacharozę obecną w brzeczce. Następnie można zauważyć fazę zastoju, po której następuje powolna redukcja cukrów do poziomu 4,5 +/- 0,2 °Brix. W tym czasie miał miejsce powolny metabolizm maltozy i maltotrioz, które badany szczep fermentuje ze znacznymi trudnościami [295].

Szczep *Saccharomyces cerevisiae* fermentował brzeczki gwałtownie do 3 dnia zmniejszając zawartość cukrów z 10 +/- 0,2 °Brix do 6 +/- 0,2 °Brix. Następnie w mniejszym tempie fermentował brzeczki do uzyskania ekstraktu na poziomie 1,5 +/- 0,2 °Brix 16 dnia fermentacji. Najciekawsze zjawisko zaobserwowano w przypadku *Saccharomyces pastorianus*, który już drugiego dnia fermentacji obniżył ekstrakt do 5,5 +/- 0,2 °Brix. Następnie do końca trwania eksperymentu poziom cukrów spadł nieznacznie do poziomu 5 +/- 0,2 °Brix (Rysunek 60).



Rysunek 60. Zmiana zawartości cukrów podczas fermentacji z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii*, jako szczepu odniesienia zastosowano *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*

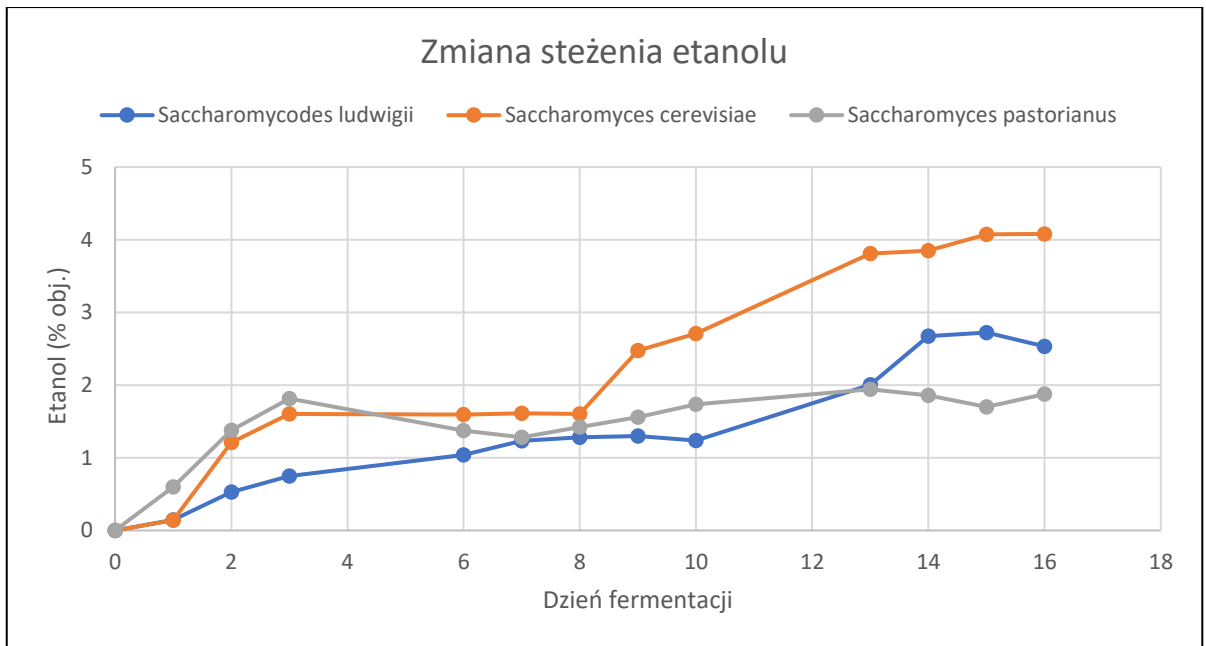
Podczas fermentacji w próbie badawczej jak i próbach odniesienia zaobserwowano największy spadek pH od początku do drugiego dnia fermentacji. Szczep *Saccharomyces ludwigii* osiągnął wtedy pH na poziomie 4,85. *Saccharomyces pastorianus* osiągnął wartość 4,66. Najmocniej pH fermentującej brzezki obniżył szczep *Saccharomyces cerevisiae* dochodząc do wartości 4,30. W kolejnych dniach zaobserwowano, że szczep *Saccharomyces pastorianus* utrzymywał pH na w miarę stałym poziomie aż do końca fermentacji. W przypadku pozostałych szczepów zaobserwowano delikatne obniżenie pH podczas kolejnych dni fermentacji. *Saccharomyces ludwigii* osiągnął wartość pH na poziomie 4,38 ostatniego dnia eksperymentu, zaś *Saccharomyces cerevisiae* obniżył pH do poziomu 4 (Rysunek 61).



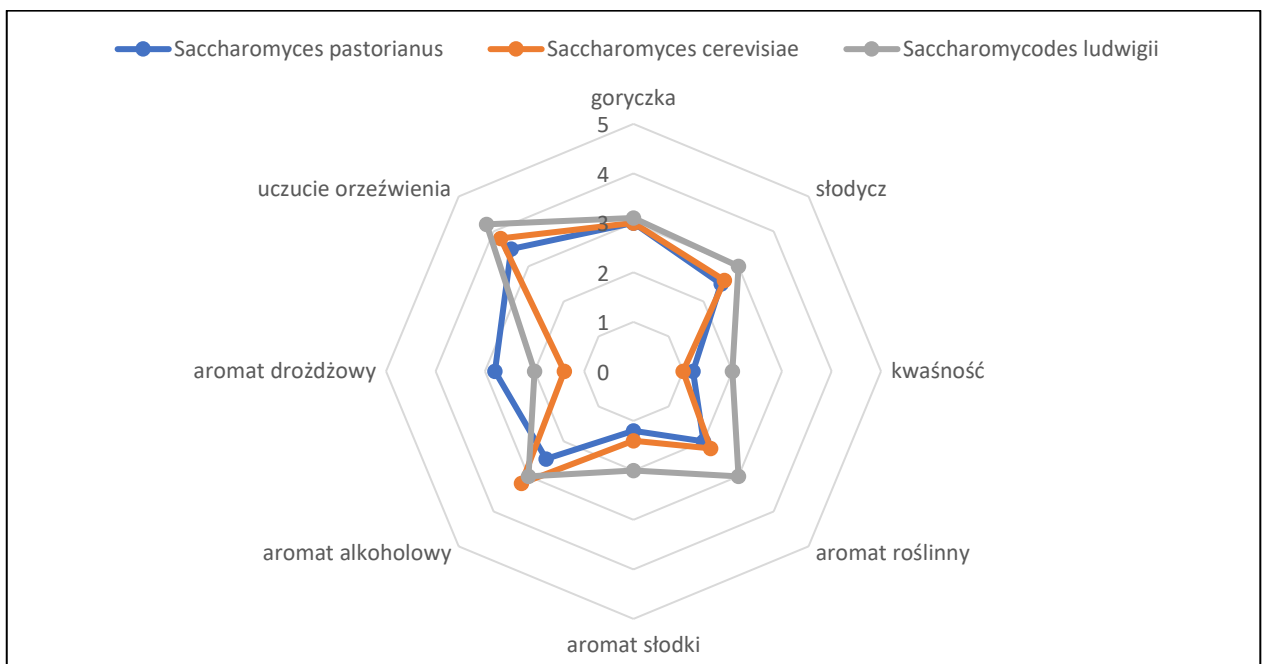
Rysunek 61. Zmiana wartości pH podczas fermentacji z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii*, jako szczepu odniesienia zastosowano *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*

Z punktu widzenia eksperymentu najważniejsza była zmiana w stężeniu alkoholu etylowego. Współczynniki wydajności produktu dla badanych szczepów wyniosły: dla *Saccharomyces ludwigii* 0,29, dla *Saccharomyces cerevisiae* 0,32 oraz dla *Saccharomyces pastorianus* również 0,32. Podane wartości oznaczają że *Saccharomyces ludwigii* produkuje etanol z mniejszą wydajnością niż *Saccharomyces cerevisiae*. Najmniejszy współczynnik wydajności produktu wykazał szczep *S. ludwigii*. Najwięcej etanolu wytworzył szczep *Saccharomyces cerevisiae*, który na drodze fermentacji wyprodukował 4,08 +/- 0,06 % obj. alkoholu. *Saccharomyces pastorianus* trzeciego dnia fermentacji osiągnął stężenie etanolu na poziomie 1,81 +/- 0,06 % obj. a następnie utrzymywał tę wartość do końca trwania eksperymentu. *Saccharomyces ludwigii* do ostatniego dnia fermentacji wytworzył 2,53 +/- 0,06 % obj. alkoholu. Mimo, że jest to ilość za duża aby piwo można było nazwać bezalkoholowym, to w porównaniu do referencyjnych drożdży górnej fermentacji można otrzymany produkt nazwać piwem o obniżonej zawartości alkoholu.

Kolejnym ważnym czynnikiem powodującym, że *Saccharomyces ludwigii* nadaje się do produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu jest wolniejszy niż w przypadku prób odniesienia przyrost poziomu etanolu. Daje to lepszą możliwość kontrolowania procesu fermentacji i ewentualnego jej przerwania w celu otrzymania piwa bezalkoholowego. W przypadku szczepu *Saccharomyces ludwigii* poziom piwa bezalkoholowego, czyli takiego o zawartości etanolu na poziomie nie większym niż 0,5 % obj., udało się osiągnąć drugiego dnia, kiedy fermentująca brzeczka miała 0,51 +/- 0,06 % obj. etanolu oraz poziom cukrów na poziomie 8 +/- 0,2 °Brix. Piątego dnia osiągnięto najwyższe stężenie etanolu uznawane w niektórych krajach Unii Europejskiej, czyli 1,2 % obj. Wtedy piwo miało stężenie etanolu na poziomie 1,23 +/- 0,06 % obj. oraz poziom ekstraktu 6,5 +/- 0,2 °Brix (Rysunek 62).



Rysunek 62. Zmiana stężenia etanolu podczas fermentacji z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii* jako szczepu odniesienia zastosowano *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*



Rysunek 63. Wyniki testów organoleptycznych dla piwa uzyskanego z wykorzystaniem szczepu *Saccharomyces ludwigii* jako szczepu odniesienia zastosowano *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Saccharomyces pastorianus*

Testy organoleptyczne pokazały, że drożdże *Saccharomyces ludwigii* wyprodukowały piwo o porównywalnej goryczce i aromacie alkoholowym do szczepów kontrolnych. Niemniej zaobserwowano, że badany szczep wytworzył więcej substancji odpowiadających za uczucie

kwaśności oraz aromaty słodkie i roślinne. Uczucie orzeźwienia w próbie badawczej było najwyższe spośród użytych mikroorganizmów (Rysunek 63).

Eksperyment został wykonany w celu zbadania szczepu *Saccharomyces ludwigii* jako organizmu do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. W tym celu wyprodukowano niemal klasyczną brzecznię piwną ze zmienionym reżimem zacierania w celu ograniczenia zawartości maltozy w roztworze. Badany szczep sprawdził się dobrze w roli mikroorganizmu do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Dzięki powolnemu wytwarzaniu etanolu można stosunkowo łatwo wybrać moment, w którym przerwać fermentację w celu otrzymania piwa bezalkoholowego lub niskoalkoholowego.

5.1.7 Kofermentacja z wykorzystaniem szczepów *Saccharomyces cerevisiae* i *Lactobacillus brevis*

Celem eksperymentu było stworzenie warunków konkurencji między dwoma szczepami *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Lactobacillus brevis*. Drożdże produkują etanol na drodze fermentacji alkoholowej, natomiast bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają kwas mlekowy jako swój główny metabolit. W wyniku obecności dwóch mikroorganizmów, konkurujących o cukry zawarte w brzeczce, można spodziewać się, że część cukrów zostanie przekształcona w kwas mlekowy zamiast w etanol, dzięki czemu gotowy produkt będzie miał mniejsze stężenie etanolu niż piwo powstałe wskutek fermentacji prowadzonej przez *Saccharomyces cerevisiae*.

Po trzynastu dniach fermentacji, kiedy nie obserwowano już zmian w poziomie ekstraktu pobrano próbki i zmierzono w nich zawartość cukrów, pH, zawartość etanolu oraz stężenie kwasu mlekowego. Najniższe stężenie etanolu zaobserwowano w próbie kontrolnej zawierającej tylko bakterie *Lactobacillus brevis*, gdzie wartość ta wynosiła 0,16% obj. (Tabela 18) Wartość ta pozwala na nazwanie napoju bezalkoholowym lecz brak drożdży dyskwalifikuje otrzymany napój jako piwo. Z wykorzystaniem kofermentacji najmniej etanolu osiągnięto w próbie nr 1 czyli dla zawartości cukrów 6 °Brix, goryczki 10 IBU oraz przy równoczesnym zaszczepieniu obydwu mikroorganizmów (Tabela 14). W omawianym przypadku zawartość etanolu wyniosła 2,37% obj. co nie jest wartością wystarczającą aby nazwać piwo bezalkoholowym, niemniej jest to produkt o obniżonej zawartości alkoholu w stosunku do tradycyjnych piw. Najniższy stopień odfermentowania wynoszący 10,3% uzyskano dla fermentacji kontrolnej prowadzonej przez szczep *L. brevis*. Może to wskazywać na stymulujący wpływ drożdży na bakterie fermentacji mlekowej, prawdopodobnie kluczowy wpływ mają tutaj egzoenzymy wydzielane przez drożdże, które rozkładają dwucukry w monosacharydy [92]. W próbach badawczych najniższy stopień odfermentowania zaobserwowano w próbie 3 i 7 gdzie stopień odfermentowania wyniósł 68,7%.

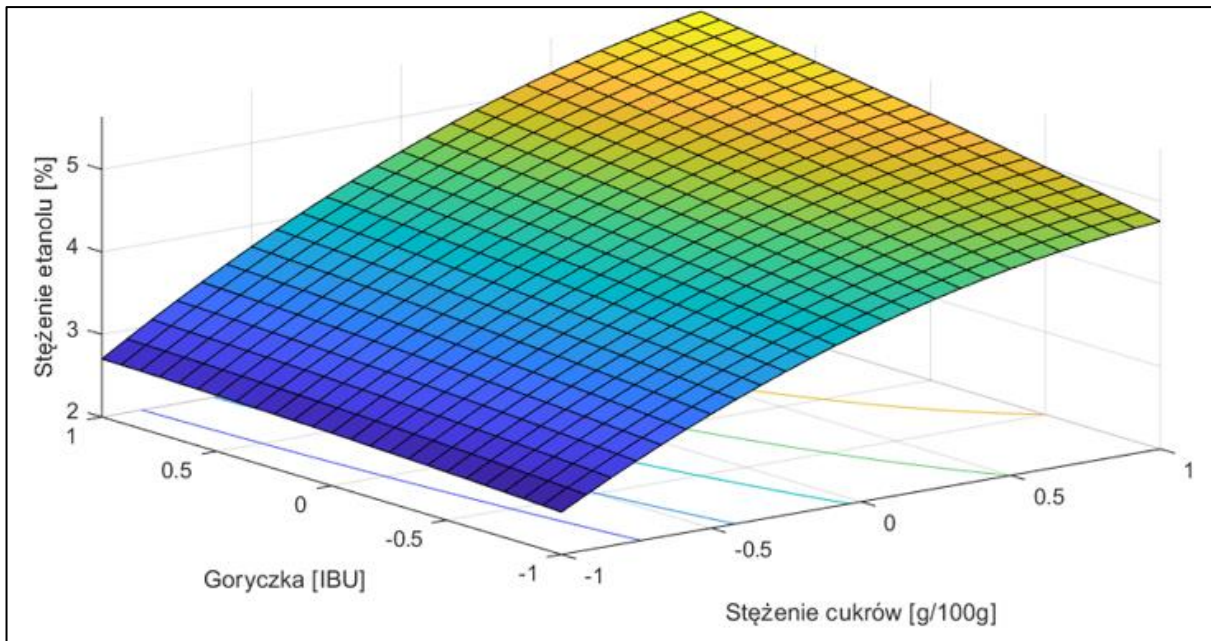
Współczynniki wydajności produktu różniły się w zależności od warunków eksperymentu. Najniższą wartość wynoszącą 0,16 zaobserwowano dla próby kontrolnej ze szczepem *L. brevis*. W przypadku prób badawczych najniższy współczynnik wydajności produktu wynoszący 0,37 odnotowano dla próby nr 7, czyli przy początkowym stężeniu cukrów 14 Brix, goryczce 30 IBU oraz zaszczepieniu drożdży 3 dni po bakteriach kwasu mlekowego. Natomiast najwyższy współczynnik wydajności produktu wynoszący 0,61 odnotowano w próbce o początkowym stężeniu cukrów wynoszącym 6 °Brix, goryczce na poziomie 30 IBU oraz przy zaszczepieniu drożdży 3 dni po bakteriach fermentacji mlekowej (Tabela 18).

Tabela 18. Wyniki testów kofermentacji *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Lactobacillus brevis*

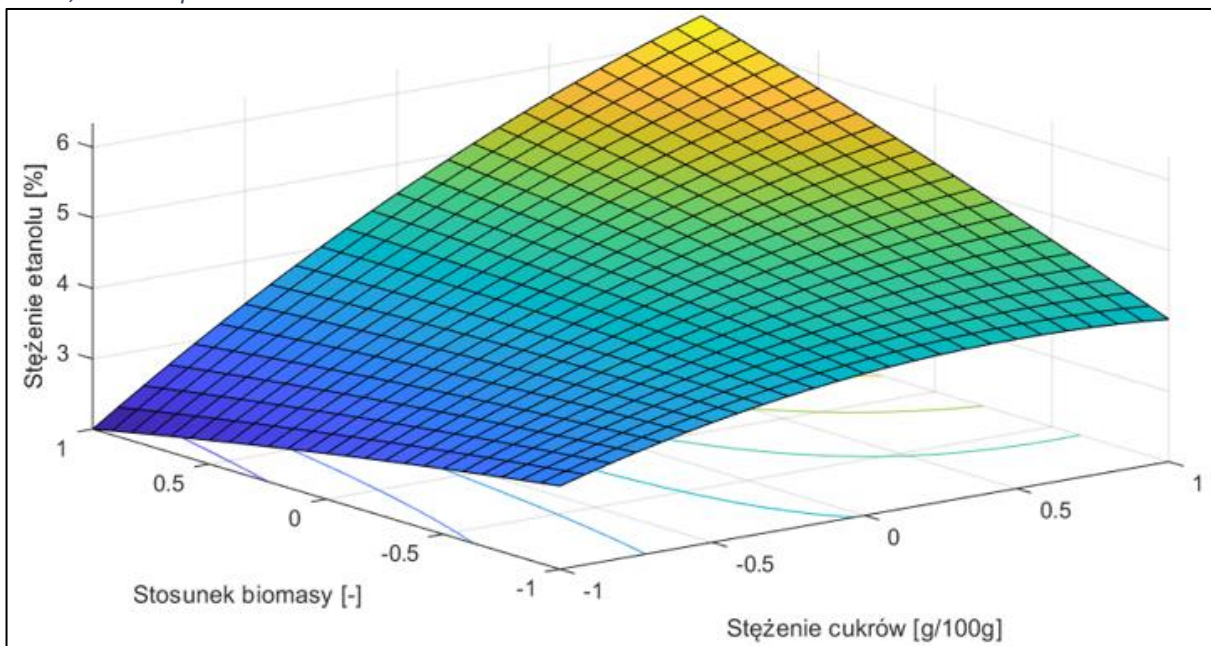
Nr próby	Ekstrakt [°Brix]	Kwas mlekowy [g/L]	pH	Etanol [% obj]	Odfermentowanie (%)	Współczynnik wydajności produktu
1	1,29	3,07	3,64	2,37 +/- 0,06	78,6	0,50
2	0,62	0,81	4,55	2,56 +/- 0,06	89,7	0,48
3	4,38	10,25	3,41	4,94 +/- 0,06	68,7	0,51
4	2,99	4,28	3,94	5,83 +/- 0,06	78,6	0,53
5	0,93	1,77	4,01	3,07 +/- 0,06	84,6	0,61
6	0,67	1,05	4,36	2,49 +/- 0,06	88,8	0,47
7	4,38	3,49	3,73	3,57 +/- 0,06	68,7	0,37
8	2,69	3,81	4,32	6,49 +/- 0,06	80,8	0,57
9	2,38	5,42	3,50	3,96 +/- 0,06	76,2	0,52
10	1,44	3,81	3,76	4,07 +/- 0,06	85,6	0,48
11	1,44	3,14	3,91	4,64 +/- 0,06	85,6	0,54
12	1,69	1,69	4,45	4,46 +/- 0,06	83,1	0,54
13	2,05	3,56	3,84	4,38 +/- 0,06	79,5	0,55
14 (kontr. <i>L.brevis</i>)	8,97	2,61	4,44	0,16 +/- 0,06	10,3	0,16
15 (kontr. <i>S.cerevisiae</i>)	1,82	1,80	4,32	4,30 +/- 0,06	81,8	0,53

Otrzymane wyniki zostały zoptymalizowane z wykorzystaniem metody Boxa Benkhena przy użyciu programu Matlab (skrypt programu zamieszczono w materiałach dodatkowych). W wyniku optymalizacji otrzymano macierz odpowiedzi, która informuje w jakich warunkach w procesie powstanie najwięcej etanolu, a w jakich najmniej.

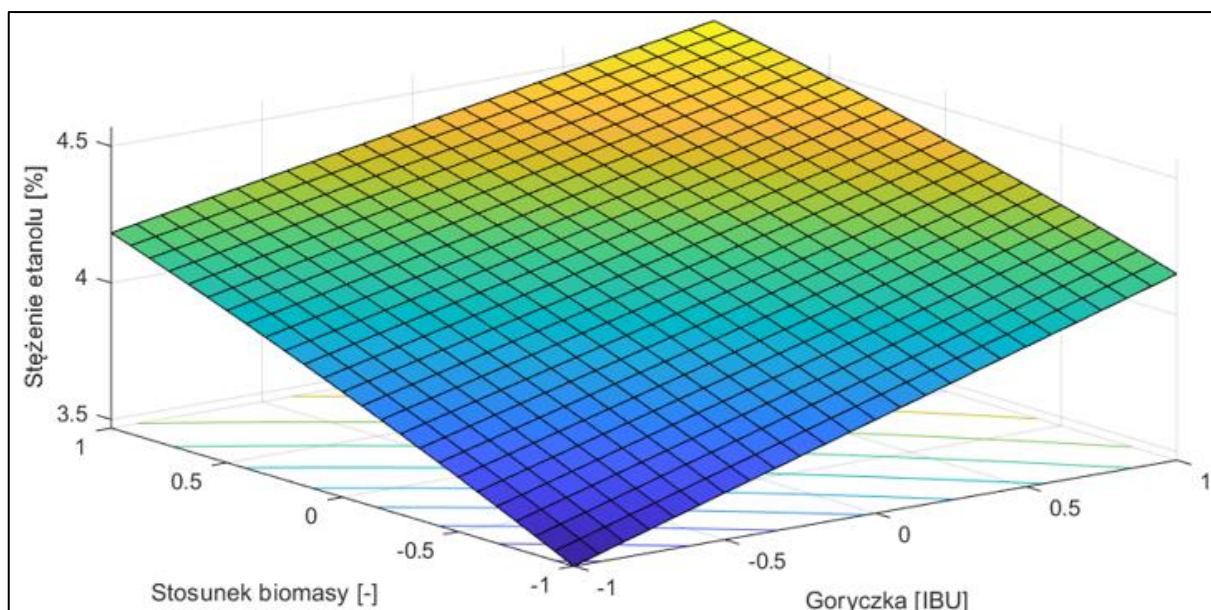
Najwięcej etanolu powstanie przy zawartości cukrów na poziomie 14 Brix, goryczce wynoszącej 40 IBU oraz bakterii kwasu mlekowego dodanych z trzydniowym opóźnieniem. Wtedy poziom etanolu powinien wynieść 6,68% obj. Najmniej etanolu według symulacji powinno powstać przy zawartości cukrów na poziomie 6 Brix, goryczce na poziomie 10 IBU oraz przy trzydniowym opóźnieniu w dodaniu *L. brevis* do *S. cerevisiae*. W tych warunkach przewidywane stężenie etanolu wynosi 1,97% obj. (Rysunek 64, Rysunek 65, Rysunek 66)



Rysunek 64. Płaszczyzna odpowiedzi dla zależności w produkcji etanolu dla goryczki i stężenia cukrów. Goryczka -1 odpowiada 10 IBU, zaś 1 odpowiada 30 IBU. Stężenie cukrów -1 odpowiada 6 Brix, zaś 1 odpowiada 14 Brix



Rysunek 65. Płaszczyzna odpowiedzi dla zależności w produkcji etanolu dla stosunku biomasy i stężenia cukrów. Stosunek biomasy -1 odpowiada 3 dniowemu opóźnieniu w dodaniu drożdży zaś 1 odpowiada 3 dniowemu opóźnieniu w dodaniu bakterii kwasu mlekowego. Stężenie cukrów -1 odpowiada 6 Brix, zaś 1 odpowiada 14 Brix



Rysunek 66. Płaszczyzna odpowiedzi dla zależności w produkcji etanolu dla goryczki i stosunku biomasy. Stosunek biomasy -1 odpowiada 3 dniowemu opóźnieniu w dodaniu drożdży zaś 1 odpowiada 3 dniowemu opóźnieniu w dodaniu bakterii kwasu mlekowego. Goryczka na poziomie -1 odpowiada 10 IBU, zaś 1 odpowiada 30 IBU.

5.1.8 Produkcja niefermentowanego substytutu piwa

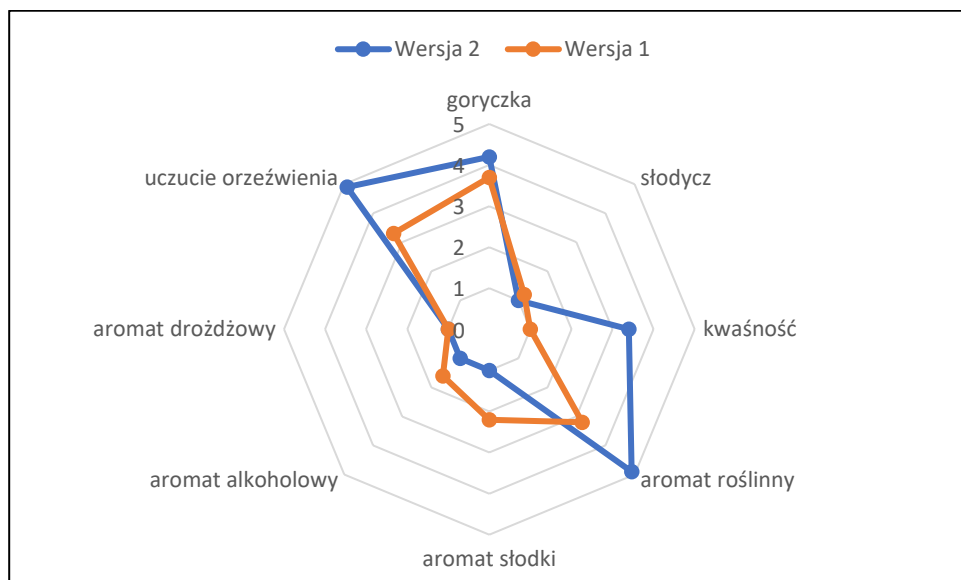
Wyprodukowane substytuty piwa poddano analizie podobnej jak w przypadku piwa. Wyniki badanych parametrów zestawiono w poniższej tabeli (Tabela 19), gdzie wersja 1 to napój wytworzony z dodatkiem ciemnego słodu w celu nadania ciemniejszej barwy, zaś wersja 2 to napój wzbogacony o mięć i kwas cytrynowy w celu poprawy walorów smakowych.

Tabela 19. Wyniki analiz niefermentowanych substytutów piwa

Wersja	gęstość [g/cm ³]	pH	Barwa [EBC]	Goryczka [IBU]	Polifenole [mg/g]	α-kwasy [mg/dm ³]	izo-α-kwasy [mg/dm ³]	Etanol [% obj.]
1	1,0020	5,71	27 +/-1	7 +/-1	0,0110	1,6	7,1	0
2	1,0018	2,66	3 +/-1	9 +/-1	0,0165	2,4	8,2	0

Wykonane analizy pokazują, że obydwa napoje nie zawierają etanolu nawet w ilościach śladowych, przez co spełniają wymogi napoju bezalkoholowego. Gęstość badanych trunków jest nieznacznie wyższa od gęstości wody, co może być spowodowane związkami, które udało się wyługować z chmielu, słodu i mięty. Dodatek ciemnego słodu w pierwszej wersji napoju spowodował otrzymanie produktu o ciemnej barwie odpowiadającej niektórym ciemnym piwom takim jak ciemny lager [197]. Goryczka otrzymanych napojów jest niewielka, gdyż w obydwu przypadkach jest mniejsza od 10, niemniej biorąc pod uwagę brak cukrów, tradycyjnie dostarczanych do piwa przez sód, rzeczywiste odczucie goryczy było znacznie bardziej intensywne. Zawartość α-kwasów na poziomie 1,6 mg/dm³ dla napoju w wersji 1 oraz 2,4 1,6 mg/dm³ dla napoju w wersji drugiej odpowiadała za wyraźny chmielowy aromat, szczególnie mocno wyczuwalny w świeżym napoju. pH obydwu napojów różniło się znacznie, przede wszystkim za sprawą kwasu cytrynowego użytego do produkcji napoju w wersji 2. Kwas cytrynowy

znacząco poprawił właściwości orzeźwiającego otrzymanego napoju jak i pomógł zredukować odczucie goryczy. Zawartość polifenoli w obydwu produktach była na podobnym poziomie.



Rysunek 67. Wyniki testów organoleptycznych badanych niefermentowanych substytutów piwa

Testy organoleptyczne wykazały, że substytut w wersji 1 miał bardziej wyczuwalny aromat słodki jak i alkoholowy. Może to wynikać z użytego ciemnego słoju, który wprowadził charakterystyczny palony aromat przez niektórych testerów określany jako zapach whisky. Substytut w wersji 2 wykazywał dużo większy poziom aromatu roślinnego jak i uczucia orzeźwienia. Może to wynikać z braku słoju jak i dodatku mięty i kwasu cytrynowego do napoju (Rysunek 67)

Niestety ze względu na brak przeprowadzonej fermentacji nie można otrzymanych napojów, zgodnie z definicją, nazwać piwem. Obecnie na polskim rynku można znaleźć kilka napojów produkowanych w podobny sposób [296], [297]. Autorowi tej pracy nie udało się znaleźć żadnej analizy tego typu trunków, przez co ta część badań ma charakter pionierski.

5.2 Procesy separacji etanolu z piwa

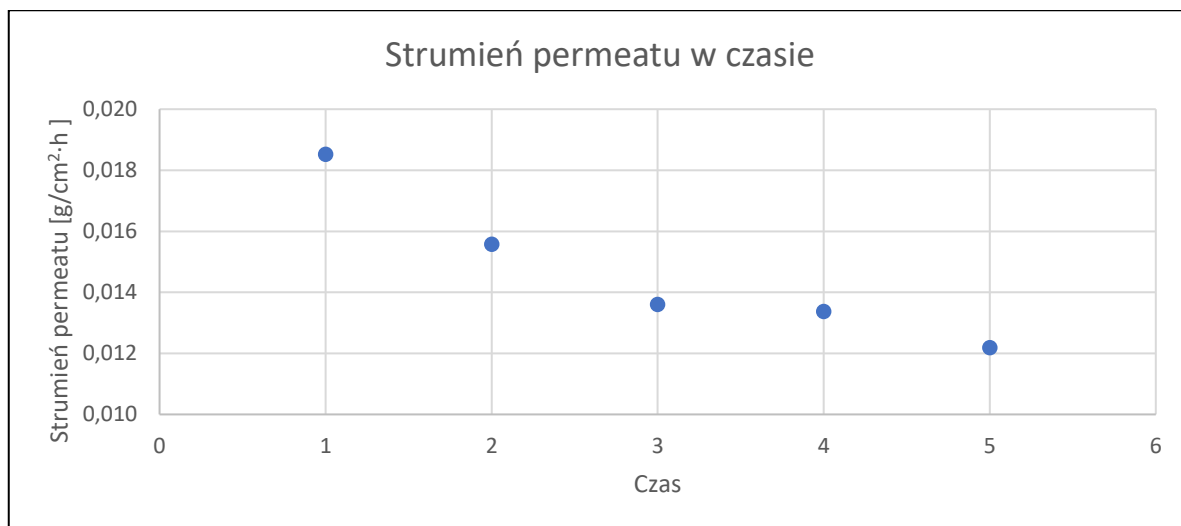
Jednym z badanych sposobów produkcji piwa bezalkoholowego była separacja etanolu z piwa. W tym celu posłużono się metodą membranową w postaci perwaporacji oraz metodami termicznymi w postaci destylacji czy rektyfikacji.

5.2.1 Perwaporacja

Perwaporacja to proces separacji opierający się na separacji membranowej składników lotnych mieszaniny, których pary są w stanie przechodzić przez membranę. W badanym przypadku celem

była separacja etanolu z wodnego roztworu jakim jest piwo. Membranę perwap 4510 wybrano z tego względu gdyż jest to membrana używana do separacji alkoholi i wody [298].

Proces perwaporacji prowadzono w trybie okresowym monitorując natężenie przepływu permeatu. Wartość gęstości strumienia permeatu wahała się w przedziale 0,019 g/cm²·h na początku procesu do 0,012 g/cm²·h na końcu procesu (Rysunek 68)



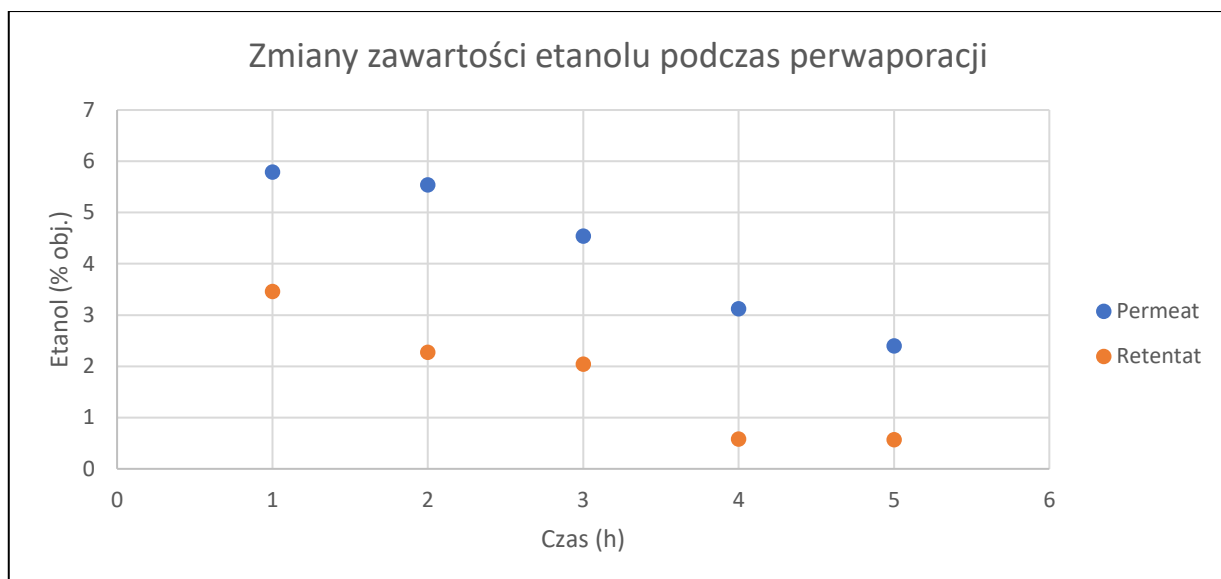
Rysunek 68. Wykres gęstości strumienia permeatu w czasie podczas prowadzonej perwaporacji okresowej z wykorzystaniem membrany Pervap 4510 w temp 50 °C i pod ciśnieniem 40 mbar.

Próbki permeatu jak i retentatu zbierano co godzinę i monitorowano w nich zawartość etanolu, barwę oraz stężenie kwasu ferulowego będącego jednym z antyoksydantów występujących w piwie [189], 4-winylogwajakolu będącego pochodną kwasu ferulowego [287] oraz maltolu, który jest związkiem wzmacniającym smak piwa oraz posiadającym liczne właściwości prozdrowotne [194], [195]. Wyniki pomiarów zestawiono w poniższej tabeli (Tabela 20)

Tabela 20. Zmiany badanych parametrów piwa w permeacie i retentacie w trakcie trwania perwaporacji okresowej z wykorzystaniem membrany Pervap 4510 w temp 50 °C i pod ciśnieniem 40 mbar z uwzględnieniem współczynnika rozdziálu etanol-woda β .

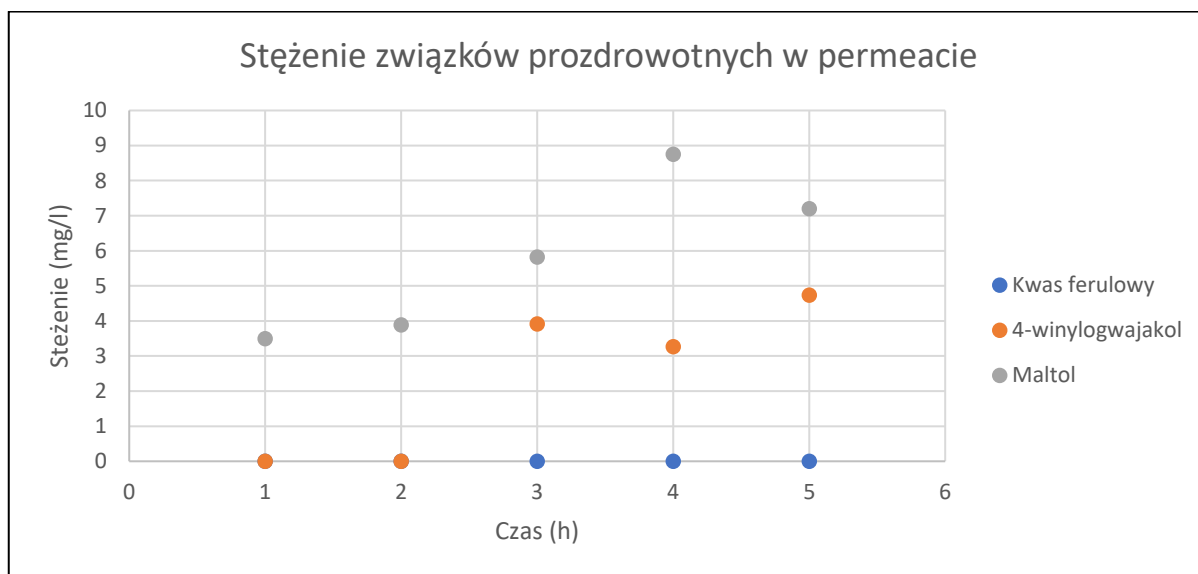
	Czas procesu [h]	Objętość frakcji [cm ³]	Kwas ferulowy [mg/dm ³]	4-winylogwajakol [mg/ dm ³]	alkohol [% obj.]	Barwa [EBC]	maltol [mg/ dm ³]	β
Permeat	1	15,0	0,0 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	5,79 +/-0,06	0 +/-1	3,5 +/-0,5	0,59
	2	10,0	0,0 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	5,54 +/-0,06	0 +/-1	3,9 +/-0,5	0,62
	3	7,5	0,0 +/- 0,5	3,9 +/- 0,5	4,54 +/-0,06	0 +/-1	5,8 +/-0,5	0,76
	4	10,0	0,0 +/- 0,5	3,3 +/- 0,5	3,12 +/-0,06	0 +/-1	8,8 +/-0,5	1,13
	5	12,0	0,0 +/- 0,5	4,7 +/- 0,5	2,40 +/-0,06	0 +/-1	7,2 +/-0,5	1,47
Retentat	1	10,0	7,7 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	3,46 +/-0,06	7 +/-1	23,2 +/-0,5	
	2	10,0	7,5 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	2,27 +/-0,06	6 +/-1	21,0 +/-0,5	
	3	10,0	8,0 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	2,04 +/-0,06	6 +/-1	25,6 +/-0,5	
	4	10,0	8,5 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	0,58 +/-0,06	7 +/-1	35,4 +/-0,5	
	5	10,0	9,1 +/- 0,5	0,0 +/- 0,5	0,57 +/-0,06	6 +/-1	38,0 +/-0,5	
Nadawa			11,5 +/- 0,5	18,3 +/- 0,5	3,50 +/-0,06	7 +/-1	22,0 +/-0,5	

Badania pokazały, że na drodze perwaporacji można otrzymać piwo o obniżonej zawartości alkoholu. W przeprowadzonym eksperymencie udało się obniżyć zawartość etanolu z 3,53 % obj. do 0,57 % obj. co jest na granicy wartości dopuszczalnej przez polskie prawodawstwo. W danych literaturowych można znaleźć informacje o obniżeniu zawartości etanolu w piwie z 4,60 % obj. do 0,60 % obj. [223], co jest wynikiem porównywalnym z tym otrzymanym w wykonanym eksperymencie. Współczynnik rozdziálu udało się osiągnąć na poziomie 1,47 po 5 godzinach prowadzenia eksperymentu (Rysunek 69).



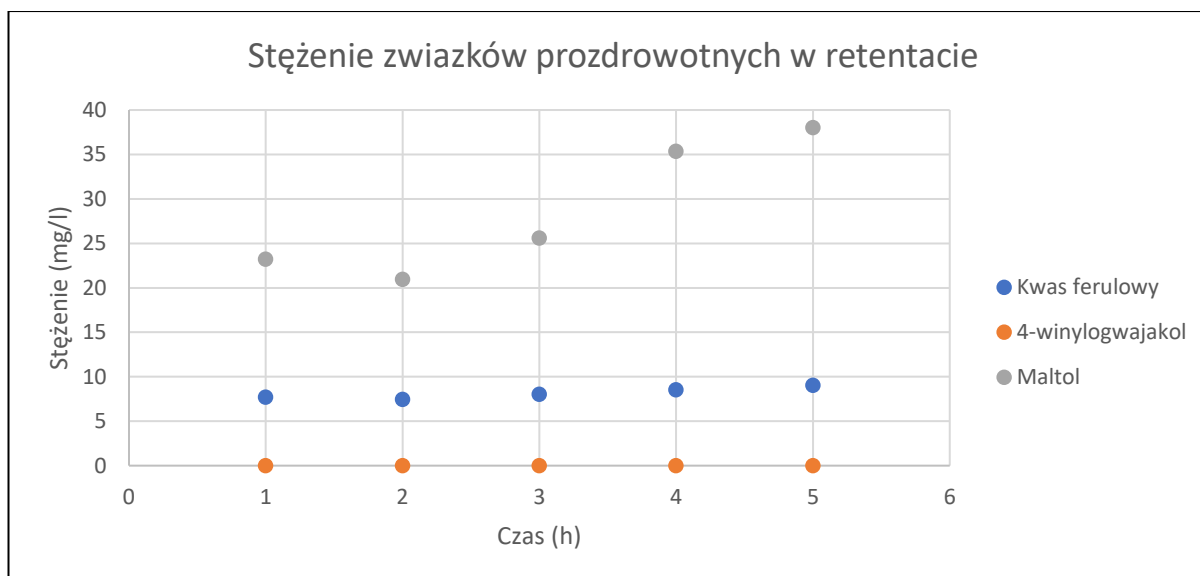
Rysunek 69. Wykres zawartości etanolu w permeacie i retentacie podczas perwaporacji okresowej z wykorzystaniem membrany Pervap 4510 w temp 50 °C i pod ciśnieniem 40 mbar.

Według analizy wyników eksperymentu związki odpowiadające za barwę piwa pozostają w retentacie (Tabela 20). Ponadto kwas ferulowy był zatrzymywany przez membranę i wskutek zatężenia retentatu jego stężenie w dealkoholizowanym piwie nieznacznie wzrastało, natomiast jego pochodna, 4-winylogwajakol dyfundował przez membranę i był obecny w permeacie (Rysunek 70, Rysunek 71).



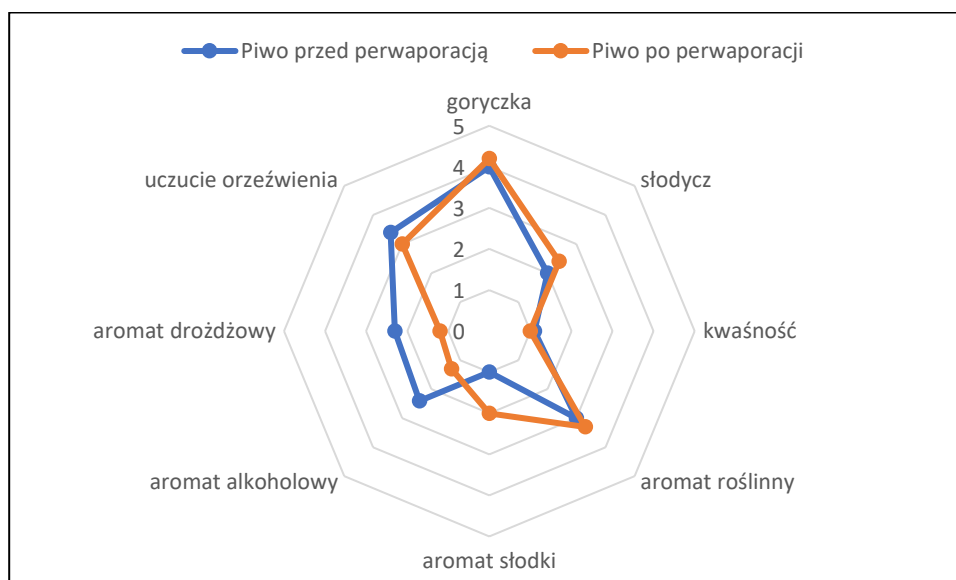
Rysunek 70. Wykres stężenia kwasu ferulowego, 4-winylogwajakolu oraz maltolu w permeacie podczas perwaporacji okresowej z wykorzystaniem membrany Pervap 4510 w temp 50 °C i pod ciśnieniem 40 mbar.

Maltol w toku perwaporacji ulegał zatężeniu po stronie retentatu, niemniej nieznaczne jego ilości przechodziły przez membranę i związek ten był w niewielkich stężeniach wykrywany również w permeacie.



Rysunek 71. Wykres stężenia kwasu ferulowego, 4-winylogwajakolu oraz maltolu w retentacie podczas perwaporacji okresowej z wykorzystaniem membrany Pervap 4510 w temp 50 °C i pod ciśnieniem 40 mbar.

Nieduża ilość danych literaturowych utrudnia porównanie otrzymanych wyników separacji membranowej związków prozdrowotnych z danymi uzyskanymi przez innych badaczy. Dotychczas di Matteo i wsp. dokonali dealkoholizacji piwa metodą perwaporacji. W omawianym eksperymencie proces separacji trwał 7 godzin, zaś temperatura procesu wynosiła 35 °C pod ciśnieniem 25 mbar. Podczas badań użyto membrany pervap 4060, co pozwoliło na zmniejszenie stężenia etanolu z 7,71% obj. do 1,11% obj. Barwa pozostała na tym samym poziomie, zaś stężenie kwasu ferulowego zmalało podczas separacji z 2,12 mg/dm³ do 1,77 mg/dm³ [299]. Niestety dotychczas nie natrafiono na publikację, która opisuje zmiany stężenia maltolu w procesie perwaporacji.



Rysunek 72. Wykres przedstawiający porównanie właściwości organoleptycznych piwa przed oraz po perwaporacji

Wykonany eksperyment pokazał, że za pomocą perwaporacji możliwe jest otrzymanie piwa niskoalkoholowego o zwiększonym stężeniu maltolu i kwasu ferulowego w stosunku do surowca.

Dzięki temu z piwa usuwana jest jedyna toksyna w postaci etanolu, zaś substancje prozdrowotne ulegają zatężeniu co dodatnio wpływa na wartości odżywcze otrzymanego produktu. Wyniki testów organoleptycznych wykazały, że parametry piwa poddanego omawianemu procesowi separacji nie ulegają znaczącemu pogorszeniu, a nawet można zauważyć spadek aromatu drożdżowego, który jest niemile widziany w piwie (Rysunek 72. Wykres przedstawiający porównanie właściwości organoleptycznych piwa przed oraz po perwaporacji Rysunek 72). Niestety wyznaczona gęstość strumienia permeatu wskazuje na fakt, że proces perwaporacji jest długotrwały i w przypadku zastosowania przemysłowego konieczne musiałyby być rozbudowanie powierzchni separacji lub ewentualnie opracowanie nowych jakościowo membran w celu zapewnienia wydajności akceptowalnej przez przemysł.

5.2.2 Destylacja prosta

Destylacja to proces polegający na rozdziale substancji ze względu na ich temperatury wrzenia. W przypadku produkcji piwa bezalkoholowego celem jest usunięcie etanolu, który wrze w temperaturze 78,37 °C

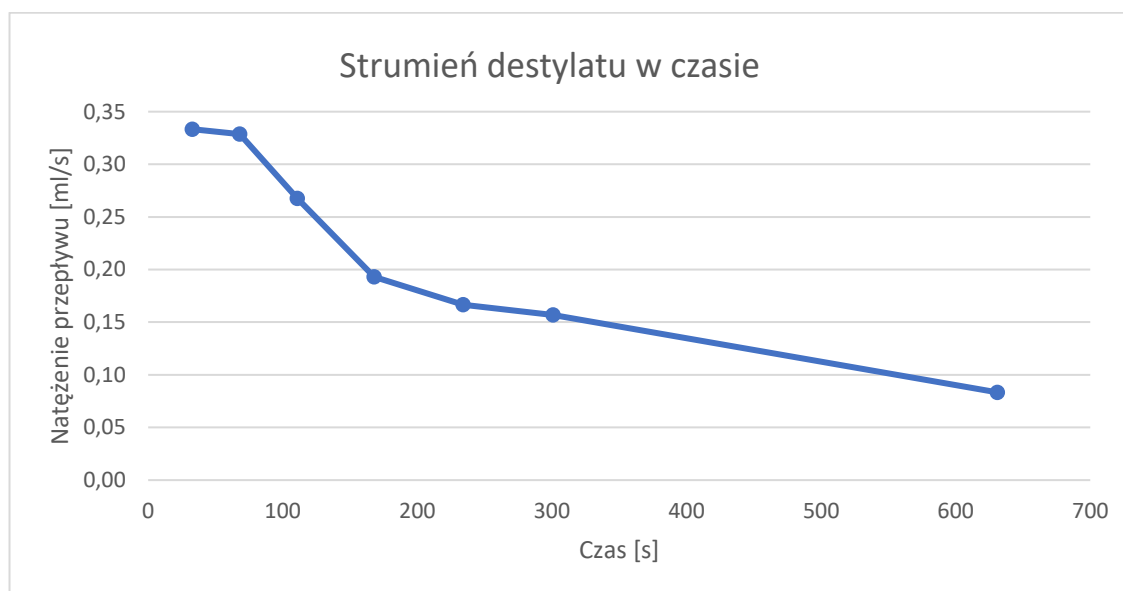
Piwo wyjściowe poddane destylacji miało następujące parametry: pH wynoszące 4,50 +/-0,1, barwę równą 12 +/-1 EBC, goryczkę wynoszącą 18 +/-1 IBU, ekstrakt pozorny 6,0 +/-0,2 °Brix oraz zawartość etanolu na poziomie 3,58 +/-0,06 % obj. Dodatkowo w piwie będącym surowcem do procesu oznaczono stężenia izobutanolu, mleczanu etylu i alkoholu feniloetylowego. Stężenie izobutanolu było na poziomie wykrywalności. Alkohol feniloetylowy był obecny w stężeniu 27 +/-1 mg/dm³, zaś mleczan etylu oznaczono na poziomie 33 +/-1 mg/dm³. Do wykonania eksperymentu użyto 2500 cm³ piwa

Po procesie uzyskano 2400 cm³ cieczy wyczerpanej. Wartości parametrów dla piwa o obniżonej zawartości etanolu uzyskanego metodą destylacji zestawiono w poniższej tabeli (Tabela 21).

Tabela 21. Parametry piwa wyjściowego oraz produktów po procesie destylacji, czyli piwa o obniżonej zawartości etanolu oraz destylatu

Rodzaj piwa	Objętość [cm ³]	pH	Ekstrakt pozorny [°Brix]	Etanol [% obj.]	Goryczka [IBU]	Barwa [EBC]	Izobutanol [mg/dm ³]	Alkohol feniloetylowy [mg/dm ³]	Mleczan etylu [mg/dm ³]
Piwo wyjściowe	2500 +/- 10	4,50 +/- 0,1	6 +/- 0,2	3,58 +/- 0,06	18 +/- 1	12 +/- 1	Poniżej progu oznaczalności	27 +/- 1	33 +/- 1
Piwo po destylacji	2400 +/- 10	4,37 +/- 0,1	6 +/- 0,2	0,82 +/- 0,06	16 +/- 1	12 +/- 1	Poniżej progu oznaczalności	32 +/- 1	238 +/- 1
Destylat	77,5 +/- 0,1	4,98 +/- 0,1	0 +/- 0,2	66,44 +/- 0,06	0 +/- 1	0 +/- 1	646 +/- 1	16 +/- 1	31 +/- 1

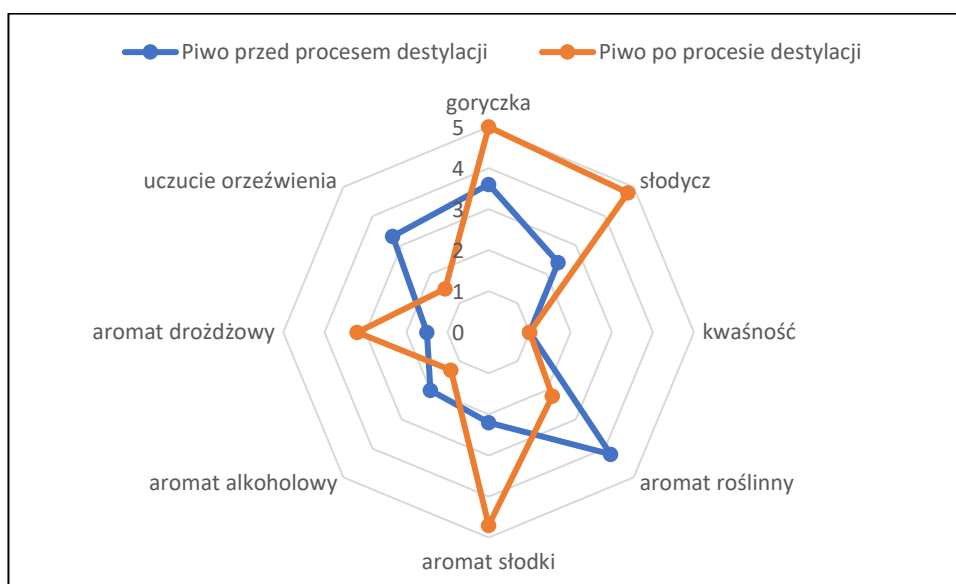
Podczas procesu odebrano łącznie $77,5 \pm 0,1 \text{ cm}^3$ destylatu zawierającego etanol w stężeniu $66,80 \pm 0,6 \%$ obj. Początkowy strumień destylatu wynosił $33 \text{ cm}^3/\text{min}$ przy temperaturze $78 \text{ }^\circ\text{C}$ aby pod koniec procesu, kiedy temperatura osiągnęła $97 \text{ }^\circ\text{C}$, zmniejszył się ponad trzykrotnie, co widać na wykresie (Rysunek 73)



Rysunek 73. Wykres strumienia destylatu w trakcie destylacji prostej piwa o zawartości alkoholu 3,58 % obj.

W toku eksperymentu udało się zmniejszyć stężenie etanolu w produkcie z $3,58 \pm 0,06 \%$ obj. do $0,82 \pm 0,06 \%$ obj. Otrzymane piwo o obniżonej zawartości alkoholu zawierało więcej etanolu niż jest to dopuszczalne przez polskie prawodawstwo [51]. Niemniej ten poziom etanolu jest akceptowalny w piwach bezalkoholowych sprzedawanych w niektórych krajach Europy [223]. Ostatnia porcja odbieranego destylatu miała temperaturę $97 \text{ }^\circ\text{C}$, co świadczy o niewielkiej zawartości odparowywanego etanolu w destylacie. Temperaturę $97 \text{ }^\circ\text{C}$ osiągnięto po około 5 minutach prowadzenia procesu, po czym przez kolejne 5 minut temperatura utrzymywała się na tym poziomie aż do końca trwania procesu. Przeprowadzone analizy pokazały, że wskutek ekspozycji na podwyższoną temperaturę zmalała goryczka piwa z 18 do 16 IBU. W związku z brakiem substancji goryczkowych w postaci izo-alfa kwasów w destylacie można wnioskować, iż część z nich uległa termicznemu rozkładowi [300]. Badania związków lotnych wykazały, że izobutanol w całości przeszedł do destylatu natomiast mleczan etylu jak i alkohol fenyletylowy były obecne zarówno w destylacie jak i cieczy wyczerpanej, z czego mleczan etylu został usunięty w nieznacznym stopniu. Pozostałe badane parametry piwa nie zmieniły się w zauważalnym stopniu. Odbierany destylat miał zawartość etanolu na poziomie $66,44 \pm 0,06 \%$ etanolu obj. (Tabela 21), co pozwala wykorzystać ten produkt między innymi w browarze do celów gospodarczych takich jak odkażanie.

Parametry organoleptyczne piwa po procesie destylacji uległy znacznym zmianom. W wyniku odparowania etanolu goryczka jak i słodycz stały się dużo bardziej wyczuwalne niż w alkoholowym odpowiedniku. Ponadto bardziej wyczuwalne stały się aromaty słodkie (słodowe) oraz aromat drożdżowy (Rysunek 74).



Rysunek 74. Parametry organoleptyczne piwa przed destylacją i po procesie destylacji

5.2.3 Rektyfikacja okresowa

Rektyfikacja to proces podobny do destylacji, gdzie każdy stopień procesu zasilany jest destylatem z poprzedniego. Proces rektyfikacji jest skuteczniejszy od procesu destylacji, dlatego został on wykorzystany w celu uzyskania piwa o obniżonej zawartości alkoholu.

Do rektyfikacji wykorzystano to samo piwo, co w procesie destylacji (Tabela 21).

W toku eksperymentu piwo poddano dwóm procesom rektyfikacji przy różnym stopniu zawrotu destylatu. W pierwszym przypadku zawrót destylatu wynosił ok. 20% (Rektyfikacja 1) w drugim przypadku zawrót destylatu wynosił ok. 60% (Rektyfikacja 2). W obydwu przypadkach pierwsze krople destylatu zebrano w temperaturze 80 °C. Temperatura ostatnich porcji destylatu wynosiła 96 °C w przypadku pierwszej rektyfikacji i 95 °C dla drugiej rektyfikacji. Piwo poddane rektyfikacji zostało zbadane pod kątem barwy, zawartości etanolu, goryczki, pH oraz ekstraktu pozornego. Do wykonania każdego eksperymentu użyto 2500 cm³ piwa uzyskując około 2300 cm³ cieczy wyczerpanej będącej piwem o obniżonej zawartości etanolu. Wartości parametrów dla piwa o obniżonej zawartości etanolu uzyskanego metodą rektyfikacji zestawiono w poniższej tabeli (Tabela 22).

Tabela 22. Parametry piwa o obniżonej zawartości alkoholu uzyskanego na drodze rektyfikacji oraz parametry uzyskanych destylatów.

Oznaczenie eksperymentu	Objętość [cm ³]	pH	Ekstrakt pozorny [°Brix]	Etanol [% obj.]	Goryczka [IBU]	Barwa [EBC]	Izobutanol [mg/dm ³]	Alkohol fenyloetylowy [mg/dm ³]	Mleczan etylu [mg/dm ³]
Rektyfikacja 1 – ciecz wyczerpana	2300	4,34 +/- 0,1	6 +/- 0,2	0,75 +/- 0,06	13 +/- 1	12 +/- 1	Poniżej progu oznaczalności	25 +/- 1	31 +/- 1
Rektyfikacja 2 – ciecz wyczerpana	2340	4,37 +/- 0,1	5,8 +/- 0,2	0,48 +/- 0,06	14 +/- 1	12 +/- 1	Poniżej progu oznaczalności	26 +/- 1	37 +/- 1
Rektyfikacja 1 - destylat	55,0	5,18 +/- 0,1	0 +/- 0,2	81,38 +/- 0,06	0 +/- 1	0 +/- 1	32 +/- 1	14 +/- 1	33 +/- 1
Rektyfikacja 2 - destylat	64,5	4,38 +/- 0,1	0 +/- 0,2	75,56 +/- 0,06	0 +/- 1	0 +/- 1	78 +/- 1	24 +/- 1	22 +/- 1

Destylat odbierano przez cały czas trwania procesu uzyskując 55,0 +/- 0,1 cm³ zatężonego roztworu etanolu w pierwszej rektyfikacji oraz 64,5 +/- 0,1 cm³ w drugiej rektyfikacji. Parametry uzyskanych destylatów zestawiono w powyższej tabeli (Tabela 22).

Obydwa piwa o obniżonej zawartości alkoholu uzyskane na drodze rektyfikacji cechowały się podobnymi parametrami takimi jak pH, ekstrakt pozorny, goryczka i barwa. Niemniej zawartość etanolu w obydwu przypadkach była różna. Piwo poddane rektyfikacji w pierwszym eksperymencie miało zawartość etanolu na poziomie 0,75 +/- 0,06% obj. Co pozwala je zaklasyfikować jako piwo bezalkoholowe w niektórych krajach Europy. Piwo z drugiego eksperymentu zawierało etanol na poziomie 0,48 +/- 0,06% obj. co jest powszechnie dopuszczalną wartością dla piw bezalkoholowych. Pozostałe badane związki lotne były na bardzo zbliżonych poziomach. Izobutanol w obydwu przypadkach był obecny jednak poniżej progu oznaczalności. Alkohol fenyloetylowy występował na porównywalnym poziomie, tak jak mleczan etylu. Niemniej w drugiej rektyfikacji omawianego związku było o 6 mg/dm³ więcej.

W porównaniu do destylacji prostej, obydwie procesy rektyfikacji dały produkt o zbliżonych parametrach do piwa wyjściowego, z wyjątkiem goryczki która była niższa od 2 do 4 IBU w porównaniu

do nadawy. Najistotniejszą różnicę można było zauważyć w zawartości etanolu. Za każdym razem udało się zmniejszyć jego zawartość lecz dopiero w przypadku drugiej rektyfikacji udało się uzyskać piwo o obniżonej zawartości alkoholu spełniające wymagania stawiane piwom bezalkoholowym ().



Rysunek 75. Parametry organoleptyczne piwa przed i po procesie rektyfikacji

Testy organoleptyczne wykonano dla surowca oraz piwa o zawartości etanolu 0,48 % obj. Goryczka i słodycz zwiększyła się w stosunku do piwa alkoholowego. Mimo, że zmierzono spadek goryczki (Tabela 22) w stosunku do surowca poddanego rektyfikacji to brak alkoholu jak i częściowe zagęszczenie próbki spowodowały, że w testach organoleptycznych uczucie goryczki zostało spotęgowane. Aromaty alkoholowy i roślinny uległy zmniejszeniu, zaś aromat słodki został bardziej wyeksponowany w piwie bezalkoholowym. Respondenci również zauważyli mniejsze uczucie orzeźwienia, głównie za sprawą faktu że piwo stało się bardziej skondensowane i esencjonalne (Rysunek 75).

5.2.4 Destylacja próżniowa

Piwo wyjściowe poddane separacji miało następujące parametry: pH wynoszące 4,50, barwę równą 10 EBC, goryczkę wynoszącą 18 IBU, ekstrakt pozorny 6 °Brix oraz zawartość etanolu na poziomie 3,58 +/-0,06% obj. oraz gęstość 1,0130 g/cm³. Dodatkowo w piwie będącym surowcem do procesu oznaczono stężenia izobutanolu, mleczanu etylu i alkoholu fenyletylowego. Izobutanol był wykrywany lecz jego stężenie było poniżej zakresu oznaczalności. Alkohol fenyletylowy był obecny w stężeniu 27 +/-1 mg/dm³, zaś mleczan etylu oznaczono na poziomie 33 +/-1 mg/dm³. W obydwu eksperymentach separacji poddawano 150 ml piwa.

5.2.4.1 Destylacja prowadzona pod ciśnieniem 150 mbar

Separacje prowadzono w zakresie temperatur od 40 °C do 60 °C. Dla ciśnienia 150 mbar udało się zebrać destylat tylko w przypadku procesu prowadzonego w temperaturze 60 °C. W niższych temperaturach destylatu nie uzyskano, zaś badane parametry nie zmieniły się podczas ekspozycji na badane temperatury. W związku z tym nie zamieszczono tych informacji w tabeli.

Tabela 23. Parametry piwa o obniżonej zawartości etanolu uzyskanego podczas destylacji pod ciśnieniem 150 mbar

Parametry cieczy wyczerpanej									
Temp. [°C]	Czas trwania procesu [min]	Objętość destylatu [ml]	Objętość cieczy wyczerpanej [ml]	Gęstość [g/cm ³]	Barwa [EBC]	pH	Ekstrakt pozorny [B/g]	Zawartość etanolu [% obj]	Goryczka [IBU]
60	20	2,8	148,0	1,0157	10+/-1	4,35	6,1 +/-0,2	2,20 +/-0,06	19 +/-1
	40	6,9	146,0	1,0177	10+/-1	4,34	6,0 +/-0,2	1,27 +/-0,06	19 +/-1
	60	8,0	142,0	1,0183	11+/-1	4,34	6,0 +/-1 0,2	0,87 +/-0,06	17 +/-1

Podczas dealkoholizacji barwa piwa nie uległa zmianom. Gęstość nieznacznie wzrosła, co jest skutkiem odparowania związków lotnych o niskiej gęstości, zaś pH zmalało. Ekstrakt, czyli zawartość cukrów, jak i goryczka nie zmieniły się. Zawartość etanolu zmalała w toku trwania procesu. Po 20 minutach w piwie było 2,2 % obj. etanolu. Po 40 minutach omawiana wartość spadła do wartości 1,27 % obj. co jest wartością spotykaną dla piw niskoalkoholowych. Natomiast po 60 minutach destylacji zawartość etanolu zmalała do 0,87 % obj (Tabela 23). co jest wartością dopuszczalną w niektórych krajach Unii Europejskiej. Dodatkowo w piwie będącym najbliższym wymaganiom pod kątem zawartości etanolu zmierzono stężenia alkoholu fenyloetylowego, mleczanu etylu oraz izobutanolu. Izobutanol nie został wykryty w badanej próbce, natomiast alkohol fenyloetylowy był obecny w ilości 27 +/-1 mg/dm³, co było wartością taką samą jak w piwie wyjściowym. Stężenie mleczanu etylu oznaczono na 27 +/-1 mg/dm³ co było ilością o 6 mg/dm³ mniejszą niż w surowcu do dealkoholizacji. Parametry destylatu różniły się w zależności od czasu trwania procesu (Tabela 24). Wraz z czasem trwania procesu uzyskiwano coraz większe objętości destylatu lecz o coraz mniejszym stężeniu etanolu. Po 20 minutach uzyskano 2,8 ml destylatu o zawartości etanolu wynoszącej 52,54 % obj. Natomiast po 60 minutach trwania procesu uzyskano 8 ml destylatu o zawartości etanolu 46,51 % obj. Gęstość jak i pH destylatu zwiększały się w trakcie trwania procesu wskutek odparowywania coraz większej ilości wody jak i wyższych alkoholi z piwa.

Tabela 24. Parametry destylatu uzyskanego podczas destylacji piwa pod ciśnieniem 150 mbar

Destylat								
Temp. [°C]	Czas trwania procesu [min]	Objętość destylatu [ml]	Gęstość [g/cm ³]	pH	Zawartość etanolu [% obj.]	Izobutanol [mg/ dm ³]	Mleczan etylu [mg/ dm ³]	Alkohol fenyloetylowy [mg/ dm ³]
60	20	2,8	0,9332	4,93	52,54 +/-0,06	0 +/-1	12 +/-1	17 +/-1
	40	6,9	0,9480	4,96	45,85 +/-0,06	0 +/-1	5 +/-1	17 +/-1
	60	8,0	0,9467	5,08	46,51 +/-0,06	0 +/-1	4 +/-1	20 +/-1

Podczas destylacji, poza etanolem, obserwowano zmiany w stężeniu trzech związków; izobutanolu, mleczanu etylu oraz alkoholu fenyloetylowego, które naturalnie występują w piwie. W materiale poddawany destylacji nie udało się oznaczyć stężenia tych związków ze względu na ich niską zawartość, natomiast w destylacie były one bardziej stężone, przez co można było je z powodzeniem oznaczyć. W destylacie nie wykryto izobutanolu, natomiast mleczan etylu jak i alkohol fenyloetylowy były obecne we wszystkich eksperymentach przeprowadzonych pod ciśnieniem 150 mbar w temperaturze 60 °C. Mleczan etylu był obecny po 20 minutach prowadzenia procesu w stężeniu 12 mg/l. W przypadku dłuższego czasu separacji, czyli 40 i 60 minut badany związek był obecny w stężeniach 5,1 mg/l oraz 4,2 mg/l. Najprawdopodobniej znaczną część mleczanu etylu oddało się usunąć podczas destylacji próżniowej w przeciągu pierwszych 20 minut, następnie stężenie maleje, co jest spowodowane rozcieńczaniem próbki w miarę wzrostu objętości destylatu. Alkohol fenyloetylowy jest obecny w niemal stałym stężeniu po 20 i 40 minutach trwania procesu. Natomiast po 60 minutach jego stężenie rośnie do 20,5 mg/l. Może to świadczyć o tym, że ten związek jest cały czas sukcesywnie usuwany z piwa, przez co jego stężenie w destylacie rośnie w trakcie trwania procesu separacji.

5.2.4.2 Destylacja prowadzona pod ciśnieniem 90 mbar

Separacje prowadzono w zakresie temperatur od 40 °C do 60 °C. Dla procesu prowadzonego pod ciśnieniem 90 mbar udało się uzyskać destylat w temperaturach 50 °C, 55 °C oraz 60 °C. W niższych temperaturach nie otrzymano destylatu. Podczas eksperymentu mierzono objętość, gęstość, pH oraz zawartość etanolu w destylacie jak i cieczy wyczerpanej. Ponadto w piwie poddanym dealkoholizacji badano goryczkę, ekstrakt pozorny oraz barwę. W destylacie jak i wybranych cieczach wyczerpanych dodatkowo badano zawartość izobutanolu, mleczanu etylu oraz alkoholu fenyloetylowego, czyli związków lotnych naturalnie występujących w piwie.

Tabela 25. Parametry piwa o obniżonej zawartości etanolu uzyskanego podczas destylacji pod ciśnieniem 90 mbar

Parametry cieczy wyczerpanej									
Temp. [°C]	Czas trwania	Objętość destylatu [ml]	Objętość cieczy wyczerpanej [ml]	Gęstość [g/cm ³]	Barwa [EBC]	pH	Ekstrakt pozorny [B/g]	Zawartość etanolu (% obj.)	Goryczka [IBU]
50	20	4,6	142	1,0157	11 +/-1	4,34	6,2 +/-0,2	2,12 +/-0,06	18 +/-1
	40	31,0	107	1,0259	15 +/-1	4,32	7,0 +/-0,2	0,15 +/-0,06	24 +/-1
	60	35,0	112	1,0245	14 +/-1	4,32	7,5 +/-0,2	0,16 +/-0,06	22 +/-1
55	20	30,5	112	1,0241	14 +/-1	4,32	7,1 +/-0,2	0,31 +/-0,06	23 +/-1
	40	60,0	84	1,0326	19 +/-1	4,33	9,4 +/-0,2	0 +/-0,06	30 +/-1
	60	79,8	70	1,0414	24 +/-1	4,34	11,2 +/-0,2	0 +/-0,06	31 +/-1
60	20	80,0	66	1,0425	23 +/-1	4,35	11,8 +/-0,2	0 +/-0,06	31 +/-1
	40	120,0	25	1,0550	26 +/-1	4,36	26,2 +/-0,2	0 +/-0,06	31 +/-1
	60	138,0	ok 10 ml gęstej cieczy	nieznaczną ilość próbki jak i jej gęstość nie pozwoliły na wykonanie analiz					

Podczas dealkoholizacji piwa zauważono, że w trakcie destylacji barwa piwa zmienia się na ciemniejszą. Jest to spowodowane odparowaniem substancji lotnych i zagęszczeniem roztworu. Po 20 minutach trwania procesu w 50 °C uzyskano piwo o zawartości alkoholu 2,12 +/-0,06% obj. co jest wartością zbyt wysoką by tego typu produkt mógł być nazywany mianem piwa bezalkoholowego. W kolejnych eksperymentach (przy wyższej temperaturze i czasie ekspozycji) udało się uzyskać piwo o zawartości etanolu poniżej 0,5% obj, co jest wartością akceptowalną dla piw bezalkoholowych. Dodatkowo w temperaturze 55 °C po 40 jak i 60 minutach trwania procesu uzyskano piwo, w którym nie wykryto obecności etanolu. Taki sam rezultat uzyskano dla cieczy wyczerpanej powstałej po destylacji w 60 °C (Tabela 25). pH dealkoholizowanych piw nie zmieniło się, natomiast goryczka jak i zawartość cukrów wyrażona jako ekstrakt wzrosły wskutek zatężenia roztworu. Najlepsze parametry piwa bezalkoholowego otrzymano dla procesu prowadzonego w temperaturze 50 °C po czasie 40 i 60 minut ze względu na nieduże zmiany parametrów jak i najniższe temperatury, na które było ekspozowane piwo. Dodatkowo w omawianych warunkach uzyskano największą objętość cieczy wyczerpanej, czyli piwa pozbawionego etanolu. W produktach, o największym potencjale jako piwo bezalkoholowe zmierzono stężenie izobutanolu, mleczanu etylu i alkoholu fenyloetylowego. Wytypowanymi próbkami były: ciecz wyczerpana po destylacji w temperaturze 50 °C i 40 min, czyli

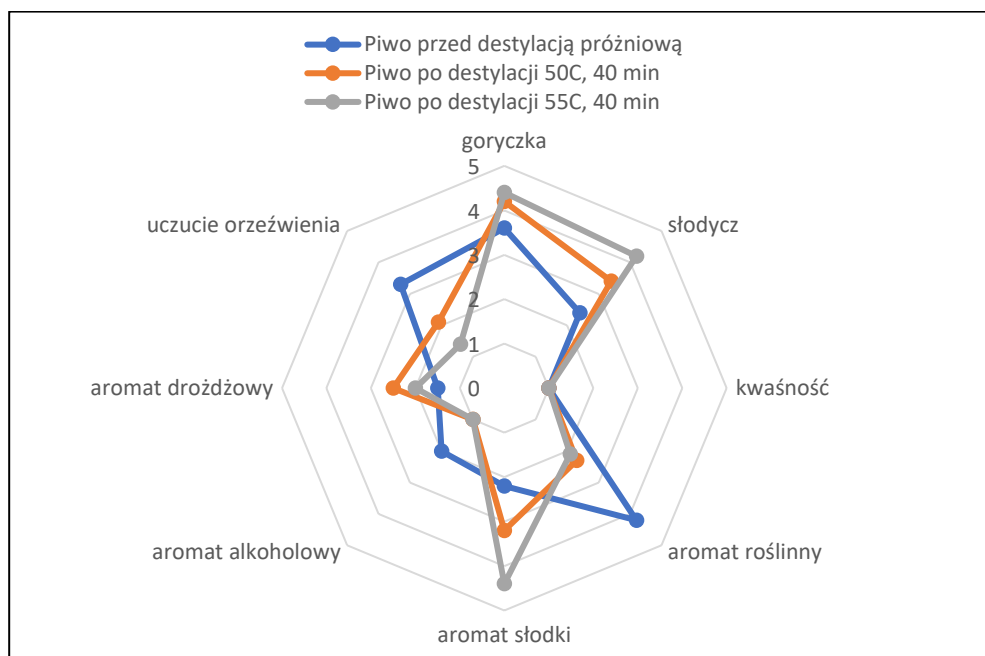
próbka, w której w najdelikatniejszych warunkach udało się usunąć etanol do poziomu pozwalającego klasyfikować to piwo jako bezalkoholowe (o stężeniu etanolu poniżej 0,5% obj.). Drugą próbką była ta destylowana w temperaturze 55 °C przez 40 minut, czyli produkt, z którego usunięto cały etanol przy jak najmniejszej temperaturze i czasie procesu. W piwie bezalkoholowym uzyskanym w temperaturze 50 °C i 40 min izobutanol nie został wykryty, alkohol fenyloetylowy oznaczono na poziomie 30 mg/dm³, zaś mleczan etylu na poziomie 56 mg/dm³. W piwie o zawartości alkoholu 0,0% obj. izobutanol również nie został wykryty natomiast alkohol fenyloetylowy był obecny w stężeniu 36 mg/dm³, zaś mleczan etylu w stężeniu 69 mg/dm³. W obydwu piwach o obniżonej zawartości alkoholu mleczan etylu jak i alkohol fenyloetylowy uległy zatężeniu, zaś izobutanol został całkowicie usunięty z piwa. Wzrost goryczki jak i zmianę barwy piwa można zniwelować rozcieńczając piwo do pierwotnej objętości.

Tabela 26. Parametry destylatu uzyskanego podczas destylacji piwa pod ciśnieniem 90 mbar

Destylat								
Temp. [°C]	Czas trwania procesu [min]	Objętość destylatu [ml]	Gęstość [g/cm ³]	PH	Zawartość etanolu [% obj.]	Izobutanol [mg/ dm ³]	Mleczan etylu [mg/ dm ³]	Alkohol fenyloetylowy [mg/ dm ³]
50	20	4,6	0,9765	4,92	19,73 +/-0,06	31 +/-1	13 +/-1	16 +/-1
	40	35,0	0,9872	3,71	7,40 +/-0,06	20 +/-1	4 +/-1	17 +/-1
	60	31,0	0,9885	3,54	7,46 +/-0,06	15 +/-1	3 +/-1	18 +/-1
55	20	30,5	0,9878	4,34	8,15 +/-0,06	12 +/-1	12 +/-1	18 +/-1
	40	60,0	0,9926	3,82	3,44 +/-0,06	10 +/-1	3 +/-1	19 +/-1
	60	79,8	0,9925	3,61	3,83 +/-0,06	9 +/-1	3 +/-1	20 +/-1
60	20	80,0	0,9920	3,85	3,72 +/-0,06	11 +/-1	3 +/-1	19 +/-1
	40	120,0	0,9932	4,20	2,70 +/-0,06	5 +/-1	6 +/-1	18 +/-1
	60	138,0	0,9947	5,12	2,56 +/-0,06	8 +/-1	8 +/-1	20 +/-1

Destylat powstały wskutek dealkoholizacji piwa pod ciśnieniem 90 mbar cechował się mniejszym stężeniem etanolu niż destylaty uzyskane pod wyższym ciśnieniem (Tabela 24, Tabela 26). Działo się to za sprawą większych objętości destylatów uzyskanych w toku procesu dealkoholizacji piwa. W przeciwieństwie do procesu prowadzonego pod ciśnieniem 150 mbar, w destylacji prowadzonej pod ciśnieniem 90 mbar usunięto z piwa izobutanol, który obecny był we wszystkich próbkach destylatów. Największe stężenie izobutanolu wynoszące 31,17 mg/dm³ odnotowano w destylacie uzyskanym po 20 minutach procesu w 50 °C. Mleczan etylu został częściowo usunięty w eksperymentach

prorowadzonych w temperaturze 50 i 55 °C, co widać w jego dużym stężeniu po 20 minutach trwania procesu i następnie powolnym spadkiem stężenia spowodowanym rozcieńczeniem destylatu. W 60 °C widać ciągły wzrost stężenia mleczanu etylu, co może być spowodowane odparowaniem znacznej objętości destylowanego piwa, a co za tym idzie pozostałego mleczanu etylu. Alkohol feniloetylowy obecny jest we wszystkich próbkach niezależnie od czasu trwania procesu jak i temperatury, zaś jego stężenie waha się między 16,12 mg/ dm³ a 19,68 mg/dm³.



Rysunek 76. Parametry piwa poddanego destylacji próżniowej przy ciśnieniu 90 mbar

Do testów organoleptycznych wybrano dwa piwa. Pierwsze to takie, w którym uzyskano dopuszczalną zawartość etanolu w jak najniższej temperaturze. Był to eksperyment prowadzony pod ciśnieniem 90 mbar w temperaturze 50 °C przez 40 minut. Drugim wybranym piwem było to, z którego usunięto cały etanol w jak najdelikatniejszych warunkach. Te warunki spełniła próba prowadzona pod ciśnieniem 90 mbar w temperaturze 55 °C przez 40 minut. Respondenci wskazali, że otrzymane piwa były bardziej słodkie i goryczkowe od piwa alkoholowego, zauważono również częściowy zanik aromatu roślinnego. Aromat alkoholowy był niemal niewyczuwalny natomiast aromat drożdżowy był nieznacznie bardziej odbierany po procesie dealkoholizacji. Uczucie orzeźwienia zmniejszyło się w mniejszym stopniu niż w przypadku pozostałych eksperymentów opartych na destylacji i rektyfikacji (Rysunek 76).

VI Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania miały charakter interdyscyplinary łącząc w sobie wiedzę z inżynierii chemicznej, technologii żywności, nauk chemicznych, chemii analitycznej oraz mikrobiologii. Ich celem było poznanie i zbadanie dostępnych metod produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Dodatkowo w trakcie badań zaproponowano kilka podejść nowatorskich. Niewątpliwym atutem przeprowadzonych badań jest wykonanie analiz instrumentalnych jak i organoleptycznych w tych samych warunkach jak i używając tej samej metodyki, przez co wyniki są łatwe do porównania. Ponadto prezentowana praca ma charakter pionierski, gdyż w Polsce nie powstało jeszcze wyczerpujące opracowanie dotyczące produkcji jak i właściwości piw bezalkoholowych.

Podczas przeprowadzonych badań sprawdzono kilka podejść do produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Wypróbowano metody fizyczne jak i biologiczne, z których każda wymaga dokładniejszego podsumowania.

Zbiorcze porównanie wyników zamieszczono w tabeli (Tabela 27). Produkt zupełnie pozbawiony alkoholu udało się otrzymać w dwóch procesach. Dla destylacji próżniowej pod ciśnieniem 90 mbar w temperaturze 55 °C i przy czasie ekspozycji 40 minut oraz w przypadku produkcji substytutu. Jednocześnie są to najskuteczniejsze metody fizyczne (destylacja próżniowa) i biologiczne (substytut) spośród badanych.

Badania pokazały, że metody fizyczne okazały się skuteczne, gdyż w ich wyniku udało się usunąć z piwa od 77 % etanolu dla destylacji pod ciśnieniem atmosferycznym do 100% dla destylacji próżniowej prowadzonej pod ciśnieniem 90 mbar w temperaturze 55 °C przez 40 minut. Dodatkowo zaobserwowano, że im niższe ciśnienie i temperatura procesu, tym dealkoholizowane piwo ma parametry bliższe swojemu alkoholowemu odpowiednikowi. Destylacja próżniowa okazała się najbardziej efektywnym procesem usuwania etanolu. Kolejnymi metodami cechującymi się dużą wydajnością były rektyfikacja oraz perwaporacja, które usunęły z piwa odpowiednio 86,59 % etanolu i 84,25 % etanolu.

Destylacja i rektyfikacja pod ciśnieniem atmosferycznym powodowała zubożenie otrzymywanego piwa oraz znaczącą zmianę jego cech organoleptycznych i tego typu metoda nie powinna być rozważana do produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu. Natomiast perwaporacja dawała zadowalające wyniki pozwalając na uzyskanie piwa bezalkoholowego o parametrach zbliżonych do swojego alkoholowego odpowiednika. Niestety wydajność procesu perwaporacji nie jest zadowalająca. Potencjalnie perwaporacja może się sprawdzić do odzysku aromatów z destylatu uzyskanego z piwa. Tego typu aromaty mogą zarówno wzbogacić smak piwa otrzymywanego na drodze rektyfikacji próżniowej jak i produktów otrzymanych metodami biologicznymi.

Tabela 27. Zbiorcze porównanie wyników przeprowadzonych eksperymentów

Metoda	Etanol w piwie o obniżonej zawartości alkoholu [% obj.]	Etanol przed procesem lub w próbie kontrolnej [% obj.]	Zmniejszenie poziomu etanolu [%]
Perwaporacja	0,57 +/-0,06	3,62 +/-0,06	84,25
Destylacja pod ciśnieniem atmosferycznym	0,82 +/-0,06	3,58 +/-0,06	77,09
Destylacja próżniowa najmniejsza temperatura [90 mbar 50 °C, 40 min]	0,15 +/-0,06	3,58 +/-0,06	95,81
Destylacja próżniowa najmniej etanolu [90 mbar, 55 °C, 40 min]	0 +/-0,06	3,58 +/-0,06	100,00
Rektyfikacja	0,48 +/-0,06	3,58 +/-0,06	86,59
Przerwana fermentacja	0,54 +/-0,06	4,03 +/-0,06	86,60
Proces zimnego kontaktu	0,42 +/-0,06	2,00 +/-0,06	79,00
Zmiana zacierania szczep Wyeast 1318	3,20 +/-0,06	3,48 +/-0,06	8,05
Zmiana zacierania szczep Voss Kveik	1,22 +/-0,06	3,08 +/-0,06	60,39
Zmiana zacierania szczep S-33	1,56 +/-0,06	3,49 +/-0,06	55,30
Zmiana zacierania połączona z procesem zimnego kontaktu	0,94 +/-0,06	n/d	n/d
Fermentacja beztlenowa <i>Monascus ruber</i>	5,50 +/-0,06	5,56 +/-0,06	1,08
Fermentacja <i>Saccharomyces ludwigii</i>	2,53 +/-0,06	4,08 +/-0,06	37,99
Substytut	0 +/-0,06	n/d	n/d
Kofermentacja <i>S. cerevisiae</i> i <i>L. brevis</i>	2,03 +/-0,06	6,68 +/-0,06	69,61

Metody biologiczne takie jak przerwana fermentacja czy proces zimnego kontaktu okazały się skutecznymi sposobami produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu, w wyniku czego powstały produkty o zawartości etanolu odpowiednio 0,54 % obj. i 0,42 % obj. Przerwana fermentacja pozwoliła na redukcję poziomu etanolu o 86,60 %. Niestety piwo powstałe w tym procesie znacząco się różniło od w pełni przefermentowanego produktu (Rysunek 49). Istnieje możliwość poprawy smaku piwa powstałego na drodze zatrzymanej fermentacji poprzez przygotowanie brzezki o mniejszej zawartości cukrów, przez co słodki posmak byłby mniej wyczuwalny. Kolejnym proponowanym rozwiązaniem niedoskonałości otrzymanego produktu może być jego suplementacja za pomocą brakujących aromatów, czyli w badanym przypadku 4-winylogwajakolem. Proces zimnego kontaktu pozwolił na redukcję etanolu w piwie o 79,00 % jednocześnie gotowy produkt cechował się zadowalającymi

parametrami organoleptycznymi. Niestety proces zimnego kontaktu był czasochłonny przez co jego zastosowanie może zmniejszyć moce przerobowe fermentowni w browarze.

Zmiany w sposobie zacierania okazały się prostą i skuteczną metodą na znaczną redukcję poziomu etanolu w przefermentowanym piwie. Niemniej, jak pokazały badania, kluczowym dla procesu jest dobór odpowiednich szczepów drożdży. Spośród trzech komercyjnie dostępnych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* szczep Voss Kveik okazał się najskuteczniejszym z badanych skutkując redukcją etanolu o 60,39 % w stosunku do piwa wytworzonego z tym samym szczepem i przy normalnej procedurze zacierania. Użycie szczepu S-33 skutkowało również zadowalającymi wynikami redukując poziom etanolu o 55,30%. Niestety szczep Wyeast 1318 okazał się niepodatny na zmiany w reżimie zacierania i zastosowana procedura spowodowała redukcję etanolu o tylko 8,05 % w stosunku do piwa powstałego przy tradycyjnym modelu zacierania. Mimo, że zmiany w procesie zacierania spowodowały znaczne obniżenie zawartości etanolu w piwie, to żaden z otrzymanych produktów nie może zostać nazwany piwem bezalkoholowym. Prawdopodobnie można poprawić skuteczność tej metody stosując dodatkowe zmiany w składzie zasypu przykładowo stosując dodatek surowców niestodowanych lub korzystając ze słodu o niższej aktywności biologicznej.

Połączenie zmian w reżimie zacierania z procesem zimnego kontaktu skutkowało otrzymaniem produktu o zawartości alkoholu wynoszącej 0,94% obj. akceptowalnym w niektórych europejskich państwach (Tabela 11). Niestety proces okazał się czasochłonny, przez co z komercyjnego punktu widzenia byłby nieopłacalny dla browarów działających na rynku.

W toku prac badano również dwa nietypowe szczepy pod kątem produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. Pierwszy *Saccharomyces ludwigii* okazał się mikroorganizmem o dużym potencjale do produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu gdyż spowodował redukcję poziomu etanolu o 37,99 % w stosunku do piwa fermentowanego za pomocą standardowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Niestety otrzymany produkt nie spełnił wymagań stawianych piwom bezalkoholowym. Niestety drugi szczep, czyli *Monascus ruber* okazał się szczepem nie rokującym w przypadku produkcji piw o obniżonej zawartości alkoholu gdyż zredukował poziom etanolu w wytworzonym przez siebie piwie o 1,08 %. Niemniej dzięki jego stosunkowo powolnej fermentacji jego kontrola pod kątem procesu przerwanej fermentacji może być dużo łatwiejsza niż w przypadku tradycyjnych szczepów. Dodatkowo wyniki testów organoleptycznych pokazały, że badany szczep produkuje metabolity dodatnio wpływające na smak i aromat produkowanego piwa (Rysunek 59).

Badanie kofermentacji brzeczki piwnej z wykorzystaniem drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterii kwasu mlekowego *Lactobacillus brevis* pokazało, że tego typu zabieg jest w stanie zauważalnie zmniejszyć stężenie etanolu w gotowym piwie. Dzięki zastosowaniu metody Boxa-Benkheņa udało się stworzyć macierz odpowiedzi, która wskazała w jakich warunkach uzyskuje się największe stężenie etanolu i w jakich najmniejsze. Dzięki zastosowaniu omawianej metody udało się zredukować zawartość etanolu w piwie o 69,61 %.

Dodatkowo w trakcie badań stworzono niefermentowane substytuty piwa, które mimo że powstają z wykorzystaniem surowców browarniczych to nie mogą być uznane za piwo. Dzięki dobrym walorom organoleptycznym uzyskanych napojów (Rysunek 67) mogą one się stać cennym dodatkiem do asortymentu napojów sprzedawanych przez browary. Szczególnie tyczy się to małych browarów restauracyjnych, w których wdrożenie bardziej zaawansowanych technologii jak i ścisła kontrola procesu mogą być problematyczne.

Metody fizyczne ze względu na znaczne koszty inwestycyjne i złożoność instalacji są warte do rozważenia dla dużych browarów posiadających znaczny kapitał pozwalający na budowę linii do

dealkoholizacji piwa. Metody biologiczne, ze względu na prostotę wykonania jak i możliwość wykorzystania standardowej aparatury browarniczej polecane są bardziej dla małych i średnich browarów.

Wykonana praca pozwoliła przybliżyć i porównać większość znanych metod produkcji piwa bezalkoholowego jak i zaproponowała nowatorskie metody produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu. W ostatnich latach zauważono, że konsumenci poszukują nowych piw bezalkoholowych, co widać w znacznym wzroście tego sektora piwowarstwa. Co więcej nawet epidemia wirusa SARS CoV-2 nie powstrzymała wzrostu rynku piw bezalkoholowych. W związku z tym browary aby utrzymać swoją konkurencyjność zmuszone są do stworzenia własnej wersji piwa bezalkoholowego. Biorąc pod uwagę kompleksowość przeprowadzonych badań można uznać że niniejsza praca posiada charakter pionierski w całościowym opisie zagadnienia jakim jest piwo o obniżonej zawartości alkoholu. Przedstawione opracowanie posiada znaczne walory poznawcze zarówno dla osób badających proces produkcji piwa jak i firm browarniczych, które muszą dostosować się do zmian na rynku w celu maksymalizacji zysków.

VII Spis oznaczeń

^oBrix – zawartość cukrów podana w stopniach Brix, jeden stopień Brix odpowiada 1% masowemu sacharozy w roztworze

IBU – międzynarodowa jednostka goryczki (ang. International Bitterness Unit). Przyjmuje się, że 1 IBU równa się 1 ppm izohumulonu w roztworze

EBC – jednostka barwy piwa uznawana przez Europejską Konwencję Browarników

DSM – oznaczenie katalogowe niemieckiej kolekcji kultur należącej do instytutu Leibniza

PV – perwaporacja

MF - mikrofiltracja

VIII Spis ilustracji

RYSUNEK 1. ANTYCZNY MODEL EGIPSKIEGO BROWARU. EKSPONAT ZE ZBIORÓW ERMITAŻU.....	6
RYSUNEK 2. SCHEMAT TECHNOLOGII PRODUKCJI PIWA W STAROŻYTNYM EGIPCIE. (NA PODSTAWIE [13]).....	7
RYSUNEK 3. LABORATORIUM BROWARU CARLSBERG [ŹRÓDŁO: HTTPS://WWW.CARLSBERGGROUP.COM/MEDIA/21153/LABFRONTBYGNING_ARTIKELSPOT.JPG]	9
RYSUNEK 4. WIDOKÓWKA Z BROWARU HAASEGO WE WROCŁAWIU. NA UWAGĘ ZASŁUGUJE NAPIS "LAGERBIER BRAUEREI" CZYLI BROWAR WARZĄCY PIWA DOLNEJ FERMENTACJI. TEN NAPIS ŚWIADCZY O NOWOCZESNOŚCI ZAKŁADU, KTÓRY PODAŻAŁ Z NAJNOWSZYMI TRENDAMI W DZIEDZINIE PIWOWARSTWA. [ŹRÓDŁO: HTTPS://FOTOPOLSKA.EU/70391,FOTO.HTML?O=B10407]	10
RYSUNEK 5. SCHEMAT BUDOWY ZIARNA JĘCZMIENIA [ŹRÓDŁO HTTPS://TWOJBROWAR.PL/PL/BLOG/SLODOWANIE-NA-CZYM-POLEGA-I-DLACZEGO-JEST-KONIECZNE-]	15
RYSUNEK 6. SCHEMAT PRODUKCJI SŁODU	16
RYSUNEK 7. SZYSZKI CHMIELU ZWYCZAJNEGO (HUMULUS LUPULUS). FOT. IWONA FEIER	18
RYSUNEK 8 PRZEKRÓJ PRZEZ SZYSZKĘ CHMIELU. WIDOCZNA LUPULINA W POSTACI ŻÓŁTYCH GRANULEK. FOT. IWONA FEIER.....	19
RYSUNEK 9. SUSZONY CHMIEL W FORMIE PELLETU (PO LEWEJ) ORAZ SUSZONE SZYSZKI CHMIELOWE (PO PRAWIEJ)	20
RYSUNEK 10. SCHEMAT KOMÓRKI DROŹDZOWEJ. NA ILUSTRACJI OZNACZONO: 1- JĄDRO KOMÓRKOWE, 2 - WAKUOLA, 3 - MITOCHONDRIA, 4 - APARAT GOLGIEGO, 5 - RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNE, 6 - ŚCIANA KOMÓRKOWA, 7 - BLIZNA PO PODZIALE KOMÓRKOWYM. ILUSTRACJA WYKONANA NA PODSTAWIE [92]	23
RYSUNEK 11. SCHEMAT METABOLIZMU DROŹDZI W WARUNKACH TLENOWYCH ORAZ BEZTLENOWYCH	26
RYSUNEK 12. SCHEMAT PROCESU PRODUKCJI PIWA	27
RYSUNEK 13. SCHEMAT DZIAŁANIA ENZYMÓW HYDROLIZUJĄCYCH SKROBIĘ PODCZAS ZACIERANIA	29
RYSUNEK 14. WNĘTRZE KADZI FILTRACYJNEJ. NA ILUSTRACJI WIDAĆ FAŁSZYWE DNO, MIESZALNIK MECHANICZNY JAK I ZRASZACZE UŻYWANE DO WYPŁUKIWANIA POZOSTAŁYCH CUKRÓW Z MŁÓTA.....	31
RYSUNEK 15. WYSŁODZINY BROWARNICZE W FORMIE PŁACKA FILTRACYJNEGO NA DNE KADZI FILTRACYJNEJ.	32
RYSUNEK 16. TERMICZNA IZOMERYZACJA ŻYWIC CHMIELOWYCH NA PRZYKŁADZIE HUMULONU. OPRACOWANIE WEDŁUG [144].....	33
RYSUNEK 17. OSADY POWSTAŁE PO ODWIROWANIU GORĄCEJ BRZECZKI W BROWARZE JASTRZĘBIE. FOT. MATEUSZ BŁATOŃ.....	33
RYSUNEK 18. OTWARTA KADŹ FERMENTACYJNA W BROWARZE TENCZYNEK. NA ZDJĘCIU WIDAĆ FERMENTUJĄCE PIWO W FAZIE NISKICH KRĄŻKÓW	35
RYSUNEK 19. ZBIORNIKI LEŻAKOWE ZNAJDUJĄCE SIĘ W BROWARZE TENCZYNEK	35
RYSUNEK 20. FERMENTORY CYLINDRYCZNO-STOŻKOWE W BROWARZE JASTRZĘBIE. FOT. MATEUSZ BŁATOŃ	36
RYSUNEK 21. PŁYTOWY FILTR DO PIWA W BROWARZE TENCZYNEK	37
RYSUNEK 22. PODZIAŁ ŚWIATOWEJ PRODUKCJI PIWA W 2018 ROKU ZE WZGLĘDU NA REGIONY. OPRACOWANIE WEDŁUG [149]	39
RYSUNEK 23. APARATURA DO REKTYFIKACJI PRÓŹNIOWEJ FIRMY SCHMIDT ZNAJDUJĄCA SIĘ W BROWARZE TENCZYNEK	51

RYSUNEK 24. SCHEMAT INSTALACJI PRZEMYSŁOWEJ DO REKTYFIKACJI PRÓŻNIOWEJ PIWA	52
RYSUNEK 25. INSTALACJA DO DEALKOHOLIZACJI PIWA NA DRODZE ODWRÓCONEJ OSMOZY FIRMY GEA. ZDJECIE Z MATERIAŁÓW PROMOCYJNYCH FIRMY	53
RYSUNEK 26. SCHEMAT PRZEDSTAWIAJACY ZASADĘ DZIAŁANIA PERWAPORACJI NA PRZYKŁADZIE INSTALACJI DO DEALKOHOLIZACJI PIWA	54
RYSUNEK 27. SCHEMAT KOLUMNY Z WIRUJĄCYMI STOŻKAMI. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [244]	55
RYSUNEK 28. WYBRANE STRATEGIE MODYFIKACJI DROŻDZY W CELU REDUKCJI WYTWARZANIA ETANOLU. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [268]	58
RYSUNEK 29. SCHEMAT INSTALACJI DO CIĄGŁEJ FERMENTACJI BRZECZKI PIWNEJ.....	59
RYSUNEK 30. REAKCJA KATALIZOWANA PRZEZ DEHYDROGENAZĘ ALKOHOLOWĄ.....	59
RYSUNEK 31. WARSZEWIA BROWARU POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ.....	64
RYSUNEK 32. SCHEMAT INSTALACJI LABORATORYJNEJ Z MEMBRANĄ PERWAPORACYJNĄ. 1 – ZBIORNIK NADAWY, 2 – POMPA CYRKULUJĄCA, 3 – POMPA PRÓŻNIOWA, 4 – ZBIORNIK PERMEATU	66
RYSUNEK 33. KOLUMNA DO DESTYLACJI Z DEFLEGMACJĄ. 1 - ZBIORNIK NADAWY Z PŁASZCZEM GRZEJNYM, 2 - KOLUMNA Z WYPEŁNIENIEM, 3- CHŁODNICA, 4 - KOMORA ZAWOROWA, 5 - WĘŻYK ODPROWADZAJACY DESTYLAT	66
RYSUNEK 34. ZESTAW DO DESTYLACJI PRÓŻNIOWEJ FIRMY BUCHI	67
RYSUNEK 35. SCHEMAT PRZEPROWADZENIA EKSPERYMENTU Z PROCESEM ZIMNEGO KONTAKTU	68
RYSUNEK 36. SCHEMAT EKSPERYMENTU ZE ZMIENIONYM REŻIMEM ZACIERANIA W CELU OSIĄGNIĘCIA BRZECZKI O MNIJSZEJ ILOŚCI CUKRÓW FERMENTOWALNYCH	69
RYSUNEK 37. SCHEMAT EKSPERYMENTU FERMENTACJI BRZECZKI PIWNEJ Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU MONASCUS RUBER.....	71
RYSUNEK 38. WYKRES PRZEDSTAWIAJĄCY ZMIANĘ ZAWARTOŚCI CUKRÓW W BRZECZCE PODCZAS FERMENTACJI Z UŻYCIEM SZCZEPU S-33.....	81
RYSUNEK 39. WYKRES STĘŻENIA ETANOLU PODCZAS FERMENTACJI Z UŻYCIEM SZCZEPU S-33	82
RYSUNEK 40. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA ZMIENIONEGO ZACIERANIA I FERMENTACJI Z UŻYCIEM SZCZEPU S-33	82
RYSUNEK 41. WYKRES ZAWARTOŚCI CUKRÓW PODCZAS FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU WYEAST 1318	83
RYSUNEK 42. ZAWARTOŚĆ ETANOLU W TRAKCIE FERMENTACJI Z UŻYCIEM DROŻDZY WYEAST 1318	83
RYSUNEK 43. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA ZMIENIONEGO ZACIERANIA I FERMENTACJI Z UŻYCIEM SZCZEPU WYEAST 1318.....	84
RYSUNEK 44. WYKRES ZAWARTOŚCI CUKRÓW PODCZAS FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU VOSS KVEIK.....	84
RYSUNEK 45. ZAWARTOŚĆ ETANOLU W TRAKCIE FERMENTACJI Z UŻYCIEM DROŻDZY VOSS KVEIK.....	85
RYSUNEK 46. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA ZMIENIONEGO ZACIERANIA I FERMENTACJI Z UŻYCIEM SZCZEPU VOSS KVEIK	85
RYSUNEK 47. WYKRES ZAWARTOŚCI ETANOLU I CUKRÓW (EKSTRAKTU) PODCZAS FERMENTACJI. CZERWONĄ LINIĄ OZNACZONO MOMENT ZATRZYMANIA FERMENTACJI W CELU OTRZYMANIA PIWA BEZALKOHOLOWEGO.....	87
RYSUNEK 48. WYKRES STĘŻENIA 4-WINYLOGWAJAKOLU I KWASU FERULOWEGO PODCZAS FERMENTACJI. CZERWONĄ LINIĄ ZAZNACZONO MOMENT ZATRZYMANIA FERMENTACJI W CELU OTRZYMANIA PIWA BEZALKOHOLOWEGO.....	88
RYSUNEK 49. PORÓWNANIE WYNIKÓW TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH PIWA POWSTAŁEGO NA DRODZE PRZERWANEJ FERMENTACJI W PORÓWNIANIU Z W PEŁNI PRZEFERMENTOWANYM ODPOWIEDNIKIEM.....	89
RYSUNEK 50. KONTROLOWANY PRZEBIEG TEMPERATURY PODCZAS FERMENTACJI W PROCESIE ZIMNEGO KONTAKTU. W PIERWSZYCH DNIACH WIDAĆ WZROST TEMPERATURY W CELU UŁATWIENIA DROŻDZOM BUDOWY BIOMASY.	90
RYSUNEK 51. WYKRES ZAWARTOŚCI CUKRÓW PODCZAS FERMENTACJI W REŻIMIE ZIMNEGO KONTAKTU. OD 10 DNIA WIDAĆ BARDZO POWOLNY SPADEK SPOWODOWANY OBNIŻENIEM TEMPERATURY	90
RYSUNEK 52. WYKRES ZAWARTOŚCI ETANOLU W TRAKCIE FERMENTACJI. NA UWAGĘ ZASŁUGUJE DŁUGI OKRES, W KTÓRYM ETANOL NIE BYŁ WYTWARZANY (TZW. LAG FAZA), NASTĘPNIE MOŻNA ZAOBSERWOWAĆ POWOLNY WZROST STĘŻENIA ETANOLU W PIWIE. ..	91
RYSUNEK 53. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA PIWA BEZALKOHOLOWEGO UZYSKANEGO ZA POMOCĄ PROCESU ZIMNEGO KONTAKTU	92
RYSUNEK 54. WYKRES ZMIAN STĘŻENIA CUKRÓW W BRZECZCE POWSTAŁEJ WSKUTEK ZMIENIONEGO ZACIERANIA I FERMENTOWANEJ METODĄ ZIMNEGO KONTAKTU.....	93
RYSUNEK 55. WYKRES ZMIAN STĘŻENIA ETANOLU W BRZECZCE POWSTAŁEJ WSKUTEK ZMIENIONEGO ZACIERANIA I FERMENTOWANEJ METODĄ ZIMNEGO KONTAKTU.....	93
RYSUNEK 56. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA PIWA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOŁU UZYSKANEGO ZA POMOCĄ PROCESU ZIMNEGO KONTAKTU I PRZY ZMIENIONYM REŻIMIE ZACIERANIA	94

RYSUNEK 57. ZMIANY ZAWARTOŚCI CUKRÓW W BRZECZCE PODCZAS TESTÓW FERMENTACYJNYCH Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPÓW MONASCUS RUBER. SACCHAROMYCES CEREVISIAE I SACCHAROMYCES PASTORIANUS TO SZCZEPY REFERENCYJNE OZNACZONE SKRÓTAMI S. CEREVISIAE I S. PASTORIANUS. SZCZEP MONASCUS RUBER BADANY BYŁ W WARUNKACH TLENOWYCH I BEZTLENOWYCH. W WARUNKACH BEZTLENOWYCH PRZEPROWADZONO FERMENTACJE Z PH USTAWIONYM NA 4,5 (OZNACZENIE PH 4,5 START) ORAZ Z PH UTRZYMYWANYM STALE POWYŻEJ WARTOŚCI 4,5 (OZNACZENIE PH > 4,5).	95
RYSUNEK 58. WYKRES ZMIAN STĘŻENIA ETANOLU W TRAKCIE FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU MONASCUS RUBER. SACCHAROMYCES CEREVISIAE I SACCHAROMYCES PASTORIANUS TO SZCZEPY REFERENCYJNE OZNACZONE SKRÓTAMI S. CEREVISIAE I S. PASTORIANUS. SZCZEP MONASCUS RUBER BADANY BYŁ W WARUNKACH TLENOWYCH I BEZTLENOWYCH. W WARUNKACH BEZTLENOWYCH PRZEPROWADZONO FERMENTACJE Z PH USTAWIONYM NA 4,5 (OZNACZENIE PH 4,5 START) ORAZ Z PH UTRZYMYWANYM STALE POWYŻEJ WARTOŚCI 4,5 (OZNACZENIE PH > 4,5).	96
RYSUNEK 59. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA FERMENTACJI PRZEPROWADZONYCH Z UŻYCIEM MONASCUS RUBER. SACCHAROMYCES CEREVISIAE I SACCHAROMYCES PASTORIANUS TO SZCZEPY REFERENCYJNE OZNACZONE SKRÓTAMI S. CEREVISIAE I S. PASTORIANUS. SZCZEP MONASCUS RUBER OZNACZANY SKRÓTOWO M. RUBER BADANY BYŁ W WARUNKACH TLENOWYCH I BEZTLENOWYCH. W WARUNKACH BEZTLENOWYCH PRZEPROWADZONO FERMENTACJE Z PH USTAWIONYM NA 4,5 (OZNACZENIE PH 4,5 START) ORAZ Z PH UTRZYMYWANYM STALE POWYŻEJ WARTOŚCI 4,5 (OZNACZENIE PH > 4,5).	97
RYSUNEK 60. ZMIANA ZAWARTOŚCI CUKRÓW PODCZAS FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU SACCHAROMYCODES LUDWIGI, JAKO SZCZEPY ODNIESIENIA ZASTOSOWANO SACCHAROMYCES CEREVISIAE ORAZ SACCHAROMYCES PASTORIANUS.....	99
RYSUNEK 61. ZMIANA WARTOŚCI PH PODCZAS FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU SACCHAROMYCODES LUDWIGII, JAKO SZCZEPY ODNIESIENIA ZASTOSOWANO SACCHAROMYCES CEREVISIAE ORAZ SACCHAROMYCES PASTORIANUS	100
RYSUNEK 62. ZMIANA STĘŻENIA ETANOLU PODCZAS FERMENTACJI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU SACCHAROMYCODES LUDWIGII, JAKO SZCZEPY ODNIESIENIA ZASTOSOWANO SACCHAROMYCES CEREVISIAE ORAZ SACCHAROMYCES PASTORIANUS	101
RYSUNEK 63. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH DLA PIWA UZYSKANEGO Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPU SACCHAROMYCODES LUDWIGII JAKO SZCZEPY ODNIESIENIA ZASTOSOWANO SACCHAROMYCES CEREVISIAE ORAZ SACCHAROMYCES PASTORIANUS... ..	101
RYSUNEK 64. PŁASZCZYZNA ODPOWIEDZI DLA ZALEŻNOŚCI W PRODUKCJI ETANOLU DLA GORYCZKI I STĘŻENIA CUKRÓW. GORYCZKA -1 ODPOWIADA 10 IBU, ZAŚ 1 ODPOWIADA 30 IBU. STĘŻENIE CUKRÓW -1 ODPOWIADA 6 BRUX, ZAŚ 1 ODPOWIADA 14 BRUX.	104
RYSUNEK 65. PŁASZCZYZNA ODPOWIEDZI DLA ZALEŻNOŚCI W PRODUKCJI ETANOLU DLA STOSUNKU BIOMASY I STĘŻENIA CUKRÓW. STOSUNEK BIOMASY -1 ODPOWIADA 3 DNIOWEMU OPÓŹNIENIU W DODANIU DROŻDŻY ZAŚ 1 ODPOWIADA 3 DNIOWEMU OPÓŹNIENIU W DODANIU BAKTERII KWASU MLEKOWEGO. STĘŻENIE CUKRÓW -1 ODPOWIADA 6 BRUX, ZAŚ 1 ODPOWIADA 14 BRUX	104
RYSUNEK 66. PŁASZCZYZNA ODPOWIEDZI DLA ZALEŻNOŚCI W PRODUKCJI ETANOLU DLA GORYCZKI I STOSUNKU BIOMASY. STOSUNEK BIOMASY -1 ODPOWIADA 3 DNIOWEMU OPÓŹNIENIU W DODANIU DROŻDŻY ZAŚ 1 ODPOWIADA 3 DNIOWEMU OPÓŹNIENIU W DODANIU BAKTERII KWASU MLEKOWEGO. GORYCZKA NA POZIOMIE -1 ODPOWIADA 10 IBU, ZAŚ 1 ODPOWIADA 30 IBU.	105
RYSUNEK 67. WYNIKI TESTÓW ORGANOLEPTYCZNYCH BADANYCH NIEFERMENTOWANYCH SUBSTYTUTÓW PIWA	106
RYSUNEK 68. WYKRES GĘSTOŚCI STRUMIENIA PERMEATU W CZASIE PODCZAS PROWADZONEJ PERWAPORACJI OKRESOWEJ Z WYKORZYSTANIEM MEMBRANY PERVAP 4510 W TEMP 50 °C I POD CIŚNIENIEM 40 MBAR.....	107
RYSUNEK 69. WYKRES ZAWARTOŚCI ETANOLU W PERMEACIE I RETENTACIE PODCZAS PERWAPORACJI OKRESOWEJ Z WYKORZYSTANIEM MEMBRANY PERVAP 4510 W TEMP 50 °C I POD CIŚNIENIEM 40 MBAR.	109
RYSUNEK 70. WYKRES STĘŻENIA KWASU FERULOWEGO, 4-WINYLOGWAJAKOLU ORAZ MALTOLU W PERMEACIE PODCZAS PERWAPORACJI OKRESOWEJ Z WYKORZYSTANIEM MEMBRANY PERVAP 4510 W TEMP 50 °C I POD CIŚNIENIEM 40 MBAR.	109
RYSUNEK 71. WYKRES STĘŻENIA KWASU FERULOWEGO, 4-WINYLOGWAJAKOLU ORAZ MALTOLU W RETENTACIE PODCZAS PERWAPORACJI OKRESOWEJ Z WYKORZYSTANIEM MEMBRANY PERVAP 4510 W TEMP 50 °C I POD CIŚNIENIEM 40 MBAR.	110
RYSUNEK 72. WYKRES PRZEDSTAWIAJĄCY PORÓWNIANIE WŁAŚCIWOŚCI ORGANOLEPTYCZNYCH PIWA PRZED ORAZ PO PERWAPORACJI	110
RYSUNEK 73. WYKRES STRUMIENIA DESTYLATU W TRAKCIE DESTYLACJI PROSTEJ PIWA O ZAWARTOŚCI ALKOHOLU 3,58 % OBJ.	112
RYSUNEK 74. PARAMETRY ORGANOLEPTYCZNE PIWA PRZED DESTYLACJĄ I PO PROCESIE DESTYLACJI.....	113
RYSUNEK 75. PARAMETRY ORGANOLEPTYCZNE PIWA PRZED I PO PROCESIE REKTYFIKACJI.....	115
RYSUNEK 76. PARAMETRY PIWA Poddanego DESTYLACJI PRÓŻNIOWEJ PRZY CIŚNIENIU 90 MBAR	120

IX Spis tabel

TABELA 1. PROCENTOWE ZUŻYCIE WODY W BROWARZE. PRZY ROZLEWIE ZAŁOŻONO, ŻE 50% PIWA TRAFIA DO KEGÓW, ZAŚ DO PUSZEK I BUTELEK PO 25%.....	12
TABELA 2. SKŁAD SZYSZKI CHMIELOWEJ. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [75]	20
TABELA 3. SKŁAD KOMÓRKI DROŹDŻOWEJ. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [90].....	22
TABELA 4. KOLEJNOŚĆ METABOLIZOWANIA AMINOKWASÓW PRZEZ DROŹDŻE. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [88].	24
TABELA 5. WPŁYW WYBRANYCH MINERAŁÓW NA METABOLIZM DROŹDŻY W ASPEKCIE ICH WYKORZYSTANIA W BROWARNICTWIE	25
TABELA 6. WYBRANE ENZYMY AKTYWNE PODCZAS ZACIERANIA I OPTIMALNE WARUNKI ICH DZIAŁANIA [120].	29
TABELA 7. PRODUKCJA PIWA W EUROPIE W LATACH 2014-2020. WIELKOŚCI PODANE W TYS. HL. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [154]	40
TABELA 8. SPRZEDAŻ PIWA W EUROPIE W LATACH 2014-2020. WIELKOŚCI PODANE W TYS. HL. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [154]	41
TABELA 9. SPOŻYCIE PIWA W EUROPIE PER CAPITA W LATACH 2014-2020. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [154].....	42
TABELA 10. ILOŚĆ BROWARÓW W EUROPIE. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [154]	43
TABELA 11. ZESTAWIENIE MAKSYMALNEJ ZAWARTOŚCI ETANOLU W PIWACH BEZALKOHOLOWYCH W WYBRANYCH KRAJACH ŚWIATA. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [51], [223]	49
TABELA 12. SCHEMAT PRACY BADAWCZEJ WYKONANEJ W RAMACH DOKTORATU.	61
TABELA 13. WARUNKI PRZEPROWADZONEJ MIKROFILTRACJI SUROWCA DO PERWAPORACJI.....	65
TABELA 14. SCHEMAT EKSPERYMENTU Z WYKORZYSTANIEM KOFERMENTACJI <i>S. CEREVISIAE</i> Z <i>L. BREVIS</i>	73
TABELA 15. WŁAŚCIWOŚCI ANALIZOWANYCH ZWIĄZKÓW AROMATYCZNYCH	77
TABELA 16. PORÓWNANIE PARAMETRÓW PIWA OTRZYMANEGO POPRZEZ ZMIANY W PROCESIE ZACIERANIA Z WYKORZYSTANIEM TRZECH KOMERCYJNIE DOSTĘPNYCH SZCZEPÓW DROŹDŻY BROWARNICZYCH.....	86
TABELA 17. ZESTAWIENIE PARAMETRÓW STANDARDOWEGO PIWA PSZENICZNEGO Z PIWEM O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOŁU OTRZYMANYM METODĄ PRZERWANEJ FERMENTACJI.	88
TABELA 18. WYNIKI TESTÓW KOFERMENTACJI <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ORAZ <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i>	103
TABELA 19. WYNIKI ANALIZ NIEFERMENTOWANYCH SUBSTYTUTÓW PIWA	105
TABELA 20. ZMIANY BADANYCH PARAMETRÓW PIWA W PERMEACIE I RETENTACIE W TRAKCIE TRWANIA PERWAPORACJI OKRESOWEJ Z WYKORZYSTANIEM MEMBRANY PERVAP 4510 W TEMP 50 °C I POD CIŚNIENIEM 40 MBAR Z UWZGLĘDNIENIEM WSPÓŁCZYNNIKA ROZDZIAŁU ETANOL-WODA B.....	108
TABELA 21. PARAMETRY PIWA WYJŚCIOWEGO ORAZ PRODUKTÓW PO PROCESIE DESTYLACJI, CZYLI PIWA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ETANOLU ORAZ DESTYLATU	111
TABELA 22. PARAMETRY PIWA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ALKOHOŁU UZYSKANEGO NA DRODZE REKTYFIKACJI ORAZ PARAMETRY UZYSKANYCH DESTYLATÓW.	114
TABELA 23. PARAMETRY PIWA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ETANOLU UZYSKANEGO PODCZAS DESTYLACJI POD CIŚNIENIEM 150 MBAR	116
TABELA 24. PARAMETRY DESTYLATU UZYSKANEGO PODCZAS DESTYLACJI PIWA POD CIŚNIENIEM 150 MBAR	117
TABELA 25. PARAMETRY PIWA O OBNIŻONEJ ZAWARTOŚCI ETANOLU UZYSKANEGO PODCZAS DESTYLACJI POD CIŚNIENIEM 90 MBAR	118
TABELA 26. PARAMETRY DESTYLATU UZYSKANEGO PODCZAS DESTYLACJI PIWA POD CIŚNIENIEM 90 MBAR	119
TABELA 27. ZBIORCZE PORÓWNANIE WYNIKÓW PRZEPROWADZONYCH EKSPERYMENTÓW	122

X Literatura

- [1] M. Cyganiak, "Rynek piwa w Polsce A.D. 2022," in *XIX Jesienne Spotkanie Browarników*, 2022.
- [2] O. Dietrich, M. Heun, J. Notroff, K. Schmidt, and M. Zarnkow, "The role of cult and feasting in the emergence of Neolithic communities. New evidence from Göbekli Tepe, south-eastern Turkey," *Antiquity*, vol. 86, no. 333, pp. 674–695, 2012.
- [3] M. Zarnkow, E. Spieleder, W. Back, B. Sacher, A. Otto, and B. Einwag, "Interdisziplinäre Untersuchungen zum altorientalischen Bierbrauen in der Siedlung von Tall Bazi/Nordsyrien vor rund 3200 Jahren," *Technikgeschichte*, vol. 73, no. 1, pp. 3–26, 2006.
- [4] A. G. Heiss *et al.*, *Mashes to mashes, crust to crust. Presenting a novel microstructural marker for malting in the archaeological record*, vol. 15, no. 5. 2020.
- [5] L. Dietrich *et al.*, "Investigating the function of Pre-Pottery Neolithic stone troughs from Göbekli Tepe – An integrated approach," *J. Archaeol. Sci. Reports*, vol. 34, no. November, 2020.
- [6] P. Wiśniewski, *Piwa historie niezwykle*. Warszawa: Print Shops PREGO – Polska, 1993.
- [7] W. Sallaberger, "The city and the palace at archaic Ur," in *Shepherds of the black-headed people: the royal office vis-a-vis godhead in ancient Mesopotamia*, P. Charvat, K. Saskova, and L. Pecha, Eds. Plzen: UNIV WEST BOHEMIA, 2010, pp. 31–37.
- [8] M. Stępień, *Kodeks Hammurabiego*. Warszawa: Alfa, 2000.
- [9] S. M. Valamoti, "Brewing beer in wine country ? First archaeobotanical indications for beer making in Early and Middle Bronze Age Greece," *Veg. Hist. Archaeobot.*, vol. 27, no. 4, pp. 611–625, 2018.
- [10] M. Forsyth, *Krótką historia pijaństwa*. Poznań: Publicat S.A., 2018.
- [11] "World's oldest known beer factory may have been unearthed in Egypt," 2021. [Online]. Available: <https://www.theguardian.com/science/2021/feb/13/worlds-oldest-known-beer-factory-may-have-been-unearthed-in-egypt?fbclid=IwAR0qO7N2picaVFAKIYx3j357Altz9hhDdqAbFtjOL4-wduAxUkV41f2tNGU>. [Accessed: 15-Feb-2021].
- [12] K. M. Ciałowicz, "10 lat badań na Wzgórzu Kurczaka," *Alma Mater UJ*, vol. 99, p. 202, 2008.
- [13] S. Delwen, "Brewing and baking," in *Ancient Egyptian Materials and Technology*, 4th ed., P. Nicholson and I. Shaw, Eds. Cambridge: Cambridge University Press, 2006, pp. 537–576.
- [14] M. Lewis and T. Young, *Piwowarstwo*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN S.A., 2001.
- [15] T. Tuszyński, "Immobilizacja drobnoustrojów," *Laboratorium*, vol. 10, pp. 34–38, 2008.
- [16] N. Grimal, *Dzieje starożytnego Egiptu*. Warszawa: Państwowy Instytut Wydawniczy, 2004.
- [17] S. A. Maksoud, M. N. El Hadidi, W. M. Amer, and T. Herbarium, "Beer from the early dynasties (3500-3400 cal B.C.) of Upper Egypt, detected by archaeochemical methods," *Veg. Hist. Archaeobot.*, no. 3, pp. 219–224, 1994.
- [18] P. K. Skiadas and J. G. Lascaratos, "Original Communication Dietetics in ancient Greek philosophy : Plato ' s concepts of healthy diet," pp. 532–537, 2001.

- [19] N. Martins *et al.*, "LWT - Food Science and Technology An ancient winemaking technology : Exploring the volatile composition of amphora wines," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 96, no. April, pp. 288–295, 2018.
- [20] B. P. Foley, M. C. Hansson, D. P. Kourkouvelis, and T. A. Theodoulou, "Aspects of ancient Greek trade re-evaluated with amphora DNA evidence," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 39, no. 2, pp. 389–398, 2012.
- [21] M. Nelson, "DID ANCIENT GREEKS DRINK BEER?," *Phoenix*, vol. 67, no. 1–2, p. 27, 2014.
- [22] J. Wilkins, D. Harvey, and M. Dobson, *Food in antiquity*. Exeter: University of exeter Press, 1995.
- [23] M. Nelson, "Beer in Greco - Roman Antiquity," The University of British Columbia, 2001.
- [24] M. Nelson, *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. New York: Routledge, 2005.
- [25] Celsus, *On Medicine, Volume I: Books 1-4. Translated by W. G. Spencer*. Cambridge: Harvard University Press, 1935.
- [26] M. Nelson, "To your health! The role of beer in ancient medicine," in *In beer: Production, consumption and health effects*, W. H. Salazar, Ed. Nova science publishers, 2016, pp. 1–25.
- [27] J. Alcock, *Food in Roman Britain*. Cheltenham: The History Press LTD, 2001.
- [28] A. Bowman, *Life and Letters on the Roman Frontier: Vindolanda and its people*, 1st ed. London: British Museum Press, 2004.
- [29] J. Szymański, *Polskie piwo. Biografia (historia lekko podchmielona)*. Warszawa: Fronda, 2018.
- [30] Ian S. Hornsey, *History of Beer and Brewing*. London: RSC Publishing, 2003.
- [31] H. Dornbusch, *Prost! The Story of German Beer*. Boulder: Brewers Publications, 1997.
- [32] J. Harrison, *Old British Beers and How to Make Them*, 1st ed. London: Durden Park Beer Circle, 1991.
- [33] P. Placeway, "Recreating Medieval English Ales," 1998. .
- [34] K. Lechowski, "Prawo czystości," *Piwowar*, vol. 1, p. 24, 2010.
- [35] W. Dylkowski and T. Gołębiowski, *Technologia browarnictwa*. Warszawa: Wydawnictwo przemysłu lekkiego i spożywczego, 1963.
- [36] C. Hansen, Emil, *Practical Studies in Fermentation*. London: E. & F.N., 1896.
- [37] M. Michalik, *Kronika Techniki*. Warszawa: Wydawnictwo Kronika, 1992.
- [38] "Carl von Linde, 1842–1934," *Nature*, vol. 149, p. 1942, 1942.
- [39] A. Tufegdžić and M. R. Blagojević, "Golden era of lager breweries in the southern austro-hungarian empire," *Ind. Archaeol. Rev.*, vol. 37, no. 1, pp. 33–47, 2015.
- [40] H. Okólska, *Piwo we wrocławiu - od średniowiecza po czasy współczesne*. Wrocław: Korab, 2002.
- [41] B. Wojtyra and Ł. Grudzień, "Rozwój przemysłu piwowarskiego w Polsce w okresie tzw. piwnej rewolucji w latach 2011–2016," *Stud. Ind. Geogr. Comm. Polish Geogr. Soc.*, vol. 31, no. 1, pp. 52–67, 2017.

- [42] T. Kopyra, *Piwo wszystko co musisz wiedzieć żeby nie wyjść na głupka*. Kraków: Flow Books, 2016.
- [43] A. J. MacIntosh, M. Josey, and R. A. Speers, "An examination of substrate and product kinetics during brewing fermentations," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 74, no. 4, pp. 250–257, 2016.
- [44] G. Dragone, D. P. Silva, and J. B. De Almeida E Silva, "Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 37, no. 7, pp. 797–802, 2004.
- [45] B. Muster-Slawitsch, M. Hubmann, M. Murkovic, and C. Brunner, "Process modelling and technology evaluation in brewing," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 84, pp. 98–108, 2014.
- [46] I. Parcunev *et al.*, "Modeling of alcohol fermentation in brewing - Some practical approaches," *Proc. - 26th Eur. Conf. Model. Simulation, ECMS 2012*, 2012.
- [47] M.-J. Syu, G. T. Tsao, G. D. Austin, G. Celotto, and T. D'Amore, "Neural Network Modeling for Predicting Brewing Fermentations," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 52, no. 1, pp. 15–19, 1994.
- [48] M. Fanari, M. Forteschi, M. Sanna, M. Zinellu, M. C. Porcu, and L. Pretti, "Comparison of enzymatic and precipitation treatments for gluten-free craft beers production," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 49, no. March, pp. 76–81, 2018.
- [49] M. D. P. Fernández-Gil *et al.*, "Gluten assessment in beers: Comparison by different commercial elisa kits and evaluation of nir analysis as a complementary technique," *Foods*, vol. 10, no. 6, 2021.
- [50] A. S. Hager, J. P. Taylor, D. M. Waters, and E. K. Arendt, "Gluten free beer - A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 36, no. 1, pp. 44–54, 2014.
- [51] *Art. 94 pkt 1 Ustawy o podatku akcyzowym (Dz.U. z 2017 r. poz. 43)*. Poland.
- [52] D. Siedlecki, "Definicja piwa," 2015. [Online]. Available: <https://browarparagraf.com/2015/10/definicja-piwa/>.
- [53] J. Palmer and C. Kaminski, *Water a comprehensive guide for brewers*. Boulder: Brewers Publications, 2013.
- [54] S. Bak *et al.*, *European Brewery Convention: Water in Brewing, Manual of Good Practice*. Nurnberg: European Brewery Convention, 2001.
- [55] F. Hlavacek and A. Lhotsky, *Piwowarstwo*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowo Techniczne, 1969.
- [56] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemia*, 5th ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
- [57] J. Mallet, *Malt A practical guide from field to brewhouse*. Boulder: Brewers Publications, 2014.
- [58] P. M. Malcew, *Technologia i aparatura przemysłu piwowarskiego*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwa Techniczne, 1953.
- [59] D. Ceccaroni, V. Sileoni, O. Marconi, G. De Francesco, E. G. Lee, and G. Perretti, "Specialty rice malt optimization and improvement of rice malt beer aspect and aroma," *Lwt*, vol. 99, no. September 2018, pp. 299–305, 2019.
- [60] L. A. M. Pelembe, J. Dewar, and J. R. . N. Taylor, "Effect of Malting Conditions on Pearl Millet Malt Quality," *J. Inst. Brew.*, vol. 108, no. 1, pp. 7–12, 2002.

- [61] J. Jasnowska, M. Jasnowski, J. Radomski, S. Friedrich, and W. Kowalski, *Botanika*, 3rd ed. Szczecin: Brasika, 2008.
- [62] K. Szulc, "Odmiany jęczmienia browarnego dla słodowni," 2017. [Online]. Available: <https://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/zboza/odmiany-jeczmienia-browarnego-dla-slodowni,69313.html>.
- [63] A. MIKYŠKA and J. PROKEŠ, "Barley storage system and its impact on malt and beer quality.," *Kvas. Prum.*, vol. 55, no. 3, pp. 73–81, 2009.
- [64] W. Kunze, *Technologia piwa i siodu*. Warszawa: Piwochmiel, 1999.
- [65] D. E. Briggs, P. A. Brookes, R. Stevens, and C. A. Boulton, *Brewing: Science and Practice*. CRC Press, 2004.
- [66] C. Müller and F. J. Methner, "An accelerated malting procedure - influences on malt quality and cost savings by reduced energy consumption and malting losses," *J. Inst. Brew.*, vol. 121, no. 2, pp. 181–192, 2015.
- [67] Ian S. Hornsey, *Brewing*, 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2013.
- [68] F. Nowotny, *Chemia i Technologia Przemysłów Rolnych*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, 1961.
- [69] Z. Mirek, H. Piękoś-Mirkowa, A. Zając, and M. Zając, *Flowering Plants and Pteridophytes of Poland. A Checklist*. Kraków: Instytut Botaniki PAN im. Władysława Szafera w Krakowie, 2002.
- [70] S. Tołpa and J. Radomski, *Botanika*, 15th ed. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, 1980.
- [71] P. Tomski, *Rozwój branży piwowarstwa rzemieślniczego wybrane problemy*. Częstochowa: Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, 2020.
- [72] E. Small, "A Numerical and Nomenclatural Analysis of Morpho-Geographic Taxa of *Humulus* Author (s): Ernest Small Published by : American Society of Plant Taxonomists Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2418532> Accessed : 15-05-2016 23 : 11 UTC Your use of the," *Syst. Bot.*, vol. 3, no. 1, pp. 37–76, 1978.
- [73] C. Almaguer, C. Schönberger, M. Gastl, E. K. Arendt, and T. Becker, "Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review," *J. Inst. Brew.*, vol. 120, no. 4, pp. 289–314, 2014.
- [74] J. Harrison, "Microbrewery trials with this material indicate that it will not affect beer quality," *J. Inst. Brew.*, vol. 77, pp. 350–352, 1971.
- [75] M. Verzele, "CENTENARY REVIEW 100 YEARS OF HOP CHEMISTRY AND ITS RELEVANCE TO BREWING," *J. Inst. Brew.*, vol. 92, pp. 32–48, 1986.
- [76] S. Hieronymus, *For the Love of hops The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops*. Boulder: Brewers Association, 2012.
- [77] "Gdzie w Polsce Uprawia się Chmiel," 2019. [Online]. Available: <https://szyskachmielu.pl/uprawa-chmiel-polska/>. [Accessed: 16-Jan-2022].
- [78] J. Dwornikiewicz, "Stan aktualny i perspektywy uprawy chmielu w Polsce do oku 2020," *Stud. i Rap. IUNG-PIB*, vol. 14, pp. 133–146, 2009.
- [79] D. Arora, *Handbook of Fungal Biotechnology*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2004.
- [80] H. Schlegel, *Mikrobiologia ogólna*, 2nd ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.

- [81] Y. Asakawa *et al.*, "Lactobacillus curtus sp. nov., isolated from beer in Finland," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 67, no. 10, pp. 3899–3906, 2017.
- [82] C. Garofalo, A. Osimani, V. Milanović, M. Taccari, L. Aquilanti, and F. Clementi, "The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production," *J. Food Sci.*, vol. 80, no. 12, pp. M2845–M2852, 2015.
- [83] J. Schneiderbanger, F. Jacob, and M. Hutzler, "Genotypic and phenotypic diversity of Lactobacillus rossiae isolated from beer," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 126, no. 4, pp. 1187–1198, 2019.
- [84] P. Preissler, J. Behr, and R. F. Vogel, "Detection of beer-spoilage Lactobacillus brevis strains by reduction of resazurin," *J. Inst. Brew.*, vol. 116, no. 4, pp. 399–404, 2010.
- [85] J. Steensels, L. Daenen, P. Malcorps, G. Derdelinckx, H. Verachtert, and K. J. Verstrepen, "Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 206, pp. 24–38, 2015.
- [86] M. Jackowski and A. Modzelewska, "Dekkera bruxellensis - utrapienie winiarzy i skarb piwowarów," *Kierun. Spożywczy*, vol. 4, pp. 61–63, 2021.
- [87] M. Serra Colomer, B. Funch, and J. Forster, "The raise of Brettanomyces yeast species for beer production," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 56, pp. 30–35, 2019.
- [88] H. M. Esslinger, *Handbook of Brewing*, vol. 1. 2015.
- [89] F. Felix, J. Lisa, S. Michael, M. Hutzler, and F. Jürgen, "Yeast extract production using spent yeast from beer manufacture : influence of industrially applicable disruption methods on selected substance groups with biotechnological relevance," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 245, no. 6, pp. 1169–1182, 2019.
- [90] A. Jaeger, E. K. Arendt, and E. Zannini, "Brewer ' s Spent Yeast (BSY), an Underutilized Brewing By-Product," pp. 1–23, 2020.
- [91] D. Martin, E. Solomon, and J. Berg, *Biologia*, 9th ed. Warszawa: Multico, 2014.
- [92] C. White and J. Zainasheff, *Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation*. Boulder: Brewers Publications, 2010.
- [93] L. Rodríguez, T. Ruiz, J. R. Villanueva, and R. Sentandreu, "Yeast invertase: Subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes," *Curr. Microbiol.*, vol. 1, no. 1, pp. 41–44, 1978.
- [94] M. A. Sainz-Polo *et al.*, "Three-dimensional structure of Saccharomyces invertase: Role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 14, pp. 9755–9766, 2013.
- [95] T. X. Jiang, D. G. Xiao, and Q. Gao, "Characterisation of maltose metabolism in lean dough by lagging and non-lagging baker's yeast strains," *Ann. Microbiol.*, vol. 58, no. 4, pp. 655–660, 2008.
- [96] M. Fehr, W. B. Frommer, and S. Lalonde, "Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 15, pp. 9846–9851, 2002.
- [97] Y. Chen and J. Nielsen, "Yeast has evolved to minimize protein resource cost for synthesizing amino acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 119, no. 4, pp. 10–12, 2022.

- [98] T. Pfeiffer and A. Morley, "An evolutionary perspective on the Crabtree effect," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 1, no. OCT, pp. 1–6, 2014.
- [99] M. Imura, K. Nitta, R. Iwakiri, F. Matsuda, H. Shimizu, and E. Fukusaki, "Comparison of metabolic profiles of yeasts based on the difference of the Crabtree positive and negative," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 129, no. 1, pp. 52–58, 2020.
- [100] J. Piškur, E. Rozpedowska, S. Polakova, A. Merico, and C. Compagno, "How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?," *Trends Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 183–186, 2006.
- [101] D. C. Hess, W. Lu, J. D. Rabinowitz, and D. Botstein, "Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 2012–2023, 2006.
- [102] X. Jin, H. Yang, T. E. Coldea, Y. Xu, and H. Zhao, "Metabonomic analysis reveals enhanced growth and ethanol production of brewer's yeast by wheat gluten hydrolysates and potassium supplementation," *Lwt*, vol. 145, no. March, p. 111387, 2021.
- [103] R. B. De Souza, R. K. Silva, D. S. Ferreira, S. De Sá Leitão Paiva Junior, W. De Barros Pita, and M. A. De Moraes Junior, "Magnesium ions in yeast: Setting free the metabolism from glucose catabolite repression," *Metallomics*, vol. 8, no. 11, pp. 1193–1203, 2016.
- [104] R. M. Birch and G. M. Walker, "Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 26, no. 9–10, pp. 678–687, 2000.
- [105] K. J. Verstrepen, G. Derdelinckx, H. Verachtert, and F. R. Delvaux, "Yeast flocculation: What brewers should know," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 61, no. 3, pp. 197–205, 2003.
- [106] X. Q. Zhao and F. W. Bai, "Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 6, pp. 849–856, 2009.
- [107] X. Q. Zhao, C. Xue, X. M. Ge, W. J. Yuan, J. Y. Wang, and F. W. Bai, "Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation," *J. Biotechnol.*, vol. 139, no. 1, pp. 55–60, 2009.
- [108] X. Q. Zhao and F. wu Bai, "Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role," *J. Biotechnol.*, vol. 158, no. 4, pp. 176–183, 2012.
- [109] R. De Nicola and G. M. Walker, "Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 44, no. 4, pp. 210–216, 2009.
- [110] C. I. S. Rodrigues, A. Wahl, and A. K. Gombert, "Aerobic growth physiology of *Saccharomyces cerevisiae* on sucrose is strain-dependent," *FEMS Yeast Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 1–2, 2021.
- [111] K. Otterstedt *et al.*, "Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO Rep.*, vol. 5, no. 5, pp. 532–537, 2004.
- [112] S. Maicas, "The role of yeasts in fermentation processes," *Microorganisms*, vol. 8, no. 8, pp. 1–8, 2020.
- [113] I. S. Ishtar Snoek and H. Yde Steensma, "Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [114] V. Leskovac, S. Trivić, D. Peričin, M. Popović, and J. Kandrač, "Binding of coenzymes to yeast alcohol dehydrogenase," *J. Serbian Chem. Soc.*, vol. 75, no. 2, pp. 185–194, 2010.
- [115] S. M. G. Saerens, F. R. Delvaux, K. J. Verstrepen, and J. M. Thevelein, "Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microb. Biotechnol.*, vol. 3,

- no. 2, pp. 165–177, 2010.
- [116] “Beer malt explosion parameters,” in *XXIV International Symposium on Combustion Processes*, 2019.
- [117] T. Pazera and T. Rzemieniuk, *Browarnictwo*. Warszawa: Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne, 1998.
- [118] R. Muller, “An assessment of malt friability from analysis of the sound made during milling,” *J. Cereal Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 241–251, 2003.
- [119] S. Yang, S. Hu, Q. Chang, and X. Cheng, “Design of Electronic Control System of 8A Malt Roller Crusher,” *Proc. - 2020 Chinese Autom. Congr. CAC 2020*, pp. 6372–6375, 2020.
- [120] W. Back, M. Gastl, M. Krottenthaler, L. Narzis, and M. Zarnkow, *Brewing Techniques in Practice*. Nuremberg: Fachverlag Hans Carl GmbH, 2019.
- [121] B. S. L. Matthews, H. Byrne, and G. P. Hennigan, “Preparation of a Low Carbohydrate Beer by Mashing at High Temperature with Glucoamylase,” *J. Inst. Brew.*, vol. 107, no. 3, pp. 185–194, 2001.
- [122] A. Juric, Ć. Nevena, A. Odak, Z. Herceg, and M. Tisma, “Analysis of total polyphenols, bitterness and haze in pale and dark lager beers produced under different mashing and boiling conditions,” *J. Inst. Brew.*, vol. 121, pp. 541–547, 2015.
- [123] M. L. Andersen and L. H. Skibsted, “Modification of the Levels of Polyphenols in Wort and Beer by Addition of Hexamethylenetetramine or Sulfite during Mashing,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 5232–5237, 2001.
- [124] C. McGregor and N. McGregor, *The Beer Brewing Guide EBC Quality Handbook for Small Breweries*, 1st ed. Tiel: Lannoo, 2021.
- [125] Y. Shen *et al.*, “Feed nutritional value of brewers’ spent grain residue resulting from protease aided protein removal,” vol. 1, pp. 1–10, 2019.
- [126] J. S. C. Mbagwu and G. C. Ekwealor, “Agronomic potential of brewers’ spent grains,” *Biol. Wastes*, vol. 34, no. 4, pp. 335–347, 1990.
- [127] H. Vural and E. Burc, “Original article Utilization of brewer’s spent grain in the production of Frankfurters,” pp. 1093–1099, 2009.
- [128] K. M. Lynch, E. J. Steffen, and E. K. Arendt, “Brewers’ spent grain: a review with an emphasis on food and health,” *J. Inst. Brew.*, vol. 122, no. 4, pp. 553–568, 2016.
- [129] H. Z. Hassona, “High fibre bread containing brewer’s spent grains and its effect on lipid metabolism in rats,” *Food / Nahrung*, vol. 37, no. 6, pp. 576–582, 1993.
- [130] E. Ferraz, J. Coroado, J. Gamelas, J. Silva, F. Rocha, and A. Velosa, “Spent brewery grains for improvement of thermal insulation of ceramic bricks,” *J. Mater. Civ. Eng.*, vol. 25, no. 11, pp. 1638–1646, 2013.
- [131] W. Russ, H. Mörtel, and R. Meyer-Pittroff, “Application of spent grains to increase porosity in bricks,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 19, no. 2, pp. 117–126, 2005.
- [132] M. Jackowski *et al.*, “Hydrothermal Carbonization of Brewery’s Spent Grains for the Production of Solid Biofuels,” *Beverages*, vol. 5, no. 1, p. 12, 2019.
- [133] M. Jackowski *et al.*, “HTC of Wet Residues of the Brewing Process: Comprehensive Characterization of Produced Beer, Spent Grain and Valorized Residues,” *Energies*, Apr. 2020.

- [134] C. Bougrier, D. Dognin, C. Laroche, V. Gonzalez, D. Benali-Raclot, and J. A. Cacho Rivero, "Anaerobic digestion of Brewery Spent Grains: Trace elements addition requirement," *Bioresour. Technol.*, vol. 247, no. June 2017, pp. 1193–1196, 2018.
- [135] M. P. Olszewski, S. A. Nicolae, P. J. Arauzo, M. M. Titirici, and A. Kruse, "Wet and dry? Influence of hydrothermal carbonization on the pyrolysis of spent grains," *J. Clean. Prod.*, vol. 260, p. 121101, 2020.
- [136] P. Arauzo, M. Olszewski, and A. Kruse, "Hydrothermal Carbonization Brewer's Spent Grains with the Focus on Improving the Degradation of the Feedstock," *Energies*, vol. 11, no. 11, p. 3226, 2018.
- [137] M. Jackowski *et al.*, "Synergetic co-production of beer colouring agent and solid fuel from brewers' spent grain in the circular economy perspective," *Sustain.*, vol. 13, no. 18, 2021.
- [138] M. Jackowski, L. Niedzwiecki, K. Jagiełło, O. Uchańska, and A. Trusek, "Brewer's Spent Grains — Valuable Beer Industry By-Product," *Biomolecules*, vol. 10, no. 12, 2020.
- [139] J. P. Silva *et al.*, "Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 40, no. 3, pp. 309–315, 2004.
- [140] N. G. T. Meneses, S. Martins, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 108, pp. 152–158, 2013.
- [141] A. M. Ferreira, J. Martins, L. H. Carvalho, and F. D. Magalhães, "Biosourced disposable trays made of brewer's spent grain and potato starch," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 5, 2019.
- [142] Y. X. Tan, W. K. Mok, J. Lee, J. Kim, and W. N. Chen, "Solid state fermentation of Brewers' spent grains for improved nutritional profile using *Bacillus subtilis* WX-17," *Fermentation*, vol. 5, no. 3, pp. 1–13, 2019.
- [143] A. Chettrariu and A. Dabija, "Brewer's spent grains: Possibilities of valorization, a review," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 16, pp. 1–17, 2020.
- [144] C. W. Bamforth, I. Russell, and G. Stewart, *Beer: A Quality Perspective A Volume of the Handbook of Alcoholic Beverages Series*. Burlington: Academic Press, 2009.
- [145] M. Desz, *Materiałoznawstwo piwowskie*. Warszawa: Wydawnictwo przemysłu lekkiego i spożywczego, 1955.
- [146] W. Rzędowski, *Klarowanie win i soków pitnych*. Warszawa: Wydawnictwo przemysłu lekkiego i spożywczego, 1956.
- [147] H. Stobińska, Z. Żakowska, D. Kołożyn-Krajewska, L. Krala, Z. Libudzisz, and A. Piątkiewicz, "Utrwalanie żywności," in *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności t2*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.
- [148] B. Vanderhaegen, H. Neven, H. Verachtert, and G. Derdelinckx, "The chemistry of beer aging - A critical review," *Food Chem.*, vol. 95, no. 3, pp. 357–381, 2006.
- [149] "Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2018," 2019. [Online]. Available: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2019/1003_01.html. [Accessed: 13-Oct-2021].
- [150] "Top Beer Companies in the World," 2021. [Online]. Available: <https://www.imarcgroup.com/beer-companies>. [Accessed: 10-Oct-2021].

- [151] B. Woźniak, "Asahi, czyli kim jest nowy właściciel Kompanii Piwowarskiej?," 2016. [Online]. Available: <https://www.portalspozywczy.pl/alkohole-uzywki/wiadomosci/asahi-czyli-kim-jest-nowy-wlasciciel-kompanii-piwowarskiej,138152.html>. [Accessed: 05-Nov-2021].
- [152] M. Jackson, *Beer*, 1st ed. London: Dorling Kindersley Limited, 2007.
- [153] The Brewers of Europe, "European Beer Trends - Statistics Report | 2019 Edition," *Eur. Beer Trends*, p. 36, 2020.
- [154] The Brewers of Europe, "European Beer Trends - Statistics Report | 2020 Edition," *Eur. Beer Trends*, pp. 1–36, 2021.
- [155] Deloitte, "Podsumowanie analizy wybranych wskaźników wpływu przemysłu piwowarskiego na polską gospodarkę i otoczenie," Warszawa, 2018.
- [156] V. Pozynak and D. Rekve, Eds., "Global status report on alcohol and health 2018," World Health Organization, Geneva, 2018.
- [157] H. Ciborowska and A. Rudnicka, *Dietetyka Żywnienie zdrowego i chorego człowieka*, 4th ed. Warszawa: PZWL, 2019.
- [158] J. Olšovská, K. Štěřba, T. Vrzal, and P. Čejka, "Nutritional composition and energy value of different types of beer and cider," *Kvas. Prum.*, vol. 65, no. 1, pp. 32–37, 2019.
- [159] S. Jongberg, M. L. Andersen, and M. N. Lund, "Characterisation of protein-polyphenol interactions in beer during forced aging," *J. Inst. Brew.*, vol. 126, no. 4, pp. 371–381, 2020.
- [160] E. M. Kahle, M. Zarnkow, and F. Jacob, "Beer Turbidity Part 1: A Review of Factors and Solutions," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–16, 2020.
- [161] C. W. Bamforth, "Nutritional aspects of beer - A review," *Nutr. Res.*, vol. 22, no. 1–2, pp. 227–237, 2002.
- [162] J. P. Bellia, J. D. Birchall, N. B. Roberts, C. T. Price, K. J. Koval, and J. R. Langford, "Beer: a dietary source of silicon.," *Lancet (London, England)*, vol. 343, no. 8891, p. 316783, Jan. 1994.
- [163] C. T. Price, K. J. Koval, and J. R. Langford, "Silicon: a review of its potential role in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis.," *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2013, p. 316783, 2013.
- [164] R. A. Carciochi, C. A. Sologubik, B. Fern, G. D. Manrique, L. Galv, and D. A. Id, "Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds from Brewer ' s Spent Grain : Optimization and Kinetics Modeling," 2018.
- [165] R. I. Birsan, P. Wilde, K. W. Waldron, and D. K. Rai, "Recovery of polyphenols from brewer's spent grains," *Antioxidants*, vol. 8, no. 9, pp. 1–12, 2019.
- [166] A. Fărcaș *et al.*, "Brewers ' spent grain – A new potential ingredient for functional foods," 2014.
- [167] L. F. Guido and M. M. Moreira, "Techniques for Extraction of Brewer's Spent Grain Polyphenols: a Review," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1192–1209, 2017.
- [168] J. F. Stevens and J. E. Page, "Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health!," *Phytochemistry*, vol. 65, no. 10, pp. 1317–1330, 2004.
- [169] P. J. Magalhães, D. O. Carvalho, J. M. Cruz, L. F. Guido, and A. A. Barros, "Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer.," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 4, no. 5, pp. 591–610, May 2009.

- [170] W. Chen, T. Becker, F. Qian, and J. Ring, "Beer and beer compounds: Physiological effects on skin health," *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 28, no. 2, pp. 142–150, 2014.
- [171] S. Campillo *et al.*, "Effect of treatment with xanthohumol on cardiological alterations secondary to ageing," *J. Funct. Foods*, vol. 49, no. February, pp. 44–51, 2018.
- [172] L. L. Legette *et al.*, "Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats," *Phytochemistry*, vol. 91, pp. 236–241, 2013.
- [173] S. Wei, T. Sun, J. Du, B. Zhang, D. Xiang, and W. Li, "Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro," *Oncol. Rep.*, vol. 40, no. 6, pp. 3213–3222, 2018.
- [174] S. Sohrabvandi, A. M. Mortazavian, and K. Rezaei, "Health-related aspects of beer: A review," *Int. J. Food Prop.*, vol. 15, no. 2, pp. 350–373, 2012.
- [175] M. Di Domenico *et al.*, "Antioxidant Effect of Beer Polyphenols and Their Bioavailability in Dental-Derived Stem Cells (D-dSCs) and Human Intestinal Epithelial Lines (Caco-2) Cells," *Stem Cells Int.*, vol. 2020, 2020.
- [176] E. Szliszka and W. Krol, "The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention," *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 20, no. 1, pp. 63–69, 2011.
- [177] O. Lapcák, M. Hill, R. Hampl, K. Wähälä, and H. Adlercreutz, "Identification of isoflavonoids in beer," *Steroids*, vol. 63, no. 1, pp. 14–20, 1998.
- [178] C. Gerhäuser, "Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents.," *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 13, pp. 1941–1954, Sep. 2005.
- [179] S. Nadova, E. Miadokova, and L. Cipak, "Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis.," *Neoplasma*, vol. 54, no. 3, pp. 202–206, 2007.
- [180] K. Brusselmans, R. Vrolix, G. Verhoeven, and J. V. Swinnen, "Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 7, pp. 5636–5645, 2005.
- [181] X. L. Tang *et al.*, "Protective Effect of Kaempferol on LPS plus ATP-Induced Inflammatory Response in Cardiac Fibroblasts," *Inflammation*, vol. 38, no. 1, pp. 94–101, 2014.
- [182] S. Y. Nam, H. J. Jeong, and H. M. Kim, "Kaempferol impedes IL-32-induced monocyte-macrophage differentiation," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 274, pp. 107–115, 2017.
- [183] W. Alam, H. Khan, M. A. Shah, O. Cauli, and L. Saso, "Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: Current Therapeutic Standing," *Molecules*, vol. 25, no. 18, pp. 1–12, 2020.
- [184] J. I. Arranz, M. T. Miranda, F. J. Sepúlveda, I. Montero, and C. V. Rojas, "Analysis of Drying of Brewers' Spent Grain," *Proceedings*, vol. 2, no. 23, p. 1467, 2018.
- [185] S. Arranz, G. Chiva-Blanch, P. Valderas-Martínez, A. Medina-Remón, R. M. Lamuela-Raventós, and R. Estruch, "Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer," *Nutrients*, vol. 4, no. 7, pp. 759–781, 2012.
- [186] H. J. Jeong, J. B. Jeong, C. C. Hsieh, B. Hernández-Ledesma, and B. O. De Lumen, "Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in in vivo and in vitro studies," *Nutr. Cancer*, vol. 62, no. 8, pp. 1113–1119, 2010.

- [187] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, and H. Taniguchi, "Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 7, pp. 2161–2168, 2002.
- [188] R. Pulido, L. Bravo, and F. Saura-Calixto, "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 3396–3402, 2000.
- [189] E. Graf, "Antioxidant potential of ferulic acid," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 435–448, 1992.
- [190] E. Barone, V. Calabrese, and C. Mancuso, "Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases," *Biogerontology*, vol. 10, no. 2, pp. 97–108, 2009.
- [191] H. Takahashi, M. Kashimura, H. Koiso, T. Kuda, and B. Kimura, "Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food," *Food Control*, vol. 33, no. 1, pp. 244–248, 2013.
- [192] B. I. Mcmurrough, D. Madigan, D. Donnelly, J. Hurley, and A. Doyle, "Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing," *J. Inst. Brew.*, vol. 102, pp. 327–332, 1996.
- [193] S. Hong, Y. Iizuka, T. Lee, C. Y. Kim, and G. J. Seong, "Neuroprotective and neurite outgrowth effects of maltol on retinal ganglion cells under oxidative stress.," *Mol. Vis.*, vol. 20, no. June, pp. 1456–62, 2014.
- [194] W. Liu *et al.*, "The liver protection effects of maltol, a flavoring agent, on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via inhibiting apoptosis and inflammatory response," *Molecules*, vol. 23, no. 9, 2018.
- [195] Y. Han, Q. Xu, J. N. Hu, X. Y. Han, W. Li, and L. C. Zhao, "Maltol, a food flavoring agent, attenuates acute alcohol-induced oxidative damage in mice," *Nutrients*, vol. 7, no. 1, pp. 682–696, 2015.
- [196] Y. Yang, J. Wang, C. Xu, H. Pan, and Z. Zhang, "Maltol Inhibits Apoptosis of Human Neuroblastoma Cells Induced by Hydrogen Peroxide," *BMB Rep.*, vol. 39, no. 2, pp. 145–149, 2011.
- [197] T. Hampson, *The 50 greatest beers of the world*. London: Icon Books Ltd, 2016.
- [198] J. L. Taylor, N. Dolhert, L. Friedman, M. Mumenthaler, and J. A. Yesavage, "Alcohol elimination and simulator performance of male and female aviators: a preliminary report.," *Aviat. Space Environ. Med.*, vol. 67, no. 5, pp. 407–413, May 1996.
- [199] H. R. Thomasson, "Gender Differences in Alcohol Metabolism BT - Recent Developments in Alcoholism: Alcoholism and Women," M. Galanter, H. Begleiter, R. Deitrich, D. Gallant, D. Goodwin, E. Gottheil, A. Paredes, M. Rothschild, D. Van Thiel, and H. Edwards, Eds. Boston, MA: Springer US, 1995, pp. 163–179.
- [200] H. Moskowitz and M. Burns, "Effects of alcohol on driving performance.," *Alcohol Heal. Res. World*, vol. 14, no. 1, pp. 12–14, 1990.
- [201] M. S. Mumenthaler, J. L. Taylor, R. O'Hara, and J. A. Yesavage, "Gender differences in moderate drinking effects," *Alcohol Res. Heal.*, vol. 23, no. 1, pp. 55–64, 1999.
- [202] D. F. Hermens and J. Lagopoulos, "Binge drinking and the young brain: A mini review of the neurobiological underpinnings of alcohol-induced blackout," *Front. Psychol.*, vol. 9, no. JAN, pp. 1–7, 2018.

- [203] A. Cservenka and T. Brumback, "The burden of binge and heavy drinking on the brain: Effects on adolescent and young adult neural structure and function," *Front. Psychol.*, vol. 8, no. JUN, 2017.
- [204] M. E. Rose and J. E. Grant, "Alcohol-Induced Blackout," *J Addict Med*, vol. 4, no. 2, pp. 61–73, 2010.
- [205] M. L. Risher *et al.*, "Adolescent Intermittent Alcohol Exposure: Persistence of Structural and Functional Hippocampal Abnormalities into Adulthood," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 989–997, 2015.
- [206] F. Fadda, "Chronic ethanol consumption:from neuroadaptation to neurodegeneration," *Prog. Neurobiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 385–431, 1998.
- [207] D. M. Lovinger, "Excitotoxicity and alcohol-related brain damage.," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 19–27, Feb. 1993.
- [208] N. Spoerke *et al.*, "Effects of ethanol intoxication and gender on blood coagulation," *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care*, vol. 68, no. 5, pp. 1106–1110, 2010.
- [209] M. R. Cook, S. G. Louis, S. P. McCully, R. S. Stucke, S. P. Fabricant, and M. A. Schreiber, "Positive blood alcohol is associated with reduced DVT in trauma," *Injury*, vol. 46, no. 1, pp. 131–135, 2015.
- [210] S. Smith, K. Fair, A. Goodman, J. Watson, C. Dodgion, and M. Schreiber, "Consumption of alcohol leads to platelet inhibition in men," *Am. J. Surg.*, vol. 217, no. 5, pp. 868–872, 2019.
- [211] J. M. Gaziano and J. E. Manson, "Diet and heart disease. The role of fat, alcohol, and antioxidants.," *Cardiol. Clin.*, vol. 14, no. 1, pp. 69–83, Feb. 1996.
- [212] E. R. De Oliveira e Silva *et al.*, "Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II," *Circulation*, vol. 102, no. 19 SUPPL., pp. 2347–2352, 2000.
- [213] I. Suh, B. J. Shaten, J. A. Cutler, and L. H. Kuller, "Alcohol use and mortality from coronary heart disease: the role of high-density lipoprotein cholesterol. The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 116, no. 11, pp. 881–887, Jun. 1992.
- [214] P. Brennan *et al.*, "Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review.," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 159, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2004.
- [215] A. J. Wright and D. L. Pyle, "An investigation into the use of the spinning cone column for in situ ethanol removal from a yeast broth," *Process Biochem.*, vol. 31, no. 7, pp. 651–658, 1996.
- [216] P. Boffetta and M. Hashibe, "Alcohol and cancer," *Lancet Oncol.*, vol. 7, no. 2, pp. 149–156, 2006.
- [217] Y. Cho, S. Choi, K. Kim, G. Lee, and S. M. Park, "Association between alcohol consumption and bone mineral density in elderly Korean men and women," *Arch. Osteoporos.*, vol. 13, no. 1, 2018.
- [218] D. J. McLernon, J. J. Powell, R. Jugdaohsingh, and H. M. Macdonald, "Do lifestyle choices explain the effect of alcohol on bone mineral density in women around menopause?," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 95, no. 5, pp. 1261–1269, May 2012.
- [219] K. Mojka, "Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych," *Probl. Hig. Epidemiol.*, vol. 94(4), no. 4, pp. 722–729, 2013.

- [220] F. Allen and D. Cantwell, *Barley Wine: History, Brewing Techniques, Recipes*. Boulder: Brewers Publications, 1998.
- [221] *Ustawa z dnia 26 października 1982 r. o wychowaniu w trzeźwości i przeciwdziałaniu alkoholizmowi*. Poland.
- [222] D. Siedlecki, "Piwo bezalkoholowe, niskoalkoholowe - słów kilka o definicjach," 2020. [Online]. Available: <https://browarparagraf.com/2020/09/piwo-bezalkoholowe-niskoalkoholowe-slow-kilka-o-definicjach/>. [Accessed: 26-Jan-2022].
- [223] M. Müller, K. Bellut, J. Tippmann, and T. Becker, "Physical Methods for Dealcoholization of Beverage Matrices and their Impact on Quality Attributes," *ChemBioEng Rev.*, no. 5, pp. 310–326, 2017.
- [224] G. Krebs, M. Müller, T. Becker, and M. Gastl, "Characterization of the macromolecular and sensory profile of non-alcoholic beers produced with various methods," *Food Res. Int.*, vol. 116, no. August 2018, pp. 508–517, 2019.
- [225] M. Jackowski and A. Trusek, "Non-Alcoholic beer production-an overview," *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 20, no. 4, 2018.
- [226] L. Cloninger, "Alcohol determination of malt-based beverages by rapid distillation," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 76, no. 1, pp. 21–23, 2018.
- [227] C. Andrés-Iglesias, C. A. Blanco, J. García-Serna, V. Pando, and O. Montero, "Volatile Compound Profiling in Commercial Lager Regular Beers and Derived Alcohol-Free Beers After Dealcoholization by Vacuum Distillation," *Food Anal. Methods*, vol. 9, no. 11, pp. 3230–3241, 2016.
- [228] M. Jackowski, "Piwo bezalkoholowe - jakie to proste," *Przem. Spożywczy*, vol. 75, no. 8, pp. 45–47, 2021.
- [229] J. Wiśniewski and A. Różańska, "Ekonomiczne aspekty odzyskiwania kwasów i soli metali ze ścieków przemysłowych," *Ochr. środowiska*, vol. 29, no. 2, pp. 43–47, 2007.
- [230] A. Narębska and M. Staniszewski, "Separation of carboxylic acids from carboxylates by diffusion dialysis," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 3, pp. 490–501, 2008.
- [231] S. Donhauser, K. Glas, and O. Mueller, "Behavior of beer components during the manufacture of alcohol-reduced products by dialysis," *Brauwelt Int.*, no. 2, pp. 139–144, 1991.
- [232] T. Brányik, D. P. Silva, M. Baszczyński, R. Lehnert, and J. B. Almeida E Silva, "A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production," *J. Food Eng.*, vol. 108, no. 4, pp. 493–506, 2012.
- [233] I. J. Leskosek and M. Mitrovic, "Optimization of beer dialysis with cuprophane membranes," *J. Inst. Brew.*, vol. 100, no. July-August, pp. 287–292, 1994.
- [234] I. Leskošek, M. Mitrović, and V. Nedović, "Factors influencing alcohol and extract separation in beer dialysis," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 11, no. 5, pp. 512–514, 1995.
- [235] I. G. Wenten and Khoiruddin, "Reverse osmosis applications: Prospect and challenges," *Desalination*, vol. 391, pp. 112–125, 2016.
- [236] L. Liguori, G. De Francesco, P. Russo, G. Perretti, D. Albanese, and M. Di Matteo, "Production and characterization of alcohol-free beer by membrane process," *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, pp. 158–168, 2015.

- [237] L. F. Greenlee, D. F. Lawler, B. D. Freeman, B. Marrot, and P. Moulin, "Reverse osmosis desalination: Water sources, technology, and today's challenges," *Water Res.*, vol. 43, no. 9, pp. 2317–2348, 2009.
- [238] A. Basile and A. Figoli, *Pervaporation, Vapour Permeation and Membrane Distillation*. 2015.
- [239] Q. Wang, N. Li, B. Bolto, M. Hoang, and Z. Xie, "Desalination by pervaporation: A review," *Desalination*, vol. 387, pp. 46–60, 2016.
- [240] W. Kaminski, J. Marszałek, and E. Tomczak, "Water desalination by pervaporation – Comparison of energy consumption," *Desalination*, vol. 433, no. February, pp. 89–93, 2018.
- [241] L. Takács, G. Vatai, and K. Korány, "Production of alcohol free wine by pervaporation," *J. Food Eng.*, vol. 78, no. 1, pp. 118–125, 2007.
- [242] R. Castro-Muñoz, "Pervaporation-based membrane processes for the production of non-alcoholic beverages," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 5, pp. 2333–2344, 2019.
- [243] A. Dawiec-Liśniewska, A. Szumny, D. Podstawczyk, and A. Witek-Krowiak, "Concentration of natural aroma compounds from fruit juice hydrolates by pervaporation in laboratory and semi-technical scale. Part 1. Base study," *Food Chem.*, vol. 258, no. March, pp. 63–70, 2018.
- [244] S. V. Makarytchev, T. A. G. Langrish, and R. G. H. Prince, "Structure and regimes of liquid film flow in spinning cone columns," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 53, no. 8, pp. 1541–1550, 1998.
- [245] S. V. Makarytchev, T. A. G. Langrish, and D. F. Fletcher, "CFD analysis of scale effects in spinning cone columns," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 83, no. 8 A, pp. 951–958, 2005.
- [246] H. Błasiński and B. Młodziński, *Aparatura przemysłu chemicznego*, 3rd ed. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1983.
- [247] F. Huerta-Pérez and J. R. Pérez-Correa, "Optimizing ethanol recovery in a spinning cone column," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 83, pp. 1–9, 2018.
- [248] M. F. Graber, J. R. Pérez-Correa, G. Verdugo, J. M. D. Valle, and E. Agosin, "Spinning cone column isolation of rosemary essential oil," *Food Control*, vol. 21, no. 5, pp. 615–619, 2010.
- [249] Y. Y. Belisario-Sánchez, A. Taboada-Rodríguez, F. Marín-Iñiesta, A. Iguaz-Gainza, and A. López-Gómez, "Aroma Recovery in Wine Dealcoholization by SCC Distillation," *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 6, pp. 2529–2539, 2012.
- [250] Y. Y. Bellsario-Sánchez, A. Taboada-Rodríguez, F. Marín-Iñiesta, and A. López-Gómez, "Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: Phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl method," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 15, pp. 6770–6778, 2009.
- [251] M. Catarino and A. Mendes, "Non-alcoholic beer - A new industrial process," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 79, no. 3, pp. 342–351, 2011.
- [252] P. Moreira da Silva and B. De Wit, "Spinning cone column distillation – innovative technology for beer dealcoholisation.," *Cerevisia*, vol. 33, pp. 91–95, 2008.
- [253] W. Xiang *et al.*, "Enhanced adsorption performance and governing mechanisms of ball-milled biochar for the removal of volatile organic compounds (VOCs)," *Chem. Eng. J.*, vol. 385, no. November 2019, p. 123842, 2020.
- [254] F. Raganati, A. Procentese, G. Olivieri, M. E. Russo, P. Salatino, and A. Marzocchella, "Bio-butanol recovery by adsorption/desorption processes," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 235, no.

September 2019, p. 116145, 2020.

- [255] M. Hajilari, A. Shariati, and M. Khosravi-Nikou, "Mass transfer determination of ethanol adsorption on activated carbon: kinetic adsorption modeling," *Heat Mass Transf. und Stoffuebertragung*, vol. 55, no. 8, pp. 2165–2171, 2019.
- [256] D. Nesheva *et al.*, "Phase characterization and ethanol adsorption in TiO₂ nanotubes anodically grown on Ti6Al4V alloy substrates," *J. Alloys Compd.*, vol. 798, pp. 394–402, 2019.
- [257] P. Liu, J. Liu, and M. Wang, "Adsorption of ethanol molecules on the Al (1 1 1) surface: A molecular dynamic study," *R. Soc. Open Sci.*, vol. 6, no. 1, 2019.
- [258] M. Jackowski and A. Trusek, "Non-alcoholic beer production – an overview," *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 20, no. 4, pp. 32–38, 2018.
- [259] R. Muller, "the Effects of Mashing Temperature and Mash Thickness on Wort Carbohydrate Composition," *J. Inst. Brew.*, vol. 97, no. 2, pp. 85–92, 1991.
- [260] C. Zürcher and R. Gruss, "Method of making alcohol-free or nearly alcohol-free beer," 1990.
- [261] R. Muller, "The production of low-alcohol and alcohol-free beers by limited fermentations," *Ferment*, vol. 3, pp. 224–230, 1990.
- [262] R. Vejarano, "Saccharomyces ludwigii, control and potential uses in winemaking processes," *Fermentation*, vol. 4, no. 3, pp. 1–19, 2018.
- [263] G. De Francesco, B. Turchetti, V. Sileoni, O. Marconi, and G. Perretti, "Screening of new strains of Saccharomyces ludwigii and Zygosaccharomyces rouxii to produce low-alcohol beer," *J. Inst. Brew.*, vol. 121, no. 1, pp. 113–121, 2015.
- [264] M. Jackowski, "Microorganisms potential for non-alcoholic beer production," in *ChemBioTIC Chemistry & Biotechnology International Conference*, 2021, p. 58.
- [265] S. Sohrabvandi, S. H. Rasavi, and S. M. Mousavi, "Application of Saccharomyces rouxii for the Production of non-alcoholic beer," vol. 18, no. 5, pp. 1132–1137, 2009.
- [266] L. Canonico, A. Agarbati, F. Comitini, and M. Ciani, "Torulaspora delbrueckii in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content," *Food Microbiol.*, vol. 56, pp. 45–51, 2016.
- [267] E. Coton, M. Coton, D. Levert, S. Casaregola, and D. Sohier, "Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 108, no. 1, pp. 130–135, 2006.
- [268] J. Varela and C. Varela, "Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 56, pp. 88–96, 2019.
- [269] F. K. N'Guessan, D. Y. N'Dri, F. Camara, and M. K. Djè, "Saccharomyces cerevisiae and Candida tropicalis as starter cultures for the alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 693–699, 2010.
- [270] W. H. Coulibaly, K. F. N'guessan, I. Coulibaly, M. Cot, P. Rigou, and K. M. Djè, "Influence of freeze-dried yeast starter cultures on volatile compounds of tchapalo, a traditional sorghum beer from côte d'ivoire," *Beverages*, vol. 2, no. 4, pp. 1–9, 2016.
- [271] W. Bednarski and A. Rejs, *Biotechnologia żywności*, 2nd ed. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2003.
- [272] P. H. Pilkington, A. Margaritis, N. A. Mensour, and I. Russell, "Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review," *J. Inst. Brew.*, vol. 104, no. 1, pp. 19–

31, 1998.

- [273] N. A. Mensour, A. Margaritis, C. L. Briens, H. Pilkington, and I. Russell, "New Developments in the Brewing Industry Using Immobilised Yeast Cell Bioreactor Systems," *J. Inst. Brew.*, vol. 103, no. 6, pp. 363–370, 1997.
- [274] V. Naydenova, M. Badova, S. Vassilev, V. Iliev, M. Kaneva, and G. Kostov, "Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: Lab scale optimization of lager beer fermentation," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 28, no. 2, pp. 277–284, 2014.
- [275] R. Lehnert, P. Novák, F. Macieira, M. Kuřec, J. A. Teixeira, and T. Brányik, "Optimisation of lab-scale continuous alcohol-free beer production," *Czech J. Food Sci.*, vol. 27, no. 4, pp. 267–275, 2009.
- [276] A. Mota *et al.*, "Formation of flavor-active compounds during continuous alcohol-free beer production: The influence of yeast strain, reactor configuration, and carrier type," *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–7, 2011.
- [277] E. Szczepańska and F. Boratyński, "Dehydrogenazy Alkoholowe Pochodzenia Mikrobiologicznego-Właściwości I Ich Zastosowanie Microbial Alcohol Dehydrogenases-Properties and Their Application," *Wiadomości Chem.*, vol. 68, pp. 11–12, 2014.
- [278] Y. Pocker, "Bioinorganic and bioorganic studies of liver alcohol dehydrogenase," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 130–132, pp. 383–393, 2001.
- [279] M. Łaniewska-Dunaj, W. Jelski, and M. Szmitkowski, "Dehydrogenaza alkoholowa - Znaczenie fizjologiczne i diagnostyczne," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 67, pp. 901–907, 2013.
- [280] E. Czech and M. Hartleb, "Polimorfizm genetyczny dehydrogenazy alkoholowej – znaczenie patofizjologiczne," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 12, no. 6, pp. 801–809, 2003.
- [281] J. Rumble, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 103rd ed. CRC Press, 2021.
- [282] M. J. Callejo *et al.*, "Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 245, no. 6, pp. 1229–1238, 2019.
- [283] L. N. Borshchevskaya, T. L. Gordeeva, A. N. Kalinina, and S. P. Sineokii, "Spectrophotometric determination of lactic acid," *J. Anal. Chem.*, vol. 71, no. 8, pp. 755–758, 2016.
- [284] S. A. Pieczonka *et al.*, "Hidden in its color: A molecular-level analysis of the beer's Maillard reaction network," *Food Chem.*, vol. 361, no. March, 2021.
- [285] S. A. Pieczonka, S. Paravicini, M. Rychlik, and P. Schmitt-Kopplin, "On the Trail of the German Purity Law: Distinguishing the Metabolic Signatures of Wheat, Corn and Rice in Beer," *Front. Chem.*, vol. 9, no. July, pp. 1–12, 2021.
- [286] S. Ou and K. C. Kwok, "Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 84, no. 11, pp. 1261–1269, 2004.
- [287] S. Coghe, K. Benoot, F. Delvaux, B. Vanderhaegen, and F. R. Delvaux, "Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 3, pp. 602–608, 2004.
- [288] A. M. Mortazavian, S. H. Razavi, S. M. Mousavi, S. Malganji, and S. Sohrabvandi, "The effect of *Saccharomyces* strain and fermentation conditions on quality parameters of non-alcoholic beer," *J. Paramed. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 21–26, 2014.

- [289] J. Aguilera, F. Randez-Gil, and J. A. Prieto, "Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: New functions for old mechanisms," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 327–341, 2007.
- [290] T.-F. L. Lin, Y.-L. Chen, and T.-H. Wang, "Method for Producing Beer-Like and Alcohol-Free Fermented Beverage," GB2414486A, 2005.
- [291] H. Hajjaj, P. Blanc, E. Groussac, J. L. Uribelarrea, G. Goma, and P. Loubiere, "Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 8, pp. 619–625, 2000.
- [292] A. M. Moharram, M. Eman Mostafa, and M. A. Ismail, "Chemical profile of *Monascus ruber* strains," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 50, no. 4, pp. 490–499, 2012.
- [293] P. Patakova, "Monascus secondary metabolites: Production and biological activity," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 2, pp. 169–181, 2013.
- [294] G. De Francesco, B. Turchetti, V. Sileoni, O. Marconi, and G. Perretti, "Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer," *J. Inst. Brew.*, vol. 121, no. 1, pp. 113–121, 2015.
- [295] A. Mohammadi, S. H. Razavi, S. M. Mousavi, and K. Rezaei, "A Comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces rouxii* on brewer's spent grain," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 42, no. 2, pp. 605–615, 2011.
- [296] D. Leszczak, "Browar Nepomucen," 2018. [Online]. Available: <https://czaswina.pl/artykul/browar-nepomucen/>. [Accessed: 02-Jan-2022].
- [297] P. Piechocki, "Woda chmielowa rdzą przyprawiona (Nepomucen vs Browar Jana)," 2016. [Online]. Available: <https://www.piwnybrodacz.pl/2016/11/woda-chmielowa-rdza-przyprawiona.html>. [Accessed: 02-Jan-2022].
- [298] A. J. Toth *et al.*, "Treatment of Pharmaceutical Process Wastewater with Hybrid Separation Method: Distillation and Hydrophilic Pervaporation," *Waste Treat. Recover.*, vol. 3, no. 1, pp. 8–13, 2018.
- [299] P. Di Matteo, M. Stoller, R. Petrucci, and P. Russo, "Development of a diafiltration-pervaporation process for beer dealcoholisation," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 87, no. August 2020, pp. 13–18, 2021.
- [300] J. Short, C. Li, K. O'Brien, and T. D'Andrea, "Thermal decomposition kinetics of iso-alpha-acids," in *Proceedings of the 75th ASBC Annual Meeting*, 2014.

X Materiały dodatkowe

Dodatek 1. Karta testów organoleptycznych

Karta testów organoleptycznych	
Numer próbki:	
Każdą wartość proszę ocenić w skali od 1 do 5, gdzie 1 to aromat/smak niewyczuwalny, zaś 5 to aromat/smak dominujący	
Parametr	Ocena od 1 do 5
goryczka	
słodczy	
kwaśność	
aromat roślinny	
aromat słodki	
aromat alkoholowy	
aromat drożdżowy	
uczucie orzeźwienia	

Dodatek 2. Skrypt z programu Matlab służący do obliczania macierzy odpowiedzi według metodyki Boxa Benkhena

```
clc
clear
close all
runorder = randperm(15);
% Box-Behnken Design
z = bbdesign(3);
% Input values [min max;min max;min max]
dane = [6 14;10 40;1 3];
% coding
x = zeros(size(z));
for i = 1:size(z,2)
    zmax = max(z(:,i));
    zmin = min(z(:,i));
    x(:,i) = interp1([zmin zmax],dane(i,:),z(:,i));
end
% Output values y=[y1,y2,y3...] or y=[y1 y2 y3...]
y = [2.371
2.562
4.954
5.834
3.068
```

```

2.491
3.570
6.486
3.960
4.073
4.641
4.461
4.377
4.379
4.374]';
xname={'x1'; 'x2'; 'x3'};
yname={'y'};
% fitting function
s = regstats(y,x, 'quadratic'); % uncoded
s1 = regstats(y, z, 'quadratic'); % coded
b=s.beta;
% two factors
xb=[z(:,1), z(:,2)];
xc=[z(:,1), z(:,3)];
xd=[z(:,2), z(:,3)];
s2=regstats(y, xb, 'quadratic');
s3=regstats(y, xc, 'quadratic');
s4=regstats(y, xd, 'quadratic');
b1=s2.beta;
b2=s3.beta;
b3=s4.beta;
% correlation coefficient
R=s1.rsquare;
disp('R^2')
disp(R)
% 3D plots
x1 = z(:,1);
x2 = z(:,2);
x3 = z(:,3);
xx1 = linspace(min(x1),max(x1),25);
xx2 = linspace(min(x2),max(x2),25);
xx3 = linspace(min(x3),max(x3),25);
axes('FontSize',12)
[X1,X2] = meshgrid(xx1,xx2);
Y = b1(1) + b1(2)*X1 + b1(3)*X2+ ...
b1(4)*X1.*X2 + ...
b1(5)*X1.^2 + b1(6)*X2.^2;
subplot(2,2,1)
surfc(X1,X2,Y)
% axes label x-X1 y-X2 z-Y
xlabel('Stężenie cukrów [g/100g]')
ylabel('Goryczka [IBU]')
zlabel('Stężenie etanolu [%]')
title('A')
axes('FontSize',12)
[X1,X3] = meshgrid(xx1,xx3);

```

```

Y = b2(1) + b2(2)*X1 + b2(3)*X3+ ...
b2(4)*X1.*X3 + ...
b2(5)*X1.^2 + b2(6)*X3.^2;
subplot(2,2,2)
surfc(X1,X3,Y)
% axes label x-X1 y-X3 z-Y
xlabel('Stężenie cukrów [g/100g]')
ylabel('Stosunek biomasy [-]')
zlabel('Stężenie etanolu [%]')
title('B')
axes('FontSize',12)
[X2,X3] = meshgrid(xx2,xx3);
Y = b3(1) + b3(2)*X2 + b3(3)*X3+ ...
b3(4)*X2.*X3 + ...
b3(5)*X2.^2 + b3(6)*X3.^2;
subplot(2,2,3)
surfc(X2,X3,Y)
% axes label x-X2 y-X3 z-Y
xlabel('Goryczka [IBU]')
ylabel('Stosunek biomasy [-]')
zlabel('Stężenie etanolu [%]')
title('C')
% optimization
f = @(x) -x2fx(x, 'quadratic')*s1.beta;
lb = [-1 -1 -1]; ub = [1 1 1]; x0 = [0 0 0];
[optfactors, fval] = fmincon(f,x0,[],[],[],[],lb,ub);
maxval = -fval;
maxloc = (optfactors + 1)';
add_term = maxloc*((dane(:,2) - dane(:,1))/2)';
maxloc = dane(:,1) + diag(add_term);
disp('Optimal Values:')
disp({'x1','x2','x3','Y'})
disp([maxloc' maxval])
% plot predicted vs. experimental
xs=linspace(0,90); % tutaj ustawiasz od 0 do maksymalnej wartości odpowiedzi + 5
ys=xs;
figure
plot(y,s1.yhat, 'r.', xs, ys)
xlabel('Experimental values')
ylabel('Teoritical values')
% tu wyrzuca predicted response values
disp('predicted')
disp(s1.yhat)
[RR,p]=corrcoef(y,s1.yhat); % współczynnik korelacji predicted vs. experimental
% ANOVA
f = s.fstat;
fprintf('\n')
fprintf('Regression ANOVA');
fprintf('\n\n')
fprintf('%6s', 'Source');
fprintf('%10s', 'df', 'SS', 'MS', 'F', 'P');

```

```
fprintf('\n')
fprintf('%6s','Regr');
fprintf('%10.4f',f.dfr,f.ssr,f.ssr/f.dfr,f.f,f.pval);
fprintf('\n')
fprintf('%6s','Resid');
fprintf('%10.4f',f.dfe,f.sse,f.sse/f.dfe);
fprintf('\n')
fprintf('%6s','Total');
fprintf('%10.4f',f.dfe+f.dfr,f.sse+f.ssr);
fprintf('\n')
res1=s1.tstat.beta;
res2=s1.tstat.se;
res3=s1.tstat.pval;
res4=s1.tstat.t;
res5=s1.tstat.dfe;
% współczynniki w równaniu kwadratowym dla wartości zakodowanych
disp('beta')
disp(s1.beta)
```