

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia



**mgr inż. Justyna Paszkot**

**Projektowanie piw ciemnych o wysokim potencjale  
antyoksydacyjnym**

Designing of dark beers with high antioxidant potential

**Rozprawa doktorska**

Promotor:  
prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska

Wrocław 2023

## SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE .....	3
ABSTRACT .....	6
1. Wprowadzenie .....	9
2. Cel pracy .....	21
3. Hipotezy badawcze .....	22
4. Postępowanie eksperymentalne .....	23
5. Wykaz prac stanowiących cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....	32
6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....	33
7. Podsumowanie .....	50
8. Wnioski .....	53
9. Literatura .....	56
10. Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej .....	63
11. Oświadczenia współautorów publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej .....	118

## STRESZCZENIE

Wzbogacenie żywności o związki bioaktywne i ograniczenie ich strat w procesie obróbki stanowią wyzwania dla nowoczesnej technologii żywności. Jednym z podstawowych surowców wykorzystywanych w przemyśle spożywczym są zboża, które są źródłem składników odżywczych i związków bioaktywnych w diecie człowieka. W technologii produkcji piwa głównym surowcem są słody wytwarzane w wyniku moczenia, kiełkowania i suszenia ziaren zbóż. Są one źródłem 80% związków fenolowych zawartych w piwie oraz melanoidyn – związków reakcji Maillarda wykazujących działanie przeciwutleniające, w które szczególnie bogate są słody ciemne. Na kompozycje związków bioaktywnych piwa wpływa głównie dobór słodów, jak również chmieli, technologii wytwarzania brzezki, szczepów drożdży i parametrów procesu fermentacji. Z tego względu zasadnym jest zbadanie wpływu zastosowania słodów ciemnych w technologii piwowarstwa na właściwości antyoksydacyjne piw oraz przebieg procesu technologicznego.

Celem badań była ocena potencjału wykorzystania słodów ciemnych i prażonych ziaren zbóż, dobór technologii produkcji oraz szczepów drożdży w kształtowaniu jakości piw ciemnych o zwiększonej zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej. Materiał badawczy stanowiły ciemne słody (czekoladowy jasny, czekoladowy ciemny, pszeniczny czekoladowy), prażone ziarna zbóż (jęczmień prażony i jęczmień brown), chmiele (Marynka, Lubelski, Amarillo, Cascade, Centennial, Galaxy) oraz drożdże piwowarskie dolnej fermentacji *Saccharomyces pastorianus* S23, górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04, jak również niekonwencjonalne drożdże górnej fermentacji *S. cerevisiae* var. *diastaticus* oraz *S. cerevisiae* typu kveik. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie spójnego tematycznie cyklu publikacji naukowych, na który składają się cztery prace badawcze. W badaniach szczególną uwagę poświęcono kluczowym dla kształtowania właściwości przeciwutleniających piwa etapom procesu technologicznego: opracowaniu składu zasypu słodowego, procesowi chmielenia z uwzględnieniem chmielenia techniką na zimno, jak również procesowi fermentacji z udziałem szczepów drożdży piwowarskich o zróżnicowanej charakterystyce. W efekcie przeprowadzonych badań oceniono

przydatność ciemnych słodów i prażonych ziaren zbóż w produkcji brzeczek o podwyższonej aktywności przeciwutleniającej oraz opracowano recepturę i technologię produkcji piw ciemnych chmielonych na zimno o wysokiej zawartości ksantohumolu. W cyklu badawczym uwzględniono również analizę wpływu stosowania słodów ciemnych na przebieg i efekty fermentacji etanolowej prowadzonej z udziałem różnych szczepów drożdży, w tym niekonwencjonalnych.

Na podstawie uzyskanych wyników określono, że zastosowanie 10% dodatku słodu czekoladowego ciemnego lub jęczmienia prażonego w kompozycji surowców zacieru prowadziło do ponad dwukrotnego wzrostu ogólnej zawartości związków fenolowych (TPC, ang. total phenolic content) skorelowanego ze wzrostem zdolności do redukcji jonów żelaza FRAP (ang. ferric reducing antioxidant power) i pojemności przeciwutleniającej ABTS<sup>+</sup> (ang. 2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt) brzeczek. Ponadto zastosowanie znaczącego udziału słodu czekoladowego ciemnego (20 – 40%) w składzie zasypu słodowego powodowało obniżenie zawartości maltozy i maltotriozy w profilu węglowodanowym brzeczek, jak również wzrost wartości indeksu brązowienia, zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu, TPC oraz aktywności przeciwutleniającej (FRAP i ABTS<sup>+</sup>). Wykazano, że wartość TPC w technologii produkcji piw rosła w wyniku procesu chmielenia (7,7 – 22,9%), fermentacji (30,8 – 86,0%) i dofermentowania (2,5 – 17,8%). Następnie, po leżakowaniu obniżała się (35,1 – 55,8%). Zaobserwowano, że fermentacja z zastosowaniem szczepu *S. cerevisiae* S04 powoduje całkowitą redukcję 5-hydroksymetylofurfuralu w piwach. Udowodniono również, że dobór surowców, zastosowana metoda zacierania oraz chmielenie na zimno prowadziło do wytworzenia piw o wysokiej zawartości ksantohumolu (1,77 – 3,83 mg/L) i izokszantohumolu (0,85 – 1,19 mg/L). Najwyższą wartością TPC (475,05 mg GAE/L, ang. gallic acid equivalents), jak również zawartością ksantohumolu (3,83 mg/L) i izokszantohumolu (1,19 mg/L) charakteryzowało się piwo ciemne chmielone odmianą Galaxy.

W kolejnym etapie badań potwierdzono, że spośród badanych szczepów drożdży *S. cerevisiae* var. *diastaticus* charakteryzował się zdolnością do wykorzystywania dekstryn, co pozwoliło na wytworzenie piwa o wysokim stopniu odfermentowania

(78,56 – 80,36% w/w) i zawartości etanolu (5,6 – 5,79% v/v). Wykazano również, że zastosowanie sładów ciemnych powodowało obniżenie rzeczywistego i pozornego stopnia odfermentowania piw. Ponadto badane piwa ciemne charakteryzowały się wyższą TPC (20,62 – 123,96%) oraz potencjałem przeciwutleniającym FRAP (60,19 – 69,07%) i ABTS<sup>•+</sup> (39,86 – 48,80%) niż piwa jasne. Wykazano, że piwo ciemne fermentowane z udziałem *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzowało się najwyższą TPC (547,56 mg GAE/L), jak również najwyższą całkowitą zawartością związków lotnych (TV, ang. total volatiles; 134,33 – 143,08 mg/L) spośród analizowanych piw. Dodatek ciemnego sładów nie wpłynął na TV w piwach, jednak był przyczyną zmian w całkowitej zawartości estrów oraz terpenów i terpenoidów w części badanych piw. Kluczowe różnice w profilu związków lotnych piw fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów wynikały z zawartości estrów i alkoholi wyższych. Dominującą grupą związków we wszystkich analizowanych piwach były alkohole wyższe (56,41 – 72,17%), następnie estry (14,58 – 20,82%), aldehydy (8,35-20,52%), terpeny i terpenoidy (1,22 – 6,57%) oraz ketony (0,42 – 1,00%). Wśród alkoholi wyższych zidentyfikowano najwięcej 2-metylopropan-1-olu, 3-metylobutanolu i alkoholu feniloetylowego, wśród aldehydów – furfuralu, dekanalu i nonanal, a wśród estrów – octanu etylu, octanu feniloetylu i octan izoamylu.

Przedstawiony cykl prac badawczych pozwala na potwierdzenie potencjału wykorzystania sładów ciemnych w produkcji piw o podwyższonej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań wykazały również potencjał fermentacji z udziałem różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym szczepów niekonwencjonalnych, jako metody kształtującej zdolności antyoksydacyjne, jak również cechy sensoryczne piw przez wpływ na profil związków lotnych.

## ABSTRACT

The enrichment of food with bioactive compounds and the prevention of their loss during processing are challenges for modern food technology. One of the main raw materials used in the food industry are cereals, which are a source of nutrients and bioactive compounds in the human diet. In beer production technology, the main raw materials are malts produced by soaking, germination and drying of cereal grains. They are the source of 80% of the phenolic compounds contained in beer, as well as melanoidins - Maillard reaction compounds that exhibit antioxidant activity, in which dark malts are particularly rich. The compositions of beer's bioactive compounds are mainly influenced by the selection of malts, as well as hops, wort production technology, yeast strains and parameters of the fermentation process. Therefore, it is reasonable to study the influence of the use of dark malts in brewing technology on the antioxidant properties of beers and the course of the technological process.

The aim of the study was to evaluate the potential of using dark malts and roasted cereal grains, the selection of production technology and yeast strains in shaping the quality of dark beers with an increased content of phenolic compounds and antioxidant activity. The experimental material consisted of dark malts (pale chocolate malt, dark chocolate malt, wheat chocolate malt), roasted cereal grains (roasted barley and brown barley), hops (Marynka, Lubelski, Amarillo, Cascade, Centennial, Galaxy) and bottom-fermentation brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* S23, top fermentation *Saccharomyces cerevisiae* S04, as well as unconventional top-fermentation yeast *S. cerevisiae* var. *diastaticus* and *S. cerevisiae* type kveik. The results of the research were presented in a thematically consistent series of scientific publications, comprising four research papers. In the research, special attention was paid to the key stages of the technological process for shaping the antioxidant properties of beer: the development of the malt composition, the hopping process including dry hopping technique, as well as the fermentation process with the participation of brewing yeast strains with different characteristics. As a result of the research, the usability of dark malts and roasted cereal grains in the production of worts with increased antioxidant activity was evaluated, and a recipe and technology for the production of dry hopped dark beers with high

xanthohumol content was developed. The research cycle also included an analysis of the effect of using dark malts on the course and effects of ethanol fermentation carried out with different yeast strains, including unconventional.

Based on the results, it was determined that the use of a 10% addition of dark chocolate malt or roasted barley in the composition of mash raw materials led to a more than two-fold increase in total phenolic content (TPC) correlated with an increase in the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and antioxidant capacity ABTS<sup>·+</sup> (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt) of worts. In addition, applying a significant proportion of dark chocolate malt (20 – 40%) in the composition of the malt, a decrease in maltose and maltotriose content in the carbohydrate profile of the wort was observed, as well as an increase in the values of browning index, 5-hydroxymethylfurfural content, TPC and antioxidant capacity (FRAP and ABTS<sup>·+</sup>). It was shown that the TPC value increased as a result of hopping (7.7 – 22.9%), fermentation (30.8 – 86.0%) and post fermentation (2.5 – 17.8%). Then, after aging, it decreased (35.1 – 55.8%). It was observed that fermentation with *S. cerevisiae* S04 results in a complete reduction of 5-hydroxymethylfurfural in beers. It was also proven that the selection of raw materials, the use of decoction mashing and dry hopping led to the production of beers with a high content of xanthohumol (1.77 – 3.83 mg/L) and isoxanthohumol (0.85 – 1.19 mg/L). Dark beers hopped with the Galaxy variety had the highest TPC value (475.05 mg GAE/L, gallic acid equivalents), as well as xanthohumol (3.83 mg/L) and isoxanthohumol (1.19 mg/L) contents.

In the next step of the study, it was confirmed that among the tested yeast strains *S. cerevisiae* var. *diastaticus* was characterized by its ability to utilize dextrins, which allowed to produce beers with a high degree of attenuation (78.56 – 80.36% w/w) and ethanol content (5.6 – 5.79% v/v). It was also shown that the use of dark malts reduced the real and apparent degree of attenuation of the beers. In addition, the dark beers tested had higher TPC (20.62 – 123.96%) and antioxidant potentials FRAP (60.19 - 69.07%) and ABTS<sup>·+</sup> (39.86 – 48.80%) than pale beers. It was shown that dark beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA had the highest TPC (547.56 mg GAE/L), as well as the highest total volatiles (TV; 134.33 - 143.08 mg/L) among the beers analyzed. The

addition of dark malt did not affect TV in the beers, but it was responsible for changes in the total ester content and terpenes and terpenoids in some of the beers studied. The key differences in the volatile compound profile of beers fermented with different strains were due to the content of esters and higher alcohols. Higher alcohols were the dominant group of compounds in all analyzed beers (56.41 – 72.17%), followed by esters (14.58 – 20.82%), aldehydes (8.35 – 20.52%), terpenes and terpenoids (1.22-6.57%) and ketones (0.42 – 1.00%). Among higher alcohols, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutanol and phenylethyl alcohol were identified the most, among aldehydes - furfural, decanal and nonanal, and among esters - ethyl acetate, phenylethyl acetate and isoamyl acetate.

The presented series of research allows to confirm the potential of using dark malts in the production of beers with increased phenolic compounds and antioxidant activity. In addition, the results of the research also showed the potential of fermentation with different strains of top and bottom-fermenting brewing yeasts, including unconventional strains, as a method for shaping antioxidant capacity, as well as sensory characteristics of beers by affecting the profile of volatile compounds.



## 1. Wprowadzenie

Zawartość związków bioaktywnych jest ważnym aspektem w kontekście projektowania receptur produktów spożywczych. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie konsumentów produktami, które charakteryzują się potencjałem do modulowania procesów fizjologicznych i metabolicznych człowieka, wpisując się w strategię zapobiegania przewlekłym chorobom niezakaźnym, w których jednym z czynników ryzyka jest narażenie organizmu na stres oksydacyjny. Dostarczanie z dietą związków antyoksydacyjnych jest elementem koncepcji przeciwdziałania negatywnym zmianom wywołanym przez wolne rodniki w organizmie człowieka, dlatego niezwykle ważnym aspektem technologii żywności jest doskonalenie receptur i procesów w celu maksymalnego wykorzystania potencjału składników biologicznie czynnych. Ponadto potencjał do zmiatania wolnych rodników wpływa na zachowanie cech jakościowych produktu w trakcie przechowywania (Zhao 2015). Surowce roślinne, w tym słody i chmiel, z których wytwarzane jest piwo, są źródłem szerokiej gamy związków o działaniu przeciwutleniającym. Do szczególnie interesujących związków bioaktywnych, będących składnikami piwa zaliczane są związki fenolowe i melanoidyny (Martinez-Gomez i wsp. 2020). Badania prowadzone nad przemianami w trakcie procesu technologicznego, które wpływają na właściwości przeciwutleniające są więc niezwykle istotne zarówno z perspektywy udziału antyoksydantów w kształtowaniu stabilności oksydacyjnej piw, ale również ze względu na potencjalne korzyści dla konsumentów wynikające z wartości prozdrowotnej przeciwutleniaczy.

Piwo jest napojem otrzymanym w wyniku procesu fermentacji etanolowej brzezki wytworzonej z wody, słodu i chmielu. Pierwszym etapem procesu technologicznego produkcji piwa jest zacieranie, którego głównym celem jest hydroliza enzymatyczna skrobi i białek z udziałem endogennych enzymów słodu. Wśród słodów piwowarskich wyróżniamy słody podstawowe oraz słody specjalne, do których zaliczamy słody produkowane z ziaren zbóż nietypowych rodzajów lub słody wytwarzane z zastosowaniem zmodyfikowanej technologii (Coghe i wsp. 2005). Podstawowym surowcem używanym do produkcji słodu jest jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare L.*) (Wannenmacher i wsp. 2018). Słód piwowarski wytwarzany jest w wyniku procesu

słodowania ziaren zbóż, obejmującego moczenie, kiełkowanie i suszenie (Zhao 2015). Kompozycja surowców używanych w produkcji piwa może być złożona wyłącznie ze słodów jasnych, ale może również uwzględniać dodatek ciemnych słodów celem nadania piwu pożądanej barwy, smaku i aromatu. Wśród ciemnych słodów specjalnych wyróżniamy słody karmelowe i palone, które są produkowane z zastosowaniem prażenia wykiełkowanych ziaren (słody karmelowe) tzw. sładu zielonego (ang. green malt) lub uprzednio wysuszonego sładu (słody prażone). Ponadto w asortymencie słodowni znajdziemy często również prażone, niesłodowane ziarna zbóż np. jęczmienia lub pszenicy (Coghe i wsp. 2003). Barwę słodów i brzeczek słodowych wyraża się w skali EBC (ang. European Brewery Convention). Na rynku dostępne są słody o barwie w zakresie 5 – 1600 EBC (Coghe i wsp. 2003). W zależności od intensywności obróbki termicznej stosowanej w procesie suszenia i prażenia, słodownie oferują szeroką gamę słodów karmelowych, czekoladowych i malanoidynowych. Zalecana dawka sładu ciemnego w recepturze piwa różni się w zależności od stopnia jego wyprażenia. Bardzo jasne słody karmelowe można dodawać do zasypu słodowego w dawce stanowiącej nawet 40%, a ciemne w ilości 5 – 10% (Kunze 1999). Stosowanie słodów ciemnych, jako dodatków w produkcji piwa pozwala na modyfikację: barwy, smaku, zapachu, jak również zwiększenie odczucia pełni smaku, ze względu na zawartość melanoidyn i dekstryn (Prado i wsp. 2021).

Słody karmelowe i prażone swoje cechy sensoryczne zawdzięczają związkom smakowo – zapachowym generowanym głównie w wyniku reakcji Maillarda (Prado i wsp. 2021). Ten cykl przemian obserwuje się w żywności podczas obróbki termicznej, jak również długotrwałego przechowywania. Produkty reakcji wpływają zarówno na cechy sensoryczne żywności, trwałość i wartość żywieniową (Shakoor i wsp. 2022). Wyróżnia się trzy etapy reakcji: fazę wczesną, zaawansowaną i końcową (Michalska i Zieliński 2007). Cykl zapoczątkowany jest reakcją pomiędzy grupą aminową wolnych aminokwasów, peptydów lub białek, a cukrem redukującym, w wyniku czego otrzymywane są zasady Schiffa (aldozyloaminy i ketozyloaminy), które następnie ulegają przegrupowaniu Amadori lub Heynsa (Hellwig i Henle 2020). Powstające na tym etapie związki stanowią substraty do dalszych przemian, w których generowane są związki lotne kształtujące aromat oraz substancje odpowiedzialne za brązowe

zabarwienie (Cui i wsp. 2020). W zależności od wartości pH środowiska reakcji na tym etapie mogą powstawać zróżnicowane produkty. W  $\text{pH} \leq 7$  obserwuje się reakcje 1,2-enolizacji prowadzącą do powstania 3-deoksyosonu, z którego następnie może powstać 5-hydroksymetylofurfural (w przypadku, gdy substratem są heksozy) lub furfural (gdy substratem są pentozy). W  $\text{pH} > 7$  obserwuje się głównie 2,3-enolizację, której produktem jest 1-deoksyoson, który z kolei zostaje następnie zdegradowany do związków  $\alpha$ -dikarbonylowych oraz ketonów (Shakoor i wsp. 2022, Michalska i Zieliński 2007). Nie jest to jednak jedyna ścieżka przemian na tym etapie cyklu. Produkty przegrupowania Amadori mogą również ulegać oksydacji, dekarboksylacji lub reakjom enzymatycznym (Shakoor i wsp. 2022). Powstające podczas procesu związki  $\alpha$ -dikarbonylowe mogą ponadto uczestniczyć w procesie degradacji Streckera, który prowadzi do powstania lotnych produktów istotnych z perspektywy sensoryki żywności np. pirazyń, piranonów, furanów, furanonów, piroli, tioli, tiofenów i tiazoli (Hellwing i Henle 2020, Shakoor i wsp. 2022). Shakoor i wsp. (2022) wskazują ponad 100 związków reakcji Maillarda, których mechanizmy syntezy zostały poznane. W końcowej fazie reakcji powstają melanoidyny, definiowane jako wysokocząsteczkowe związki azotowe o potencjale przeciwutleniającym i brązowej barwie odpowiadającej za charakterystyczny kolor produktów spożywczych takich jak kawa, słód, chleb czy kakao (Echavarría i wsp. 2012, Carvalho i wsp. 2014, ALjahdali i Carbonero 2019).

Melanoidyny wykazują silne właściwości redukujące, które mogą świadczyć o ich właściwościach prozdrowotnych (Echavarría i wsp. 2012). Schemat działania melanoidyn jako przeciwutleniaczy polega na zdolności do przerywania łańcuchowych reakcji rodnikowych, chelatowaniu metali, redukcji nadtlenu wodoru i zmiataniu wolnych rodników (Delgado-Andrade i Morales 2005, Delgado-Andrade i wsp. 2005, Martinez-Gomez i wsp. 2020, Carvalho i wsp. 2012). Ponadto wykazują one także właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwmutagenne, przeciwalergiczne, obniżające poziom cholesterolu, zapobiegające nadciśnieniu oraz prebiotyczne (Alijahdali i wsp. 2020, Echavarría i wsp. 2012, Carvalho i wsp. 2014). W literaturze opisywana jest również prooksydacyjna aktywność melanoidyn oraz wpływ

cytotoksyczny, rakotwórczy i mutageny związków generowanych w trakcie obróbki termicznej żywności (Carvalho i wsp. 2012, Echavarría i wsp. 2012).

Budowa chemiczna melanoidyn nie została dotychczas dokładnie poznana. Określa się, że jest to grupa wielkocząsteczkowych związków powstających w wyniku polimeryzacji pośrednich produktów reakcji Maillarda o mniejszych rozmiarach cząsteczek, obserwowanej w trakcie procesu termicznej obróbki żywności (Martinez-Gomez i wsp. 2020, Carvalho i wsp. 2014). Słody jasne zawierają więcej związków z grupy niskocząsteczkowych produktów reakcji Maillarda (LMW – ang. low molecular weight compounds) niż słody prażone, w których dominują wielkocząsteczkowe produkty reakcji (HMW – ang. high molecular weight compounds) (Coghe i wsp. 2006, Carvalho i wsp. 2014). Zmienność struktury i masy cząsteczkowej melanoidyn przypisuje się typowi substratów reakcji, wartości pH środowiska, temperaturze i czasowi obróbki termicznej (Martinez-Gomez i wsp. 2020). Określono, że wysokocząsteczkowe melanoidyny (>300 kDa, HMW) wykazują nawet 3-krotnie wyższą aktywność przeciwutleniającą niż LMW (<10 kDa), a ich zawartość wzrasta wraz z wydłużeniem czasu prażenia (Carvalho i wsp. 2014). Właściwości przeciwutleniające przypisuje się również związkom powstającym na wcześniejszych etapach reakcji Maillarda np. niektórym produktom przegrupowania Amadori, związkom  $\alpha$ -dikarbonylowym, ketonom, lotnym związkom siarkowym i heterocyklicznym związkom lotnym (Shakoor i wsp. 2022).

Podczas obróbki termicznej ziarna jęczmienia, słodu i brzezki piwowarskiej obserwuje się reakcje nieenzymatycznego brązowienia, w tym pirolizę, karmelizację i reakcje Maillarda. Smak, zapach i kolor słodu zależy od parametrów procesu technologicznego m.in. czasu, temperatury i wilgotności w trakcie obróbki (Prado i wsp. 2021). Podczas suszenia i prażenia, ekspozycja na wysoką temperaturę, poza udziałem w tworzeniu związków lotnych, jest również przyczyną utraty aktywności enzymatycznej i składników odżywczych w ziarnie. Suszenie słodu prowadzi się zwykle w temperaturze do 80°C, natomiast w trakcie prażenia temperatury osiągają 110 - 250°C (Carvalho i wsp. 2014). W zależności od zawartości oraz składu aminokwasów i cukrów w ziarnie jęczmienia, reakcje nieenzymatycznego brązowienia mogą

zachodzić z wytworzeniem różnej kompozycji związków smakowo-zapachowych (Nobis i wsp. 2019). Suszenie i prażenie są kluczowymi etapami w produkcji sładów ciemnych. Podczas prażenia obserwuje się pyrolizę, czyli rozpad cukrów w wyniku narażenia na temperaturę powyżej 200°C. Z kolei karmelizacja zachodzi w temperaturze powyżej 120°C i odpowiada za konwersję cząsteczek cukrów z wydzieleniem pożądaných aromatów. W odróżnieniu od karmelizacji i pyrolizy, reakcje Maillarda zachodzą w łagodniejszych warunkach, nawet w 50°C, i to właśnie one są najistotniejsze z perspektywy kształtowania pożądaných cech sensorycznych sład. Wśród związków ważnych dla modelowania smaku i zapachu sład możemy wyróżnić pochodne furfuralu o karmelowym aromacie, maltol i izo-maltol o zapachu palonym, aldehydy Streckera, 2-acetylo-1-pyrolinę wprowadzającą aromat popkornu oraz pirazyny odpowiedzialne za nuty prażone (Prado i wsp. 2021).

Wiele badań skupia się na wysokiej zdolności do redukcji wolnych rodników wykazywanej przez żywność bogatą w produkty reakcji Maillarda m.in. piwo, pieczywo i kawę (Echavarría i wsp. 2012). Celem oceny przebiegu reakcji nieenzymatycznego brązowienia w żywności stosuje się najczęściej pomiary spektrofotometryczne dla oceny zawartości związków pirazyny lub w celu wykrycia brązowego zabarwienia kształtowanego m.in. melanoidyny. Alternatywą mogą być również metody kolorymetryczne oraz ocena zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu (5-HMF) jako pośredniego produktu cyklu reakcji Maillarda, (Echavarría i wsp. 2012). W przypadku brzeczek piwowskich oraz piw do określenia barwy stosuje się również skalę zaproponowaną przez European Brewery Convention, opartą na analizie absorbancji (Analityca EBC).

Ciemne słody specjalne, dzięki zawartości melanoidyn mogą poprawiać pienistość i pełnię smaku oraz zwiększać stabilność cech sensorycznych piwa podczas przechowywania (Coghe i wsp. 2005). Od kompozycji zasypu słodowego zależy zawartość węglowodanów i aminokwasów w brzeczce, co z kolei jest kluczowym czynnikiem wpływającym na jakość piwa, ponieważ związki te są niezbędne dla prawidłowego metabolizmu komórki drożdży. W przebiegu reakcji Maillarda, w trakcie termicznej obróbki sład, zostaje wykorzystana część węglowodanów

i aminokwasów ziarna. Z tego względu brzeczki wytwarzane ze znaczącym udziałem sładów ciemnych charakteryzują się zmniejszoną zawartością ekstraktu w porównaniu do brzeczki sporządzanych ze słodu jasnego. Może to być przyczyną obniżenia dynamiki fermentacji i stopnia odfermentowania piw (Coghe i wsp. 2005). Aminokwasy brzeczki piwowarskiej uczestniczą w budowaniu struktur komórkowych oraz kształtowaniu profilu związków lotnych piw. Obniżona zawartość aminokwasów w brzeczce może być przyczyną zmian w kompozycji alkoholi wyższych, estrów i ketonów (Olaniran i wsp. 2017). Ze względu na to zaleca się dawkowanie ciemnych sładów w niewielkiej ilości stanowiącej 5-10% zasypu słodowego (Coghe i wsp. 2005).

Słody ciemne nie wykazują aktywności enzymatycznej. Ich dodatek w procesie technologicznym jest przyczyną obniżenia wydajności procesu zacierania, w wyniku czego ograniczona zostaje ilość dostępnych dla drożdży węglowodanów i aminokwasów w brzeczce. W rezultacie zawartość cukrów fermentowanych przez drożdże piwowarskie (glukozy, fruktozy, sacharozy, maltozy, maltotriozy) w brzeczce obniża się wraz ze wzrostem udziału sładów ciemnych w składzie zacieru (Coghe i wsp. 2005). Ponadto dodatek ciemnych sładów w technologii wytwarzania piwa wiąże się z wprowadzeniem znaczących ilości związków powstających w wyniku reakcji nieenzymatycznego brązowienia w tym związków, wykazujących działanie toksyczne wobec drożdży piwowarskich (Dack i wsp. 2017, Liu i wsp. 2004). Substancje powstające w wyniku obróbki termicznej słodu mają wpływ na metabolizm mikroorganizmów m.in. powodują inhibicję enzymów katalizujących przebieg fermentacji etanolowej. Wśród tych związków możemy wyróżnić: furfural, 5-HMF i melanoidyny (Dack i wsp. 2017, Liu i wsp. 2004). Furfural i 5-HMF wykazują potencjał do hamowania aktywności enzymów glikolitycznych i indukowania uszkodzeń DNA komórki (Liu i wsp. 2004). Ponadto, związki te hamują aktywność dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy aldehydowej, które uczestniczą w syntezie alkoholi wyższych z aminokwasów na szlaku Erlicha (Dack i wsp. 2017). Co więcej, również melanoidyny mogą mieć negatywny wpływ na zdolności fermentacyjne drożdży. Wynika to z ich potencjału do chelatowania jonów magnezu, które mają kluczową rolę w przebiegu fermentacji ze względu na pełnienie funkcji kofaktorów enzymów. Jony magnezu są niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu

procesów metabolicznych drożdży. Ich zawartość w środowisku fermentacyjnym przeciwdziała skutkom narażenia na stres komórkowy oraz pozwala na prawidłowy wzrost i rozwój komórek (Dack i wsp. 2017, Liu i wsp. 2004). Z tego względu, ograniczenie ich dostępności może mieć negatywny wpływ na przebieg fermentacji.

Zawartość związków Maillarda w żywności wiąże się ze wzbogaceniem cech sensorycznych przy jednoczesnym obniżeniu wartości żywieniowej produktów, wynikającej z niekorzystnego wpływu furozyny, końcowych produktów zaawansowanej glikacji, akrylamidu, heterocyklicznych amin i 5-HMF na zdrowie człowieka (ALjahdali i Carbonero 2019). Związki te powstają w trakcie obróbki żywności i mogą wykazywać działanie mutagenne, rakotwórcze lub cytotoksyczne. Z drugiej strony, 5-HMF, furozyna i malanoidyny wykazują właściwości antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe i zapobiegające nadciśnieniu (ALjahdali i Carbonero 2019). 5-HMF występuje powszechnie w żywności. Jego zawartość obserwuje się m.in. w miodzie, ciastkach, pieczywie, suszonych owocach, ziarnach kawy, płatkach śniadaniowych i słodzie piwowarskim (Akillioglu i wsp. 2011). Ziarno jęczmienia zawiera 100 – 1200 mg/kg 5-HMF, słód 100 – 6300 mg/kg, podczas gdy piwo w zależności od stylu jedynie 2,4 – 7,4 mg/L (Akillioglu i wsp. 2011, Choudhary i wsp. 2021, Capuano i wsp. 2011). Fermentacja jest jedną ze strategii obniżania zawartości 5-HMF i akrylamidu w żywności (Lee i wsp. 2019). Wykazano, że *Saccharomyces cerevisiae* i *Lactobacillus plantarum* są zdolne do metabolizowania 5-HMF do alkoholu 5-hydroksymetylofurfurylowego podczas fermentacji (Lee i wsp. 2019, Akillioglu i wsp. 2011) lub 2,5-bis-hydroksymetylofuranu (Hellwig i wsp. 2021). Zawartość 5-HMF w środowisku fermentacji ma jednak negatywny wpływ na jej przebieg ze względu na inhibicję dehydrogenazy alkoholowej, dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy aldehydowej, które są istotne dla metabolizmu i rozwoju drożdży (Erkan i wsp. 2022).

Poza związkami Maillarda za aktywność przeciwutleniającą piw odpowiadają również związki fenolowe. Korzystny wpływ związków fenolowych na zdrowie człowieka związany jest z ich aktywnością przeciwutleniającą. Wykazują one zdolność do zmiatania wolnych rodników tlenowych i azotowych m.in. takich jak rodniki

hydroksylowe, nadtlenuk wodoru czy tlen singletowy. Mają również zdolność do inhibicji enzymów, których aktywność generuje wolne rodniki oraz chelatowania jonów miedzi i żelaza, które uczestniczą w oksydacji lipoprotein o niskiej gęstości (Karabín i wsp. 2016). Zaburzenie równowagi pomiędzy ilością generowanych wolnych rodników, a zdolnościami przeciwutleniającymi wywołuje zjawisko stresu oksydacyjnego w organizmie, co z kolei jest jedną z przyczyn chorób nowotworowych, miażdżycy, cukrzycy, choroby Alzheimera czy choroby Parkinsona (Karabín i wsp. 2016).

Szacuje się że 80% związków fenolowych piwa pochodzi ze słodu, a 20% z chmielu (Carvalho i Guido 2022, Zhao 2015, Wannemacher i wsp. 2018). Związki te kształtują właściwości przeciwutleniające przez co mają wpływ na stabilność jakości piwa podczas przechowywania (Wannemacher i wsp. 2018, Zhao 2015). Jęczmień jest źródłem prostych związków fenolowych, kwasów fenolowych, kwasów hydroksycynamonowych i ich pochodnych oraz flawonoidów, z czego nawet 88% związków występuje w nierozpuszczalnej postaci związanej (np. glikozydów lub estrów) (Zhao 2015, Carvalho i Guido 2022). Proces słodowania wpływa na skład ilościowy związków fenolowych w ziarnie, prowadząc do zwiększania ich zawartości m.in. dzięki przemianom pod wpływem temperatury procesu i aktywności enzymów (Wannemacher i wsp. 2018, Zhao 2005). Istotnym etapem produkcji słodu, wpływającym na zawartość związków fenolowych jest suszenie. Podczas początkowych faz suszenia ziarna (<80°C) zawartość związków fenolowych wzrasta ze względu m.in. na aktywność enzymów estarazy kwasu cyjanonowego i estarazy kwasu ferulowego. W wyższych temperaturach obserwowane jest obniżenie zawartości związków fenolowych przypisywane termicznej degradacji lub reakcji z pośrednimi produktami reakcji Maillarda (Wannemacher i wsp. 2018). Dominującymi związkami fenolowymi w ziarnach jęczmienia są: kwas ferulowy, kwas p-kumarowy, kwas prokatechowy, katechina, kwercetyna, naringina, prodelphinidyna B3, procyjanidyna B2, B3 i C2 (Carvalho i Guido 2022).

Proces zacierania jest kluczowy w kształtowaniu składu brzezki. W wyniku hydrolizy enzymatycznej skrobi, dzięki endogennym enzymom słodu powstają cukry



będące substratem w fermentacji etanolowej prowadzanej przez drożdże piwowarskie (Jurková i wsp. 2012). Wyróżniamy dwie podstawowe metody prowadzenia zacierania: infuzyjną lub dekokcyjną. W metodzie infuzyjnej wzrost temperatury zacieru osiąga się przez ogrzewanie całej jego objętości, natomiast metoda dekokcyjna polega na odebraniu części zacieru, zagotowaniu w osobnym kotle i zawróceniu jej do głównej kadzi zaciernej (Mikyška i wsp. 2023, Jurková i wsp. 2012). Podczas zacierania obserwuje się zwiększenie zawartości związków fenolowych związane z działaniem enzymów hydrolitycznych słodu. Dobór temperatur, czas zacierania i ilość prowadzonych cykli dekokcji ma wpływ na ekstrakcję związków fenolowych. Zacieranie metodą dekokcyjną zarówno jednowarową, dwuwarową jak i trójwarową pozwala na uzyskanie wyższej zawartości związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej piw w porównaniu do metody infuzyjnej. Co więcej w piwach produkowanych z użyciem dekokcyjnego zacierania obserwuje się wyższą zawartość fenoli z grup flawanoli, proantocyjanidyn, jak również chmielowych flawonoli i prenyloflawonoidów (Mikyška i wsp. 2023, Jurková i wsp. 2012).

Kolejnym kluczowym etapem technologicznym, mającym wpływ na zawartość związków fenolowych w piwie jest chmielenie, podczas którego następuje ekstrakcja związków fenolowych z chmielu i termiczna degradacja niektórych związków. Co więcej, podczas gotowania zachodzą interakcje między polifenolami oraz między polifenolami, a białkami i polisacharydami (Fumi i wsp. 2011). Zawartość związków fenolowych w chmielu jest nawet o 40% wyższa niż słodu, jednak udział chmielu w kształtowaniu profilu związków fenolowych piwa jest niższy ze względu na znacznie niższą dawkę surowca w procesie warzenia piwa w porównaniu do dawki słodu (Carvalho i Guido 2022). Wzrost zawartości związków fenolowych po gotowaniu brzezki zależy od czasu i temperatury chmielenia, odmiany chmielu oraz typu stosowanego produktu chmielowego. Na rynku dostępny jest chmiel w formie szyszek, peletów i ekstraktów (Magalhaes i wsp. 2007). Związki fenolowe chmielu, które w największym stopniu odpowiadają za aktywność przeciwutleniającą to (+) katechina, procyanidyna B3, kwercetyna, kwas galusowy, jak również kwas cynamonowy, kwas kawowy, kwas ferulowy, gallokatechina, ksantohumol i mirycetyna (Karabín i wsp. 2016).

Wśród związków fenolowych chmielu wyróżniającą aktywnością biologiczną odznacza się ksantohumol. Przy zastosowaniu klasycznej technologii produkcji piwa notuje się duże straty tego cennego związku. W rezultacie jego zawartość jest zwykle niewystarczająca, aby gwarantować aktywność biologiczną (de Andrade Silva i wsp. 2022, Wunderlich i wsp. 2005). Ksantohumol to prenyloflawonoid, o aktywności przeciwutleniającej zbliżonej do katechin z zielonej herbaty i kilkukrotnie silniejszej niż aktywność witaminy C i E (Karabín i wsp. 2016). Działa przeciwzapalnie, przeciwwirusowo, przeciwbakteryjnie, przeciwnowotworowo, przeciwmiażdżycowo, przeciwmutagennie, antyoksydacyjnie, wspomagająco w chorobach układu pokarmowego oraz zapobiega otyłości (de Andrade Silva i wsp. 2022, Di Sotto i wsp. 2018, Karabín i wsp. 2013, Stevens i Page 2004, Wunderlich i wsp. 2005). Straty ksantohumolu w procesie wytwarzania piwa wynikają z jego termicznej izomeryzacji do izokszantohumolu w trakcie gotowania brzezki, adsorpcji na powierzchni komórek drożdżowych i osadów białkowych, które są oddzielane od piwa w procesach filtracji (Wunderlich i wsp. 2005). W rezultacie w piwach obserwuje się zwykle zawartość ksantohumolu na poziomie 0,2 mg/L (Gołąbczak i wsp. 2010). Izokszantohumol, powstający podczas gotowania brzezki charakteryzuje się niższą aktywnością biologiczną niż ksantohumol, dlatego dąży się do ograniczenia procesu izomeryzacji. Wykazano, że piwa ciemne zawierają znacząco więcej ksantohumolu niż piwa jasne (Magalhães i wsp. 2008). Przypisuje się to hamowaniu procesu izomeryzacji przez wysokocząsteczkowe związki Maillarda zawarte w słodach prażonych (Magalhães i wsp. 2008, Wunderlich i wsp. 2005, Karabín i wsp. 2013). Związki te prawdopodobnie tworzą kompleksy z ksantohumolem, ograniczając jego izomeryzację. Innymi strategiami uzyskania piwa o podwyższonej zawartości tego cennego związku są: dawkowanie chmielu pod koniec procesu gotowania brzezki, dawkowanie chmielu do brzezki o obniżonej temperaturze ( $<80^{\circ}\text{C}$ ), chmienie na zimno oraz stosowanie ekstraktów chmielowych bogatych w ksantohumol na różnych etapach produkcji piwa (Magalhães i wsp. 2008, Wunderlich i wsp. 2005, Karabín i wsp. 2013, Machado i wsp. 2019). Szczególnie interesujące w procesie produkcji piw o wysokiej zawartości ksantohumolu jest chmienie na zimno, w którym chmiel dawkowany jest do

schłodzonej brzeczki lub piwa, więc wykluczony jest główny czynnik sprzyjający izomeryzacji - temperatura (Machado i wsp. 2019).

Głównymi związkami fenolowymi w gotowych piwach są: proste fenole, pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego, kumaryny, katechiny, flawonoidy, proantocyjanidyny, chalkony oraz  $\alpha$ -kwasy i izo- $\alpha$ -kwasy (Gerhäuser i wsp. 2005, Wannemacher i wsp. 2018). Część związków fenolowych w piwie występuje w formie związanej w postaci m.in. glikozydów (Wannemacher i wsp. 2018). Dominującymi związkami wśród identyfikowanych związków fenolowych są kwas ferulowy, kwas p-kumarowy, kwas galusowy, kwas kawowy, kwas wanilinowy i kwas sinapowy (Carvalho i Guido 2022). Zawartość związków fenolowych w gotowym piwie zależy od doboru surowców, parametrów procesu zacierania i gotowania brzeczki, odmiany i dawki zastosowanego chmielu, technologii chmielenia brzeczki, stosowania filtracji i przebiegu procesu fermentacji (Mikyška i wsp. 2023, Zhao 2015).

Fermentacja jest metodą przetwarzania żywności, wykazującą potencjał do zwiększenia zawartości związków fenolowych i poprawy wartości odżywczej. Podczas fermentacji obserwuje się zmiany w zawartości związków fenolowych spowodowane biotransformacjami lub procesem adsorpcji na powierzchni komórek mikroorganizmów (Leonard i wsp. 2021). Dzięki zjawisku adsorpcji, komórki drożdżowe charakteryzujące się dobrym stanem fizjologicznym mają zdolność do wychwytywania związków fenolowych z medium fermentacyjnego (Salmon 2006, Fumi i wsp. 2011). Najbardziej podatne na adsorpcję są związki z grupy flawan-3-oli, w tym katechina, epikatechnina i procyjanidyny, które są silnymi antyoksydantami (Márquez Campos i wsp. 2019). Zjawisko adsorpcji może być traktowane jako korzystne ze względu na możliwość oddzielenia komórek z zaabsorbowanymi związkami fenolowymi od fermentującego produktu, co może pozwolić na ograniczenie powstawania zmętnień polifenolowo-białkowych podczas przechowywania piwa. Z drugiej strony, w ten sposób produkt fermentowany pozbawiony zostaje części związków bioaktywnych (Márquez Campos i wsp. 2019, Leonard i wsp. 2021).

Zmiany w zawartości i kompozycji w związków fenolowych podczas fermentacji mogą wynikać m.in. z przemian form glikozydów w aglikony, hydrolizy

z wytworzeniem prostszych związków, wiązania się związków fenolowych w kompleksy z białkami, biotransformacji z wytworzeniem nowych związków i kondensacji fenoli. Biotransformacjom ulegają związki z grupy antocyjanów, flawanonów, flawonów i izoflawonów, flawonoli, kwasów fenolowych, tanin, stilbenów, lignanów i innych (Leonard i wsp. 2021). W rezultacie zachodzących w trakcie fermentacji przemian najczęściej obserwuje się wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych, jednak analiza zmian aktywności przeciwutleniającej nie daje jednoznacznych rezultatów. Fermentacja ma wpływ na aktywność antyoksydacyjną, dzięki uwalnianiu związanych form fenoli oraz ich konwersji do nowych związków, jednak wyniki otrzymywane przy stosowaniu różnych technik analizy właściwości antyoksydacyjnych są niejednoznaczne ze względu na różne mechanizmy działania przeciwutleniaczy (Leonard i wsp. 2021, Munteanu i wsp. 2021).

**Niniejsze badania zostały podjęte z uwagi na udział związków fenolowych oraz związków Maillarda w kształtowaniu aktywności przeciwutleniającej piw oraz ich wpływ na przebieg procesu fermentacji. W doświadczeniach określono potencjał zastosowania sładów ciemnych w wytwarzaniu piw o wysokiej zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej. Ponadto oceniono wpływ etapów procesu technologicznego: wytwarzania brzezki, procesu chmielenia z zastosowaniem różnych odmian chmielu i procesu fermentacji etanolowej z udziałem różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji na przebieg i efekty procesu fermentacji brzeczki wytworzonych z dodatkiem ciemnych sładów. Koncepcja badań obejmowała ponadto analizę kompozycji związków lotnych piw połączoną z kompleksową analizą sensoryczną celem wskazania wpływu stosowania różnych szczepów drożdży piwowarskich i dodatku sładów ciemnych na cechy jakościowe piw.**

## **2. Cel pracy**

**Celem badań była ocena potencjału wykorzystania sładów ciemnych i prażonych ziaren zbóż, dobór technologii produkcji oraz szczepów drożdży w kształtowaniu jakości piw ciemnych o zwiększonej zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej**

### **Cele szczegółowe**

- I. Określenie potencjału wykorzystania sładów ciemnych i prażonych ziaren zbóż w procesie technologicznym pozyskiwania brzeczek laboratoryjnych o zwiększonym potencjale przeciwutleniającym
- II. Opracowanie receptury i technologii produkcji piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu
- III. Analiza wpływu doboru szczepu drożdży oraz zastosowania ciemnych sładów na efekty procesu fermentacji etanolowej
- IV. Określenie wpływu doboru szczepu drożdży i zastosowania ciemnych sładów na kompozycję lotnych związków oraz cechy sensoryczne piw

### 3. Hipotezy badawcze

- I. Zastosowanie ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych w technologii piwowarstwa stanowi metodę zwiększenia zawartości związków fenolowych o działaniu przeciwutleniającym w brzeczkach
- II. Profil węglowodanowy, zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu oraz barwa brzeczek są kształtowane przez zastosowanie ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych w recepturze zasypu słodowego
- III. Modyfikacja składu surowców i przebiegu procesu technologicznego pozwala na otrzymanie piw ciemnych o zwiększonej zawartości ksantohumolu
- IV. Przebieg procesu fermentacji, cechy fizykochemiczne, potencjał przeciwutleniający oraz zawartość związków fenolowych w piwach ciemnych zależą od doboru szczepów drożdży piwowarskich stosowanych w procesie fermentacji
- V. Profil związków lotnych i właściwości sensoryczne piw są kształtowane przez kompozycję zasypu słodowego oraz dobór szczepów drożdży piwowarskich zastosowanych w procesie fermentacji

#### 4. Postępowanie eksperymentalne

Na schemacie 1. przedstawiony został szczegółowy zakres prac badawczych przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej. Cele i założenia badawcze zostały zrealizowane poprzez analizę i interpretację danych pozyskanych w przeprowadzonych doświadczeniach. Cykl badawczy obejmował cztery etapy zakończone publikacją wyników prac eksperymentalnych w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR).

**Etap 1:** Określenie potencjału wykorzystania sładów ciemnych i ziaren zbóż prażonych w procesie technologicznym pozyskiwania brzeczki laboratoryjnej o zwiększonym potencjale przeciwutleniającym

- Wytworzenie metodą infuzyjną serii brzeczek ze sładów pilzneńskiego z dodatkiem wybranych ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych
- Analiza profilu węglowodanowego brzeczek
- Określenie barwy oraz zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu
- Analiza ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej brzeczek

**Etap 2:** Opracowanie receptury i technologii produkcji piwa ciemnego o wysokiej zawartości związków biologicznie aktywnych

- Opracowanie technologii produkcji piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu
- Wytworzenie serii piw z zastosowaniem dodatku ciemnego sładów, dekokcyjnej metody zacierania i techniki chmielenia na zimno
- Analiza profilu węglowodanowego brzeczek i piw
- Ocena zawartości etanolu i glicerolu w piwach
- Określenie zawartości ksantohumolu i izoksantohumolu w piwach
- Określenie barwy oraz zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu w brzeczkach i piwach
- Analiza ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności brzeczek i piw

**Etap 3:** Ocena wpływu doboru materiału biologicznego na parametry fizykochemiczne piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji

- Wytworzenie serii piw jasnych ze słodu pilzneńskiego i ciemnych z dodatkiem ciemnego słodu z zastosowaniem infuzyjnej metody zacierania i fermentacji z udziałem wybranych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym szczepów niekonwencjonalnych
- Analiza profilu węglowodanowego brzeczek i piw
- Ocena zawartości etanolu i glicerolu w piwach
- Analiza ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności antyoksydacyjnej brzeczek i piw
- Ocena cech morfologicznych komórek drożdży za pomocą analizatora Scepter Cell Counter

**Etap 4:** Badanie wpływu doboru materiału biologicznego na profil związków lotnych piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji

- Wytworzenie serii piw jasnych ze słodu pilzneńskiego i ciemnych z dodatkiem ciemnego słodu z zastosowaniem infuzyjnej metody zacierania i fermentacji z udziałem wybranych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym szczepów niekonwencjonalnych
- Analiza piw za pomocą chromatografii gazowej
- Zaprojektowanie autorskiej ankiety oceny sensorycznej piw ukierunkowanej na analizę aromatów w piwach
- Przeprowadzenie panelu sensorycznego

**Schemat 1.** Szczegółowy zakres prac badawczych



## 4.2. Model badawczy

Technologia wytwarzania piwa jest procesem złożonym i obejmuje szereg operacji, w tym dobór surowców, zacieranie słołu, filtrację i wysładzanie zacieru, chmielenie brzezki oraz fermentację. Koncepcja przeprowadzonych badań obejmowała analizę rozwiązań technologicznych stosowanych na etapie zacierania i pozyskiwania brzezki, procesu chmielenia, w tym również chmielenia metodą na zimno oraz fermentacji z zastosowaniem drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji celem otrzymania piw o wysokim potencjale przeciwutleniającym. W wyniku realizacji planu badawczego pozyskano kompleksowe informacje o wpływie kompozycji surowców i kluczowych procesów technologicznych oraz doboru materiału biologicznego na przebieg procesu fermentacji i wyróżniki jakościowe gotowych piw.

**Etap 1:** Określenie potencjału wykorzystania słołów ciemnych i ziaren zbóż prażonych w procesie technologicznym pozyskiwania brzezki laboratoryjnej o zwiększonym potencjale przeciwutleniającym

**Etap 2:** Opracowanie receptury i technologii produkcji piwa ciemnego o wysokiej zawartości związków biologicznie aktywnych

**Etap 3:** Ocena wpływu doboru materiału biologicznego na parametry fizykochemiczne piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji

**Etap 4:** Badanie wpływu doboru materiału biologicznego na profil związków lotnych piw jasnych i ciemnych górnej i dolnej fermentacji

### 4.3. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły słody podstawowe, słody specjalne, prażone ziarna zbóż, chmiele odmian goryczkowych i aromatycznych oraz drożdże górnej i dolnej fermentacji. Charakterystykę wykorzystanego materiału badawczego przedstawiono w tabelach 1 - 3.

**Tabela 1.** Charakterystyka słodów zastosowanych w badaniach

Nazwa	Barwa	Producent
<b>Słód podstawowy</b>		
Słód pilzneński	3 – 4,3 EBC	Viking Malt, Strzegom, Polska
<b>Słody specjalne</b>		
Słód czekoladowy jasny	350 – 450 EBC	Viking Malt, Strzegom, Polska
Słód czekoladowy ciemny	1100 – 1300 EBC	Viking Malt, Strzegom, Polska
Słód pszeniczny czekoladowy	800 – 1000 EBC	Thomas Fawcett & Sons, Castleford, Wielka Brytania
<b>Prażone ziarna zbóż</b>		
Jęczmień prażony	> 1000 EBC	Viking Malt, Strzegom, Polska
Jęczmień brown	175 – 200 EBC	Viking Malt, Strzegom, Polska

**Tabela 2.** Charakterystyka chmieli zastosowanych w badaniach

Odmiana	Zawartość $\alpha$ -kwasów [%]	Źródło
Marynka	8,8	Twój Browar, Wrocław, Polska Marxam, Kraków, Polska
Lubelski	5 – 6	Marxam, Kraków, Polska
Amarillo	8,8	Twój Browar, Wrocław, Polska
Cascade	7,7	Twój Browar, Wrocław, Polska
Centennial	8,5	Twój Browar, Wrocław, Polska
Galaxy	13,3	Twój Browar, Wrocław, Polska

**Tabela 3.** Charakterystyka drożdży zastosowanych w badaniach

Drożdże	Typ	Nazwa handlowa	Producent
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Górnej fermentacji	Safale S04	Fermentis, Lesaffre, Francja
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Dolnej fermentacji	Saflager S23	Fermentis, Lesaffre, Francja
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Górnej fermentacji	Voss kveik	Lallemand, Kanada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	Górnej fermentacji	Belle Saison	Lallemand, Kanada

#### 4.4. Metody badawcze

**Tabela 4.** Aparatura badawcza oraz metody analityczne zastosowane w celu realizacji cyklu badań

<b>Aparatura</b>	<b>Zastosowanie / Badany parametr</b>	<b>Metoda</b>
Młynek do słodu DLFU W20050 (VLB, Berlin, Niemcy)	Śrutowanie słodu	-
Zacierańnica laboratoryjna typu LB-12 (VLB, Berlin, Niemcy)	Prowadzenie procesu zacierania infuzyjnego słodu w kontrolowanych warunkach temperatury celem pozyskania brzeczek	-
Wirówka laboratoryjna MPW-351R (MPW MED. INSTRUMENTS, Warszawa, Polska)	Oddzielenie biomasy drożdży od podłoża fermentacyjnego	-
Wytrząsarka laboratoryjna 358A (Elpin Plus, Lubawa, Polska)	Odgazowanie piw	-
Kolumnienki Strata C18-E, 500 mg / 6 mL (Phenomenex, Torrance, USA)	Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) poprzedzająca chromatograficzną analizę prenyloflawonoidów (ksantohumolu i izoksantohumolu)	Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Gęstościomierz oscylacyjny 30PX (Mettler Toledo, Columbus, USA)	Ekstrakt	Pomiar zawartości ekstraktu
pH-metr MP 240 (Mettler Toledo, Columbus, USA)	Wartość pH	Pomiar pH
Gęstościomierz oscylacyjny z analizatorem piwa DMA 450M (Anton Paar, Graz, Austria)	Gęstość, ekstrakt rzeczywisty i pozorny, ekstrakt brzezki, rzeczywisty i pozorny stopień odfermentowania (ADF i RDF), barwa brzezki, kaloryczność, zawartość etanolu	Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni
Wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC) Shimadzu Prominence LC-20DP (Shimadzu, Kyoto, Japan) wyposażony w detektor refraktometryczny Shimadzu RID-10A oraz kolumnę Rezex ROA-Organic Acid H+ column (300 × 7.8 mm) (Phenomenex, Torrance, USA)	Profil węglowodanowy (zawartość glukozy, maltozy, maltotriozy, dekstryn), zawartość produktów fermentacji (etanolu i glicerolu)	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
Wysokosprawny chromatograf cieczowy	Zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu	Wysokosprawna chromatografia cieczowa

<p>(HPLC) Dionex (Thermo Fischer Scientific, Germering, Niemcy) wyposażony w detektor typu DAD (diode array detector) UltiMate 3000, pompę LPG-3400A, autosampler EWPS-300SI oraz kolumnę Cadenza CD-C18 (75 × 4.6 mm, 5 μm) (Imtakt, Kyoto, Japan)</p>		
<p>Wysokosprawny chromatograf cieczowy Waters 2690 (Millipore, USA) wyposażony w detektor typu DAD Waters 996 (Millipore, USA) oraz kolumnę Kinetex C-18 5u XB-C18 100A (Phenomenex Torrance, USA)</p>	<p>Zawartość prenyloflawonoidów (ksantohumolu i izoksantohumolu)</p>	<p>Wysokosprawna chromatografia cieczowa</p>
<p>Chromatograf gazowy GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) ze spektrometrem mas GCMS-QP2010 SE (Shimadzu, Kyoto, Japan) wyposażony w kolumnę ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)</p>	<p>Profil związków lotnych</p>	<p>Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)</p>

(Phenomenex, Torrance, USA)		
Spektrofotometr UV-2401 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)	Ogólna zawartość związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu oraz aktywność przeciwutleniająca metodą badania zdolności do redukcji jonów żelaza (FRAP), metodą pomiaru zdolności neutralizacji rodnika DPPH <sup>•</sup> i kationorodnika ABTS <sup>•+</sup>	Spektrofotometria UV-VIS
Spektrofotometr BECKMAN DU-650 UV-2401 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)	Analiza poziomu goryczki w piwie (IBU)	Spektrofotometria UV-VIS
Spektrofotometr Evolution 300 (ThermoScientific, Waltham, USA)	Analiza indeksu brązowienia (BI)	Spektrofotometria UV-VIS
Analizator komórek Scepter Cell Counter wyposażony w 40 µm sensory (Merck, Darmstadt, Niemcy)	Analiza cech morfologicznych drożdży	Pomiar różnic napięć elektrycznych w trakcie przepływu przez sensor zawiesiny komórkowej

## **5. Wykaz prac stanowiących cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**

**Gąsior, J.,** Kawa-Rygielska, J. & Kucharska, A. Z. (2020). Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules*, 25(17), p. 3882.

**MEiN 140, IF 4,412**

**Paszkot, J.,** Kawa-Rygielska, J. & Anioł, M. (2021). Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants*, 10(5), p.763.

**MEiN 100, IF 7,675**

**Paszkot, J.,** Kawa-Rygielska, J. (2022). Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process. *Molecules*, 27, 3971.

**MEiN 140, IF 4,6**

**Paszkot, J.,** Gasiński, A. & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented with different strains of brewing yeast. *Scientific Reports*, 13(1), 6725.

**MEiN 140, IF 4,6**

**Sumaryczna ilość punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi: 520**

**Sumaryczny Impact Factor wynosi: 21,287**



## 6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Cykl prac badawczych stanowi opracowanie technologii produkcji piwa ciemnego o wysokim potencjale antyoksydacyjnym, uwzględniający etapy technologiczne i ich wpływ na skład i parametry technologiczne brzeczek i piw. W badaniach szczególna uwaga została poświęcona kluczowym dla kształtowania właściwości przeciwutleniających etapom procesu technologicznego: projektowaniu składu zasypu słodowego (**publikacja 1**), procesowi chmielenia z uwzględnieniem chmielenia techniką na zimno (**publikacja 2**), jak również procesowi fermentacji z udziałem szczepów drożdży piwowarskich o odmiennej charakterystyce (**publikacja 3 i 4**). W tym rozdziale przedstawione zostały najważniejsze wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych badań. Publikacje omawiane są chronologicznie, w kolejności ukazywania się w czasopiśmie.

**Publikacja 1:** Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains

**Przedmiotem badań było określenie wpływu stosowania sładów ciemnych i ziaren zbóż prażonych na jakość brzeczki piwowarskiej.** Model doświadczalny obejmował ocenę profilu węglowodanowego, zawartości związków fenolowych, właściwości przeciwutleniających, poziomu brązowienia oraz zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu w brzeczках wytworzonych z dodatkiem ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych. Wyróżniającym elementem badań była analiza jakości brzeczki, której skład ma kluczowy wpływ na przebieg procesu fermentacji i właściwości przeciwutleniające piwa.

Materiał badawczy stanowiły brzeczki pozyskane w wyniku filtracji zacierów wytworzonych z 90% sładu jęczmiennego typu pilzneńskiego oraz dodatku 10% wybranego sładu ciemnego (czekoladowego jasnego - CJ, czekoladowego ciemnego - CC, pszenicznego czekoladowego - PC) lub prażonego ziarna zbóż (jęczmienia prażonego - JP oraz jęczmienia brown - JB) oraz brzeczki pozyskane w wyniku filtracji zacierów wytworzonych z 60 - 80% sładu jęczmiennego typu pilzneńskiego oraz 20 - 40 % sładu czekoladowego ciemnego (CC20, CC25, CC30, CC35, CC40). W procesie wytwarzania brzeczek zastosowano następujące parametry: 52°C przez 10 min, 63°C przez 40 min, 72°C przez 30 min oraz 78°C przez 10 min mash out. Zacierzy poddano filtracji uzyskując brzeczki. Próbę kontrolną (P) stanowiła brzeczka sporządzona w analogicznych warunkach ze 100% sładu jęczmiennego typu pilzneńskiego. Zawartość ekstraktu w brzeczках ustalono na 12°Bx.

Przeprowadzone badania wykazały, że głównymi węglowodanami brzeczek były: maltoza (51,8 - 55,71 %), maltotrioza (13,9 - 14,64%), dekstryny (24,91 - 28,90%) i glukoza (0,77 - 6,80 %). Wyniki te potwierdzają inni autorzy (Coghe i wsp. 2005, Briggs i wsp. 2004). Wykazano, że brzeczki wytworzone z 10% udziałem różnych sładów ciemnych lub prażonych ziaren różniły się pod względem zawartości: maltozy, dekstryn, maltotriozy i glukozy. W wyniku dodatku ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych zawartość maltozy obniżała się (CJ, CC, PC, JB) lub pozostawała bez zmian (JP). Zawartość dekstryn była wyższa w porównaniu do próby kontrolnej w próbach

CC, JP i JB, a niższa w CJ i PC. Określono również, że wraz ze wzrostem udziału słodu ciemnego w zasypie (w zakresie 20 – 40%) obniżała się zawartość maltozy i maltotriozy, a zawartość dekstryn w brzeczkiach rosła. Spośród analizowanych węglowodanów, maltoza, maltotrioza i glukoza są cukrami ulegającymi fermentacji z udziałem drożdży *S. cerevisiae*. Dekstryny nie są fermentowane przez klasyczne szczepy drożdży piwowarskich (Walker i Stewart 2016). Najwyższą zawartością cukrów fermentowanych przez *S. cerevisiae* w brzeczkiach cechowała się próba JP, kolejno próba kontrolna P i JB. Brzeczki JP i JB były wytworzone z zastosowaniem niesłodowanych, prażonych ziaren zbóż. Wyniki wskazują, że stosowanie niesłodowanych ziaren zbóż prażonych w mniejszym stopniu wpływało na zawartość cukrów fermentujących w brzeczce w porównaniu do stosowania sładów ciemnych. W serii prób wytworzonych z dodatkiem 20 – 40 % słodu czekoladowego ciemnego zaobserwowano obniżenie zawartości cukrów fermentowanych przez klasyczne szczepy drożdży piwowarskich w porównaniu do próby kontrolnej. Wyniki badań Coghe i wsp. (2005) potwierdzają, że dodatek 10% sładów ciemnych nie powoduje znaczących zmian w profilu węglowodanowym brzeczki, ale może mieć niekorzystny wpływ na proces fermentacji etanolowej, prowadząc do obniżenia stopnia odfermentowania i zawartości etanolu w piwach.

Miarą zawartości produktów reakcji Maillarda w próbach był indeks brązowienia (BI) oraz zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu (5-HMF). Brzeczki różniły się pod względem BI w zależności od zastosowanego typu słodu ciemnego lub prażonych ziaren, jak również ich dawki. Próba kontrolna charakteryzowała się wartością indeksu brązowienia 0,62 AU i zawartością 5-HMF 0,66 mg/L. Brzeczki z dodatkiem ciemnych sładów wykazywały znacząco wyższy BI (1,05 – 17,77 AU) i zawartość 5-HMF (5,54 – 91,94 mg/L). Ponadto zaobserwowano, że wraz ze wzrostem intensywności barwy (BI) wzrastała zawartość dekstryn oraz 5-HMF, a obniżała się zawartość maltozy i maltotriozy w brzeczkiach.

Brzeczki poddano również analizie ogólnej zawartości związków fenolowych metodą Folina – Ciocalteu (TPC), zdolności do redukcji jonów żelaza FRAP (ang. ferric reducing antioxidant power) oraz aktywności przeciwutleniającej ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-

azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Zawartość związków fenolowych w brzeczkach z dodatkiem wybranego słoðu ciemnego lub ziaren prażonych wynosiła 176,02 – 922,32 mg GAE/L i była wyższa od zawartości w próbie kontrolnej (192,58 mg GAE/L) dla wszystkich brzeczek ciemnych poza JB. Analiza korelacji wykazała, że wraz ze wzrostem ogólnej zawartości związków fenolowych wzrastała aktywność przeciwutleniająca określona zarówno metodą FRAP, jak i ABTS<sup>+</sup>. Zaobserwowano również związek pomiędzy TPC, ABTS<sup>+</sup> i FRAP, a poziomem brązowienia brzeczek i zawartością 5-HMF. Wykazano, że TPC wzrastała wraz ze wzrastającą wartością BI i 5-HMF. Oznacza to, że dodatek ciemnych słoðów był przyczyną wzrostu zawartości związków fenolowych jak również aktywności przeciwutleniającej brzeczek.

**Osiągnięciem naukowym badań przedstawianych w publikacji jest wskazanie zmian w parametrach technologicznych i właściwościach przeciwutleniających brzeczek piwowarskich spowodowanych dodatkiem ciemnych słoðów lub ziaren zbóð prażonych.** W wyniku przeprowadzonych badań określono, że zastosowanie ciemnych słoðów lub prażonych ziaren zbóð w dawce 10% pozwoliło na zwiększenie zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego brzeczek. Spośród brzeczek sporządzonych z 10% dodatkiem słoðu ciemnego lub prażonego ziarna zbóð, najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych i aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się brzezki wytworzone z dodatkiem słoðu czekoladowego ciemnego i jęczmienia prażonego. Wraz ze zwiększającym się udziałem słoðu ciemnego z składzie zasypu słoðowego zaobserwowano obniżenie zawartości maltozy, maltotriozy i glukozy w profilu węglowodanowym brzezki, jak również wzrost wartości indeksu brązowienia, zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu, ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej. Na podstawie analizy profilu węglowodanowego, ogólnej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej brzeczek jako materiał badawczy do kolejnego etapu badań wytypowano brzezke wytworzoną z dodatkiem 10% słoðu czekoladowego ciemnego.

**Publikacja 2:** Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content

**Celem badań było określenie wpływu procesu technologicznego na właściwości przeciwutleniające piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu.** Badania obejmowały zaprojektowanie receptury i technologii produkcji piwa ciemnego pozwalającej na uzysk wysokiej zawartości związków fenolowych, ze szczególnym uwzględnieniem wybranych prenyloflawonoidów chmielu. Analizie poddano zawartość etanolu, ekstraktu rzeczywistego i pozornego, stopień odfermentowania, gęstość, poziom goryczki, profil węglowodanowy (zawartość maltozy, maltotriozy, glukozy i dekstryn), zawartość glicerolu, zawartość ksantohumolu i izoksantohumolu, barwę, zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu, ogólną zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą (FRAP i ABTS<sup>•+</sup>).

Materiał doświadczalny stanowiły brzeczki i piwa ciemne. Receptura i technologia produkcji została opracowana pod kątem celem uzyskania piw o podwyższonej zawartości ksantohumolu i aktywności przeciwutleniającej. Zacier złożony z 90% słodu jęczmiennego typu pilzneńskiego oraz 10% słodu czekoladowego ciemnego. Otrzymałą w wyniku filtracji zacieru brzeczki nachmielono z zastosowaniem chmielu goryczkowego Marynka (1,2 g/L, 60 min, 100°C), następnie podzielono na 4 próby i każdą z nich nachmielono jedną z odmian chmieli aromatycznych: Amarillo, Cascade, Centennial lub Galaxy (2,5 g/L, 10 min, 100°C). Nachmielone brzeczki schłodzono i inokulowano uprzednio rehydratowaną biomasą drożdży piwowskich górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04. Fermentację prowadzono przez 7 dni w temperaturze 18°C. Następnie brzeczki zlaną z osadu drożdżowego do sterylnych fermentorów, chmielono na zimno (2,5 g/L) i poddano dofermentowaniu przez kolejne 7 dni w temperaturze 18°C. Następnie piwa przelano do butelek i poddano refermentacji. Leżakowanie prowadzono przez 28 dni w temperaturze 4°C. Próby do analiz pobierano po następujących etapach technologicznych: chmieleniu, fermentacji, dofermentowaniu i leżakowaniu.

Na podstawie przeprowadzonych badań określono, że wytworzone piwa nie różniły się pod względem zawartości etanolu, która wynosiła 5,37 – 5,49 % v/v. Zbliżona zawartość etanolu, poziom odfermentowania i gęstość piw wynikały z użycia

w procesie tej samej brzeczki, której zawartość ekstraktu wynosiła 12,31 – 12,61 % w/w. Goryczka piw różniła się pomiędzy wariantami piw chmielonych różnymi odmianami chmielu i wynosiła 55,45 – 75,22 IBU (ang. International Brewery Unit). Nachmielone brzeczki różniły się również zawartością maltozy (49,21 – 58,02 g/L), dekstryn (30,68 – 46,85 g/L), maltotriozy (12,06 – 15,13 g/L) i glukozy (6,53 – 8,34 g/L). Proces fermentacji doprowadził do obniżenia zawartości maltozy (0,34 – 0,36 g/L), maltotriozy (4,51 – 5,31 g/L) i całkowitego wykorzystania glukozy. Badania wykazały, że zastosowany szczep drożdży *S. cerevisiae* S04 wykorzystywał w procesie fermentacji glukozę, maltozę i maltotriozę. Zdolność do wykorzystania tych węglowodanów przez drożdże górnej fermentacji *S. cerevisiae* potwierdzają badania innych autorów (Walker i Stewart 2016). Dekstryny nie zostały wykorzystane w procesie fermentacji etanolowej przeprowadzonej z zastosowaniem wybranego szczepu drożdży *S. cerevisiae* S04. Zawartość maltozy w piwach po fermentacji, dofermentowaniu i leżakowaniu nie różniła się. Po dofermentowaniu wśród węglowodanów dominowały dekstryny (34,22 – 44,24 g/L). W gotowych piwach wykazano zawartość maltozy (0,14 – 0,46 g/L), maltotriozy (0 – 1,39 g/L), glukozy (0 – 0,84 g/L) i dekstryn (33,58 – 42,56 g/L). Ponadto na tym etapie technologicznym zaobserwowano również obniżenie zawartości dekstryn w próbach piw ciemnych chmielonych odmianami Cascade i Centennial. Przyczyną tego zjawiska może być aktywność enzymów chmielu dawkowanego techniką na zimno po fermentacji głównej do piwa (Kirkpatrick i wsp. 2018). Zawartość glicerolu, który jest głównym produktem ubocznym fermentacji zmieniała się w trakcie kolejnych etapów fermentacji i w gotowym piwie wynosiła 2,74 – 3,03 g/L. Biosynteza glicerolu przez *S. cerevisiae* zależy od temperatury procesu fermentacji, wykorzystanego szczepu drożdży piwowarskich, zawartości ekstraktu w fermentującej brzeczce, ilości i rodzaju źródła azotu, wartości pH, zawartości SO<sub>2</sub> i tlenu w podłożu hodowlanym (Zhao 2015).

Brzeczki i piwa ciemne zostały poddane analizie ogólnej zawartości związków fenolowych, właściwości przeciwutleniających (FRAP i ABTS<sup>•+</sup>) oraz zawartości ksantohumolu oraz izoksantohumolu. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że zastosowanie różnych odmian chmieli prowadzi do uzyskania piw różniących się ogólną zawartością związków fenolowych (371,51 – 475,05 mg GAE/L), zdolnością do

redukcji jonów żelaza (3,64 – 4,88 mmol TE/L) oraz pojemnością przeciwutleniającą ABTS<sup>•+</sup> (1,18 – 1,43 mmol TE/L). Podczas procesu technologicznego w większości piw zaobserwowano wzrost ogólnej zawartości związków fenolowych po chmieleniu brzeczki, fermentacji i dofermentowaniu oraz obniżenie zawartości po leżakowaniu. Zdolność do redukcji jonów żelaza rosła wraz z przebiegiem kolejnych etapów procesu technologicznego, a dla gotowych piw wynosiła 3,64 – 4,88 mmol TE/L. Z kolei wzrost pojemności przeciwutleniającej ABTS<sup>•+</sup> obserwowano po chmieleniu (1,53 – 1,76 mmol TE/L), natomiast po leżakowaniu zanotowano obniżenie się jej wartości (1,18 – 1,43 mmol TE/L). Badane piwa charakteryzowały się wyróżniająco wysoką zawartością ksantohumolu (1,77 – 1,93 mg/L) i izokszantohumolu (0,85 – 1,19 mg/L) w porównaniu do piw badanych przez innych autorów (Stevens i wsp. 1999, Tobała i wsp. 2014). Wysoka zawartość ksantohumolu w badanych piwach ciemnych może być związana z wykorzystaniem w procesie produkcji sładów ciemnych bogatych w melanoidyny, które mogą ograniczać proces izomeryzacji ksantohumolu do izokszantohumolu (Magalhães i wsp. 2008, Wunderlich i wsp. 2005, Karabín i wsp. 2013). Piwo chmielone odmianą chmielu Galaxy miało najwyższą ogólną zawartość związków fenolowych, aktywność przeciwutleniającą FRAP i ABTS<sup>•+</sup> oraz zawierało najwięcej ksantohumolu i izokszantohumolu. Różnice w zawartości związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej, jak również w zawartości ksantohumolu w różnych odmianach chmielu potwierdzają inni autorzy (Kowalczyk i wsp. 2013, Stevens i Page 2004).

Analizie poddano również barwę brzeczek i piw oraz zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu. Gotowanie brzeczki było przyczyną wzrostu intensywności barwy (133,43 EBC), natomiast fermentacja prowadziła do jej obniżenia (107,10 – 132,08 EBC). W rezultacie gotowe piwa charakteryzowały się barwą 110,40 – 130,05 EBC. Zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu wykazano jedynie w brzeczkach (18,92 – 26,72 mg/L). Po procesie fermentacji głównej zaobserwowano całkowitą redukcję zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu w piwach. 5-HMF w procesie fermentacji zostaje prawdopodobnie przekształcony do alkoholu 5-hydroksymetylofurfurylowego (Viegas i wsp. 2018).

Wytworzone w ramach doświadczenia piwa ciemne różniły się zawartością związków fenolowych i potencjałem przeciwutleniającym w zależności od zastosowanej w procesie technologicznym odmiany chmielu. Ogólna zawartość związków fenolowych w piwach rosła po fermentacji głównej i dofermentowaniu, a obniżała się po leżakowaniu. Z kolei zdolność piw do redukcji jonów żelaza rosła z każdym kolejnym badanym etapem procesu technologicznego. Fermentacja etanolowa prowadziła do zmian barwy piwa oraz była przyczyną całkowitej redukcji zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu. Wybrany materiał badawczy oraz zastosowana technologia produkcji piwa pozwoliły na uzyskanie piw o wyróżniająco wysokiej zawartości ksantohumolu i izoksantohumolu w porównaniu do piw komercyjnych oraz piw wytworzonych klasycznymi metodami przez innych autorów.

**Osiągnięciem naukowym badań przedstawionych w publikacji jest określenie kluczowych etapów procesu technologicznego dla kształtowania zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego.** Ponadto uzyskane wyniki pozwoliły na scharakteryzowanie wpływu procesu fermentacji etanolowej na barwę piw i zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu. Ustalono, że w trakcie fermentacji obserwuje się całkowitą redukcję 5-hydroksymetylofurfuralu w piwach. Udowodniono również, że dobór surowców, metody zacierania oraz chmielenia pozwala na pozyskanie piw ciemnych o wysokiej zawartości ksantohumolu.



### **Publikacja 3: Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process**

**Celem badań była analiza wpływu zastosowania ciemnych sładów oraz doboru materiału biologicznego na efekty procesu fermentacji etanolowej piw.** Materiał badawczy stanowiły brzeczki, brzeczki nachmielone, piwa wytworzone z udziałem różnych szczepów drożdży piwowarskich, jak również biomasa drożdży piwowarskich oddzielona po procesie fermentacji. Brzeczki zostały uzyskane w wyniku filtracji zacierów. Zastosowano następujące parametry zacierania: 52°C przez 10 min, 63°C przez 40 min, 72°C przez 30 min i 78°C przez 10 min (mash out). Surowcem w produkcji brzeczki jasnej był słód pilzneński, który stanowił 100% zasypu słodowego. Do produkcji brzeczki ciemnej użyto 90% słodu pilzneńskiego oraz 10% słodu czekoladowego ciemnego. Po procesie filtracji przeprowadzono chmielenie brzeczek chmielem gorzcowym Marynka (1 g/L, 60 min, 100°C) oraz chmielem aromatycznym Lubelski (1 g/L, 10 min, 100°C). W procesie fermentacji zastosowano drożdże piwowarskie dolnej fermentacji *Saccharomyces pastorianus* S23 (Saflager S-23), drożdże górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04 (Safale S-04) oraz niekonwencjonalne szczepy *S. cerevisiae* KV (Voss kveik) lub *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA (Belle Saison). Proces fermentacji głównej prowadzono przez 7 dni w temperaturze optymalnej dla badanego szczepu drożdży (S23 – 12°C, S04 – 18°C, KV – 35°C, SA – 18°C). Następnie piwa zlane z nad osadu drożdżowego i poddano dofermentowaniu przez kolejne 7 dni. Po procesie dofermentowania piwa zabutelkowano z dodatkiem glukozy w celu przeprowadzenia refermentacji i wysycenia dwutlenkiem węgla.

W wytworzonych brzeczkach określono zawartość dekstryn, maltozy, maltotriozy i glukozy. Dodatek 10% słodu czekoladowego ciemnego w procesie technologicznym produkcji brzeczki nie wpłynął na zawartość maltotriozy (8,17 – 9,78 g/L), jak również na całkowitą zawartość zidentyfikowanych węglowodanów w brzeczkach nachmielonych (64,91 – 69,11 g/L). Gotowe piwa nie różniły się istotnie statystycznie zawartością maltozy (0 – 1 g/L), maltotriozy (0,85 – 1,84 g/L) i glukozy (0 – 0,6 g/L). Badania potwierdziły zdolność drożdży *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA

do wykorzystywania dekstryn. W piwach fermentowanych z zastosowaniem tego szczepu drożdży zanotowano obniżenie zawartości dekstryn o 50,8 – 59,0% w stosunku do odpowiednich brzeczek nachmielonych. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* wykazują aktywność enzymu glukoamylazy, dzięki czemu mają zdolność wykorzystywania dekstryn w procesie fermentacji (Krogerus i Gibson 2020).

Zawartość etanolu w piwach wynosiła 4,51 – 5,79% v/v. Poza etanolem i dwutlenkiem węgla w procesie fermentacji etanolowej powstaje szereg ubocznych produktów fermentacji, wśród których dominuje glicerol (Walker i Stewart 2016). Uzyskane piwa zawierały 1,37 – 2,05 g/L glicerolu. Nie zaobserwowano jednoznacznych tendencji obrazujących wpływ zastosowania ciemnych sładów lub szczepu drożdży zastosowanego w procesie fermentacji na zawartość glicerolu. Piwa fermentowane przez *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA niezależnie od zastosowania ciemnych sładów w produkcji brzeczki charakteryzowały się najwyższą zawartością etanolu (5,60 – 5,79% v/v), rzeczywistym i pozornym stopniem odfermentowania (RDF 78,56 – 80,36% w/w, ADF 95,89 – 98,26% w/w) i najniższą zawartością ekstraktu rzeczywistego (2,23 – 2,58% w/w) i pozornego (0,19 – 0,47% w/w). Badane piwa jasne wykazały wyższy rzeczywisty i pozorny stopień odfermentowania niż piwa ciemne fermentowane z użyciem tego samego szczepu drożdży. Może to być rezultatem hamującego wpływu związków Maillarda na procesy metaboliczne drożdży, jak również różnic w zdolności komórek drożdży różnych szczepów do flokulacji (Dack i wsp. 2017, Stewart 2018).

Przeprowadzone badania pozwoliły również określić, w jaki sposób stosowanie ciemnych sładów oraz zastosowany szczep drożdży piwowarskich wpływają na ogólną zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą (FRAP, ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>). Zarówno brzeczki jak i piwa wytworzone z dodatkiem ciemnego sładów charakteryzowały się wyższą ogólną zawartością związków fenolowych (TPC) oraz potencjałem przeciwutleniającym FRAP i ABTS<sup>•+</sup> niż odpowiadające im brzeczki i piwa jasne. Ciemne piwa charakteryzowały się wyższą wartością TPC o 20,62 – 123,96%, zdolnością do redukcji jonów żelaza o 60,19 – 69,07%, a pojemnością antyoksydacyjną ABTS<sup>•+</sup> o 39,86 – 48,80% wyższą w porównaniu do odpowiednich piw

jasnych. Ponadto charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwutleniającą, co prawdopodobnie wynika z zawartości melanoidyn – związków powstających w końcowym etapie reakcji Maillarda o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej (Carvalho i wsp. 2014, Echavarría i wsp. 2012, Martinez-Gomez i wsp. 2020). Proces fermentacji prowadzi do zmian w zawartości związków fenolowych, a w rezultacie również właściwości przeciwutleniających piw m.in. ze względu na zjawisko adsorpcji polifenoli na powierzchni ścian komórkowych komórek drożdżowych (Carvalho i wsp. 2022). Budowa ściany komórkowej zmienia się w trakcie cyklu życiowego komórki drożdżowej. Wraz z pogarszającym się stanem fizjologicznym biomasy, zmniejsza się udział mannoprotein w strukturze ścian komórkowych, co może być przyczyną zmniejszenia zdolności komórki do adsorpcji związków fenolowych na powierzchni i uwolnienia tych związków do podłoża pod koniec procesu fermentacji. Szczepy drożdży różnią się składem ściany komórkowej, co z kolei może wpłynąć na zróżnicowanie zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego piw (Carvalho i wsp. 2022, Fumi i wsp. 2011, Leonard i wsp. 2021).

Biomasę pofermentacyjną drożdży poddano badaniu za pomocą analizatora komórek Scepter Cell Counter. Określono średnią objętość i średnicę komórek. Ponadto na podstawie danych literaturowych komórki drożdży podzielono na cztery klasy wielkości: klasa I – komórki o średnicy 3 – 4,5  $\mu\text{m}$ , klasa II – komórki o średnicy 4,6 – 8  $\mu\text{m}$ , klasa III – komórki o średnicy 8,1 – 15,0  $\mu\text{m}$  (Kawa-Rygielska 2012). Drożdże *S. cerevisiae* S04 oraz *S. pastorianus* S23 charakteryzowały się największą średnicą spośród badanych szczepów (5,86 – 6,0  $\mu\text{m}$ ). Najmniejszy rozmiar komórek był charakterystyczny dla drożdży *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA. (4,13 – 4,5  $\mu\text{m}$ ), a największym zróżnicowaniem pomiędzy wielkością komórek po fermentacji piwa jasnego i ciemnego charakteryzowały się drożdże *S. cerevisiae* KV (4,54 – 5,43  $\mu\text{m}$ ), gdzie komórki były średnio niemal o 0,89  $\mu\text{m}$  większe po fermentacji brzezki wytworzonej z dodatkiem ciemnego słodu. Ponadto wykazano zróżnicowanie pomiędzy rozkładem wielkości komórek zarówno pomiędzy szczepami drożdży, jak i te wynikające z różnego składu podłoża fermentacyjnego. Większość komórek drożdży w biomacie pofermentacyjnej *S. cerevisiae* S04 i *S. pastorianus* S23 charakteryzowała się średnicą 4,6 – 8  $\mu\text{m}$ . Nie wykazano znaczącego zróżnicowania w wielkości komórek

w przypadku zastosowania ciemnych sładów w technologii produkcji. Drożdże *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzowały się największym udziałem komórek małych o średnicy 3 – 4,5  $\mu\text{m}$  (klasa I). Do tej klasy zaliczono aż 80,96 – 84,90% wszystkich analizowanych komórek tego szczepu. Z kolei *S. cerevisiae* KV wykazały największe zróżnicowanie w wielkości komórek w zależności od dodatku sładów ciemnego w procesie wytwarzania brzezki. W przypadku biomasy drożdży KV zanotowano wyraźny wyższy udział komórek w klasie I (3 – 4,5  $\mu\text{m}$ ) w biomacie po fermentacji brzezki ciemnej w porównaniu do biomasy po fermentacji brzezki jasnej. Rozmiar komórek drożdży po procesie fermentacji zależny był od zawartości etanolu w podłożu. Wraz ze wzrostem jego zawartości obserwuje się zwiększenie udziału mniejszych komórek w biomacie. Potwierdzają to badania Foszczyńskiej i wsp. (2013). Co więcej na rozmiar komórek wpływ może mieć również zawartość związków reakcji Maillarda, które działają hamująco na wzrost i rozwój komórek m.in. przez właściwości chelatujące jony magnezu, które są istotne z perspektywy metabolizmu komórki drożdżowej (Dack i wsp. 2017).

**Innowacyjnym elementem pracy było wykazanie różnic w przebiegu i efektach procesu fermentacji brzeczki w zależności od zastosowania dodatku sładów ciemnego w technologii produkcji oraz doboru szczepu drożdży piwowarskich.** W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że zastosowanie ciemnych sładów w technologii produkcji brzezki odgrywało kluczową rolę w kształtowaniu cech jakościowych i technologicznych piwa. Brzezki różniły się pod względem kompozycji węglowodanów w zależności od zasypu słodowego. Głównymi węglowodanami w brzeczki i piwach były dekstryny. Szczep drożdży *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzował się zdolnością do wykorzystywania dekstryn, co w rezultacie pozwoliło na wytworzenie piwa o wysokim stopniu odfermentowania i zawartości etanolu. Wykazano, że zastosowanie sładów ciemnych powodowało obniżenie stopnia odfermentowania piw, niezależnie od szczepu drożdży użytego w procesie fermentacji. Badane piwa ciemne charakteryzowały się wyższą ogólną zawartością związków fenolowych oraz potencjałem przeciwutleniającym (FRAP i ABTS<sup>+</sup>) niż piwa jasne. Ponadto określono wpływ szczepu drożdży zastosowanego w procesie fermentacji na aktywność antyoksydacyjną i zawartość związków

fenolowych w piwach. Wykazano, że w przypadku piwa ciemnego najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych charakteryzowało się piwo fermentowane z udziałem *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA, a w przypadku piwa jasnego – z udziałem szczepu *S. cerevisiae* S04. Zastosowanie słodów ciemnych w recepturze zacieru wpłynęło również na rozmiar komórek drożdży w biomacie pofermentacyjnej, powodując zmiany w wielkości komórek widoczne szczególnie w biomacie *S. cerevisiae* KV. Ponadto zaobserwowano różnice w średnicy komórek drożdży piwowarskich różnych szczepów.

**Publikacja 4:** Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented with different strains of brewing yeast

**Celem badań była analiza wpływu zastosowania ciemnego słołu i różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji na profil związków lotnych i właściwości sensoryczne piw.** Materiał badawczy stanowiło osiem piw, w tym cztery piwa jasne wytworzone ze 100% słołu jęczmiennego typu pilzneńskiego oraz cztery piwa ciemne wytworzone z 90% słołu jęczmiennego typu pilzneńskiego oraz 10% słołu czekoladowego ciemnego. Zacieranie słołu przeprowadzono w następujących warunkach: 52°C przez 10 min, 63°C przez 40 min, 72°C przez 30 min i 78°C przez 10 min (mash out). Brzeczki nachmielono z zastosowaniem chmielu goryczkowego Marynka (1 g/L; 60 min, 100°C) oraz chmielu aromatycznego Lubelski (1 g/L, 10 min, 100°C). Brzeczki jasne i ciemne zostały poddane fermentacji z udziałem drożdży *Saccharomyces pastorianus* S23 (Saflager S-23), *Saccharomyces cerevisiae* S04 (Safale S-04) oraz niekonwencjonalnych w piwowarstwie szczepów *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA (Belle Saison) oraz *S. cerevisiae* KV (Voss kveik). Fermentację główną i dofermentowanie prowadzono w temperaturach optymalnych dla zastosowanych szczepów drożdży (S23 – 12°C, S04 – 18°C, KV – 35°C, SA – 18°C). Piwa po dofermentowaniu zabutelkowano, poddano refermentacji i leżakowaniu (4°C przez 28 dni). Profil związków lotnych analizowano metodą chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo jonizacyjną (GC-FID) oraz chromatografii gazowej ze spektrometrią masową (GC-MS). Przeprowadzono również analizę sensoryczną piw z zastosowaniem autorskiej ankiety zaprojektowanej na potrzeby doświadczenia.

W badanych piwach zidentyfikowano 58 związków lotnych, w tym 16 alkoholi wyższych, 15 estrów, 9 aldehydów, 4 ketony, 1 kwas tłuszczowy, 1 alkan i 1 dien. Dominującą grupą związków chemicznych w profilu związków lotnych wszystkich badanych piw były alkohole wyższe (56,41 – 72,17%), następnie estry (14,58 – 20,82%), aldehydy (8,35 – 20,52%), terpeny i terpenoidy (1,22 – 6,57%) oraz ketony (0,42 – 1,00%). Zastosowany szczep drożdży piwowarskich wpłynął na całkowitą zawartość związków lotnych (TV) w piwach. Najwyższą TV charakteryzowały się piwa fermentowane przez drożdże *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA (134,33 – 143,08 mg/L).

Klasyczne piwa górnej fermentacji fermentowane przez szczep drożdży *S. cerevisiae* S04 charakteryzowały się niższą TV (105,69 – 114,00 mg/L), a najmniej związków lotnych zawierały piwa dolnej fermentacji, fermentowane z użyciem szczepu *S. pastorianus* S23 (69,25 – 72,51 mg/L). Dodatek ciemnych sładów w produkcji brzezki miał istotny wpływ na zawartość estrów w piwach fermentowanych z udziałem S04 i SA oraz terpenów i terpenoidów w piwach fermentowanych z udziałem S04, S23 i KV. Piwa ciemne fermentowane przez *S. cerevisiae* S04 i *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA zawierały więcej estrów niż piwa jasne fermentowane z zastosowaniem tego samego szczepu. Dack i wsp. (2017) wykazali, że podczas fermentacji ciemnych brzeczek drożdże wytwarzają mniej estrów niż podczas fermentacji brzeczki jasnych. Niższą syntezę estrów przypisali oni zmniejszeniu aktywności enzymów lub ekspresji genów związanych z ich syntezą podczas fermentacji brzeczki z dodatkiem sładów ciemnych. Wyniki naszych badań wskazują, że wpływ składu brzezki, w tym zawartości związków Maillarda, na ilość wytwarzanych estrów podczas fermentacji może być zależny od szczepu drożdży użytego w procesie fermentacji. Ponadto zaobserwowaliśmy również, że piwa jasne fermentowane przez szczepy S04, S23 i KV zawierały więcej związków z grupy terpenów i terpenoidów niż odpowiadające im piwa ciemne. Różnice w zawartości terpenów i terpenoidów pomiędzy analizowanymi piwami mogą wynikać z różnego potencjału szczepów drożdży do biotransformacji terpenów oraz ich adsorpcji na powierzchni komórek (Jiang i wsp. 2023, Praet i wsp. 2012). Istotnym czynnikiem w kształtowaniu profilu związków lotnych piw jest również temperatura fermentacji. Piwa fermentowane przez szczepy drożdży o wyższej optymalnej temperaturze fermentacji, miały wyższą całkowitą zawartość zidentyfikowanych związków lotnych w porównaniu do piw dolnej fermentacji. Wyniki te potwierdzają Castro i wsp. (2022).

Spośród zidentyfikowanych alkoholi wyższych, niezależnie od zastosowanego szczepu drożdży piwowskich, dominujący był 3-metylobutanol (11,46 – 37,52 mg/L), 2-metylopropan-1-ol (6,37 – 21,84 mg/L) i alkohol fenyloetylowy (4,93 – 20,15 mg/L). W piwach ciemnych fermentowanych przez S04 i KV zaobserwowano wyższą zawartość alkoholi wyższych niż w analogicznych piwach jasnych. Estrami zidentyfikowanymi w największym stężeniu były: octan etylu (6,01 – 20,07 mg/L),

octan fenyletylu (1,81 – 7,03 mg/L), oktanian etylu (0,62 – 1,44 mg/L) i octan izoamylu (0,54 – 1,05 mg/L). Z kolei spośród aldehydów w największej ilości występowały: furfural (2,60 – 7,77 mg/L), dekanal (1,79 – 5,61 mg/L), nonanal (1,42 – 2,79 mg/L) i acetal dietylowy aldehydu octowego (0,56 – 2,23 mg/L). Wśród ketonów najwięcej zidentyfikowano 6-metylo-5-hepten-2-onu (0,11 – 0,28 mg/L) i nerylacetonu (0,11 – 0,69 mg/L). We wszystkich badanych piwach wykryto linalool (1,15 – 2,05 mg/L), citroneloll (0,32 – 1,38 mg/L) i nerolidol (0,03 – 0,12 mg/L), które należą do grupy terpenów lub terpenoidów.

W ocenie sensorycznej piw uwzględniono zarówno podstawowe wyznaczniki jakościowe piwa takie jak: nasycenie, pienistość, barwa, klarowność, goryczka, smak słodki i kwaśny oraz deskryptory aromatu: alkoholowy, słodowy, karmelowy, prażony, chmielowy, owocowy, przyprawowy i trawiasty. Kluczowymi cechami różnicującymi badane piwa była wyczuwalność smaku kwaśnego oraz aromatu karmelowego i prażonego. Zaobserwowano, że piwa fermentowane z zastosowaniem szczepu drożdży dolnej fermentacji *S. pastorianus* S23 charakteryzowały się najmniej kwaśnym smakiem spośród badanych prób, opisywanym jako bardzo słabo wyczuwalny do średnio wyczuwalnego. Dobrze wyczuwalnym smakiem kwaśnym charakteryzowało się z kolei piwo jasne fermentowane przez *S. cerevisiae* S04 oraz piwa jasne i ciemne fermentowane przez *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA oraz *S. cerevisiae* KV. Aromaty karmelowy i prażony były we wszystkich piwach ciemnych bardziej intensywne niż w piwach jasnych. Interesujących danych na temat związku deskryptorów sensorycznych piw z ilością zidentyfikowanych związków lotnych z poszczególnych grup chemicznych dostarczyła analiza korelacji. Wskazuje, że wyczuwalność aromatu alkoholowego była skorelowana głównie z zawartością alkoholi wyższych. Zaobserwowano również silną dodatnią korelację pomiędzy zawartością alkoholi wyższych i estrów oraz silną ujemną korelację pomiędzy zawartością terpenów i terpenoidów, a zawartością estrów oraz aromatem przyprawowym piw. Ponadto analiza wykazała, że wraz ze wzrostem intensywności smaku gorzkiego, obniżała się wyczuwalność smaku kwaśnego w piwach. Co więcej, wraz ze wzrastającą intensywnością barwy piwa wzrastała wyczuwalność zapachu karmelowego i prażonego. W piwach o ciemniejszej barwie zaobserwowano również zmniejszoną



wyczuwalność aromatów pochodzących od chmielu: chmielowego, owocowego i kwiatowego.

**Osiągnięciem naukowym badań przedstawianych w publikacji jest wskazanie kluczowych różnic w profilu związków lotnych piw ciemnych i jasnych fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym niekonwencjonalnych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* KV oraz *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* SA.** Piwa fermentowane przez drożdże górnej fermentacji *S. cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA wykazywały najwyższą całkowitą zawartość związków lotnych spośród analizowanych piw, podczas gdy piwo dolnej fermentacji fermentowane przez drożdże *Saccharomyces pastorianus* S23 – najniższą. Dodatek ciemnego słodu nie wpłynął na całkowitą zawartość związków lotnych w piwach, jednak spowodował istotne różnice w całkowitej zawartości estrów w piwach fermentowanych przez drożdże *S. cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA oraz terpenów i terpenoidów w piwach fermentowanych przez *S. cerevisiae* S04, *S. pastorianus* S23 oraz *S. cerevisiae* KV. Większy wpływ na profil związków lotnych piw miał zastosowany szczep drożdży piwowarskich niż kompozycja zasypu słodowego. Kluczowe różnice w profilu związków lotnych piw fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów wynikały z różnic w zawartości estrów i alkoholi wyższych. Piwa fermentowane przez *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzowały się wyróżniająco wysoką całkowitą zawartością związków lotnych na tle innych badanych szczepów drożdży.

## 7. Podsumowanie

W ramach badań przedstawionych w spójnym tematycznie cyklu publikacji pod tytułem „Projektowanie piw ciemnych o wysokim potencjale przeciwutleniającym” przeprowadzono szereg doświadczeń, których głównym celem była **ocena potencjału wykorzystania słodów ciemnych i prażonych ziaren zbóż, dobór technologii produkcji oraz szczepów drożdży w kształtowaniu jakości piw ciemnych o zwiększonej zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej**

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawione zostały w postaci czterech spójnych tematycznie publikacji wydanych w czasopismach naukowych z listy Journal Citation Reports.

W ramach wyników badań przedstawionych w **publikacji 1.** wskazano zmiany w parametrach technologicznych, właściwościach przeciwutleniających oraz zawartości związków fenolowych w brzeczках piwowskich związanych z dodatkiem ciemnych słodów lub ziaren zbóż prażonych. Udowodniono, że zastosowanie ciemnych słodów w dawce 10% pozwala na zwiększenie zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego brzeczkek. Najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych i aktywnością przeciwutleniającą charakteryzowały się brzeczki wytworzone z dodatkiem słodu czekoladowego ciemnego lub jęczmienia prażonego. Wykazano również, że wraz ze zwiększającym się udziałem słodu ciemnego w zasypie obniżała się zawartość cukrów wykorzystywanych przez drożdże piwowskie *Saccharomyces cerevisiae* w brzeczках, jak również wzrastała wartość indeksu brązowienia, zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu, ogólna zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniająca.

Osiągnięciem naukowym przedstawionym w **publikacji 2.** było określenie kluczowych etapów procesu technologicznego dla kształtowania zawartości związków fenolowych i potencjału przeciwutleniającego oraz zaprojektowanie receptury i technologii produkcji piwa ciemnego o wysokiej zawartości ksantohumolu. Zaobserwowano, że zawartość związków fenolowych w piwie rosła na etapie chmielenia i fermentacji, a obniżała się po leżakowaniu. Ponadto udowodniono, że zastosowanie słodu czekoladowego ciemnego w dawce stanowiącej 10% zasypu

słodowego, dekokcyjnej metody zacierania i chmielenia na zimno pozwoliło na uzyskanie piwa o wysokiej zawartości ksantohumolu. Co więcej, jego zawartość zależała od zastosowanej w procesie technologicznym odmiany chmielu. Zaobserwowano również całkowitą redukcję 5-hydroksymetylofurfuralu w piwach trakcie fermentacji z zastosowaniem drożdży piwowarskich górnej fermentacji *S. cerevisiae* S04.

Osiągnięciem naukowym zaprezentowanym w **publikacji 3.** było wykazanie różnic w przebiegu i efektach procesu fermentacji brzeczek w zależności od zastosowania dodatku słodu ciemnego w technologii produkcji oraz doboru szczepu drożdży piwowarskich. Określono, że zastosowane szczepy drożdży prowadziły do wytworzenia piw o odmiennym profilu węglowodanowym, jak również zawartości etanolu i glicerolu. Wykazano, że dodatek sładów ciemnych powodował obniżenie stopnia odfermentowania piw, niezależnie od szczepu drożdży użytego w procesie fermentacji. Określono również, że komórki drożdży różniły się średnicą w zależności od szczepu jak i składu podłoża fermentacyjnego. Udowodniono ponadto, że piwa ciemne charakteryzowały się wyższą ogólną zawartością związków fenolowych oraz potencjałem przeciwutleniającym (FRAP i ABTS<sup>•+</sup>) w porównaniu do piw jasnych.

Dane zaprezentowane w **publikacji 4.** pozwalają na zidentyfikowanie kluczowych różnic w profilu związków lotnych piw ciemnych i jasnych fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów drożdży piwowarskich górnej i dolnej fermentacji, w tym niekonwencjonalnych drożdży *S. cerevisiae* KV oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA. Piwa fermentowane z przez drożdże górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzowały się najwyższą całkowitą zawartością związków lotnych spośród analizowanych piw, podczas gdy piwo dolnej fermentacji fermentowane przez drożdże *Saccharomyces pastorianus* S23 – najniższą. Dodatek ciemnego słodu nie wpłynął na całkowitą zawartość związków lotnych w piwach, jednak spowodował istotne różnice w całkowitej zawartości estrów w piwach fermentowanych przez drożdże *S. cerevisiae* S04 oraz *S. cerevisiae* var. *diastaticus* SA oraz terpenów i terpenoidów w piwach fermentowanych przez *S. cerevisiae* S04, *S. pastorianus* S23 oraz *S. cerevisiae* KV. Większy wpływ na profil

związków lotnych piw miał szczep drożdży piwowarskich niż kompozycja zasypu słodowego. Kluczowe różnice w profilu związków lotnych piw fermentowanych z zastosowaniem różnych szczepów wynikały z różnic w zawartości estrów i alkoholi wyższych. Piwa fermentowane przez *S. cerevisiae* var. *diastaticus* charakteryzowały się wyróżniająco wysoką całkowitą zawartością związków lotnych na tle innych badanych szczepów drożdży.

Powyżej przedstawiony cykl prac badawczych pozwala na potwierdzenie potencjału wykorzystania ciemnych słodów w produkcji piw o podwyższonej zawartości związków fenolowych oraz aktywności przeciwutleniającej. Ponadto wyniki przeprowadzonych badań wskazały również na potencjał fermentacji jako metody kształtującej zdolności antyoksydacyjne, zawartość związków fenolowych, jak również cechy sensoryczne przez wpływ na profil związków lotnych piw.

## 8. Wnioski

- I. Zastosowanie sładów ciemnych w technologii produkcji brzezki pozwala na otrzymanie piw o zwiększonym potencjale przeciwutleniającym, jak również modyfikacje cech technologicznych i jakościowych piwa.
- II. Dodatek 10% wybranych ciemnych sładów lub ziaren zbóż prażonych w procesie technologicznym produkcji brzeczek piwowarskich spowodował wzrost potencjału antyoksydacyjnego FRAP nawet o 68,3%, ABTS<sup>•+</sup> o 87,5% oraz ogólnej zawartości związków fenolowych nawet o 110,0%.
- III. Wraz ze wzrostem indeksu brązowienia wzrastała ogólna zawartość związków fenolowych i aktywność antyoksydacyjna FRAP i ABTS<sup>•+</sup> brzeczek. Najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych charakteryzowały się brzezki z dodatkiem sładu czekoladowego ciemnego lub jęczmienia prażonego.
- IV. Wraz ze wzrostem dawki sładu czekoladowego ciemnego w zakresie 20-40% udziału w zasypie słodowym wzrastała intensywność barwy brzeczek wyrażona za pomocą indeksu brązowienia, rosła zawartość dekstryn i 5-hydroksymetylofurfuralu oraz obniżała się zawartość maltozy i maltotriozy w brzeczkach.
- V. Ogólna zawartość związków fenolowych w procesie technologicznym produkcji piwa wzrastała na etapie chmielenia (7,7 – 22,9%), fermentacji (30,8 – 86,0%) i dofermentowania (2,5 – 17,8%). Następnie, w wyniku leżakowania obniżała się (35,1 – 55,8%). W rezultacie procesu fermentacji prowadzonego z zastosowaniem szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* S04 uzyskano piwa, które w zależności od odmiany chmielu zastosowanego w procesie technologicznym, zawierały 371,51 – 475,05 mgGAE/L związków fenolowych. Najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych charakteryzowało się piwo ciemne chmielone z użyciem odmiany Galaxy.
- VI. Zastosowanie sładu czekoladowego ciemnego w dawce stanowiącej 10% zasypu słodowego, dekokcyjnej metody zacierania i chmielenia na zimno pozwoliło na uzyskanie piw o wysokiej zawartości ksantohumolu (1,77 – 1,93 mg/L) i izoksantohumolu (0,85 – 1,19 mg/L). Spośród badanych chmieli, zastosowanie

odmiany Galaxy pozwoliło na uzyskanie najwyższej zawartość ksantohumolu i izokszantohumolu w piwach.

- VII. Określono, że proces fermentacji etanolowej z zastosowaniem drożdży piwowarskich górnej fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* S04 prowadził do całkowitej redukcji zawartości 5- hydroksymetylofurfuralu w piwach.
- VIII. Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* SA charakteryzował się zdolnością do wykorzystywania dekstryn, co pozwoliło na wytworzenie piwa o wysokim stopniu odfermentowania (78,56 – 80,36% w/w) i zawartości etanolu (5,6 – 5,79% v/v).
- IX. Badane piwa ciemne fermentowane z zastosowaniem różnych szczepów drożdży piwowarskich charakteryzowały się wyższą ogólną zawartością związków fenolowych (o 20,62 – 123,96%) oraz potencjałem przeciwutleniającym FRAP (o 60,19 – 69,07%) i ABTS<sup>•+</sup> (o 39,86 – 48,80%) niż odpowiadające im piwa jasne. Wykazano, że w przypadku piwa ciemnego najwyższą ogólną zawartością związków fenolowych charakteryzowało się piwo fermentowane z udziałem *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, a w przypadku piwa jasnego – z udziałem *Saccharomyces cerevisiae* S04.
- X. Profil związków lotnych w piwach tworzyły głównie: alkohole (56,41–72,17%), aldehydy (8,35–20,52%), estry (14,58–20,82%), terpeny i terpenoidy (1,22–6,57%), a kompozycja związków była zależna głównie od szczepu drożdży zastosowanego w procesie fermentacji. Piwa fermentowane przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* SA wykazywały najwyższą całkowitą zawartość związków lotnych (134,33 – 143,08 mg/L). Dodatek ciemnego siodu w kompozycji zasypu siodowego nie wpłynął na całkowitą zawartość związków lotnych w piwach, jednak spowodował istotne różnice w zawartości estrów w piwach fermentowanych przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* S04 oraz *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* SA oraz terpenów i terpenoidów w piwach fermentowanych przez *Saccharomyces cerevisiae* S04, *Saccharomyces pastorianus* S23 oraz *Saccharomyces cerevisiae* KV.
- XI. Kluczowymi różnicami w profilu cech sensorycznych piw była wyczuwalność smaku kwaśnego oraz aromatu karmelowego i prażonego. Piwa górnej

fermentacji były bardziej kwaśne niż piwa dolnej fermentacji. W piwach ciemnych zaobserwowano większą wyczuwalność zapachu karmelowego, słodowego i prażonego oraz obniżoną wyczuwalność aromatów pochodzących od chmielu - chmielowego, owocowego i kwiatowego w porównaniu do piw jasnych.

## 9. Literatura

1. Akıllıoğlu, H. G., Mogol, B. A., & Gökmen, V. (2011). Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. *Food additives & contaminants: part A*, 28(12), 1629-1635.
2. Aljahdali, N., & Carbonero, F. (2019). Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 474-487.
3. Aljahdali, N., Gadonna-Widehem, P., Anton, P. M., & Carbonero, F. (2020). Gut microbiota modulation by dietary barley malt melanoidins. *Nutrients*, 12(1), 241.
4. Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-food science and technology*, 44(4), 793-810.
5. Carvalho, D. O., & Guido, L. F. (2022). A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chemistry*, 372, 131093.
6. Carvalho, D. O., Correia, E., Lopes, L., & Guido, L. F. (2014). Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt. *Food Chemistry*, 160, 127-133.
7. Castro, R., Díaz, A. B., Durán-Guerrero, E., & Lasanta, C. (2022). Influence of different fermentation conditions on the analytical and sensory properties of craft beers: Hopping, fermentation temperature and yeast strain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104278.
8. Choudhary, A., Kumar, V., Kumar, S., Majid, I., Aggarwal, P., & Suri, S. (2021). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: Recent developments. *Toxin Reviews*, 40(4), 545-561.
9. Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2005). Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(1), 51-60.



10. Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A., & Delvaux, F. R. (2006). Development of Maillard reaction related characteristics during malt roasting. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 148-156.
11. Coghe, S., Vanderhaegen, B., Pelgrims, B., Basteyns, A. V., & Delvaux, F. R. (2003). Characterization of dark specialty malts: New insights in color evaluation and pro-and antioxidative activity. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61(3), 125-132.
12. Cui, H., Yu, J., Zhai, Y., Feng, L., Chen, P., Hayat, K., & Ho, C. T. (2021). Formation and fate of Amadori rearrangement products in Maillard reaction. *Trends in food science & technology*, 115, 391-408.
13. Dack, R. E., Black, G. W., & Koutsidis, G. (2017). The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. *Food Chemistry*, 232, 595-601.
14. de Andrade Silva, G. V., Arend, G. D., Zielinski, A. A. F., Di Luccio, M., & Ambrosi, A. (2022). Xanthohumol properties and strategies for extraction from hops and brewery residues: A review. *Food Chemistry*, 134629.
15. Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2005). Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1403-1407.
16. Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7832-7836.
17. Di Sotto, A., Checconi, P., Celestino, I., Locatelli, M., Carissimi, S., De Angelis, M., Rossi, V., Limongi, D., Toniolo, C., Martinoli, L., Di Giacomo, S., Palamara, A.T. & Nencioni, L. (2018). Antiviral and antioxidant activity of a hydroalcoholic extract from *Humulus lupulus* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 5919237.
18. Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2012). Melanoidins formed by Maillard reaction in food and their biological activity. *Food Engineering Reviews*, 4, 203-223.

19. Erkan, S. B., Coban, H. B., & Turhan, I. (2022). Evaluation of the inhibitory effect of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) on ethanol fermentation by using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in stirred-tank bioreactor and mathematical modeling. *Fuel*, 317, 123499.
20. Foszczyńska, B., Dziuba, E., & Chmielewska, J. (2013). Ocena możliwości pomiaru średnicy komórek drożdży piwowskich przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek. *Acta Scientiarum Polonorum: Biotechnologia*, 12(2).
21. Fumi, M. D., Galli, R., Lambri, M., Donadini, G., & De Faveri, D. M. (2011). Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 568-573.
22. Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941-1954.
23. Gołąbczak, J., & Gendaszewska-Darmach, E. (2010). Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu—aspekty biologiczne i technologiczne. *biotechnologia*, 1(88), 75-89.
24. Hellwig, M., & Henle, T. (2020). Maillard reaction products in different types of brewing malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(48), 14274-14285.
25. Hellwig, M., Börner, M., & Henle, T. (2021). Reduction of 5-hydroxymethylfurfural and 1, 2-dicarbonyl compounds by *Saccharomyces cerevisiae* in model systems and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(43), 12807-12817.
26. Jiang, Z., Xu, C., Wang, L., Hong, K., Ma, C., & Lv, C. (2023). Potential enzymes involved in beer monoterpenoids transformation: structures, functions and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(14), 2082-2092.
27. Jurková, M., Horák, T., Hašková, D., Čulík, J., Čejka, P., & Kellner, V. (2012). Control of antioxidant beer activity by the mashing process. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(2), 230-235.

28. Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., & Dostálek, P. (2016). Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 542-567.
29. Karabín, M., Jelínek, L., Kinčl, T., Hudcová, T., Kotlíková, B., & Dostálek, P. (2013). New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 98-102.
30. Kawa-Rygielska, J. (2012). Oddziaływanie jonów Cr (III) na dynamikę i efekty fermentacji zacierów kukurydzianych VHG. Monografie. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, (143).
31. Kirkpatrick, K. R., & Shellhammer, T. H. (2018). Evidence of dextrin hydrolyzing enzymes in Cascade hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(34), 9121-9126.
32. Kowalczyk, D., Świeca, M., Cichocka, J., & Gawlik-Dziki, U. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 103-110.
33. Krogerus, K., & Gibson, B. (2020). A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 3745-3756.
34. Kunze, W. (1999). *Technologia słodu i piwa*. Piwochmiel, Warszawa.
35. Lee, C. H., Chen, K. T., Lin, J. A., Chen, Y. T., Chen, Y. A., Wu, J. T., & Hsieh, C. W. (2019). Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Trends in food science & technology*, 93, 271-280.
36. Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B., & Fang, Z. (2021). Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. *Biotechnology Advances*, 49, 107.
37. Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P., & Gorsich, S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-

- bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 345-352.
38. Machado Jr, J. C., Faria, M. A., Melo, A., Martins, Z. E., & Ferreira, I. M. (2019). Modeling of  $\alpha$ -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. *Food chemistry*, 278, 216-222.
39. Magalhães, P. J., Dostalek, P., Cruz, J. M., Guido, L. F., & Barros, A. A. (2008). The impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: A pilot scale approach. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 246-256.
40. Magalhaes, P. J., Guido, L. F., Cruz, J. M., & Barros, A. A. (2007). Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1150(1-2), 295-301.
41. Márquez Campos, E., Stehle, P., & Simon, M. C. (2019). Microbial metabolites of flavan-3-ols and their biological activity. *Nutrients*, 11(10), 2260.
42. Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.
43. Michalska, A., & Zielinski, H. (2007). Produkty reakcji Maillarda w żywności. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 14(2), 5-16.
44. Mikyška, A., Dušek, M., & Slabý, M. (2023). Effects of the mashing process on polyphenols and antiradical activity of beer. *European Food Research and Technology*, 249(1), 71-80.
45. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
46. Nobis, A., Röhrig, A., Hellwig, M., Henle, T., Becker, T., & Gastl, M. (2019). Formation of 3-deoxyglucosone in the malting process. *Food chemistry*, 290, 187-195.

47. Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13-23.
48. Prado, R., Gastl, M., & Becker, T. (2021). Aroma and color development during the production of specialty malts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4816-4840.
49. Praet, T., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Aerts, G., & De Cooman, L. (2012). Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia*, 36(4), 125-132.
50. Salmon, J. M. (2006). Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. *LWT-Food Science and Technology*, 39(9), 959-965.
51. Schwarz, K. J., Boitz, L. I., & Methner, F. J. (2012). Release of phenolic acids and amino acids during mashing dependent on temperature, pH, time, and raw materials. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(4), 290-295.
52. Shakoor, A., Zhang, C., Xie, J., & Yang, X. (2022). Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 133416.
53. Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*, 65(10), 1317-1330.
54. Stevens, J. F., Taylor, A. W., & Deinzer, M. L. (1999). Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 832(1-2), 97-107.
55. Stewart, G. G. (2018). Yeast flocculation—sedimentation and flotation. *Fermentation*, 4(2), 28.
56. Toboła, D., Stompor, M., Błażewicz, J., & Anioł, M. (2014). Xanthohumol content in Polish beers. *Przemysł Chemiczny*, 93(8), 1447-1450.
57. Viegas, O., Prucha, M., Gökmen, V., & Ferreira, I. M. (2018). Parameters affecting 5-hydroxymethylfurfural exposure from beer. *Food additives & contaminants: part A*, 35(8), 1464-1471.

58. Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
59. Wannemacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 953-988.
60. Wunderlich, S., Zürcher, A., & Back, W. (2005). Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(9), 874-881.
61. Zhao, H. (2015). Effects of processing stages on the profile of phenolic compounds in beer. In *Processing and impact on active components in food*. Academic Press, 533-53.

## **10. Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej**

Article

# Carbohydrates Profile, Polyphenols Content and Antioxidative Properties of Beer Worts Produced with Different Dark Malts Varieties or Roasted Barley Grains

Justyna Gašior<sup>1,\*</sup> , Joanna Kawa-Rygielska<sup>1</sup> and Alicja Z. Kucharska<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Department of Fermentation and Cereals Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chełmońskiego 37, 51-630 Wrocław, Poland; joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Fruit, Vegetable and Plant Nutraceutical Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chełmońskiego 37, 51-630 Wrocław, Poland; alicja.kucharska@upwr.edu.pl

\* Correspondence: justyna.gasior@upwr.edu.pl; Tel.: +48-71-323-9417

Received: 29 July 2020; Accepted: 24 August 2020; Published: 26 August 2020



**Abstract:** The aim of this study was to assess the possibility of shaping properties of beers at the stage of brewing wort production with the use of various types of special malts (chocolate pale, chocolate dark, wheat chocolate, brown barley) and roasted barley grains. The carbohydrate profile, polyphenols content, antioxidant capacity, 5-hydroxymethylfurfural content, and the browning index level were analyzed. Statistical analysis showed significant differences in the values of the examined features between the samples. The sugars whose content was most affected by the addition of special malts were maltose and dextrins. The polyphenol content in worts with 10% of additive was 176.02–397.03 mg GAE/L, ferric reducing antioxidant power (FRAP) 1.32–2.07 mmol TE/L, and capacity to reduction radical generated from 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS<sup>•+</sup>) 1.46–2.70 mmol TE/L. Wort with 40% dark malt showed the highest content of polyphenolic compounds and antioxidant activity (FRAP and ABTS<sup>•+</sup>). The HMF content and the browning index value were higher for wort with the addition of darker-colored malts (EBC) and increased with increasing dark malt dose.

**Keywords:** antioxidants; polyphenols; melanoidins; wort; malt; specialty malt; dark malt; beer; barley; roasting

## 1. Introduction

Composition of brewing wort is a crucial factor which forms quality of beer. The main raw materials used in the production of beer are malt and hops, which are also the main source of polyphenols. It is estimated that 80% of them come from malt and 20% from hops [1]. Polyphenols, as a part of a diet, contribute to maintaining the balance between the quantity of produced and deactivated free radicals, preventing oxidizing stress that causes numerous diseases such as obesity, diabetes type II, hypertension and atherosclerosis [2–4].

There are different types of malts used in brewery: base malts (Pilsner malt), malts made from non-standard (other than barley) grains (wheat, rye, oat, triticale, sorghum, maize etc.) and specialty malts (caramel, chocolate, roasted, melanoidin) [5,6]. Malts can be also produced from unusual materials such as leguminous plants seeds [7,8]. One of the quality indicators differentiating malts is their color described in EBC units (European Brewery Convention). The color range of malts



ranges from 5 to 1600 EBC [6]. Dark malts are received through the process of roasting sprouted, not dried grains or roasting pale malt (previously dried). The malt houses offer a wide range of dark malts of varying color intensity. Examples include caramel malt (30–600 EBC), pale chocolate malt (350–450 EBC), dark chocolate malt (800–1000 EBC), melanoidin (1300–1500 EBC), roasted barley (900–1200 EBC) and others [9]. As a result of heat treatment they lose their enzymatic activity and therefore they are traditionally used only in small amounts (usually about 5%) compared to pale malts, which are enzymatically active [10]. Intendent use of specialty malts is colorization and production of characteristic flavors and aromas. Coghe et al. [11] indicated in a sensory evaluation that the intensity of aromas defined as roasted and bitter increases with the intensity of the wort color, while the perception of sweet taste and husky flavor decrease. The use of dark malts also affects the profile of flavor compounds, which are products of yeast metabolism in the fermentation process.

Malt is mainly produced from barley grains. Technological processes influence antioxidative activity of the final product. The grain in the malt house is subjected to soaking, germination, kilning and roasting in order to obtain malt with the desired characteristics [12]. During malting, numerous changes, resulting from the activity of enzymes, occur in barley grains. The main group of polyphenols in barley grain as well as in malt are flavan-3-ols, whereas the main phenolic compounds are (+)-catechin and ferulic acid. Components that cannot be found in barley grains, but are present in barley malt are (–)-epicatechin and sinapic acid. As a result of enzymatic transformations during malting, a change in polyphenol composition occurs in the grains. Among the compounds whose content is reduced we can distinguish catechin, prodelphinidin B3, procyanidin B3 and ferulic acid [13].

The technological process of beer production can also result in a phenolic profile change. In the final product the following phenolic compounds such as simple phenolic, derivatives of benzoic and cinnamic acids, coumarins, flavan-3-ols, proanthocyanidins, chalcones, flavanones, flavons, flavonols,  $\alpha$ -acids and iso- $\alpha$ -acids can be distinguished [14]. The content of individual compounds, as well as the total content of polyphenols in beer, changes in the subsequent stages of production. Their final content in beer depends on the selection of raw material and wort production technology [15]. Melanoidins formed as a result of heat treatment of the malt made from reductive sugars and amino acids or proteins contribute to the forming of the antioxidative activity of worts and the final beers [16–18]. Colored macromolecules formed in the final stage of the Maillard reaction are subjected to a number of studies consequential to their interesting biological properties and unknown chemical structure [19]. Melanoidins positively affect antioxidative abilities of food products, as well as storage stability. The mechanism of their antioxidative activity relies on the ability to break chain reactions of radicals, chelation of metals,  $H_2O_2$  reduction and scavenging of free radicals [16,17]. Melanoidins, apart from their antioxidative properties, also demonstrate antiviral and antimutagenic activity, and the ability to reduce cholesterol levels and stimulate growth of intestinal bacteria. However, some of the compounds, formed during early stages of the Maillard reaction process, are considered carcinogenic and mutagenic. Therefore, it is difficult to explicitly decide which of the activities are dominant [20,21]. One of the compounds formed during the heating of the malt is 5-hydroxymethylfurfural (HMF), which is also formed during thermal treatment of food, e.g., malt, dried fruit, fruit juices, coffee, bread or vinegar. Toxic effects of HMF consumption have been proved after receiving a dose of 75 mg/kg of body weight [22].

Research on antioxidant compounds which are natural food components is an important element of research on the prolongation of food products' shelf life without the use of artificial preservatives [6]. The antioxidant activity of various types of beers and main raw materials used for their production has been repeatedly described in the literature. The influence of the addition of various malts, hops, fruits or fruit juices and their application on the physicochemical parameters and the sensory profile of beer have also been studied [23–28]. Additionally, it has been shown that dark beers possess a considerably higher content of polyphenols and antioxidative activity than pale beers [29–31]. This work focused on the analysis of the formation of the properties of beer through modifications at the primary stage of production—obtaining of the beer wort. Numerous publications present research that concerns the

final product, but overlooks extremely important early stages of beer production process. The content of wort affects final beer quality and that is why it is necessary to focus on the properties of this intermediate product. The analysis of HMF content and the browning index along with the influence of these features on antioxidant activity is also interesting.

The aim of this study was to assess the possibility of shaping the properties of beers at the stage of brewing wort production with the use of various types of special malts (chocolate pale, chocolate dark, wheat chocolate, brown barley) and roasted barley grains. The purpose was achieved by the means of analysis of the carbohydrate profiles, total phenolic compounds content, antioxidative capacity, the level of browning and HMF content in worts produced with the use of specialty malts.

## 2. Results

### 2.1. Carbohydrates Profile

The analysis of the content of maltose, maltotriose, dextrins and glucose was carried out on wort prepared with the addition of 10% of selected special malts (light chocolate, dark chocolate or chocolate wheat, brown barley) or roasted barley grain (series I) and tests with 20–40% dark chocolate malt (series II). In each case, the remaining part of the malt charge was Pilsen malt. The control sample (P) was a wort made of 100% Pilsen malt. The results are shown in Table 1.

**Table 1.** Carbohydrate profile of wort with the addition of special malts.

Series	Variant	Maltose	Dextrin	Maltotriose	Glucose
		g/L			
	P	51.59 ± 0.01 <sup>a,A</sup>	23.49 ± 0.04 <sup>d,E</sup>	13.57 ± 0.02 <sup>b,A</sup>	5.65 ± 0.19 <sup>b,c,A</sup>
I	CJ	45.86 ± 0.40 <sup>c</sup>	21.86 ± 0.40 <sup>e</sup>	12.21 ± 0.10 <sup>e</sup>	3.96 ± 0.15 <sup>d</sup>
	CC	50.50 ± 0.04 <sup>b</sup>	26.09 ± 0.22 <sup>b</sup>	13.46 ± 0.01 <sup>c</sup>	5.48 ± 0.14 <sup>c</sup>
	PC	34.74 ± 0.02 <sup>c</sup>	18.03 ± 0.30 <sup>f</sup>	9.13 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>e</sup>
	JP	51.69 ± 0.33 <sup>a</sup>	28.43 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.87 ± 0.08 <sup>a</sup>	5.80 ± 0.02 <sup>b</sup>
	JB	50.14 ± 0.06 <sup>b</sup>	25.31 ± 0.23 <sup>c</sup>	13.34 ± 0.00 <sup>d</sup>	6.48 ± 0.04 <sup>a</sup>
II	CC20	46.12 ± 0.18 <sup>B</sup>	35.06 ± 0.17 <sup>C</sup>	12.68 ± 0.10 <sup>B</sup>	nd
	CC25	45.50 ± 0.23 <sup>C</sup>	33.73 ± 0.32 <sup>D</sup>	11.83 ± 0.12 <sup>D</sup>	2.80 ± 0.40 <sup>C</sup>
	CC30	45.71 ± 0.41 <sup>B,C</sup>	37.22 ± 0.22 <sup>B</sup>	12.05 ± 0.11 <sup>C</sup>	4.18 ± 0.34 <sup>B</sup>
	CC35	41.17 ± 0.22 <sup>D</sup>	37.43 ± 0.22 <sup>B</sup>	10.90 ± 0.06 <sup>E</sup>	5.60 ± 0.08 <sup>A</sup>
	CC40	39.50 ± 0.06 <sup>E</sup>	39.85 ± 0.16 <sup>A</sup>	10.74 ± 0.00 <sup>F</sup>	nd

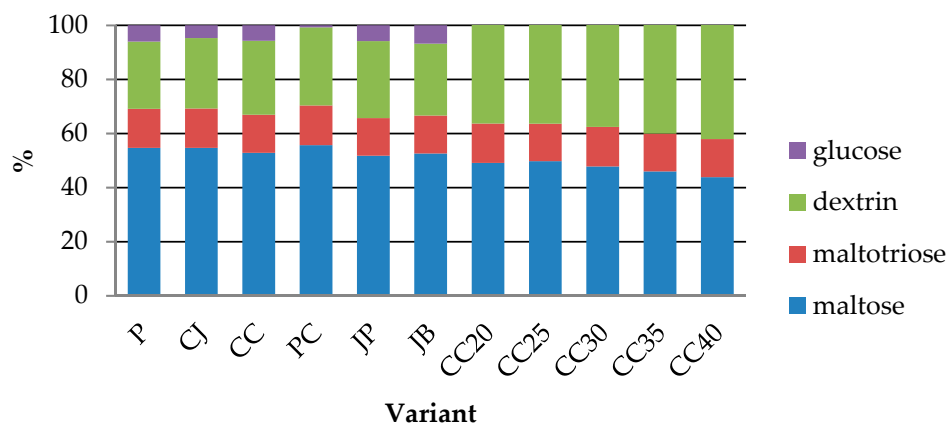
Abbreviations: nd—not detected; series I—wort with 10% addition of one of the following special malts: pale chocolate malt (CJ), dark chocolate malt (CC), wheat chocolate malt (PC), roasted barley (JP) or brown barley (JB); series II—wort with the addition of 20% (CC20), 25% (CC25), 30% (CC30), 35% (CC35) or 40% (CC40) of dark chocolate malt; control wort made of 100% Pilsen malt (P). Values are expressed as mean of 3 replications ( $n = 3$ ) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f or A, B, C, D, E, F) in the same column and within one series are statistically different ( $p$ -value < 0.05).

The sugars in series I were mainly maltose (51.8–55.71%), followed by dextrins (24.91–28.90%), maltotriose (13.9–14.64%) and glucose (0.75–6.80%). The statistical analysis showed significant differences in the content of the tested carbohydrates between the samples with the addition of special malts and the control sample, and between the samples with different types of special malts. The maltose content ranged from  $34.74 \pm 0.02$  g/L in wort with the addition of wheat chocolate malt (PC) to  $51.69 \pm 0.33$  g/L in wort with addition of roasted barley (JP). There are no statistically significant differences between the maltose content in the JP test and the control sample (P) ( $51.59 \pm 0.01$  g/L). These variants contained the most maltose among the worts in series I. The dextrin content ranged from  $18.03 \pm 0.30$  g/L (PC) to  $28.43 \pm 0.08$  g/L (JP). The results higher than the control sample were shown by the tests performed on the samples made with the addition of roasted barley grains (JP), brown barley (JB) and dark chocolate malt (CC), while the lower results were obtained for the samples with light chocolate malt (CJ) and chocolate wheat malt (PC). The amount of maltotriose in the trials ranged

from  $9.13 \pm 0.01$  (PC) to  $13.87 \pm 0.08$  g/L (JP). Despite statistically significant differences, the amount of maltotriose clearly differed from the control sample only in the PC sample. The control sample contained  $5.65 \pm 0.19$  g/L glucose. The JB showed higher glucose content. Statistical analysis showed no significant differences between the glucose content in the control sample and in the JP and CC samples.

In the series II worts, the highest proportion of sugars was maltose (43.85–58.07%), followed by dextrans (26.44–44.23%), maltotriose (11.92–15.27%) and glucose (up to 6.36%). Statistical analysis showed significant differences in the content of maltose, dextrans and maltotriose between the control sample and the series II variants. The control wort (P) contained the most glucose, maltotriose and maltose among the CC20–CC40 variants (wort with addition 20–40% of dark chocolate malt). With the increase in the share of dark chocolate malt, the content of dextrans not fermented by brewer's yeast increased, while the content of maltose and maltotriose decreased. The highest content of maltose and maltotriose was found in the control wort (P), while the lowest was in the wort with the highest addition of dark malt ( $39.50 \pm 0.06$  g/L maltose and  $10.74 \pm 0.00$  g/L maltotriose). The dextrin content ranged from  $23.49 \pm 0.04$  g/L to  $39.85 \pm 0.16$  g/L. All series II samples had a higher dextrin content than the control sample (P). No glucose was found in the CC20 and CC40. In the remaining samples, its content ranged from  $2.80 \pm 0.40$  (for CC25) to the value close to the control sample,  $5.60 \pm 0.08$  g/L (for CC35).

Figure 1 shows the shares of individual tested sugars in the carbohydrate profile of the control wort (P), worts in series I (CJ, CC, PC, JP, JB) and series II (CC20, CC25, CC30, CC35, CC40). In the control sample (P), maltose constituted 58.07% of the tested sugars, dextrans 26.44%, maltotriose 15.27%, and glucose 6.36%. Series I wort was characterized by a higher than control content of dextrans (26.06–28.9%), and a similar percentage of maltotriose (13.90–14.64%). The addition of special malts in the dose of 10% had a slight effect on the maltose content in the wort. Its share ranged from 51.80–55.71%. A significantly lower share of glucose content was characteristic for the PC wort (0.75%). On the other hand, the JB wort had a higher glucose share (6.8%). In the remaining wort, the share of glucose in the sugar profile was 4.72–5.81%.

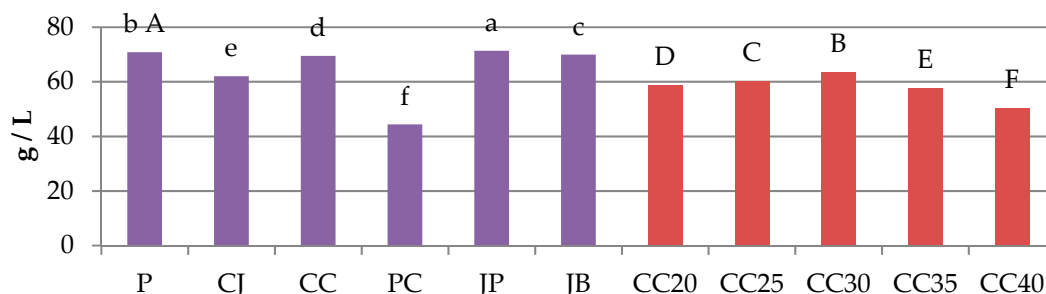


**Figure 1.** The share of individual sugars in the carbohydrate profile of the wort produced.

Series II worts were characterized by a lower than control share of maltose (43.8–48.75%) and maltotriose (11.92–13.51%), and a higher share of dextrans (36.88–44.23%). The share of dextrans in the total sugars of the wort increased with the increase in the share of dark chocolate malt in the malt charge. The opposite trend was observed for the content of maltotriose and maltose. Their content decreased with increasing dose of special malt. The CC30 and CC35 samples had the highest share of glucose, comparable to the control sample, in the carbohydrate profile.

Figure 2 shows the content of fermentable sugars (maltose, maltotriose and glucose) in the control wort (P), series I trials (CJ, CC, PC, JP, JB) and series II trials (CC20, CC25, CC30, CC35, CC40). In the series I trials, JP had the highest content of sugars fermented with brewer's yeast. These results were close to the P, CC, and JB samples. It confirms that the addition of 10% special malts does not cause major changes in the sugar profile of the wort. The lowest content of fermentable carbohydrates was

characteristic for the PC sample. The use of another variety of grain led to significant changes in the composition of the brewing wort. The content slightly varied between the tests of CC20, CC25 and CC30. With a higher proportion of special malt in the powder, the content of fermentable sugars began to drop significantly.



**Figure 2.** Content of fermentable sugars (glucose, maltose, maltotriose) in wort. Values are expressed as sums of the means of 3 replications ( $n = 3$ ) for the fermentable sugars tested (glucose, maltose, maltotriose). Mean values with different letters (a, b, c, d, e, f or A, B, C, D, E, F) are statistically different ( $p$ -value < 0.05).

## 2.2. Concentration of Total Polyphenols and Antioxidative Activity

Wort made with different types of dark malt and roasted barley grain (series I) and wort produced with different proportions of dark chocolate malt (series II) were tested for the content of phenolic compounds and antioxidant activity. The results are shown in Table 2.

**Table 2.** Characteristics of wort produced with selected dark malts and roasted barley grains in terms of polyphenol content and antioxidant activity expressed with FRAP (ferric reducing antioxidant power) and ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) methods.

Series	Variant	Total Polyphenol Content (F-C)	FRAP	ABTS <sup>•+</sup>	
		mg GAE/L	mmol TE/L	mmol TE/L	% Inhibition
I	P	192.58 ± 8.66 <sup>d,F</sup>	1.23 ± 0.01 <sup>f,D</sup>	1.44 ± 0.09 <sup>c,B</sup>	22.17 ± 0.87
	CJ	252.84 ± 12.81 <sup>c</sup>	1.66 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.76 ± 0.17 <sup>c</sup>	26.82 ± 1.70
	CC	404.38 ± 5.98 <sup>a</sup>	2.07 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.17 <sup>b</sup>	32.78 ± 1.80
	PC	303.90 ± 7.83 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.46 ± 0.11 <sup>c</sup>	22.53 ± 1.13
	JP	397.03 ± 7.63 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.40 <sup>a</sup>	40.33 ± 4.06
	JB	176.02 ± 0.59 <sup>d</sup>	1.32 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.46 ± 0.05 <sup>c</sup>	22.53 ± 0.51
II	CC20	593.82 ± 6.23 <sup>E</sup>	6.01 ± 0.09 <sup>C</sup>	1.23 ± 0.03 <sup>C</sup>	19.19 ± 0.31
	CC25	628.79 ± 10.73 <sup>D</sup>	6.10 ± 0.09 <sup>C</sup>	1.01 ± 0.03 <sup>D</sup>	16.06 ± 0.26
	CC30	776.21 ± 10.78 <sup>C</sup>	6.62 ± 0.09 <sup>B</sup>	1.50 ± 0.09 <sup>B</sup>	23.11 ± 0.92
	CC35	871.77 ± 16.55 <sup>B</sup>	7.14 ± 0.15 <sup>A</sup>	1.51 ± 0.04 <sup>B</sup>	23.26 ± 0.41
	CC40	922.32 ± 6.96 <sup>A</sup>	7.09 ± 0.07 <sup>A</sup>	1.68 ± 0.13 <sup>A</sup>	25.73 ± 1.34

Values are expressed as mean of 3 replications ( $n = 3$ ) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f or A, B, C, D, E, F) in the same column and within one series are statistically different ( $p$ -value < 0.05).

CJ, CC, PC, and JP wort contained significantly more phenolic compounds than the control sample. The JP variant was characterized by a similar phenols content to the control sample. The worts CC (404.38 ± 5.98 mg GAE/L) and JP (397.03 ± 7.63 mg GAE/L) had the highest total polyphenol content among the series I samples. The remaining worts showed a lower phenolic content. The worts were also analyzed for the ability to reduce iron ions (FRAP) and the antioxidant capacity (by the means of ABTS<sup>•+</sup> assay). Similarly to the content of total polyphenols, the CC wort (2.07 ± 0.03 mmol TE/L) was characterized by the highest FRAP value. The wort with the lowest ability to reduce iron ions was JB (1.32 ± 0.02 mmol TE/L). All the samples of series I showed a FRAP ability higher than the control. In the analysis of capacity to reduction of ABTS<sup>•+</sup> the JB wort showed the highest result

( $2.70 \pm 0.40$  mmol TE/L). The CC wort was also characterized by a high activity of scavenging ABTS<sup>•+</sup> radicals ( $2.17 \pm 0.17$  mmol TE/L).

The wort produced with different proportions of dark chocolate malt (series II) were also analyzed. The control sample was characterized by the lowest total phenol content ( $192.58 \pm 18.66$  mg GAE/L) and the lowest antioxidant activity measured with both methods (FRAP, ABTS<sup>•+</sup>). Along with an increase in the share of CC malt in the range of 20–40%, an increase in the content of polyphenols, the ability to reduce iron ions, and the ABTS<sup>•+</sup> antioxidant capacity were observed. The CC40 wort contained the most polyphenols ( $922.32 \pm 6.96$  mg GAE/L). The content of polyphenols increased in proportion to the applied dose of dark malt. As a result, the lowest polyphenol content among worts with special malt was characterized by the CC20 wort ( $593.82 \pm 26.23$  mg GAE/L). Similar trends were observed for the antioxidant activity (ABTS<sup>•+</sup> and FRAP).

### 2.3. Browning Index and Concentrations of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

The browning index analysis of samples using the spectrophotometric method of measuring absorbance at 420 nm is the simplest method of assessing the content of colored compounds. The content of HMF and the browning index are presented in the Table 3.

**Table 3.** The content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and the browning index of wort produced with the use of different types and doses of special malts in the wort.

Series	Variant	Browning Index	HMF
		AU	mg/L
I	P	$0.62 \pm 0.04$ <sup>f,F</sup>	$0.66 \pm 0.00$ <sup>f,F</sup>
	CJ	$1.80 \pm 0.01$ <sup>d</sup>	$19.65 \pm 0.00$ <sup>c</sup>
	CC	$4.43 \pm 0.04$ <sup>b</sup>	$20.90 \pm 0.01$ <sup>b</sup>
	PC	$3.16 \pm 0.01$ <sup>c</sup>	$5.54 \pm 0.03$ <sup>e</sup>
	JP	$5.57 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$24.31 \pm 0.17$ <sup>a</sup>
	JB	$1.05 \pm 0.00$ <sup>e</sup>	$12.32 \pm 0.04$ <sup>d</sup>
II	CC20	$10.05 \pm 0.07$ <sup>E</sup>	$51.81 \pm 0.54$ <sup>C</sup>
	CC25	$10.79 \pm 0.16$ <sup>D</sup>	$50.62 \pm 0.14$ <sup>D</sup>
	CC30	$13.58 \pm 0.50$ <sup>C</sup>	$47.62 \pm 0.54$ <sup>E</sup>
	CC35	$15.53 \pm 0.39$ <sup>B</sup>	$75.61 \pm 0.43$ <sup>B</sup>
	CC40	$17.99 \pm 0.48$ <sup>A</sup>	$91.94 \pm 0.85$ <sup>A</sup>

Values are expressed as mean of 3 replications ( $n = 3$ )  $\pm$  standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f for A, B, C, D, E, F) in the same column and within one series are statistically different ( $p$ -value  $< 0.05$ ).

Among the wort from series I, the JP variant ( $5.57 \pm 0.03$  AU) was characterized by the highest value of the browning index. The parameter value decreased in the following sequence: CC > PC > CJ > JB. The control sample had the lowest parameter value ( $0.62 \pm 0.04$  AU). In series II, along with the increase in the share of special malt, the level of browning index increased. The absorbance results ranged from  $10.05 \pm 0.07$  AU to  $17.99 \pm 0.48$  AU. Statistical analysis classified all the results into separate statistical groups. The HMF content increased with increasing heat treatment time or temperature. In the series I trials with the addition of various types of special malts, it was shown that the highest HMF content among the tested samples was shown by JP ( $24.31 \pm 0.17$  mg/L). The analysis results for series I trials decrease in the following sequence: CC > CJ > JB > PC. The lowest HMF content was recorded for the control sample ( $0.66 \pm 0.00$  mg/L). The highest HMF content was shown by the CC40 variant, as expected. Another test with high HMF content was the CC35 test ( $75.61 \pm 0.43$  mg/L). The differences between the remaining trials were smaller, but statistically significant. They contained from  $47.62 \pm 0.54$  to  $51.81 \pm 0.54$  mg/L of HMF.

The color of the wort expressed in absorbance units differed significantly between the samples, indicating the highest value for the JP ( $5.57 \pm 0.03$  AU), and the lowest for the control sample P ( $0.62 \pm 0.04$  AU). The color of the wort defined as the browning level was related to the color of the



malt used in the production of the wort or the dose of dark malt used. With the increase in the malt color intensity expressed in EBC units, the absorbance value in the browning analysis increased.

### 3. Discussion

#### 3.1. Carbohydrates Profile

According to results of Coghe et al. [32] the addition of 10% of special malts did not cause such significant changes in the carbohydrate profile of the wort, although it had an adverse effect on the subsequent ethanol fermentation process, causing a decrease in the degree of attenuation and ethanol content in beers. Maltose and maltotriose were the main sugars in the brewing wort in all trials of our experiment. This is consistent with the results of Briggs et al. [33]. Coghe et al. [32] also showed that in a wort made of 100% Pilsen malt, the amount of maltose is about 70% of the main fermentable sugars, about 18% is maltotriose, and 12% is glucose. The discrepancy in our results may be due to the use of different parameters of the mashing process or malt with different properties. According to Briggs et al. [33], maltose is usually between 50 and 60% of the sugars in the wort. In our research, only the wort prepared with 40% of special malt has a lower maltose content than 50%. The addition of dark malts in the wort production reduces the content of fermentable sugars [33]. Coghe et al. [32] analyzed wort with the addition of 50% special malts (7–900 EBC) and showed that the maltose content decreases as the color intensity of the malt increases in the studied range. In the worts prepared with the darkest tested malts, a decrease in the content of glucose, fructose, and maltotriose was also observed in comparison with the control wort from Pilsen malt [32]. Some of the sugars are used in non-enzymatic browning reactions during the thermal treatment of cereal grains. This is the main reason for reducing the content of fermentable sugars during heat treatment [34].

The differences in the sugar content between JP and other samples result not only from the difference in their color. Contrary to the other tested samples, these grains are not malted before the roasting process. The malting process leads to an increase in the content of maltose, sucrose and glucose, while slightly modifying the content of maltotriose and fructose [35]. Kilning and roasting, on the other hand, decrease the content of fermentable sugars. The final sugar content in the tested products is modified by a number of factors, ranging from the chemical composition, the treatment method used, grain germination, and kilning and roasting parameters.

The carbohydrate profile of brewing wort is closely related to the type of malt used in their production. The tested raw materials differ in terms of production technology. JP is roasted, unmalted barley grains, while the remaining grain samples (CC, CJ, PC, JB) are grains which were subjected to the processes of soaking, germination, kilning and roasting, so they are products with a very different chemical composition. Wheat grain may have a higher maltose content and a lower glucose content than barley, therefore the addition of wheat malt could cause changes in the composition of these sugars in the wort [36]. The glucose content of the roasted unmalted grain sample (JP) is significantly higher than in CC, CJ, and PC. According to Vinje et al. [37] in the process of grain germination, the content of maltose, maltotriose, and glucose increases in the grain due to the activity of enzymes. This suggests that the malts used should have a higher content of these sugars than unmalted grains.

According to Briggs et al. [33], the addition of special malts reduces the obtained wort extract, which consists of the content of sugars such as glucose, fructose, sucrose, maltose, and maltotriose [31]. In the case of the production of brewing wort, the toxic effect of melanoidins on yeast metabolism is important. Coghe et al. [31] tested worts with the addition (5–50%) of caramel malt (300 EBC) and Pilsen malt. The addition of dark malts had not significantly affected the apparent extract of the wort, while the samples were clearly differentiated in terms of the real extract, and thus also the degree of attenuation and the final ethanol content in the beer. This may indicate that the content of sugars in the darker worts may be less susceptible to fermentation or that the substances produced as a result of the Maillard reaction have an inhibitory effect on yeast metabolism [32]. According to our results, dextrin concentration increases with the content of the dark malts used. Dextrins do not undergo ethanol

fermentation using the classic strains of *Saccharomyces cerevisiae* brewer's yeast, therefore their amount in the wort is similar to that in the beer [38].

### 3.2. Concentration of Total Polyphenols and Antioxidative Activity

Polyphenolic compounds are responsible for antioxidant activity and storage stability, but can also cause haze in beer [1]. The ability to scavenge free radicals is also demonstrated by compounds formed in the Maillard reactions that are formed during the thermal treatment of malt and wort. Barley grains and barley malts used in brewing are dried and roasted. As a result, a number of products are obtained, differing in sensory characteristics as well as physicochemical properties. During roasting, the main chemical reactions are the Maillard reactions. These are a series of changes initiated by the reaction between reducing sugars and amino groups, leading to the formation of compounds responsible for the color and flavor of heat-treated products. The non-enzymatic browning reactions can be divided into several stages. In the first of them, the early phase reaction products are created. They are mainly products of the Amadori rearrangement. The second step involves the formation of intermediates such as: HMF, Strecker aldehydes and pyrazines. The last, third stage is the formation of the melanoidins, which are reaction end products [39]. Melanoidins are a group of compounds with a very diverse structure. They differ in chemical properties depending on the origin. Melanoidins give beer its color and provide it with antioxidant activity [40]. The antioxidant activity of the Maillard reaction products is confirmed by studies on the antioxidant properties of coffee. As the degree of roasting of coffee beans increases, some polyphenolic compounds are lost, however this is not correlated with a decrease in the antioxidant activity of coffee infusions. In place of these compounds, new chemicals are created, which also act as antioxidants [41]. Similar tendencies can be observed in the case of the wort tested in our experiment.

Polyphenolic compounds undergo chemical changes under the conditions of the technological process of malt and wort production. This happens during the thermal processing of the grains. For some polyphenols (e.g., quercetin), heat treatment is associated with an increase in antioxidant activity. Their decomposition products are more powerful antioxidants than the original compounds [42]. This proves the influence of the compound's structure on its antioxidant properties. The antioxidant activity is enhanced by the presence of certain chemical groups in the structure of phenols and the degree of polymerization of the compound [43]. Woffenden et al. [44] showed a significant increase in the content of catechin and ferulic acid during the malt kilning process. An increase in the antioxidant capacity ABTS<sup>•+</sup> and the ability to reduce iron ions (FRAP) of malt during the process was also observed. Polyphenolic compounds are extracted during the production of the wort and build its antioxidant activity. Fogarasi et al. [45] demonstrated that wheat malt is characterized by a lower content of phenolic compounds than barley malt. The differences in the content of polyphenolic compounds in the tested samples may be the result of the addition of raw materials of different varieties (barley, wheat), different colors (3–1300 EBC), and different production technologies (malting process parameters).

On the other hand, it was shown that the malt kilning process led to a reduction in ferulic acid content. Melanoidins may have the ability to cross-link simple phenolic compounds in their structure, leading to a decrease in the content of phenolic compounds. High temperatures may also affect the activity of enzymes (e.g., ferulic acid esterase) responsible for the release of phenolic compounds from the cell walls [31,46]. This explains the decrease in the ferulic acid content of the malt compared to the corresponding cereal grain. In the wort obtained in the experiment, the antioxidant activity increased with the increase in the dose of dark malts and was higher for wort obtained from darker-colored malts. Dark special malts are made through a high temperature treatment. The increase in the content of phenolic compounds during the production of malt occurs at the stage of germination and kilning. Grain soaking is the cause of the loss of some of these bioactive compounds [31,45]. Roasted barley grains are not subjected to soaking and germination, therefore their polyphenol content may differ from malts.

Despite the chemical changes that take place in the wort during the fermentation and aging process, when obtaining a wort with a higher content of polyphenolic compounds and antioxidant

activity we can expect a higher content of polyphenolic compounds in the finished product. Due to this, it is worth striving to achieve a high dose of these bioactive compounds already at the stage of wort production.

### 3.3. Browning Index and Concentrations of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

The browning index increased with the darkening of the wort color. This is consistent with the results [47] and is similar to the content of HMF. The HMF content is one of the indicators of the non-enzymatic browning reaction, as it is formed as an intermediate product of the reaction [20]. There are two main mechanisms of its formation in food. The first is the transformation of 3-deoxyglucosan during the Maillard reaction, the second is the dehydration of sugars under acidic conditions (caramelization) [48]. HMF is found in a wide variety of foods. In beer, its content ranges from 0.2–9.2 mg/kg. It can also be found in other alcohols: wine (0.1 mg/L), whiskey (8.6 mg/L), white spirit (2.2 mg/L), brandy (22 mg/L), rum (8.4 mg/L), and others [49]. Among other food products, it can also be found in honey (0.34–58.8 mg/kg), cookies (1.75–35.21 mg/kg), bread (2.2–22 mg/kg), dried fruit (25–2900 mg/kg), coffee beans (100–2186 mg/kg), instant coffee (91.3–4100 mg/kg), fruit juices (2–22 mg/kg), chocolate (42–99 mg/kg), or breakfast cereals (12–47 mg/kg) [50,51]. In brewing malt its content varies widely and ranges from 100–6300 mg/kg, while in the grain of barley it is 100–1200 mg/kg [52,53]. Compared to other food products, the HMF content in beer is relatively low. The low content of HMF in the beer compared to the values obtained in the wort results from the potential of *Saccharomyces cerevisiae* brewer's yeast to reduce this compound during the ethanol fermentation process. HMF has been shown to be converted by yeast into hydroxymethyl furfuryl alcohol with high efficiency (79–84%). Moreover, it has been shown that the degradation of HMF is carried out by yeast preferentially, faster than ethanol fermentation [53]. The HMF content in commercial beers in different styles has been analyzed. It was shown that blond beers contain HMF in range of 2.42–5.80 mg/L, amber beers 5.92–7.44 mg/L, and dark beers 6.29–7.52 mg/L. Moreover, there is no clear difference between top fermented (ale) and bottom fermented (lager) beers in the content of HMF [54]. Coffee (50.43%) and white bread (31.8%) have the highest share in the daily consumption of HMF by humans. Beer, on the other hand, influences the daily dose of HMF by 2.86% [55]. Both positive and negative effects of HMF consumption by humans have been reported [51].

### 3.4. Correlation and Linear Regression Analysis

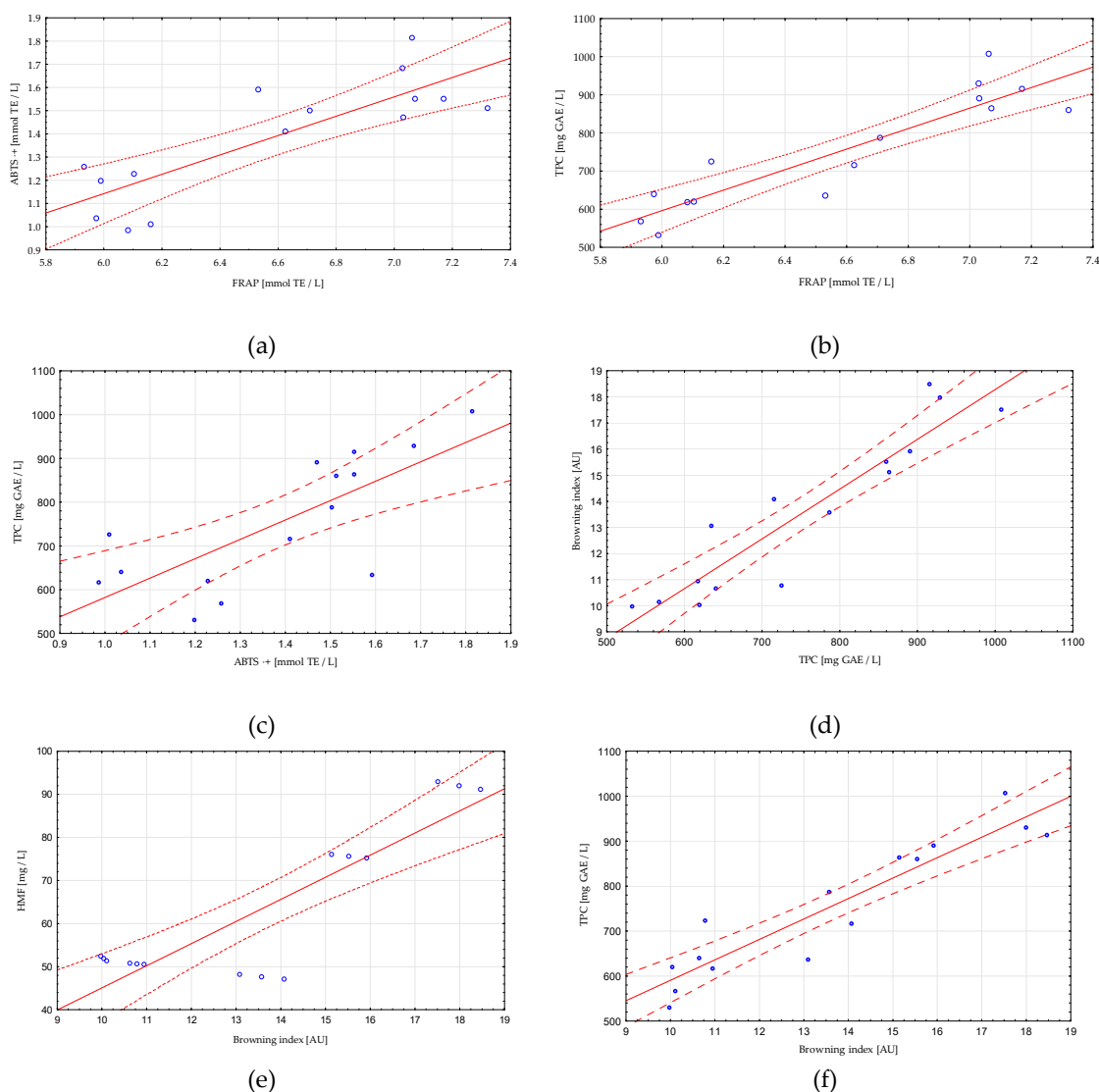
Multiple linear regression analysis was used to investigate the relationship between tested parameters and the wort composition. The results are presented in Table 4 and Figure 3, showing a number of relationships between the content of sugars, polyphenols and the antioxidant activity of worts produced with the use of 20–40% dark chocolate malt in the raw material composition.

**Table 4.** Analysis of the correlation between the antioxidant activity, total polyphenol content, color of the wort, 5-hydroxymethylfurfural (HMF) content and the carbohydrate profile of wort produced with 20–40% dark chocolate malt.

Variable	FRAP	ABTS**	TPC	BI	HMF	Dextrin	Maltotriose	Maltose	Glucose
FRAP	1.00	0.83	0.91	0.94	0.79	0.87	−0.87	−0.86	0.32
ABTS**		1.00	0.75	0.84	0.70	0.95	−0.62	−0.72	−0.01
TPC			1.00	0.93	0.87	0.82	−0.91	−0.91	0.17
BI				1.00	0.88	0.94	−0.88	−0.91	0.11
HMF					1.00	0.80	−0.88	−0.98	−0.17
Dextrin						1.00	−0.70	−0.81	−0.06
Maltotriose							1.00	0.94	−0.19
Maltose								1.00	0.04
Glucose									1.00

The marked correlation coefficients are significant with  $p < 0.05$ ,  $n = 15$ .





**Figure 3.** Scatter graphs for selected variables. Relationship between: (a) FRAP and ABTS<sup>•+</sup> assays, (b) FRAP and TPC (content of polyphenols) assays, (c) ABTS<sup>•+</sup> and TPC assays, (d) TPC and browning index, (e) HMF and browning index, (f) browning index and TPC.

A strong positive correlation was observed between the content of polyphenols (TPC) and the level of browning index expressed in absorbance units ( $r = 0.93$ ), the ability to reduce iron ions (FRAP) ( $r = 0.91$ ), antioxidant capacity ABTS<sup>•+</sup> ( $r = 0.75$ ), the content of HMF ( $r = 0.87$ ) and dextrins ( $r = 0.82$ ). The influence of polyphenolic compounds on the antioxidant activity has already been demonstrated many times [26–29]. The analysis showed significant correlation between the results of the antioxidant capacity test with the ABTS<sup>•+</sup> and FRAP methods. Tests for the analysis of antioxidant activity are based on various mechanisms. In both the FRAP and ABTS<sup>•+</sup> analyses, we investigated the ability to transfer a single electron from a compound with anti-oxidative abilities to an oxidant. These methods belong to the group of methods based on the SET (single electron transfer) mechanism. Nevertheless, they do not have to show conclusive results. An example is the study by Müller et al. [56], where the authors compared the antioxidant capacity with the use of various analytical methods, obtaining divergent results. Therefore, it is suggested to use several research methods simultaneously. It has also been shown that one of the main polyphenols of malt wort, i.e., ferulic acid and catechin, showed a higher value for ABTS<sup>•+</sup> than for FRAP (in both methods the results were presented in terms of the

Trolox equivalent). Moreover, the ABTS<sup>•+</sup>/FRAP ratio for the plant extracts analyzed by the authors varies widely, from 0.7 to 3.3 [57].

The content of polyphenolic compounds is also significantly negatively correlated with the content of maltose ( $r = -0.91$ ) and maltotriose ( $r = -0.91$ ). The amount of sugars is also related to the browning index level ( $r = -0.88$  for maltotriose,  $r = -0.91$  for maltose,  $r = 0.94$  for dextrin). Similar trends occur in the case of HMF content ( $r = -0.88$  for maltotriose,  $r = -0.98$  for maltose,  $r = 0.80$  for dextrin). Woo et al. [58] analyzed the formation of HMF during the thermal processing of glucose and maltose. It has been shown that thermal processing of maltose produces slightly less HMF compared to processing glucose. The content of dextrans in the wort is strongly related to the dose of dark malt and its concentration with its increase, which was demonstrated in this study.

The content of HMF and the browning indexes are indicators of the presence of Maillard reaction compounds derived from heat-treated malt. It was shown that the value of both these features was strongly correlated with the results of measuring the content of polyphenolic compounds by the Folin–Ciocalteu method and the antioxidant activity (FRAP and ABTS<sup>•+</sup>). Bastola et al. [59] analyzed the results of the polyphenol content (F–C) for interference with the mixture of phenolic compounds, sugars (including glucose, which belongs to the reducing sugars), and HMF. It was shown that the content of glucose and HMF did not affect the level of phenols determined by the F–C method. The analysis showed a strong correlation between the content of maltotriose and maltose and the level of browning. A correlation was not observed with glucose.  $\alpha$ -dicarbonyl compounds formed in the advanced stage of the Maillard reaction have a key influence on the type and structure of high-molecular melanoidins responsible for the color formation. Studies on Maillard reaction kinetics prove that oligomeric carbohydrates have a greater influence on the intensity of the browning reaction, and this influence increases with the increase of the compound polymerization level. This is due to the lower number of carbonyl groups in the oligosaccharides [60].

The analysis of the correlation between the examined features allows for the demonstration of a number of dependencies that are introduced by the increase in the share of dark chocolate malt in the composition of the brewing wort. Conducting such an analysis is a valuable tool that allows for a better visualization and understanding of changes in physicochemical parameters of the wort related to the change in the composition of raw materials.

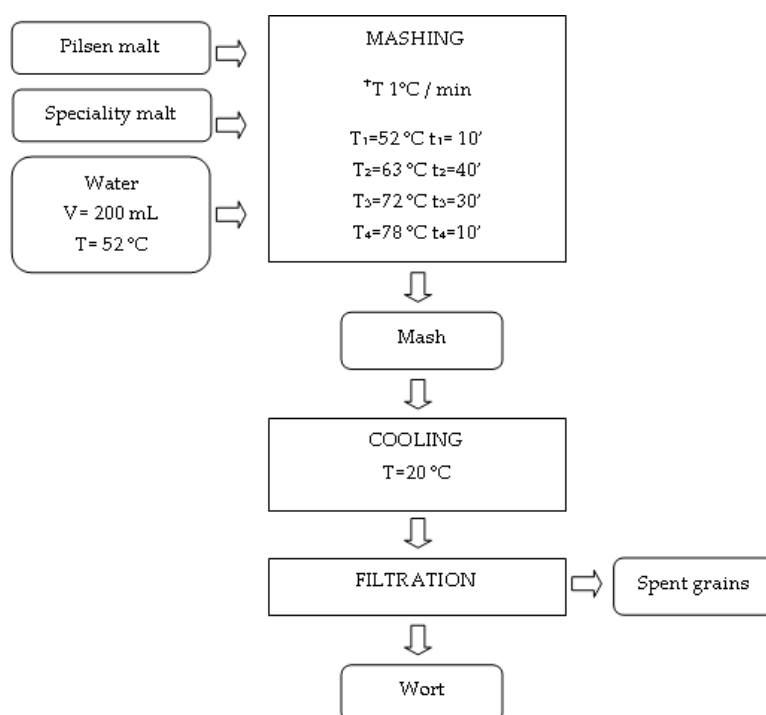
## 4. Materials and Methods

### 4.1. Raw Material

For the wort production we used: Pilsen malt 3–4.3 EBC (Viking Malt, Strzegom, Poland), pale chocolate malt 350–450 EBC (Viking Malt, Strzegom, Poland), roasted barley > 1000 EBC (Viking Malt, Strzegom), wheat chocolate malt 800–1000 EBC (Thomas Fawcett & Sons, Castleford, Great Britain), barley brown 175–200 EBC (Viking Malt, Strzegom, Poland), dark chocolate malt 1100–1300 EBC (Viking Malt, Strzegom, Poland).

### 4.2. Preparation of the Congress Worts

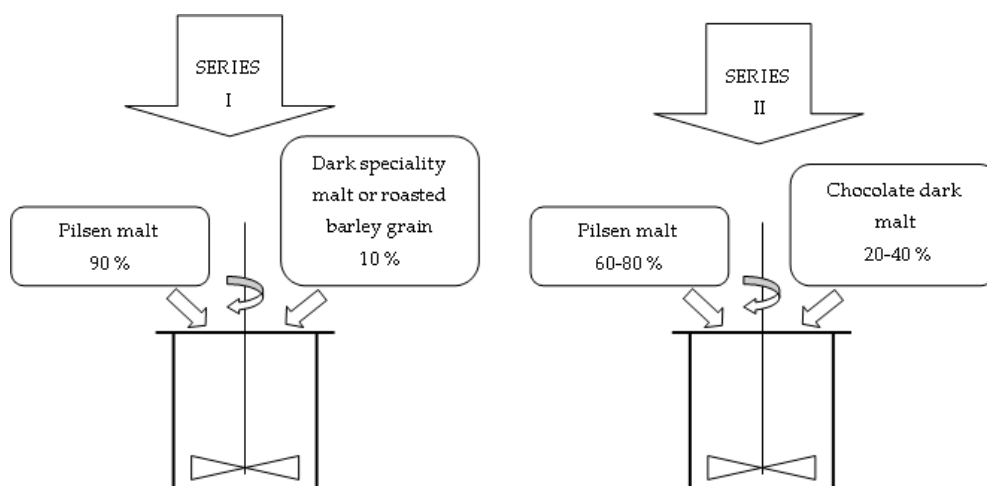
Malts were ground with the mill for malts model VLB DLFU W20050 and mashed with the laboratory masher VLB type LB. A total of 12.50 g of malt blends was weighed in a cup and complemented with 200 mL distilled water ( $T = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Cups were weighed and put in the masher along with the stirrer. The mash program was performed as follows:  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  (10 min),  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  (40 min),  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (30 min) and  $78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (10 min) (Figure 4).



**Figure 4.** Technological process of producing wort.

After the mashing was completed, the iodine test was performed. Mash was cooled down to 20 °C, filled up with water until primary mass was achieved and filtered through paper filters into an Erlenmeyer flask, while first returning 100 mL of the filtrate. The extract content in each sample was set for 12°Bx. Wort extract was studied using density meter 30PX (Columbus, OH, USA) in 20 °C. The obtained worts were centrifuged with laboratory centrifuge type MPW-351R in falcon containers with the capacity of 50 cm<sup>3</sup> using 5000 rpm for 10 min.

Obtained samples were decanted. Two series of wort were obtained (Figure 5): series I—with the addition of 10% pale chocolate malt (CJ), dark chocolate malt (CC), wheat chocolate malt (PC), roasted barley (JP) or brown barley (JB), series II—with the addition of 20% (CC20), 25% (CC25), 30% (CC30), 35% (CC35) or 40% (CC40) chocolate malt dark and control wort made of 100% Pilsen malt (P).



**Figure 5.** Wort production scheme.

### 4.3. Analytic Methods

#### 4.3.1. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Carbohydrate Profile

Carbohydrate profiles of worts were determined using high-duty methods of liquid chromatography (HPLC) [61]. Samples were centrifuged with laboratory centrifuge type MPW-351R (10 min, 5000 rpm) and subjected to 2-times dilution. Separation of the mixture was made using Rezex ROA Organic Acid H<sup>+</sup> (300 × 7.8 mm) column made by Phenomenex. Respectively, a method of high-duty chromatography HPLC, using Shimadzu Prominence apparatus, was used to analyze concentration of glucose, maltose, maltotriose, dextrin and amount of produced glycerol and ethanol. A volume of 0.02 cm<sup>3</sup> injection, celerity of the flow of eluent 0.6 cm<sup>3</sup>/min, temperature of separation 60 °C, solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 mol/dm<sup>3</sup> as eluent and refractometric method of detection were used.

#### 4.3.2. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) Content

HMF content was determined using high-performance liquid chromatography [62]. For the analysis we used a Dionex system (Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany) equipped with diode detector UltiMate 3000, LPG-3400A pump, EWPS-300SI autosampler and thermostated column TCC-3000SD. Cadenza Imtakt CD-C18 (75 × 4.6 mm, 5 μm) column was used. Moving phase was A (4.5% aq. formic acid, *v/v*) solvent and B (100% acetonitrile).

Following the procedure of elution we used: 0–1 min 5% B in A, 20 min 25% B in A, 21 min 100% B, 26 min 100% B, 27 min 5% B in A. Celerity of the flow was 1.0 mL/min, and the volume of injection 20 μL. Temperature of operating column was 30 °C. HMF was detected at 280 nm. Integration and quantification of the data was made using the software Chromeleon v.7.2.-Chromatography Data System (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Results were in mg/L of the wort.

#### 4.3.3. Total Polyphenols Content

Total content of polyphenol compounds in worts was determined using spectrophotometric Folin–Ciocalteu (F–C) method [63]. Samples of the worts with the volume of 0.1 mL along with 0.2 mL of F–C reagent were placed in the cups using automatic pipette. After 3 min each sample was completed with 1 mL 20% of the water solution of sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and 2 mL of distilled water. After 1 h, prepared samples were analyzed using UV-2401 PC Shimadzu spectrophotometer with wave length 765 nm; distilled water was used as a blind sample. Results were presented as an average value from three repetitions. Calibration curve in the range of 0.30–9.00 mg GAE/L was used to read the results.

#### 4.3.4. Antioxidative Activity

##### Ability to Iron Ions Reduction (FRAP)

The principle of the FRAP method (ferric ion reducing antioxidant parameter) is the reduction of iron-2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-thiazide [Fe(III)-TPTZ] to the ferric complex in the environment of low pH [64]. A total of 200 mL of FRAP reagent was made by combining 20 mL of a water solution containing 0.1018g of iron chloride (III) (FeCl<sub>3</sub>) with a solution of 0.0664g TPTZ in 20 mL 40 mmol solution of muriatic acid (HCl) using acetate buffer with pH 3.6.

Quantitative analysis was made using method of the external standard using iron (II) ( $2 \times 10^{-1}$  mmol/L) sulfate (VI) as a referential standard. On this basis, a correlation curve between absorbency value and compound concentration was made. A total of 1 mL of beer dissolved in distilled water and 3 mL of FRAP reagent was mixed in cups. Results were presented in milimoles of Trolox per liter of the wort. Absorbance was determined using spectrophotometer UV-2401 PC Shimadzu. Determinations were performed in triplicate.

#### Ability to Cation Radical ABTS<sup>•+</sup> Reduction

Antioxidative activity was determined using cation radical reduction method ABTS<sup>•+</sup> [65]. Thus, 0.03 mL volume wort sample was mixed with the ABTS<sup>•+</sup> solution with determined absorbance value (0.700). After 6 min, measurement was made using UV-2401 PC Shimadzu spectrophotometer with the wave length 734 nm. The measurement of each sample was conducted and repeated three times. Results were presented after calculation for mmol equivalent of Trolox for liter of the beer and as a percentage value (I%) of inhibition of oxidation reaction compared to the blind sample.

$$I\% = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

I%—inhibition of oxidation reaction degree (%); A—absorbance value for the actual sample; A<sub>0</sub>—absorbance value for the reference sample.

#### 4.3.5. Browning Index

Browning index was estimated using absorbance measurement method at 420 nm [66]. The analysis was made using UV-Vis Evolution 300 spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). The results were presented as arbitrary absorbance units (AU).

#### 4.3.6. Statistical Analysis

Obtained data were analyzed using Statistica 13.5 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). One-way variation analysis (ANOVA) on the statistical significance level 0.05 was performed. Significance of the differences between mean values was examined using Duncan test ( $p < 0.05$ ). In order to study connections between examined characteristics, a Pearson correlation ( $p < 0.05$ ) analysis was conducted. The results were presented as a correlation matrix and a regression diagram.

## 5. Conclusions

Our research confirms that the use of dark malts and roasted cereal grains in a 10% dose in the production of brewing wort influences antioxidant potential and the content of phenolic compounds of the worts, with slight changes in the carbohydrate profile. Among the tested worts, the wort with the addition of dark chocolate malt and roasted barley had a distinguishing polyphenolic content and antioxidant activity. Samples differed in terms of the tested parameters due to the type of roasted grain used. The wort with the addition of wheat malt was characterized by a lower sugar content than the other worts made of malts or barley grains. It has been shown that with increasing dose of dark chocolate malt, the share of dextrans not fermented by the brewer's yeast increased, while the content of fermentable sugars decreased. In the study of wort containing 20–40% dark chocolate malt, it has been shown that a high addition of this malt resulted in an increase in the content of polyphenols and the antioxidant capacity as well as the content of HMF and browning index. Information about the factors influencing the antioxidant activity were obtained by correlation analysis. The ability to reduce iron ions (FRAP) and capacity for reduction of ABTS<sup>•+</sup> is strongly positively correlated with the content of polyphenols, the level of browning index, and the content of dextrans, and negatively correlated with the content of maltotriose and maltose. This research allowed us to present the relationships between the tested properties of the brewed worts. The addition of dark malts can be used to increase the antioxidant activity of the wort, influencing the characteristics of the finished beer. The ability to scavenge free radicals may shape the biological activity of products and contribute to the maintenance of product quality during storage. An interesting direction for further research would be the study of the addition of other roasted raw materials, e.g., coffee beans or cocoa, as well as the use of untypical malts in beer production.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.G. and J.K.-R.; methodology, J.K.-R. and A.Z.K.; software, J.G.; validation, J.G., J.K.-R. and A.Z.K.; formal analysis, J.G. and J.K.-R.; investigation, J.G., J.K.-R. and A.Z.K.; resources, J.K.-R. and A.Z.K.; data curation, J.G. and J.K.-R.; writing—original draft preparation, J.G., J.K.-R. and A.Z.K.; writing—review and editing, J.G., J.K.-R. and A.Z.K.; visualization, J.G.; supervision, J.K.-R. and A.Z.K.; project administration, J.K.-R.; funding acquisition, J.K.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E.K.; Becker, T. Humulus lupulus—A story that begs to be told. A review. *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 289–314.
2. Kondo, K. Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors* **2004**, *22*, 303–310. [[CrossRef](#)]
3. Kołota, A.; Oczkowski, M.; Gromadzka-Ostrowska, J. Wpływ występujących w piwie związków polifenolowych na organizm—przegląd literatury. *Alcohol. Drug Addict.* **2014**, *27*, 273–281. [[CrossRef](#)]
4. Koss-Mikołajczyk, I.; Bartoszek-Pączkowska, A. Bioaktywne Fitozwiązki W Chemoprewencji Przewlekłych Chorób Niezakaźnych—Owoce I Warzywa Czy Suplementy Diety? *Żywność. Nauka. Technol. Jakość* **2019**, *1*, 5–14.
5. Blazewicz, J.; Kawa-Rygielska, J. Zalety technologiczne nietypowo suszonych słodów specjalnych. *Przemysł Ferment. Owocowo Warzywny* **2018**, *1*, 16–17. [[CrossRef](#)]
6. Coghe, S.; Vanderhaegen, B.; Pelgrims, B.; Basteyns, A.V.; Delvaux, F.R. Characterization of dark specialty malts: New insights in color evaluation and pro-and antioxidative activity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2003**, *61*, 125–132. [[CrossRef](#)]
7. Błazewicz, J.; Kawa-Rygielska, J.; Gasinski, A. Słody żytnie w ocenie technologicznej. *Przemysł Ferment. Owocowo Warzywny* **2019**, *63*. [[CrossRef](#)]
8. Błazewicz, J.; Kawa-Rygielska, J.; Gasiór, J. Słody specjalne z nasion roślin strączkowych. *Przemysł Ferment. i Owocowo Warzywny* **2019**, *63*. [[CrossRef](#)]
9. Malt, V. Available online: <https://vikingmalt.pl/oferta/> (accessed on 21 August 2020).
10. Carvalho, D.O.; Gonçalves, L.M.; Guido, L.F. Overall antioxidant properties of malt and how they are influenced by the individual constituents of barley and the malting process. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 927–943. [[CrossRef](#)]
11. Coghe, S.; Martens, E.; D'Hollander, H.; Dirinck, P.J.; Delvaux, F.R. Sensory and instrumental flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts. *J. Inst. Brew.* **2004**, *110*, 94–103. [[CrossRef](#)]
12. Baranwal, D. Malting: An indigenous technology used for improving the nutritional quality of grains: A review. *Asian J. Dairy Food Res.* **2017**, *36*, 179–183. [[CrossRef](#)]
13. Carvalho, D.O.; Curto, A.F.; Guido, L.F. Determination of phenolic content in different barley varieties and corresponding malts by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Antioxidants* **2015**, *4*, 563–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gerhäuser, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 1941–1954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pascoe, H.M.; Ames, J.M.; Chandra, S. Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in ale. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2003**, *61*, 203–209. [[CrossRef](#)]
16. Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1403–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.A.; Morales, F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7832–7836. [[CrossRef](#)]
18. Wang, H.Y.; Qian, H.; Yao, W.R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chem.* **2011**, *128*, 573–584. [[CrossRef](#)]
19. Echavarría, A.P.; Paga'n, J.; Ibarz, A. Melanoidins formed by maillard reaction in food and their biological activity. *Food. Eng. Rev.* **2012**, *4*, 203–223. [[CrossRef](#)]
20. Michalska, A.; Zielinski, H. Produkty reakcji Maillarda w żywności. *Żywność Nauka Technol. Jakość* **2007**, *14*, 5–16.



21. Aljahdali, N.; Gadonna-Widehem, P.; Anton, P.M.; Carbonero, F. Gut Microbiota Modulation by Dietary Barley Malt Melanoidins. *Nutrients* **2020**, *12*, 241. [[CrossRef](#)]
22. Farag, M.R.; Alagawany, M.; Bin-Jumah, M.; Othman, S.I.; Khafaga, A.F.; Shaheen, H.M.; Mohamed, E. The Toxicological Aspects of the Heat-Borne Toxicant 5-Hydroxymethylfurfural in Animals: A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 1941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Alves, V.; Gonçalves, J.; Figueira, J.A.; Ornelas, L.P.; Branco, R.N.; Câmara, J.S.; Pereira, J.A. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chem.* **2020**, *326*, 126856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Piazzon, A.; Forte, M.; Nardini, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10677–10683. [[CrossRef](#)]
25. Nardini, M.; Garaguso, I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chem.* **2020**, *305*, 125437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kawa-Rygielska, J.; Adamenko, K.; Kucharska, A.Z.; Prorok, P.; Piórecki, N. Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food Chem.* **2019**, *281*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gasiński, A.; Kawa-Rygielska, J.; Szumny, A.; Czubaszek, A.; Gašior, J.; Pietrzak, W. Volatile Compounds Content, Physicochemical Parameters, and Antioxidant Activity of Beers with Addition of Mango Fruit (*Mangifera Indica*). *Molecules* **2020**, *25*, 3033. [[CrossRef](#)]
28. Gasiński, A.; Kawa-Rygielska, J.; Szumny, A.; Gašior, J.; Głowacki, A. Assessment of Volatiles and Polyphenol Content, Physicochemical Parameters and Antioxidant Activity in Beers with Dotted Hawthorn (*Crataegus punctata*). *Foods* **2020**, *9*, 775. [[CrossRef](#)]
29. Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Pérez-Jiménez, J. What Contribution Is Beer to the Intake of Antioxidants in the Diet? In *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2009; pp. 441–448.
30. Tubaro, F. Antioxidant Activity of Beer's Maillard Reaction Products: Features and Health Aspects. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2009; pp. 449–457.
31. Martinez-Gomez, A.; Caballero, I.; Blanco, C.A. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules* **2020**, *10*, 400. [[CrossRef](#)]
32. Coghe, S.; D'Hollander, H.; Verachtert, H.; Delvaux, F.R. Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. *J. Inst. Brew.* **2005**, *111*, 51–60. [[CrossRef](#)]
33. Briggs, D.E.; Brookes, P.A.; Stevens, R.B.C.A.; Boulton, C.A. *Brewing: Science and Practice*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2004.
34. Oracz, J.; Nebesny, E. Effect of roasting parameters on the physicochemical characteristics of high-molecular-weight Maillard reaction products isolated from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups. *Eur. Food. Res. Technol.* **2019**, *245*, 111–128. [[CrossRef](#)]
35. Nanamori, M.; Watanabe, T.; Shinano, T.; Kihara, M.; Kawahara, K.; Yamada, S.; Osaki, M. Changes in saccharide, amino acid and S-methylmethionine content during malting of barley grown with different nitrogen and sulfur status. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Žilić, S.; Dodig, D.; Basić, Z.; Vančetović, J.; Titan, P.; Đurić, N.; Tolimir, N. Free asparagine and sugars profile of cereal species: The potential of cereals for acrylamide formation in foods. *Food Addit. Contam. Part A* **2017**, *34*, 705–713.
37. Vinje, M.A.; Duke, S.H.; Henson, C.A. Comparison of factors involved in starch degradation in barley germination under laboratory and malting conditions. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2015**, *73*, 195–205. [[CrossRef](#)]
38. Ferreira, I.M. Beer Carbohydrates. In *Beer in Health and Disease Prevention*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2009; pp. 291–298.
39. Mohsin, G.F.; Schmitt, F.J.; Kanzler, C.; Epping, J.D.; Buhrke, D.; Hornemann, A. Melanoidin formed from fructosylalanine contains more alanine than melanoidin formed from d-glucose with L-alanine. *Food Chem.* **2020**, *305*, 125459. [[CrossRef](#)]
40. Zhao, H. Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 15–24.
41. Dybkowska, E.; Sadowska, A.; Rakowska, R.; Debowska, M.; Swiderski, F.; Swiader, K. Assessing polyphenols content and antioxidant activity in coffee beans according to origin and the degree of roasting. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **2017**, *68*, 347–353.
42. Murakami, M.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Atoba, T.M. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, FCT7–FCT10. [[CrossRef](#)]

43. Jayabalan, R.; Subathradevi, P.; Marimuthu, S.; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chem.* **2008**, *109*, 227–234. [[CrossRef](#)]
44. Woffenden, H.M.; Ames, J.M.; Chandra, S.; Anese, M.; Nicoli, M.C. Effect of kilning on the antioxidant and pro-oxidant activities of pale malts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4925–4933. [[CrossRef](#)]
45. Fogarasi, A.L.; Kun, S.; Tankó, G.; Stefanovits-Bányai, É.; Hegyesné-Vecseri, B. A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chem.* **2015**, *167*, 1–6. [[CrossRef](#)]
46. Inns, E.L.; Buggey, L.A.; Booer, C.; Nursten, H.E.; Ames, J.M. Effect of modification of the kilning regimen on levels of free ferulic acid and antioxidant activity in malt. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9335–9343. [[CrossRef](#)]
47. Sun, Y.; Zhong, L.; Cao, L.; Lin, W.; Ye, X. Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*malus pumila* mill, cv. Red Fuji) juice. *Int. J. Food. Sci. Tech.* **2015**, *52*, 8336–8342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lee, C.H.; Chen, K.T.; Lin, J.A.; Chen, Y.T.; Chen, Y.A.; Wu, J.T.; Hsieh, C.W. Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *93*, 271–280. [[CrossRef](#)]
49. Monakhova, Y.B.; Lachenmeier, D.W. The margin of exposure of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in alcoholic beverages. *Environ. Health Toxicol.* **2012**, *27*, e2012016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. González, L.; Morante-Zarcero, S.; Pérez-Quintanilla, D.; Sierra, I. Hydroxymethylfurfural determination in cereal and insect bars by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry employing a functionalized mesostructured silica as sorbent in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1622*, 461124. [[CrossRef](#)]
51. Capuano, E.; Fogliano, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 793–810. [[CrossRef](#)]
52. Choudhary, A.; Kumar, V.; Kumar, S.; Majid, I.; Aggarwal, P.; Suri, S. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: Recent developments. *Toxin Rev.* **2020**, 1–17. [[CrossRef](#)]
53. Akilloglu, H.G.; Mogol, B.A.; Gökmen, V. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. *Food Addit. Contam.* **2011**, *28*, 1629–1635. [[CrossRef](#)]
54. Viegas, O.; Prucha, M.; Gökmen, V.; Ferreira, I.M. Parameters affecting 5-hydroxymethylfurfural exposure from beer. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, *35*, 1464–1471. [[CrossRef](#)]
55. Rufian-Henares, J.A.; De la Cueva, S.P. Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25*, 1306–1312. [[CrossRef](#)]
56. Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chem.* **2011**, *129*, 139–148. [[CrossRef](#)]
57. Nilsson, J.; Pillai, D.; Önning, G.; Persson, C.; Nilsson, Å.; Åkesson, B. Comparison of the 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzotiazole-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 239–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Woo, K.S.; Kim, H.Y.; Hwang, I.G.; Lee, S.H.; Jeong, H.S. Characteristics of the thermal degradation of glucose and maltose solutions. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2015**, *20*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Bastola, K.P.; Guragain, Y.N.; Bhadriraju, V.; Vadlani, P.V. Evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by Folin-Ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass. *Am. J. Anal. Chem.* **2017**, *8*, 416–431. [[CrossRef](#)]
60. Kroh, L.W.; Schulz, A. News on the Maillard reaction of oligomeric carbohydrates: A survey. *Food Nahr.* **2001**, *45*, 160–163. [[CrossRef](#)]
61. Pietrzak, W.; Kawa-Rygielska, J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat-rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. *Fuel* **2015**, *147*, 236–242. [[CrossRef](#)]
62. Adamenko, K.; Kawa-Rygielska, J.; Kucharska, A.Z. Characteristics of Cornelian cherry sour non-alcoholic beers brewed with the special yeast *Saccharomyces ludwigii*. *Food Chem.* **2020**, *312*, 125968. [[CrossRef](#)]
63. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [[CrossRef](#)]
64. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]



65. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
66. Chen, S.L.; Jin, S.Y.; Chen, C.S. Relative reactivities of glucose and galactose in browning and pyruvaldehyde formation in sugar/glycine model systems. *Food Chem.* **2005**, *92*, 597–605. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the worts are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Article

# Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content

Justyna Paszkot <sup>1,\*</sup> , Joanna Kawa-Rygielska <sup>1</sup> and Mirosław Anioł <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Fermentation and Cereals Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław, Poland; joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland; miroslaw.aniol@upwr.edu.pl

\* Correspondence: justyna.pasz kot@upwr.edu.pl

**Abstract:** The antioxidant activity of beers comes mainly from phenolic compounds and melanoidins. The aim of this research was to evaluate the effect of technological operations, especially the ethanol fermentation process using top fermentation brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, on the antioxidant activity of dark dry hopped beers with a high xanthohumol content. Four beers were produced using different varieties of hops. The polyphenol content during beer processing increased at the stage of hopping and fermentation, while it decreased during aging. The ability to reduce iron ions increased for all beers compared to hopped wort. The opposite tendency was noted for the antioxidant capacity expressed as the ability to reduce the radical cation ABTS<sup>•+</sup> generated from 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Fermentation and aging caused a decrease in beer color intensity. The content of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) increased with the color intensity of wort, therefore in beers no presence of 5-HMF was observed. The beers were characterized by a distinctly high content of xanthohumol in the range of 1.77–3.83 mg/L and 0.85–1.19 mg/L of isoxanthohumol. The content of prenylflavonoids and bitterness of beer depended on the variety of hops used.

**Keywords:** fermentation; beer; phenols; antioxidant activity; dark beer; 5-hydroxymethylfurfural; dry hopping; xanthohumol



**Citation:** Paszkot, J.;

Kawa-Rygielska, J.; Anioł, M.

Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content.

*Antioxidants* **2021**, *10*, 763. <https://doi.org/10.3390/antiox10050763>

Academic Editor: Jae-Hyung Mah

Received: 20 April 2021

Accepted: 8 May 2021

Published: 11 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Beer is an alcoholic beverage obtained by ethanol fermentation of wort consisting of water, malt and hops. In the diet, it can be a source of phytochemicals with positive effects on human health. The bioactive compounds in beer have anti-obesity, anti-cancer, anti-inflammatory, antioxidant and anti-diabetic effects [1]. Regarding the antioxidant activity of beer, it is influenced by the selection of raw materials, the method of brewing wort production, the biological material used, and the parameters of the ethanol fermentation process, as well as the conditions and storage time of the product [2].

The antioxidant activity of beer is mainly due to the content of phenolic compounds and melanoidins [3,4]. Phenols in beer are derived from malt (80%) and from hops (20%) [5]. The crucial stages for the extraction of antioxidants in the technological process of beer production are mashing and hopping [6]. The compounds obtained from raw materials during the preparation of brewing wort undergo further transformations with the participation of brewer's yeast in the process of ethanol fermentation [2]. Beer phenols are classified into the following groups: simple phenols, derivatives of benzoic and cinnamic acids, coumarins, catechins, flavonoids, proanthocyanidins, chalcones, as well as  $\alpha$ -acids and iso- $\alpha$ -acids [7]. The presence of polyphenols in beer, apart from a positive effect on antioxidant activity, also results in the appearance of temporary or permanent haze in beer during its storage. This is due to their ability to form complexes with proteins [8]. An interesting compound among beer polyphenols is the hop-derived prenylflavonoid xanthohumol (XN).

Its ability to scavenge free radicals is comparable to that of catechins present in green tea, and is several times stronger than the activity of vitamins C and E [9]. Xanthohumol has many beneficial properties, including anti-inflammatory, antiviral, antibacterial, antitumor, antiatherosclerotic, antimutagenic and antioxidant properties [10–12]. The only source of this compound in the human diet is beer. However, its content is low, and amounts to about 0.1 mg/L of beer. Dark beers have a higher XN content than pale beers, something which is probably related to the participation of melanoidins formed through the Maillard reaction in the inhibition of the isomerization of XN to a compound with lower biological activity—isoxanthohumol (IXN) [11–14]. Due to the content of melanoidins and their antioxidant activity, dark beers are also characterized by a higher total content of polyphenolic compounds and antioxidant activity than pale beers [15]. Structurally, they are nitrogenous macromolecular compounds responsible for the brown coloration produced during the process. The content of melanoidins in food cannot be estimated by our limited knowledge of their exact structure. Therefore, the content of the intermediate product 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) can be taken as an indicator of the Maillard reaction [3].

The aim of this research was to evaluate the effect of technological operations and the ethanol fermentation process using top fermentation brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the antioxidant activity of dark dry hopped beers with high XN content. A unique element of this work is the analysis of the antioxidant properties of four dry hopped dark beers produced with different varieties of hops at subsequent technological stages, with attention to the impact of indicators of the Maillard reaction on wort and beers' features. We conducted the analysis of total phenolic compounds, antioxidant capacity, 5-hydroxymethylfurfural content, color intensity, glycerol and carbohydrate profiles at successive technological stages with assessment of xanthohumol, iso- $\alpha$ -acids content and the basic physicochemical properties of finished beers.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials and Sample Preparation

#### 2.1.1. Biological Material

Top fermentation brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 (Fermentis, Lesaffre, France) was used in the beer wort fermentation process. Before adding to the wort, the yeast was rehydrated in sterile distilled water at 25 °C for 30 min. In accordance with the manufacturer's recommendations, a dose of 0.46 g/L was used.

#### 2.1.2. Raw Materials

The following malts were used in the production of beer wort: Pilsner malt (3–4.5 EBC, Viking Malt; Strzegom, Poland) and dark chocolate malt (1100–1300 EBC, Viking Malt; Strzegom, Poland). The beers were hopped with the hop varieties Marynka (Twój Browar, Poland, 8.8%  $\alpha$ -acids), Amarillo (Twój Browar, Poland, 8.8%  $\alpha$ -acids), Cascade (Twój Browar, Poland, 7.7%  $\alpha$ -acids), Centennial (Twój Browar, Poland, 8.5%  $\alpha$ -acids) and Galaxy (Twój Browar, Poland, 13.3%  $\alpha$ -acids).

#### 2.1.3. Brewing Technology

The wort was obtained by filtering the mash, which was produced using the two-step decoction method. The mash was made with 90% Pilsner malt and 10% dark chocolate malt. The mashing process steps were as follows: 52 °C for 10 min, 63 °C for 40 min, 72 °C for 30 min and 78 °C for 10 min. The temperature increase was obtained by taking 1/3 of the mash volume, boiling in a separate vessel for 10 min, and returning it to the main mash tun. After mashing, the mash was filtered. The obtained wort (10 L) was boiled with the addition of Marynka hop (12 g). The wort extract was then set at 12 °Bx by measuring with a Densito 30PX densimeter (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) (Analitica EBC, 2010). The wort was divided into four samples (2 L volume). Then, separately, the samples with the addition 2.5 g/L of hops (samples: A—Amarillo, B—Cascade, C—Centennial,

D—Galaxy) were boiled for 10 min. The worts were cooled down to 18 °C and fermented with *S. cerevisiae* Safale US-04 top fermenting yeast (Fermentis, Lesaffre, France) at a dose according to the manufacturer's recommendations (0.46 g/L) and temperature of 18 °C. Main fermentation was carried out for seven days. The beers were then decanted from the yeast sediment into disinfected fermentation flasks. The next stage of the technological process was dry hopping of the beers using a dose of 5 g of one of the hop varieties (samples: A—Amarillo, B—Cascade, C—Centennial, D—Galaxy). The beers were post-fermented for seven days at 18 °C, then poured into 500 mL bottles. Carbonation was obtained as a result of refermentation. For this purpose, sucrose was added to the beer in a dose of 4.7 g/L before bottling. The beers were aged for 4 weeks at 4 °C.

#### 2.1.4. Sample Preparation and Abbreviations

The beers were degassed in a 358A laboratory shaker (ElpinPlus, Lubawa, Poland) and filtered into Erlenmeyer flasks through a pleated filter. Before analysis, both the wort and beers were centrifuged in a laboratory centrifuge (MPW-351R type) in Falcon 50 cm<sup>3</sup> containers (5000 rpm for 10 min). The obtained samples were decanted.

The following abbreviations were used to mark the samples: W0—wort after filtration, W1—wort hopped with bitter hops (Marynka), A—wort and beers hopped with the Amarillo variety, B—wort and beers hopped with the Cascade variety, C—wort and beers hopped with the Centennial variety, D—wort and beers hopped with the Galaxy variety. Technological stages have been additionally marked with numbers: 1—hopped wort, 2—beer after main fermentation, 3—beer after post-fermentation and 4—beer after maturation.

## 2.2. Analytic methods

### 2.2.1. Basic Physico-Chemical Parameters

The beers were degassed using a 358 A laboratory shaker (Elpin Plus, Lubawa, Poland), and then filtered using paper filters and diatomaceous earth. Next, using a beer densimeter Anton Paar beer analyzer DMA 4500 M (Graz, Austria), the ethanol content, real attenuation, apparent attenuation, wort extract content, color (EBC) and beer density were measured.

### 2.2.2. Determination of Beer Bitterness (IBU)

The analysis of iso- $\alpha$ -acids content was performed according to Analytica EBC [16]. A sample of degassed beer (10 cm<sup>3</sup>) was transferred to a 35 cm<sup>3</sup> Falcon tube. Then 6 N HCl solution (0.5 cm<sup>3</sup>) and isooctane (20 cm<sup>3</sup>) were added. The samples were shaken for 5 min, before 10 cm<sup>3</sup> of the mixture was transferred to a 15 cm<sup>3</sup> Falcon centrifuge tube. The sample was centrifuged (2675 centrifugal force (RCF)) in Falcon containers (5 min, 3000 rpm). Then a sample was taken from the isooctane layer and determined with a BECKMAN DU-650 UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) at a wavelength of 275 nm. Pure isooctane was the reference sample. The content of iso- $\alpha$ -acids was calculated according to the formula:  $IBU = 50A$  (IBU—brewery units [mg/dm<sup>3</sup>], A—absorbance at 275 nm).

### 2.2.3. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Carbohydrates Content

Carbohydrate profiles (maltose, maltotriose, glucose, dextrin) and glycerol content were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) [17]. Samples were degassed and centrifuged with a laboratory centrifuge MPW-351R (10 min, 5000 rpm). Then the samples were diluted with water and filtered through 0.22  $\mu$ m filters. A 5-fold dilution for wort and a 2-fold dilution for beer samples was used. Separation was made using Rezex ROA—Organic Acid H+ (300  $\times$  7.8 mm) column (Phenomenex, Torrance, USA). The HPLC method, using Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used. Measurement parameters: injection volume—0.02 mL, flow rate—0.6 mL/min, temperature of separation—60 °C, mobile phase—0.005 mol/dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A refractometric method of detection was used. All measurements were performed in triplicate. Results were presented as g/L of wort or beer.

#### 2.2.4. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Xanthohumol (XN) and Isoxanthohumol (IXN) Content

The content of XN and IXN was analyzed using the method by Jurková et al. [18] with modifications. The analysis consisted of solid-phase extraction (SPE) using the Strata C18-E, 500 mg/6 mL column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). For the analytes separation from beer samples, we used: No.1—methanol, No. 2—water:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100:0.2 *v/v*), No. 3—methanol:water:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (20:80:0.2 *v/v/v*) and No.4—methanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100:0.2 *v/v*). Columns were conditioned by passing 10 mL of No. 1, and next 10 mL of No. 2. The acidified beer samples (25 mL) were applied to the SPE columns, treated with 10 mL of No. 3 and allowed to “dry” for 10 min under vacuum. The analytes were washed out with 5 mL of No. 4 solution into 2.5 mL measuring tubes to the level just before the mark, filled with the same solution and mixed. Samples were filtered through a 0.45 Pm PTFE filter and analyzed by HPLC.

High-performance liquid chromatograph (Waters 2690) with a diode array detector (Waters 996) was used. The analyzes were performed on a C-18 reverse phase column (Kinetex 5u XB-C18 100A). The column was thermostated at 28 °C and the analyzed samples at 12 °C. The following solutions were used as eluent: A-1% vol. formic acid in water; B 1% vol. formic acid in acetonitrile. Elution program: 65% A-10 min., 65% A-10% A-8 min., 10% A-4 min., 10% A-65% A-1 min., 65% A-7 min. The flow rate was 1.5 mL/min. The XN and IXN external standard (0.535 mg/mL of XN and 0.496 mg/mL of IXN) was used in the analysis. The analyses were performed in triplicate. Results were presented in mg of XN or IXN per liter of beer.

#### 2.2.5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) Content

The content of 5-HMF in wort and beers was analyzed by high-performance liquid chromatography using the Dionex system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and the TCC-3000SD Cadenza Imtakt CD-C18 column (75 × 4.6 mm, 5 μm) [17]. An UltiMate 3000 diode detector, LPG-3400A pump and EWPS-300SI autosampler were used. The mobile phase was composed of solvents A (4.5% *v/v* formic acid) and B (100% acetonitrile). An injection volume of 20 μL and an elution rate of 1.0 mL/min were used. The elution procedure was as follows: 0–1 min 5% B in A, 20 min 25% B in A, 21 min 100% B, 26 min 100% B, 27 min 5% B in A. The column temperature was 30 °C. 5-HMF was identified at 280 nm. Chromeleon v.7.2.—Chromatography Data System (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA, USA) was used for integration and quantification of the data. Results were presented as mg/L of wort or beer.

#### 2.2.6. Total Polyphenols Content

The Folin–Ciocalteu (F–C) spectrophotometric method was used to determine the total polyphenol content (TPC) in worts and beers [19]. The analyzed wort or beer samples (0.1 mL) and F-C reagent (0.2 mL) were mixed in plastic cuvettes and incubated for 3 min. A 20% aqueous sodium carbonate solution (1 mL) and distilled water (2 mL) were then added to the samples. The blank was distilled water. After one hour of incubation, the absorbance was analyzed spectrophotometrically using UV-2401 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) at a wavelength of 765 nm. The results are presented as the mean value of triplicates. A calibration curve in the range of 0.30–9.00 mg GAE/L was used to read the results.

#### 2.2.7. Ability of Iron Ion Reduction (FRAP)

An analysis of the ability to reduce ferric ions was performed using the method by Benzie and Strain [20]. The FRAP (ferric reducing antioxidant power) reagent was prepared by combining 20 mL of an aqueous solution of iron (III) chloride (0.1018 g FeCl<sub>3</sub>) with a solution of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (0.0664 g TPTZ) in 40 mM hydrochloric acid (20 mL HCl) with acetate buffer pH 3.6. Quantitative analysis was performed by the external standard method using iron (II) sulfate (0.2 mmol/L) (VI) as reference. A

correlation curve between the absorbance value and the compound concentration was prepared. Beer (1 mL) diluted in distilled water and FRAP reagent (3 mL) were mixed in cuvettes. Distilled water was used as a blank. The absorbance was determined at  $\lambda$  593 nm with a UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The results are presented as the mean of triplicates in millimoles of Trolox per liter of wort or beer.

### 2.2.8. Ability of Radical Cation ABTS<sup>•+</sup> Reduction

Antioxidant activity was determined using the radical cation reduction method ABTS<sup>•+</sup> [21]. The wort or beer samples (0.03 mL) were mixed with the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) solution with a determined absorbance value (0.700). After 6 min of incubation, the measurement was made using UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) with the wavelength 734 nm. Determinations were performed in triplicate. Results were presented in mmol of Trolox per liter of wort or beer.

### 2.2.9. Statistical Analysis

One-way analysis of variability (ANOVA) was performed for the obtained data. The significance of differences between the mean values was tested using Duncan's test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed using the Statistica 13.5 program (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Physicochemical Properties of Beers

Finished beers, after the aging process, were analyzed with the use of an oscillating densimeter with a beer analyzer (Table 1). The beers did not differ significantly in ethanol content (5.37–5.49% *v/v*). The values of apparent and real attenuation differed statistically significantly, but the magnitude of these differences was not large. The apparent attenuation ranged from 80.27 to 81.33% *w/w*, while the real attenuation 64.93 to 65.73% *w/w*. Similar parameters (ethanol content, attenuation and final beer density) resulted from the use of wort for fermentation with similar extract content (12.31–12.61% *w/w*). The above-mentioned parameters allowed us to conclude that the variety of hops used did not have a significant impact on the process of fermentation of beer wort.

**Table 1.** Physicochemical properties of beers.

Sample	Ethanol % <i>v/v</i>	Attenuation		Extract		Density g/cm <sup>3</sup>	Bitterness IBU
		Apparent % <i>w/w</i>	Real % <i>w/w</i>	Apparent % <i>w/w</i>	Real % <i>w/w</i>		
A4	5.42 ± 0.03 <sup>a</sup>	80.71 ± 0.02 <sup>c</sup>	65.21 ± 0.02 <sup>c</sup>	12.61 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.39 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.0076 ± 0.00 <sup>b</sup>	59.45 ± 0.10 <sup>b</sup>
B4	5.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	81.33 ± 0.01 <sup>b</sup>	65.67 ± 0.01 <sup>b</sup>	12.31 ± 0.03 <sup>c</sup>	4.23 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.0072 ± 0.00 <sup>d</sup>	55.45 ± 0.67 <sup>c</sup>
C4	5.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	80.385 ± 0.02 <sup>a</sup>	65.73 ± 0.02 <sup>a</sup>	12.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.33 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.0075 ± 0.00 <sup>c</sup>	56.35 ± 0.31 <sup>c</sup>
D4	5.49 ± 0.02 <sup>a</sup>	80.27 ± 0.02 <sup>d</sup>	64.93 ± 0.02 <sup>d</sup>	12.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.0078 ± 0.00 <sup>a</sup>	75.22 ± 1.16 <sup>a</sup>

Results are presented as a mean of three replicates ± standard deviation. The mean values presented in one column, marked with different letters (a, b, c, etc.), differ statistically ( $p < 0.05$ ).

The addition of dark malt did not significantly affect the apparent extract of wort, while the samples were clearly differentiated in terms of the real extract, the degree of attenuation, and the final ethanol content in the beer. Although wort had a similar extract content, the attenuation level and ethanol content were lower for beers with a higher proportion of dark malt, while the real extract content and density increased. This may indicate the fact that dark wort contains sugars that are less susceptible to fermentation, or that the Maillard substances inhibit yeast metabolism. Research by Coghe et al. [22] gave very similar results to those obtained in our experiment. They also used 10% dark malt to prepare the wort, and the apparent extract of the beers was (as in our trial) close to 12 °Plato. The beers they obtained were characterized by a lower real extract and a higher degree of attenuation than our beers. These values confirm that there are less fermentable sugars in



darker-colored malt. The ethanol content in the beers obtained in both experiments is at a similar level (about 5.3% *v/v*). The higher EBC value of the malt used in our research did not significantly affect the alcohol content of the produced beers [22].

Hopped wort differed statistically significantly in terms of the content of all tested sugars (Table 2). Neither of them contained glycerol. Maltotriose, maltose, and glucose contribute to the ethanol fermentation process with the use of *S. cerevisiae* brewer's yeast, therefore their content decreases during the process. Maltose is the main sugar of wort [23]. The wort contained 49.21–58.02 g/L maltose, 12.06–15.13 g/L maltotriose, 6.53–8.34 g/L glucose and 30.68–46.85 g/L dextrin. The D1 wort was characterized by the highest content of all tested sugars. After the fermentation process, the content of maltose decreased significantly to 0.34–0.36 g/L. There were no statistically significant differences in the content of this sugar in beers after the main fermentation, post-fermentation, and maturation. After main fermentation and post-fermentation, no glucose content was noted in any of the tested beer variants. Its small amounts were contained in the sample of A4 beer at the final stage of the technological process—after maturation. This may be due to the addition of glucose to the beer prior to bottling as a raw material for refermentation, which is used to naturally saturate beer with carbon dioxide.

**Table 2.** Carbohydrate profiles and glycerol content in hopped worts and beers.

Sample	Maltose	Maltotriose	Glucose	Dextrins	Glycerol
g/L					
Hopping					
A1	52.59 ± 0.23 <sup>c</sup>	13.63 ± 0.10 <sup>b</sup>	7.53 ± 0.20 <sup>b</sup>	39.46 ± 0.08 <sup>d</sup>	nd
B1	49.21 ± 1.6 <sup>d</sup>	12.13 ± 0.05 <sup>c</sup>	7.01 ± 0.05 <sup>c</sup>	34.46 ± 0.35 <sup>g</sup>	nd
C1	53.87 ± 0.79 <sup>b</sup>	12.06 ± 0.45 <sup>c</sup>	6.53 ± 0.15 <sup>d</sup>	30.68 ± 0.56 <sup>h</sup>	nd
D1	58.02 ± 0.90 <sup>a</sup>	15.13 ± 0.26 <sup>a</sup>	8.34 ± 0.39 <sup>a</sup>	46.85 ± 1.32 <sup>a</sup>	nd
Main fermentation					
A2	0.36 ± 0.01 <sup>e</sup>	5.17 ± 0.10 <sup>d</sup>	nd	38.49 ± 0.78 <sup>de</sup>	3.39 ± 0.03 <sup>a</sup>
B2	0.34 ± 0.00 <sup>e</sup>	4.83 ± 0.06 <sup>e</sup>	nd	37.28 ± 0.34 <sup>ef</sup>	2.61 ± 0.03 <sup>g</sup>
C2	0.36 ± 0.00 <sup>e</sup>	5.31 ± 0.05 <sup>d</sup>	nd	39.86 ± 0.59 <sup>d</sup>	2.71 ± 0.01 <sup>f</sup>
D2	0.36 ± 0.01 <sup>e</sup>	4.51 ± 0.09 <sup>e</sup>	nd	37.06 ± 0.18 <sup>ef</sup>	2.83 ± 0.01 <sup>cd</sup>
Post-fermentation					
A3	0.41 ± 0.01 <sup>e</sup>	nd	nd	37.15 ± 0.09 <sup>ef</sup>	2.88 ± 0.00 <sup>c</sup>
B3	0.31 ± 0.01 <sup>e</sup>	nd	nd	34.22 ± 0.55 <sup>g</sup>	2.62 ± 0.02 <sup>g</sup>
C3	0.32 ± 0.01 <sup>e</sup>	1.13 ± 0.02 <sup>f</sup>	nd	36.19 ± 0.32 <sup>f</sup>	2.13 ± 0.11 <sup>h</sup>
D3	0.39 ± 0.04 <sup>e</sup>	nd	nd	44.24 ± 0.75 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.02 <sup>b</sup>
Maturation					
A4	0.44 ± 0.04 <sup>e</sup>	1.18 ± 0.05 <sup>f</sup>	0.84 ± 0.06 <sup>e</sup>	34.8 ± 0.22 <sup>g</sup>	2.85 ± 0.03 <sup>cd</sup>
B4	0.14 ± 0.03 <sup>e</sup>	nd	nd	33.58 ± 0.08 <sup>g</sup>	2.74 ± 0.00 <sup>ef</sup>
C4	0.46 ± 0.02 <sup>e</sup>	1.34 ± 0.14 <sup>f</sup>	nd	36.82 ± 2.75 <sup>f</sup>	2.80 ± 0.12 <sup>de</sup>
D4	0.43 ± 0.04 <sup>e</sup>	1.39 ± 0.04 <sup>f</sup>	nd	42.56 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.03 ± 0.02 <sup>b</sup>

Results are presented as a mean of three replicates ± standard deviation. The mean values presented in one column, marked with different letters (a, b, c, etc.) differ statistically ( $p < 0.05$ ); nd – not detected.

The maltotriose content in beers after main fermentation (4.51–5.31 g/L) results from the order of use carbohydrates by the brewer's yeast. First, *S. cerevisiae* yeast metabolizes monosaccharides (glucose and fructose), then disaccharides (maltose and sucrose), and finally maltotriose [24]. Dextrins are carbohydrates that do not undergo ethanol fermentation using *S. cerevisiae* brewer's yeast, and therefore the significant changes in their content observed in the trials cannot be related to the use of these carbohydrates in the fermentation process. The content of dextrin decreased significantly after fermentation for trials B3 and C3, and after aging compared to beers after the main fermentation for trials A4, B4, C4. The decrease in dextrin content during the process of dry hopping is attributed

to their hydrolysis with the participation of enzymes present in hops added to cold beer or enzymes of microbiological origin. The presence of the following enzymes in hops has been documented: amyloglucosidase,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, and limit dextrinase. It is worth noting that the material tested in that experiment was Cascade hop, which was also used in our experiment (variant B). The activity of hop enzymes is the cause of fermentable sugars appearing in beer after dry hopping and a decrease in the content of dextrin. Their action may increase the attenuation of beer. Thanks to the action of enzymes from hops, an additional dose of sugars appears in the beer, which causes the ethanol fermentation to reinitiate. This phenomenon is called 'hop creep' [25]. The reason for resuming fermentation after dry hopping may also be the fact that a certain dose of sugar is introduced into the beer with hops. About 2% of the dry weight of hop cones are monosaccharides [5].

Glycerol is synthesized by *S. cerevisiae* yeast cells. It is responsible for protecting the cell against osmotic and thermal stress, and also affects the sensory features of beer defined as body and fullness [26]. The glycerol content changed with the successive stages of the technological process. It is the main byproduct of ethanol fermentation, which explains its lack in brewing wort. In finished beers, its content ranged from 2.74–3.03 g/L. Han et al. [27] examined 34 pale beers for glycerol content. The beers they tested had from 925.2 to 1502.74 mg/L. Glycerol biosynthesis by *S. cerevisiae* depends on the temperature of the fermentation process, the strain of brewer's yeast, sugar content in the fermenting wort, amount and type of nitrogen source, pH value, SO<sub>2</sub> and oxygen content in the culture medium [26].

The bitterness of the beers was also analyzed. The beers were characterized by the bitterness level index in the range of 55.45–75.22 IBU. This indicator is related to the content of iso- $\alpha$ -acids in beer. In the experiment, Marynka bitter hops were used—the same for all produced variants of beers. The samples were differentiated in terms of the variety of aromatic hops used, which, to a lesser degree, affect the bitterness of beer. The varieties of hops used differed in the content of  $\alpha$ -acids. They contained from 7.7–13.3% of these bitter compounds. The determined value of bitterness in beer depends on the content of these compounds in the type of hops used.

### 3.2. The Content of Xanthohumol and Isoxanthohumol

Hops are responsible for the beer's characteristic aroma and bitter taste. It is also a source of several bioactive substances. One group of compounds found in hops with a wide range of health-promoting properties are flavonoids. Due to the presence of hydroxyl groups and multiple bonds in the structure of these compounds, they have the ability to protect the body's cells against reactive oxygen species. A group of flavonoids with one or more prenyl groups is called prenylated flavonoids. As much as 95% of the prenylated hop flavonoids are prenylated chalcones. Among them, the dominant is xanthohumol, constituting 80–90% of the prenylflavonoids. In a smaller amount than XN, another prenylated flavonoid, desmethylxanthohumol, is also present in the lupulin glands of hop cones. As a result of thermal isomerization in beer wort, this compound is transformed into a racemic mixture of enantiomers 6-prenylnaringenin and 8-prenylnaringenin, which is the most potent plant phytoestrogen known [5].

The results of the XN and IXN content in obtained beers are presented in Table 3. The samples differed significantly in terms of the content of both prenylflavonoids. The beers were characterized by a high XN content, in the range of 1.77–3.83 mg/L, while IXN was between 0.85–1.19 mg/L. The highest XN content was found in D4 beer, hopped with the Galaxy hop variety, while the lowest in B4 beer, hopped with the same dose of Cascade hop. Compared to the XN content in beers tested by other authors, our results are outstanding. This is due to the specially designed beer production technology. The use of decoction mashing allowed efficient extraction of colored compounds from malt. As the amount of melanoidin in the wort increases, the loss of XN during the boiling of the wort decreases. This indicates the participation of these compounds in inhibiting the thermal isomerization of chalcones to flavanones [13]. Additionally, in our



experiment application of the dry hopping process, in which the thermal factor favoring isomerization of XN is excluded, we were able to obtain a high content of prenyloflavonoids in the final beer. Stevens et al. [28] analyzed 13 beers for the content of xanthohumol, isoxanthohumol, 6-prenylnaringenin, and 8-prenylnaringenin. The research showed that the total content of these four compounds in beer was in the range of 0–4 mg/L. Lager-type beers contained 0.009–0.034 mg/L of XN, while 0.4–0.68 mg/L of its isomerization product was IXN. Stout and porter beers had a higher XN content from pale beers (0.34 mg/L and 0.69 mg/L, respectively). The study of the XN content in 27 Polish beers was undertaken by our department. In these beers, the XN content was determined to be in the range of 0.006–0.22 mg/L, and the highest results were also recorded for dark beers and unfiltered light beers with extract content greater than 12.5% *w/w* [29]. The higher XN content in dark beers is probably related to the presence of melanoidins, which are high molecular weight end products of the Maillard reaction [13].

**Table 3.** The content of xanthohumol (XN) and isoxanthohumol (IXN) in beers.

Sample	mg/L	
	XN	IXN
A4	1.93 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.96 ± 0.00 <sup>c</sup>
B4	1.77 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.85 ± 0.00 <sup>d</sup>
C4	2.55 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.00 <sup>b</sup>
D4	3.83 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.01 <sup>a</sup>

Results are presented as a mean of three replicates ± standard deviation. The mean values presented in one column, marked with different letters (a, b, c, etc.), differ statistically ( $p < 0.05$ ).

Xanthohumol is the dominant substance in the composition of  $\beta$ -resins in hops. Its content in hop cones is 0.3–1.5% of dry matter. It is a prenylated chalcone present in the lupulin glands of hops. Although XN is the main component of the hard resins of hops, only a small amount of it passes into the beer as a result of the traditional production process. It has been estimated that it goes into the finished product with a yield of only 5%. This is due to its hydrophobic nature, which makes it poorly soluble in wort. Large amounts of XN are removed from the wort as the hops separate and lost during fermentation. Part of it is absorbed by yeast cells and separated by clarification processes using PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). As a result, the content of XN in the finished beer is usually lower than 0.1 mg/L [13].

Isoxanthohumol is a compound with better solubility in wort than xanthohumol, but shows lower pro-health activity. However, there are studies showing its activity as a phytoestrogen due to its conversion into 8-prenylnaringenin [30]. It was shown that the content of IXN in commercial beers ranges between 0.04–3.44 mg/L in alcoholic beers and reaches about 0.11 mg/L in nonalcoholic beers. The results of IXN content obtained in our experiment are similar to Stevens et al. [28].

Researchers have repeatedly attempted to enrich beer in XN using an addition of dark malt, modified hopping technologies, using preparations rich in XN dosed at different stages of beer production, skip filtering and stabilizing the beer with PVPP or activated carbon, reuse of yeast biomass for fermentation, and changes in pH of the wort before hopping [11,13]. Wunderlich et al. [13] obtained beer with an XN content of 17.2 mg/L as a result of using an 80 mg/L dose of XN and 10% dark malt. In our experiment, we obtained beer using conventional hopping without the use of XN extracts. It is also worth noting that our results are close to the content of XN showing biological activity (5 mg/L) [31].

### 3.3. The Content of 5-Hydroxymethylfurfural and the Color (EBC) of Wort and Beers

The color of the beers depends mainly on the malts used in the wort production process. During the production of beer, it undergoes little change, mainly at the stage where the wort is subjected to thermal treatment. The color of the wort (Table 4), before boiling with hops, was 106.73 EBC. The process of hopping with bitter hops led to a

significant darkening of wort (to 133.43 EBC). At the same time, the content of 5-HMF, one of the markers of the Maillard reaction, increased. For W0, it was 18.92 mg/L. The content of 5-HMF in brewing wort produced with the participation of 10% of various types of dark malt ranges from 5.54–24.31 mg/L, assuming the highest value for the wort produced with dark chocolate malt [23]. The wort, before hopping W0 obtained in the experiment, has a lower 5-HMF content. After boiling with bitter hops, the 5-HMF level rose to 24.65 mg/L (W1), which was due to the Maillard reaction changing during heating.

**Table 4.** Color (EBC) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) content in worts and beers.

Sample	Color	5-HMF
	EBC	mg/L
<b>Worts</b>		
W0	106.73 ± 0.22 <sup>h</sup>	18.92 ± 0.07 <sup>e</sup>
W1	133.43 ± 3.08 <sup>b</sup>	24.65 ± 0.03 <sup>b</sup>
<b>Hopping</b>		
A1	114.15 ± 0.00 <sup>fg</sup>	20.05 ± 0.46 <sup>d</sup>
B1	139.58 ± 2.32 <sup>a</sup>	23.4 ± 0.29 <sup>c</sup>
C1	142.95 ± 0.45 <sup>a</sup>	26.52 ± 0.01 <sup>a</sup>
D1	141.60 ± 0.90 <sup>a</sup>	26.72 ± 0.12 <sup>a</sup>
<b>Main fermentation</b>		
A2	107.10 ± 2.10 <sup>h</sup>	nd
B2	113.03 ± 0.08 <sup>fg</sup>	nd
C2	126.45 ± 3.30 <sup>cd</sup>	nd
D2	132.08 ± 1.58 <sup>b</sup>	nd
<b>Post-fermentation</b>		
A3	122.93 ± 2.03 <sup>de</sup>	nd
B3	114.68 ± 0.53 <sup>f</sup>	nd
C3	131.03 ± 2.32 <sup>b</sup>	nd
D3	131.40 ± 1.80 <sup>b</sup>	nd
<b>Maturation</b>		
A4	121.32 ± 3.30 <sup>e</sup>	nd
B4	110.40 ± 4.95 <sup>gh</sup>	nd
C3	123.15 ± 2.85 <sup>de</sup>	nd
D4	130.05 ± 0.30 <sup>bc</sup>	nd

Results are presented as a mean of three replicates ± standard deviation. The mean values presented in one column, marked with different letters (a, b, c, etc.) differ statistically ( $p < 0.05$ ); nd – not detected.

After the next technological stage, boiling with aromatic hops, the samples were characterized by a color of between 114.15 to 142.95 EBC and a content of 5-HMF at a level of 20.04 to 26.72 mg/L. The 5-HMF content increases with increasing EBC colour index. The intensity of boiling of the trials during hopping may be the reason for the differences in the results between the variants, differing in the type of hops used in the production process. As a result of the main fermentation, the color intensity of the beers decreased. The decrease ranged from 6.2% (A2) to 19.0% (B2). This may be the result of melanoidin decolorization by the enzyme manganese peroxidase from yeast *S. cerevisiae*. Kahraman et al. [32] showed that *S. cerevisiae* yeast caused a 33% decolorization of molasses wastewater, which were a byproduct from the sugar industry. In turn, Tsiakiri et al. [33] showed that the immobilized *S. cerevisiae* baker's yeast is capable of 80 to 100% reduction of melanoidin from solutions of various initial concentrations after 48 h of incubation. The reduction in the content of colored compounds is due to the activity of laccase and peroxidase stimulated by  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions.

After post-fermentation and maturation, the color of the beers also changed, but on a smaller scale compared to the earlier technological stage. 5-HMF is one of the intermediates in the Maillard reaction. The fermentation process carried out with the participation of *S. cerevisiae* depends on the presence of 5-HMF. The effect of doses of 0.5–15 g/L of 5-HMF was analyzed by Da Silva et al. [34]. The results indicate that the content of 1–10 g/L in the medium prolongs the yeast lag phase period proportionally to the dose, while with the use of 15 g/L the growth of yeast is completely inhibited. 5-HMF is the product of a series of reactions that occur as a result of heating a medium containing pentosis and hexosis. It hinders the fermentation process by inhibiting enzymes from the group of dehydrogenases involved in the metabolism of *S. cerevisiae* [35].

After the ethanol fermentation process, a complete reduction of the 5-HMF content was observed in all tested beer variants. 5-HMF is converted to 5-hydroxymethylfurfuryl alcohol (5-HMF alcohol) during ethanol fermentation. The yeast *S. cerevisiae* has been shown to process 5-HMF into 5-HMF alcohol both under aerobic and anaerobic conditions [36]. Viegas et al. [37], analyzed commercial beers in various styles for the content of 5-HMF. They showed that dark beers contain an average of 6.99 mg/L 5-HMF, amber beers 6.84 mg/L, while light beers contained 4.29 mg/L. The beers in our analysis were tested shortly after the finished production process, while commercial beers tested by Viegas et al. [37] were obtained from supermarkets. The higher content of 5-HMF may be due to its formation during the storage of beers.

#### 3.4. Total Polyphenol Content (TPC) and Antioxidant Activity

The total content of polyphenols (TPC) and the antioxidant activity of wort and beers at subsequent production stages are presented in Table 5. The content of polyphenols in the wort (W0) was 336.13 mg GAE/L. The ability to reduce iron ions (FRAP) and the antioxidant capacity (ABTS<sup>•+</sup>) wort were 1.61 and 0.91 mmol TE/L, respectively. After hopping the wort with bitter hops (W1), the TPC value rose to 388.19 mg GAE/L (an increase of 15.5% over the wort before hopping). The antioxidant potential ABTS<sup>•+</sup> of wort also increased by 39.5%, while FRAP by 20.8%.

TPC in hopped worts increased for samples A1 and D1 by 7.7% and 22.9%, respectively. The sample hopped with the Galaxy (D1) variety was characterized by the highest content of polyphenolic compounds. The lowest content was found in samples B1 and C1, where TPC slightly decreased in relation to W1. After hopping, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP antioxidant potential increased (by 19.5–43.0% for ABTS<sup>•+</sup> and 20.3–43.0% for FRAP results). Hop varieties differ in content of phenolic compounds. Their quantitative and qualitative composition in hops is also determined by the harvest date, place and climatic conditions of cultivation as well as the method of storage [38].

The phenolic compounds undergo changes during the thermal treatment. Such processes may occur during the boiling of the beer wort. For some of the polyphenols, heat treatment is associated with an increase in antioxidant activity. Moreover, the antioxidant ability is a feature more resistant to high temperatures than the content of polyphenols. The presence of other compounds in the environment influences the behavior of polyphenols under high temperature conditions [39].

All variants after the main fermentation had a higher TPC than before the process. There was an increase in the parameter from 30.8% for D2, up to even 86.0% for C2. The sample C2 contained 713.8 mg GAE/L, while D2 623.91 mg GAE/L. The FRAP assay results did not change statistically after fermentation for samples D2 and B2. For the remaining samples, we noted a slight increase in the FRAP capacity. Differently in the case of the radical reduction potential (ABTS<sup>•+</sup>). A statistically significant decrease in antioxidant power was noted for B2 (by 24.5%) and C2 (by 18.45%). The increase in antioxidant capacity after ethanol fermentation may be a result of the overproduction of NADH by yeast in the process of glycolysis. It is presumed that the conversion of sugars to pyruvate or acetaldehyde during ethanolic fermentation is faster than acetaldehyde to ethanol. It results in increased NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) production,

and this in turn leads to an increase in the antioxidant potential of beers after ethanol fermentation [40].

**Table 5.** The total content of polyphenolic compounds (TPC), the ability to reduce iron ions (FRAP), and the antioxidant capacity (ABTS<sup>•+</sup>) of wort and beers at subsequent technological stages.

Sample	TPC	FRAP	ABTS <sup>•+</sup>
	mg GAE/L	mmol TE/L	mmol TE/L
<b>Worts</b>			
W0	336.13 ± 3.92 <sup>k</sup>	1.61 ± 0.05 <sup>l</sup>	0.91 ± 0.01 <sup>g</sup>
W1	388.19 ± 10.67 <sup>j</sup>	1.94 ± 0.03 <sup>k</sup>	1.27 ± 0.09 <sup>ef</sup>
<b>Hopping</b>			
A1	418.00 ± 16.57 <sup>i</sup>	2.56 ± 0.04 <sup>i</sup>	1.53 ± 0.1 <sup>cd</sup>
B1	387.53 ± 10.03 <sup>j</sup>	2.32 ± 0.06 <sup>j</sup>	1.61 ± 0.16 <sup>bc</sup>
C1	383.82 ± 15.93 <sup>j</sup>	2.71 ± 0.07 <sup>gh</sup>	1.75 ± 0.00 <sup>ab</sup>
D1	477.1 ± 20.56 <sup>h</sup>	2.78 ± 0.03 <sup>fg</sup>	1.76 ± 0.06 <sup>ab</sup>
<b>Main fermentation</b>			
A2	676.74 ± 6.51 <sup>ef</sup>	2.9 ± 0.17 <sup>e</sup>	1.51 ± 0.24 <sup>cd</sup>
B2	670.2 ± 14.08 <sup>f</sup>	2.39 ± 0.09 <sup>j</sup>	1.21 ± 0.13 <sup>f</sup>
C2	713.8 ± 9.12 <sup>cd</sup>	2.85 ± 0.01 <sup>ef</sup>	1.43 ± 0.05 <sup>cde</sup>
D2	623.91 ± 9.35 <sup>g</sup>	2.78 ± 0.07 <sup>fg</sup>	1.91 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>Post-fermentation</b>			
A3	693.34 ± 17.01 <sup>de</sup>	2.67 ± 0.03 <sup>gh</sup>	1.38 ± 0.04 <sup>def</sup>
B3	740.1 ± 5.44 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.03 <sup>hi</sup>	1.26 ± 0.06 <sup>ef</sup>
C3	840.75 ± 14.89 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.03 <sup>j</sup>	1.49 ± 0.1 <sup>cd</sup>
D3	732.04 ± 8.29 <sup>bc</sup>	3.08 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.43 ± 0.08 <sup>cde</sup>
<b>Maturation</b>			
A4	433.32 ± 9.54 <sup>i</sup>	3.64 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.18 ± 0.1 <sup>f</sup>
B4	418.32 ± 11.63 <sup>i</sup>	4.88 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.11 <sup>f</sup>
C4	371.51 ± 10.94 <sup>j</sup>	3.73 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.24 ± 0.21 <sup>ef</sup>
D4	475.05 ± 23.30 <sup>h</sup>	3.86 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.43 ± 0.11 <sup>cde</sup>

Results are presented as a mean of three replicates ± standard deviation. The mean values presented in one column, marked with different letters (a, b, c, etc.) differ statistically ( $p < 0.05$ ).

After post-fermentation, an increase in TPC was observed in trials B3, C3, and D3. There were no statistically significant changes in the TPC content in sample A3 in relation to A2. At this stage, the C3 had the highest TPC content (840.75 mg GAE/L), while A3 had the lowest (693.34 mg GAE/L). After post-fermentation, the increase in polyphenol content was not as high as after the main fermentation. There was an increase in TPC from 2.5% (A3) to 17.8% (C3). It is worth noting that after separating the beer from the yeast sediment after the main fermentation, the beers were dry hopped. Dry hopping increases TPC by up to 49% [41], so it could be compensated for the decrease in TPC during post-fermentation. The ABTS<sup>•+</sup> antioxidant activity changed significantly only for D3, the remaining trials after fermentation showed no statistically significant changes in this parameter. This is not the case for FRAP activity. For this method, post-fermentation and dry hopping led to significant changes. There was a decrease in FRAP antioxidant activity for A3 and C3 (8.1% and 17.1%), while for B3 and D3 an increase (9.0% and 10.8%).

After bottling and maturation, the beers showed a statistically significant decrease in the content of TPC, regardless of the variant, from 35.1% (D4) to even 55.8% (C4). The finished beer with the highest TPC was D4 (475.05 mg GAE/L). The obtained results are not consistent with Pascoe et al. [1]. They observed an increase in antioxidant activity as a result of the mashing process, after filtration, hopping, as well as post-fermentation and pasteurization. Moreover, after filtration, storage, and bottling of beer, this increase

was correlated with an increase in the content of the most monitored polyphenolic compounds [1]. Our experiment confirms that the content of polyphenols rises at the stage of main fermentation and post-fermentation but significantly decreases during maturation. McMurrugh et al. [42] described the transformation of beer flavanols during storage. In 4–5 weeks, they noted a large loss of tested compounds. Monomeric and dimmeric flavanols disappeared, while the content of macromolecular compounds (tannins) increased. These processes can explain the reduction in TPC in the tested samples after maturation. It may also be caused by the spontaneous sorption of polyphenols by sediments and the polymerization of catechin and epicatechin [43]. Polyphenolic compounds also contribute to the formation of haze in beer. Polymerized to form macromolecular compounds forming sediments, which may also be the cause of a decrease in TPC [44].

Zhao et al. [45] showed that lager beers had a lower TPC content than beers obtained by us. It ranged from 152.01 mg GAE/L to 339.12 mg GAE/L. In Canadian beers, the content of polyphenols was between 3.72–13.73 mg GAE/100 mL, with the highest value for dark beer seen in stout style [45]. Phenolic compounds are responsible for the antioxidant activity in 55.0–88.1%. The most abundant polyphenolic in beer samples are gallic acid and ferulic acid. In turn, Piazzon et al. [46] tested commercial beers in the following styles: lager, pilsner, wheat, ale, abbey, and bock. The bock-style beer was characterized by the highest TPC determined by the Folin–Ciocalteu method (875 mg GAE/L). This value is almost twice as high as that obtained for the beer with the highest polyphenol content in our experiment. Abbey and wheat beers also had higher TPC values, while lager and pilsner styles are similar to the beers we obtained. Piazzon et al. [46] analyzed the beers in terms of FRAP antioxidant activity. We found that despite the much lower content of polyphenolic compounds, the antioxidant activity of the beers produced in our experiment is similar to bock beer (4.7  $\mu\text{mol TE/mL}$ ). The remaining tested beers styles show clearly lower activity (2.2–3.6  $\mu\text{mol TE/mL}$ ) [46].

According to Pulido et al. [47], the content of polyphenols in dark beer ranges from 37.3–57.2 mg GAE/100 mL. These results were similar to those obtained in our experiment. Compared with lagers, dark beers have a much higher polyphenol content. Pale beers contain about 31.2–37.0 mg GAE/100 mL. It is worth noting that the dark beers we obtained had an antioxidant activity higher than that of white wine (1.54  $\mu\text{mol T/mL}$ ) and rose wine (2.86  $\mu\text{mol T/mL}$ ), as well as orange juice (5.15  $\mu\text{mol T/mL}$ ), while red wine, coffee and tea are significantly stronger as antioxidants.

#### 4. Conclusions

The ethanol fermentation process, with the use of *Saccharomyces cerevisiae* top-fermented yeast, led to an increase in total polyphenol content for each tested sample when compared to responding hopped worts. The content of polyphenols increased after the main fermentation and post-fermentation, while it decreased after the maturation process. The ferric ion reduction ability (FRAP) rose at all process stages up to post-fermentation, where little variation was noted depending on the variant. After maturation, it increased again and achieved the highest value in the whole process. In turn, the ability to scavenge ABTS<sup>•+</sup> free radicals increased during hopping, while it decreased after maturation. The use of different varieties of aromatic hops led to the obtaining of beers diversified in terms of total polyphenol content, antioxidant potential, while to a lesser extent influencing the beer parameters such as: ethanol content, attenuation level or extract, as well as the carbohydrate profile and glycerol content in beers. The ethanol fermentation process led to a complete reduction of the 5-hydroxymethylfurfural content and to significant changes in the color of the beers. The beers were characterized by a distinctly higher xanthohumol content compared to commercial beers, or beers produced using conventional methods without enrichment with preparations rich in this prenylated flavonoid. The analysis of changes in sugar content during the production process allowed to observe the effect of dry hopping on changes in the carbohydrate profile, probably resulting from the activity of enzymes present in the hops.



**Author Contributions:** Conceptualization, J.P. and J.K.-R.; Data curation, J.P.; Formal analysis, J.P. and J.K.-R.; Funding acquisition, J.K.-R.; Investigation, J.P., J.K.-R. and M.A.; Methodology, J.K.-R. and M.A.; Project administration, J.K.-R.; Resources, J.P. and J.K.-R.; Software, J.P.; Supervision, J.K.-R. and M.A.; Validation, J.P., J.K.-R. and M.A.; Visualization, J.P.; Writing—original draft, J.P.; Writing—review & editing, J.P., J.K.-R. and M.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Iniguez, A.B.; Zhu, M.J. Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
2. Pascoe, H.M.; Ames, J.M.; Chandra, S. Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in ale. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2003**, *61*, 203–209. [\[CrossRef\]](#)
3. Martinez-Gomez, A.; Caballero, I.; Blanco, C.A. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure. Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules* **2020**, *10*, 400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Alves, G.; Xavier, P.; Limoeiro, R.; Perrone, D. Contribution of melanoidins from heat-processed foods to the phenolic compound intake and antioxidant capacity of the Brazilian diet. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Almaguer, C.; Schönberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E.K.; Becker, T. Humulus lupulus—a story that begs to be told. *Rev. J. Inst. Brew.* **2014**, 289–314.
6. Koren, D.; Kun, S.; Vecseri, B.H.; Kun-Farkas, G. Study of antioxidant activity during the malting and brewing process. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 3801–3809.
7. Gerhäuser, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 1941–1954. [\[CrossRef\]](#)
8. Aron, P.M.; Shellhammer, T.H. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116*, 369–380. [\[CrossRef\]](#)
9. Yamaguchi, N.; Satoh-Yamaguchi, K.; Ono, M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytochemistry* **2009**, *16*, 369–376. [\[CrossRef\]](#)
10. Di Sotto, A.; Checconi, P.; Celestino, I.; Locatelli, M.; Carissimi, S.; De Angelis, M.; Rossi, V.; Limongi, D.; Toniolo, C.; Martinoli, L.; et al. Antiviral and antioxidant activity of a hydroalcoholic extract from *Humulus lupulus* L. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, 5919237. [\[CrossRef\]](#)
11. Karabín, M.; Jelínek, L.; Kinčl, T.; Hudcová, T.; Kotlíková, B.; Dostálek, P. New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. *J. Inst. Brew.* **2013**, *119*, 98–102. [\[CrossRef\]](#)
12. Stevens, J.F.; Page, J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1317–1330. [\[CrossRef\]](#)
13. Wunderlich, S.; Zürcher, A.; Back, W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 874–881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Magalhães, P.J.; Dostalek, P.; Cruz, J.M.; Guido, L.F.; Barros, A.A. The impact of a xanthohumol-enriched hop product on the behavior of xanthohumol and isoxanthohumol in pale and dark beers: A pilot scale approach. *J. Inst. Brew.* **2008**, *114*, 246–256. [\[CrossRef\]](#)
15. Habschied, K.; Lončarić, A.; Mastanjević, K. Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. *Foods* **2020**, *9*, 238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. European Brewery Convention. *Analytica-EBC*; Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 2010.
17. Adamenko, K.; Kawa-Rygielska, J.; Kucharska, A.Z. Characteristics of Cornelian cherry sour non-alcoholic beers brewed with the special yeast *Saccharomyces ludwigii*. *Food Chem.* **2020**, *312*, 125968. [\[CrossRef\]](#)
18. Jurkova, M.; Cejka, P.; Houska, M.; Potravinarsky, V.U.; Mikyska, A. Simultaneous determination of prenylflavonoids and isoflavonoids in hops and beer by HPLC-DAD method: Study of green hops homogenate application in the brewing process. *Kvasny Prumysl* **2013**, *59*, 41–49. [\[CrossRef\]](#)
19. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [\[CrossRef\]](#)
20. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

21. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
22. Coghe, S.; D'Hollander, H.; Verachtert, H.; Delvaux, F.R. Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. *J. Inst. Brew.* **2005**, *111*, 51–60. [[CrossRef](#)]
23. Gašior, J.; Kawa-Rygielska, J.; Kucharska, A.Z. Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules* **2020**, *25*, 3882. [[CrossRef](#)]
24. Walker, G.M.; Stewart, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages* **2016**, *2*, 30. [[CrossRef](#)]
25. Kirkpatrick, K.R.; Shellhammer, T.H. Evidence of dextrin hydrolyzing enzymes in Cascade hops (*Humulus lupulus*). *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 9121–9126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhao, H. Effects of processing stages on the profile of phenolic compounds in beer. In *Processing and Impact on Active Components in Food*; Preedy, V.R., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 533–539.
27. Han, X.; Liu, F.; Kun-Farkas, G.; Kiss, Z. Simple HPLC method for determining the glycerol content of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2015**, *73*, 314–317.
28. Stevens, J.F.; Taylor, A.W.; Deinzer, M.L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 97–107. [[CrossRef](#)]
29. Tobała, D.; Stompor, M.; Blazewicz, J.; Anioł, M. Xanthohumol content in Polish beers. *Przemysł Chem.* **2014**, *93*, 1447–1450.
30. Zohnierczyk, A.K.; Mączka, W.K.; Grabarczyk, M.; Wińska, K.; Woźniak, E.; Anioł, M. Isoxanthohumol—Biologically active hop flavonoid. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 71–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Gołąbczak, J.; Gendaszewska-Darmach, E. Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu—aspekty biologiczne i technologiczne. *Biotechnologia* **2010**, *1*, 75–89.
32. Kahraman, S.İ.B.E.L.; Yeşilada, O. Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white-rot fungi in a semi-solid-state condition. *Folia Microbiol.* **2003**, *48*, 525–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tsiakiri, E.P.; Sompatzi, E.; Voukia, M.P.; Sotiropoulos, S.; Pantazaki, A.A. Biocatalytic and bioelectrolytic decolorization of simulated melanoidin wastewaters by *Saccharomyces cerevisiae* cells suspended and conjugated on silica and alumina. *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 104078. [[CrossRef](#)]
34. Da Silva, T.L.; Baptista, C.; Reis, A.; Passarinho, P.C. Using flow cytometry to evaluate the stress physiological response of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269 to the presence of 5-Hydroxymethylfurfural during ethanol fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, *181*, 1096–1107.
35. Modig, T.; Lidén, G.; Taherzadeh, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **2002**, *363*, 769–776. [[CrossRef](#)]
36. Lee, C.H.; Chen, K.T.; Lin, J.A.; Chen, Y.T.; Chen, Y.A.; Wu, J.T.; Hsieh, C.W. Recent advances in processing technology to reduce 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *93*, 271–280. [[CrossRef](#)]
37. Viegas, O.; Prucha, M.; Gökmen, V.; Ferreira, I.M. Parameters affecting 5-hydroxymethylfurfural exposure from beer. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, *35*, 1464–1471. [[CrossRef](#)]
38. Jelinek, L.; Šneberger, M.; Karabin, M.; Dostalek, P. Comparison of Czech hop cultivars based on their content of secondary metabolites. *Czech J. Food Sci.* **2010**, *28*, 309–316. [[CrossRef](#)]
39. Murakami, M.; Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Atoba, T.M. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, FCT7–FCT10. [[CrossRef](#)]
40. Saha, R.B. Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide content of brewer's yeast during different stages of fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1988**, *46*, 72–76. [[CrossRef](#)]
41. Oladokun, O.; James, S.; Cowley, T.; Smart, K.; Hort, J.; Cook, D. Dry-hopping: The effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. *Brew. Sci.* **2017**, *70*, 187–196.
42. McMurrough, I.; Madigan, D.; Kelly, R.J.; Smyth, M.R. The role of flavanoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1996**, *54*, 141–148. [[CrossRef](#)]
43. Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Pérez-Jiménez, J. What Contribution Is Beer to the Intake of Antioxidants in the Diet? In *Beer in Health and Disease Prevention*; Preedy, V.R., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2008; pp. 441–448.
44. Zhao, H.; Chen, W.; Lu, J.; Zhao, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1150–1158. [[CrossRef](#)]
45. Rahman, M.J.; Liang, J.; Eskin, N.M.; Eck, P.; Thiyam-Holländer, U. Identification of hydroxycinnamic acid derivatives of selected Canadian and foreign commercial beer extracts and determination of their antioxidant properties. *LWT* **2020**, *122*, 109021. [[CrossRef](#)]
46. Piazzon, A.; Forte, M.; Nardini, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10677–10683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pulido, R.; Hernandez-Garcia, M.; Saura-Calixto, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 1275–1282. [[CrossRef](#)]

Article

# Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process

Justyna Paszkot \*  and Joanna Kawa-Rygielska

Department of Fermentation and Cereals Technology, The Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-630 Wrocław, Poland; joanna.kawa-rygielska@upwr.edu.pl

\* Correspondence: justyna.paszkot@upwr.edu.pl

**Abstract:** Dark malts used in the production of brewing wort affect the ethanol fermentation process, the phenolic content, antioxidant capacity and the physiology of yeast cells. An innovative element of this research is the combination of investigating the effect of beer wort color modulated by the use of dark specialty malts on the course and effects of fermentation and the characteristics of post-fermentation yeast biomass of brewer's strains with different characteristics. Dark and pale beer were obtained. The beers had different ethanol contents (4.51–5.79% *v/v*), resulting from real (62.29–80.36%) and apparent (75.37–98.26%) attenuation levels. Metabolic and morphological differences were demonstrated in the brewer's yeast strains used. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* was distinguished by its ability to ferment dextrin, resulting in the highest ethanol content in beers. The total phenolic content in beer depends on the color of the wort and the yeast strain used (244.48–547.56 mg of gallic acid/L). Dark beers show higher ferric ion reduction ability (FRAP) and antioxidant capacity (ABTS<sup>•+</sup>) than pale beers fermented with the same yeast strains. Through biomass analysis, differences in yeast cell physiology depending on yeast strain and beer wort color were also revealed.

**Keywords:** fermentation; brewing; yeast; dark beers; dark malts



**Citation:** Paszkot, J.; Kawa-Rygielska, J. Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process. *Molecules* **2022**, *27*, 3971. <https://doi.org/10.3390/molecules27133971>

Academic Editor: Encarna Gómez-Plaza

Received: 10 May 2022

Accepted: 17 June 2022

Published: 21 June 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Beer is an alcoholic beverage made mainly from water, malt, and hops. The variety of raw materials gives a wide range of possibilities for creating beer recipes. Color is one of the main determinants of beer quality. It depends on the malts used and their degree of drying and roasting, as well as on thermal treatment during wort processing [1]. The Maillard initiated by reaction between reducing sugars and amino acids in the wort during its exposure to elevated temperature is responsible for shaping the intensity of color, as well as other sensory descriptors of beer [2,3]. Pale malts, such as pilsner, pale ale, and wheat, are the base material in the production of beer. Special malts are used in smaller doses to add color and enrich the sensory qualities of beer. The term specialty malts includes malts that, as a result of more intense and longer thermal processing, are characterized by intense caramel, chocolate, or roasted flavor and aroma. The use of specialty malts in the production of brewing wort has a direct effect on the composition of the wort, but also on the metabolism of yeast [1].

Among the strains used in the brewing, we can distinguish two main groups: bottom fermenting yeast (*Saccharomyces pastorianus*) and top fermenting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Yeasts differ in their metabolic capacities and therefore produce beers with different sensory and physicochemical characteristics. *Saccharomyces cerevisiae* kveik type yeast used in the production of traditional Norwegian beers and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* used in the production of Belgian saison-style beers are distinct from classic brewer's yeast strains [4,5]. *S. cerevisiae* kveik yeast shows a high ability to flocculate and rapidly attenuate wort sugars under high temperature conditions (>28 °C). A characteristic feature of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* is glucoamylase activity that allows the utilisation



of dextrins, which are one of the main carbohydrates in wort. Dextrins are not fermented by the classical strains used in brewing [5,6]. Both kveik yeast and strains used in saison beer production are capable of very efficient utilisation of wort sugars but are incapable of carrying out hydroxycinnamic acid transformations, which are the cause of unfavourable beer aroma characteristics, the so-called phenolic off flavour. These features make yeast interesting for use in the production of beers characterized by a high level of dryness and low calorific value [5].

The purpose of this study was to analyze the influence of the selection of biological material and the use of special dark malts on the effects of the ethanol fermentation process carried out by different yeast strains. Analysis of carbohydrate profiles, content of fermentation products (ethanol and glycerol), pH value, extract and degree of attenuation of worts and beers was performed to characterize the physico-chemical properties of the obtained samples. Wort and beer were subjected to analysis of the content of total phenolic compounds and antioxidant activity. The morphological characteristics of yeast cells in postfermentation biomass was examined using a Scepter Cell Counter cell analyzer. The study provides new information on the characteristics of dark and pale beers produced with different yeast strains, as well as differences in the course and effects of the fermentation process depending on the yeast strain and the color of the beer.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Physicochemical Parameters, Carbohydrates and Glycerol Content

Our research strategy involved the production of a series of dark and pale beers using different strains of brewer's yeast in the fermentation process. Top-fermenting and bottom-fermenting yeasts were used, among which *Saccharomyces cerevisiae* kveik type and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* were distinguished for their metabolic capabilities.

Carbohydrates and glycerol content in worts and beers are presented in Table 1 and Figure 1. Maltose, maltotriose, glucose, and dextrins are the main carbohydrates of beer wort. They are mainly obtained by the amylolytic decomposition of starch during malt mashing. The content of individual sugars in the wort depends on the composition and amount of sugars in the malt, the occurrence of non-enzymatic browning reactions and enzyme activity during mashing [1,7]. The proportion of sugars in the wort is influenced by the composition of the mash. The addition of dark chocolate malt at a dose of 10% did not result in significant changes in maltose, maltotriose, and glucose content compared to pale wort [6]. In our investigation, there were no significant differences in maltotriose content between HPW (hopped pale wort) and HDW (hopped dark wort). HPW contained more maltose and glucose than HDW. These sugars are classified as reducing sugars and are involved in Maillard reactions, which may be the reason for their lower content in dark worts [7]. Although DW (dark wort) had a higher extract than PW (pale wort), a lower content of all individual sugars tested was identified in this wort. The sum of the fermentable sugars accounted for 62.93% of the HPW and 56.85% of the HDW extract content. The remaining components of the wort extract are mainly compounds other than fermentable sugars. This is the direct reason for the differences in attenuation rates between pale and dark beers. This is consistent with the observations of other authors [1,6].

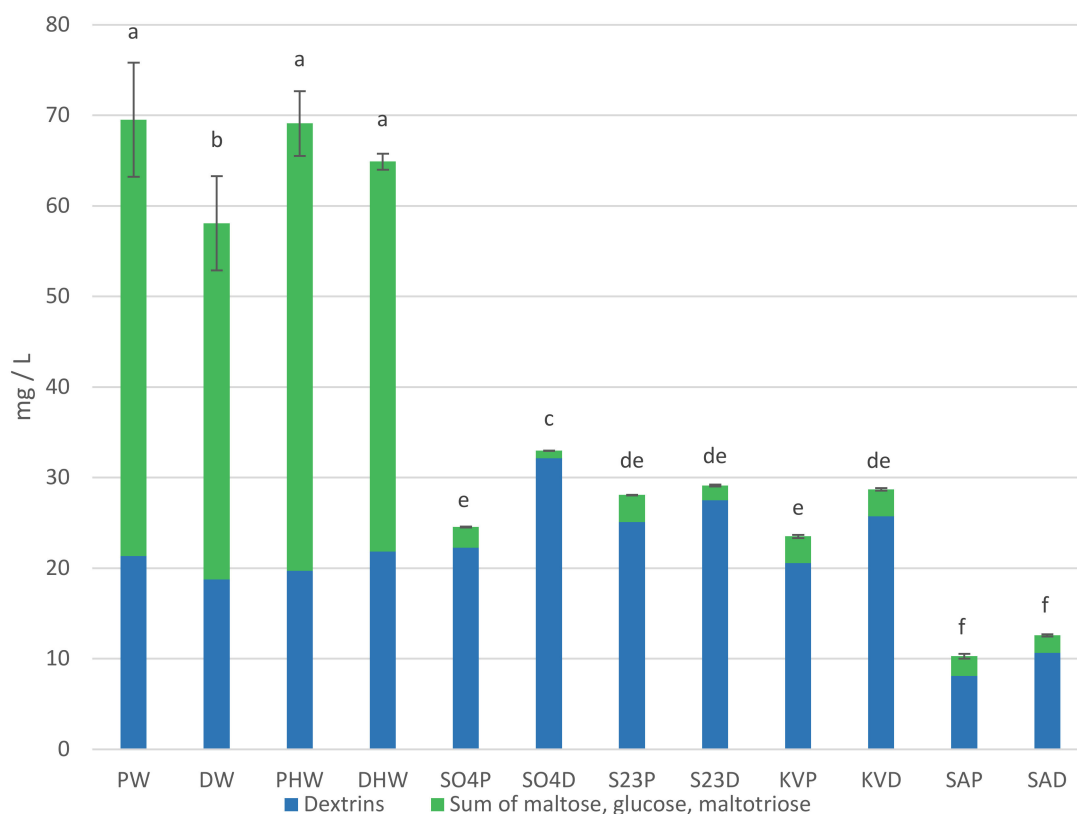
The beer variants were not statistically different in terms of maltose, maltotriose, and glucose content. Glucose as a simple sugar is utilized by yeast first. Next, among the sugars tested, the yeast utilizes maltose followed by maltotriose [8]. Dextrins are not fermented by the classical strains of top and bottom fermenting brewing yeasts (S04, S23) and kveik yeast (KV). An exception is the yeast *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (SA), which due to the activity of the enzyme glucoamylase has the ability to metabolize dextrins by fermentation [5]. This potential was confirmed in our study. SAP (pale beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*) and SAD (dark beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*) beers contained 8.08 mg/L and 10.66 mg/L of dextrins, respectively, while the corresponding HPW and HDW hopped worts contained 19.69 mg/L and 21.84 mg/L. The glucose content in the beers analyzed was 0.15–0.60 g/L. The glucose content of the beers may have resulted from

its use for refermentation. The residual amount of sugars in the beers was probably related to the attenuation ability of the yeast strains used.

**Table 1.** Carbohydrate profile and glycerol content of worts and beers.

Compound	Unit	PW	DW	HPW	HDW	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
Maltose		32.24 ± 2.53 a <sup>1</sup>	26.47 ± 1.36 c	33.10 ± 1.45 a	30.17 ± 0.40 b	0.36 ± 0.01 d	nd <sup>2</sup>	0.86 ± 0.00 d	0.66 ± 0.00 d	1.00 ± 0.01 d	0.99 ± 0.02 d	0.97 ± 0.06 d	0.86 ± 0.05 d
Maltotriose		9.61 ± 0.87 a	8.70 ± 2.48 a	9.78 ± 0.66 a	8.17 ± 0.10 a	1.71 ± 0.00 b	0.85 ± 0.00 b	1.84 ± 0.00 b	0.97 ± 0.00 b	1.37 ± 0.01 b	1.51 ± 0.04 b	1.00 ± 0.06 b	0.91 ± 0.04 b
Glucose	g/L	6.34 ± 0.53 a	4.16 ± 0.21 b	6.54 ± 0.97 a	4.73 ± 0.05 b	0.23 ± 0.00 c	nd	0.32 ± 0.00 c	nd	0.60 ± 0.01 c	0.48 ± 0.10 c	0.23 ± 0.01 c	0.15 ± 0.00 c
Dextrins		21.34 ± 2.37 de	18.77 ± 1.15 f	19.69 ± 0.51 ef	21.84 ± 0.33 d	22.25 ± 0.05 d	32.13 ± 0.01 a	25.07 ± 0.04 c	27.50 ± 0.10 b	20.55 ± 0.16 def	25.73 ± 0.19 c	8.08 ± 0.15 h	10.66 ± 0.04 g
Glycerol		nd	nd	nd	nd	1.54 ± 0.00 cd	1.92 ± 0.00 ab	2.05 ± 0.00 a	1.35 ± 0.01 d	1.37 ± 0.01 d	1.51 ± 0.15 cd	1.82 ± 0.19 abc	1.68 ± 0.33 bcd

<sup>1</sup> Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters (a, b, c, etc.) indicate significant differences between values ( $n = 2$ ,  $p < 0.05$ ), <sup>2</sup> nd, not detected. Abbreviations: PW—pale wort, DW—dark wort, HPW—hopped pale wort, HDW—hopped dark wort, S04P—pale beer fermented with *S. cerevisiae*, S04D—dark beer fermented with *S. cerevisiae*, S23P—pale beer fermented with *S. pastorianus*, S23D—dark beer fermented with *S. pastorianus*, KVP—pale beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain, KVD—dark beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain, SAP—pale beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, SAD—dark beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*.



**Figure 1.** Sum of carbohydrates (glucose, maltose, maltotriose) and dextrins in worts and beers. Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between values ( $n = 2$ ,  $p < 0.05$ ).

Glycerol is the main metabolic byproduct of *S. cerevisiae* yeast cells. Its content in beers depends on the course of fermentation and the physiological state of the yeast used in the process. Increased glycerol production is a response to osmotic stress. Therefore, it can be an indicator of the physiological state of yeast during fermentation. Its content in beer can positively influence the viscosity and smoothness sensation of beer during drinking [8]. In

our beers, the glycerol content was 1.37–2.05 g/L. The yeast strain that produced beer with the highest glycerol content regardless of beer color was *S. cerevisiae* var. *diastaticus*.

Table 2 shows the results of the analysis of physicochemical parameters of beer. The ethanol content of the beers ranged from 4.51 to 5.79% *v/v*. Beers with the highest ethanol content were obtained using the yeast strain *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. The influence of beer color on the degree of fermentation was observed. Pale beers were characterized by a higher real degree of fermentation (RDF) as well as apparent degree of fermentation (ADF) regardless of the strain of brewer's yeast used in the fermentation process. As a result of the high level of attenuation, lower real and apparent extract values were also observed for pale beers. The SAP had the highest attenuation level and the S23D (S23D—dark beer fermented with *S. pastorianus*) the lowest. The beer with the lowest attenuation level was also characterized by the highest real and apparent extract value and the highest caloric value. Beers and S04P (pale beer fermented with *S. cerevisiae*) and KVP (pale beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain) had the lowest caloric value. Dark beers due to lower attenuation and higher wort extract and real extract had higher caloric value. The pH values of the beers ranged from 3.99 to 4.44. The lowest pH values were characteristic for SAD, KVP, and KVD (dark beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain), and the highest were for S23P (pale beer fermented with *S. pastorianus*) and S23D. The dark beer fermented with the KV strain was characterized by a significantly lower pH than the corresponding pale beer. By using different yeast strains, we obtain products with different pH values, which affects the properties of the finished product.

**Table 2.** Physicochemical parameters of beers.

Parameter	Unit	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
Ethanol	% <i>v/v</i>	4.51 ± 0.02 h <sup>1</sup>	4.71 ± 0.01 e	4.73 ± 0.01 d	4.66 ± 0.00 f	4.80 ± 0.01 c	4.58 ± 0.01 g	5.60 ± 0.01 b	5.79 ± 0.00 a
Density	g/cm <sup>3</sup>	1.006 ± 0.00 d	1.009 ± 0.00 a	1.006 ± 0.00 e	1.009 ± 0.00 b	1.004 ± 0.00 f	1.008 ± 0.00 c	0.999 ± 0.00 h	1.002 ± 0.00 g
Real extract	% <i>w/w</i>	3.75 ± 0.00 d	4.38 ± 0.00 b	3.70 ± 0.00 e	4.56 ± 0.00 a	3.34 ± 0.01 f	4.20 ± 0.00 c	2.23 ± 0.00 h	2.58 ± 0.00 g
Apparent extract	% <i>w/w</i>	2.11 ± 0.01 d	2.68 ± 0.01 b	1.98 ± 0.01 e	2.87 ± 0.01 a	1.58 ± 0.01 e	2.54 ± 0.01 c	0.19 ± 0.01 g	0.47 ± 0.01 f
RDF	% <i>w/w</i>	66.06 ± 0.11 e	63.44 ± 0.02 g	67.45 ± 0.06 d	62.29 ± 0.01 h	70.03 ± 0.01 c	63.78 ± 0.06 f	80.36 ± 0.04 a	78.56 ± 0.01 b
ADF	% <i>w/w</i>	80.25 ± 0.13 e	76.81 ± 0.03 g	81.94 ± 0.08 d	75.37 ± 0.01 h	85.23 ± 0.01 c	77.31 ± 0.08 f	98.26 ± 0.04 a	95.89 ± 0.02 b
Calories	kcal/100 mL	38.07 ± 0.12 g	41.47 ± 0.02 b	39.46 ± 0.35 e	41.83 ± 0.01 a	38.24 ± 0.05 g	40.10 ± 0.07 d	38.71 ± 0.06 f	41.01 ± 0.04 c
pH	-	4.21 ± 0.04 b	4.12 ± 0.00 b	4.44 ± 0.01 a	4.42 ± 0.00 a	4.13 ± 0.01 b	4.00 ± 0.01 c	4.04 ± 0.01 c	3.99 ± 0.01 c

<sup>1</sup> Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters (a, b, c, etc.) indicate significant differences between values (n = 2, *p* < 0.05). Abbreviations: RDF—real degree of fermentation, ADF—apparent degree of fermentation.

The degree of attenuation of beers is not only the result of the yeast's potential to utilize the sugars of the wort but is also related to the ability to flocculate. Flocculation is the phenomenon of yeast forming aggregates of cells, resulting in them sedimenting to the bottom of the fermentation vessel. A strong ability to flocculate early in fermentation can result in beers with lower levels of attenuation [9]. The yeast strains we used differ in these capacity, which affects the fermentation process and the characteristics of the resulting beers. *S. cerevisiae* var. *disataticus* has a low flocculation potential, leading to SAP and SAD beers being characterized by the highest RDF and ADF, as well as the highest ethanol content. The other yeast strains, S04, S23, and KV, are characterized by flocculation capacity, which was reflected in the results of RDF, ADF, and the apparent extract content of beers.

## 2.2. Phenolic Compound Content and Antioxidant Activity of Worts and Beers

Table 3 shows the results of the analysis of worts and beers for total phenolic content (TPC) and antioxidant properties (FRAP—ferric reducing antioxidant power, ABTS<sup>•+</sup>—2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt, DPPH<sup>•</sup>—2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Both dark worts and dark beers have higher TPC, FRAP, and ABTS<sup>•+</sup> than analogous pale worts and beers made with the same yeast strain. The ability to reduce DPPH<sup>•</sup> radicals is also higher for dark than for pale worts. The antioxidant potential DPPH<sup>•</sup> for beers was not statistically significantly different depending on the color for the

variants S23P and S23D and SAP and SAD. The remaining samples showed a higher value of DPPH• capacity in pale beers than in dark beers.

**Table 3.** Total phenols content (TPC) and antioxidant activity (FRAP, ABTS<sup>+</sup>•, DPPH•) of worts and beers.

Parameter	Unit	PW	DW	HPW	HDW	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
TPC	mg	242.54 ±	316.99	278.65	402.55	286.99	346.16	260.32	365.88	233.09	333.66	244.48	547.56
	GAE/L	2.55 h <sup>1</sup>	± 3.87 e	± 2.10 f	± 7.50 b	± 5.85 f	± 1.04 d	± 3.16 g	± 5.87 c	± 7.12 i	± 3.07 d	± 3.37 h	± 2.07 a
FRAP		0.68 ±	1.28 ±	1.13 ±	1.70 ±	0.97 ±	1.64 ±	1.03 ±	1.65 ±	0.99 ±	1.62 ±	1.01 ±	1.64 ±
		0.02 g	0.02 c	0.04 d	0.02 a	0.05 f	0.04 ab	0.01 e	0.01 ab	0.02 ef	0.01 b	0.01 ef	0.01 ab
ABTS <sup>+</sup> •	mmol	1.19 ±	1.73 ±	1.31 ±	2.22 ±	1.25 ±	1.86 ±	1.38 ±	1.93 ±	1.21 ±	1.74 ±	1.25 ±	1.76 ±
	TE/L	0.02 h	0.01 d	0.02 f	0.01 a	0.02 g	0.03 c	0.01 e	0.04 b	0.01 g	0.02 d	0.04 g	0.01 d
DPPH•		0.31 ±	0.58 ±	0.20 ±	0.87 ±	0.18 ±	0.04 ±	0.27 ±	0.30 ±	0.23 ±	0.01 ±	0.50 ±	0.47 ±
		0.01 d	0.02 b	0.04 gh	0.01 a	0.02 h	0.02 i	0.01 ef	0.02 de	0.02 fg	0.01 i	0.01 c	0.01 c

<sup>1</sup> Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters (a, b, c, etc.) indicate significant differences between values (n = 2, p < 0.05).

Dark beers fermented with the same yeast strain had a higher TPC compared to analogous pale beers by 20.62% to 123.96%. Similarly, for FRAP and ABTS<sup>+</sup>•—for each beer analyzed made with the same yeast strain, dark beers showed higher antioxidant activity than pale beers. The FRAP of dark beers was higher than that of pale beers by 60.19–69.07%, ABTS<sup>+</sup>• from 39.86 to 48.80%. In turn, DPPH• radical scavenging activity did not show significant differences between the dark and pale beer variants S23P and S23D and SAP and SAD, while dark beers made with the top fermentation yeast S04P and the kveik yeast KVD had lower DPPH• value than the corresponding pale beers.

Brewing malt and hops are sources of antioxidant compounds in beer: phenols and melanoidins. The amount and type of phenols present in beer affect the sensory properties, shelf life, and colloidal stability of beer during storage. Polyphenolic compounds in a beer occur in a free or bound form [10]. Melanoidins are macromolecular compounds formed in the final phase of the Maillard reaction which are responsible for the resulting color of brewing malt during thermal processes, as well as color changes during the boiling of brewing wort [6]. They affect the antioxidant properties of beers, which explains the higher antioxidant activity of dark beers compared to pale beers.

DW and HDW show higher TPC and FRAP and ABTS<sup>+</sup>• than pale worts. As the color of the brewing wort darkens, TPC and the antioxidant activity increase [6]. The conditions of the technological process of beer production contribute to a number of changes in the composition of phenolic compounds, which are related to the temperature of the processes, active enzymes of malt, hops, or bioprocesses that occur with microorganisms during fermentation [10–12]. As evaluated in our previous studies [11], TPC in beers increases during the hopping and fermentation stages, while it decreases after maturation. According to Fumi et al. [13], fermentation leads to a 16% decrease in TPC due to the adsorption of phenolic compounds on the surface of negatively charged yeast cell walls. This is also supported by reports on the identification of phenolic compounds in waste brewing yeast biomass [14].

Yeast strains used in fermentation differentiate beers in polyphenol content and antioxidant activity [4]. The reason for these variations may be a different cell wall structure. The amount of phenolic compounds adsorbed by yeast increases with the mannan content in the cell wall structure, which depends on the yeast strain. [10]. Mannoproteins, which are one of the main building blocks of the yeast cell wall, located mainly in the outer layer of the cells, play a major role in the determination of the cell charge. During the logarithmic growth phase of yeast cells, a higher mannan content is observed in the cell wall composition compared to the stationary and death phases. As a result of the reduced physiological activity of cells, the mannanoproteins content decreases, so an increase in the content of TPC and individual phenolic compounds in beer is observed towards the end of fermentation [15]. These are released from the mannan-polymer structures. Differences in TPC between beers made with different yeast strains may be due to the physiological

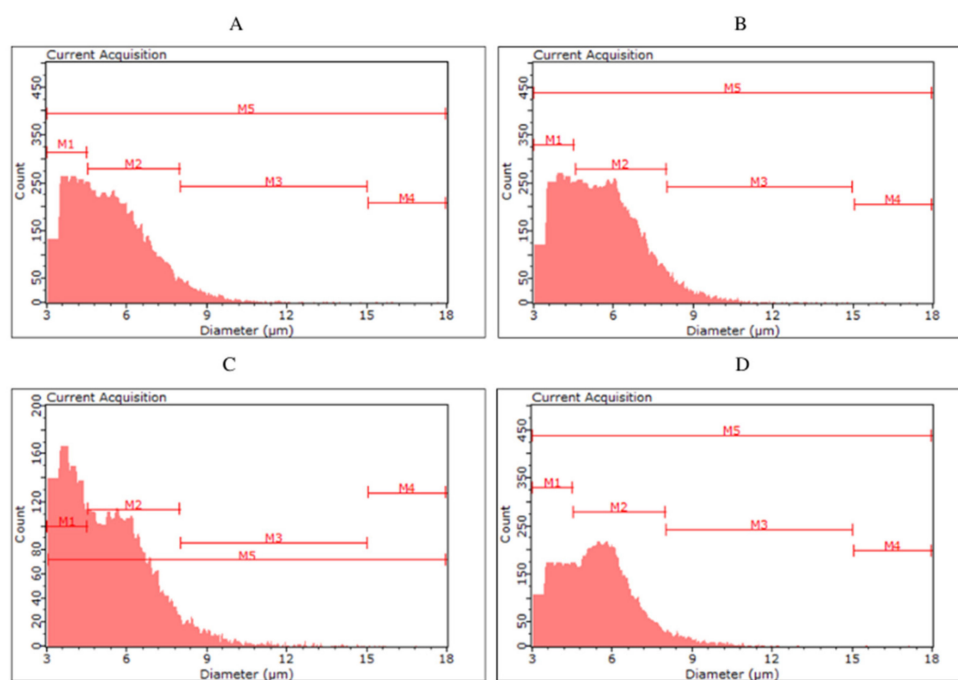
state of the cells. The poorer physiological state of biomass after fermentation of dark beers may be due to the content of Maillard reaction compounds that are toxic to yeast. Cells exposed to unfavorable conditions may release some of the adsorbed phenols, resulting in higher phenolic content in dark beers.

### 2.3. Evaluation of the Morphological Characteristics of Yeast Cells

The yeast cells of the tested strains differed in size and volume (Table 4, Figures 2 and 3). The largest diameter was characteristic for the top fermentation yeast *S. cerevisiae* and the bottom fermentation yeast *S. pastorianus*. No differences in cell volume were observed between lower and upper fermentation yeasts. The *S. cerevisiae* type kveik yeast was characterised by a cell diameter ranging from 4.54  $\mu\text{m}$  for KVD to 5.43  $\mu\text{m}$  for KVC and showed the highest variation in diameter and cell volume depending on the color of fermented beer. The smallest cells among the yeasts were characterised by *S. cerevisiae* var. *diastolicus* strain.

**Table 4.** Characteristics of the brewing yeast cell biomass using Scepter Cell Counter.

Parameter	Unit	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
Mean cell diameter	$\mu\text{m}$	5.88	6	5.86	5.89	5.43	4.54	4.15	4.13
Mean cell volume	pL	0.11	0.11	0.11	0.11	0.08	0.05	0.04	0.04
Cell size class	M1	37.26	32.43	42.59	32.04	43.80	70.74	84.90	80.96
	M2	56.98	61.19	51.11	62.50	52.96	28.76	14.51	18.54
	M3	5.57	6.25	6.13	5.30	3.16	0.50	0.59	0.51
	M4	0.19	0.13	0.18	0.16	0.08	0.00	0.00	0.00

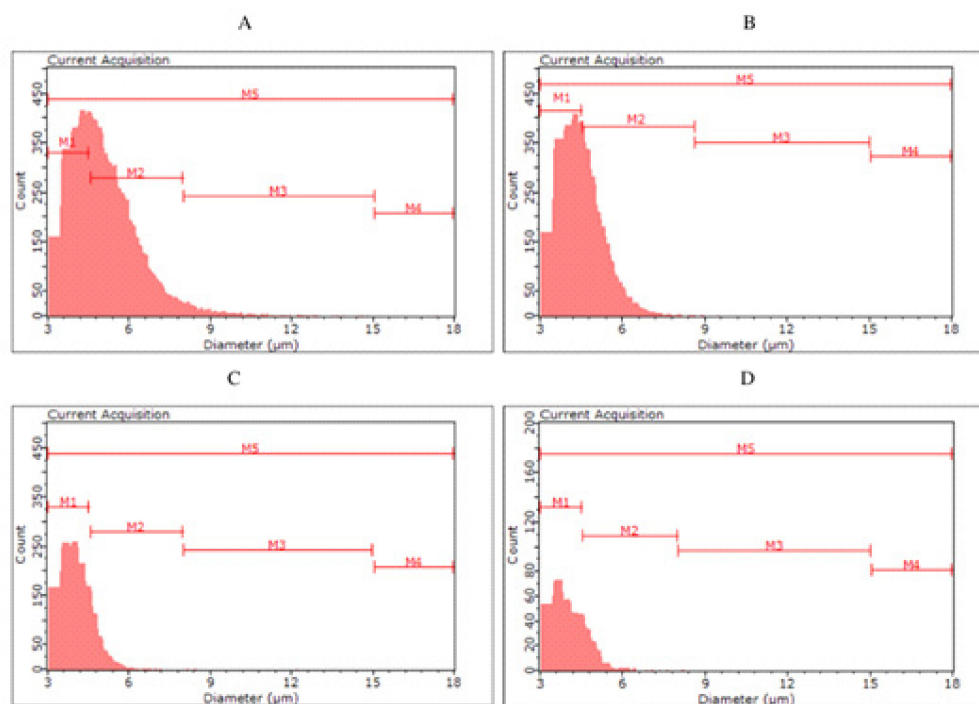


**Figure 2.** Histograms of yeast cell size in the yeast biomass after the main fermentation by the top fermentation yeast *Saccharomyces cerevisiae* ((A)—S04P, (B)—S04D) and by the bottom fermentation yeast *Saccharomyces pastorianus* ((C)—S23P, (D)—S23D).

For the biomass collected after fermentation of S04P and S04D (S04D—dark beer fermented with *S. cerevisiae*), no clear differences were observed between the classes. The highest number of cells (56.98–61.19%) were classified in the M2 group, with less in M1 (32.43–37.26%), M3 (5.57–6.25%) and M4 (0.13–0.19%). Among yeast cells in S23P and S23D, we can observe a more pronounced difference in size distribution. In S23P, the number of cells in the M2 was 51.11%, while in S23D it was up to 62.50%. On the other hand, S23P biomass was characterized by a higher proportion of smaller cells—in the M1 class (42.59%)



compared to S23D biomass (32.04%). The color of fermented beer had the greatest effect on cell size in the case of KVP and KVD variants, as well as SAP and SAD. The kveik yeast collected after dark beer (KVD) fermentation had a higher proportion of smaller cell size (M1—70.74%) than biomass from KVP beer (M1—43.80%). More cells in the M2 class were observed in the KVP biomass (KVP—52.96%, KVD—28.76%). Most of the *S. cerevisiae* var. *diastaticus* cells were characterized by a size in the range of 4.5–8.0  $\mu\text{m}$  (M1)—84.90% of SAP biomass and 80.96% of SAD biomass cells were classified in the M1 class.



**Figure 3.** Histograms of yeast cell size in yeast biomass after main fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* kveik ((A)—KVP, ((B)—KVD) and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* ((C)—SAP, (D)—SAD).

Monitoring the physiological state and morphological characteristics of yeast cells is of importance to the brewing industry. Part of the assessment of the physiological status of yeast cells is measuring their size. The stress conditions for yeast during the fermentation process can promote changes in yeast cell size. Kawa-Rygielska et al. [16] determined that the size and volume distribution of *S. cerevisiae* distillery yeast cells, as well as the concentration of cells in the media after fermentation, depend on the ethanol concentration. As the initial concentration of ethanol in the medium increased, the distribution of cell numbers in size classes changed. They also observed an increase in the number of small cells (M1) and the largest cells (M4) associated with an increase in the ethanol content in the medium. Foszczyńska et al. [17] showed that yeast differed in morphological characteristics depending on the strain used, and ethanol and glucose content in the medium. An increase in ethanol content in the medium favored yeast cells of smaller sizes. Our study confirms that a higher ethanol content causes the appearance of yeast cells with a smaller size. The highest proportion of small cells (M1) was observed in SAP and SAD, which were characterized by the highest ethanol content among all variants analyzed. In the KVD, significantly more cells were recorded in the M1 class than in the KVP. This may be a result of the influence of Maillard reaction compounds on microbial growth and development, caused, among other things, by the chelation of magnesium ions, which are an important factor in yeast metabolic processes [7].

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Biological Material

In the ethanol fermentation process of the worts, the following 4 strains of brewer's yeast were used: *Saccharomyces cerevisiae* "Safale S-04" (Fermentis, Lasaffre, France), *Saccharomyces pastorianus* Saflager S-23 (Fermentis, Lasaffre, France), *Saccharomyces cerevisiae* "Voss" (Lallemand, Canada), *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* "Belle Saison" (Lallemand, Canada).

*Saccharomyces cerevisiae* 'Safale S-04' is a yeast strain with high flocculation ability used for English-style beers. The recommended fermentation temperature is 18–26 °C [18].

*Saccharomyces pastorianus* 'Saflager S-23' is a yeast used in the production of German style beers. This strain is characterized by a high capacity for flocculation and attenuation. The recommended fermentation temperature is 12–18 °C [19].

*Saccharomyces cerevisiae* 'Voss' is one of the kveik yeast strains used in the production of traditional Norwegian beers, a strain selected by Lallemand from a heterogeneous culture of yeast and bacteria that has been cultivated using traditional methods since 1980. *Saccharomyces cerevisiae* 'Voss' kveik yeast shows a very high flocculation capacity with a medium to high attenuation level. The recommended fermentation temperature is 18–26 °C [20].

*Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* "Belle Saison" is a yeast strain used in the production of Belgian-style beers. It has a low flocculation ability, which allows for beers with a high attenuation level. The recommended fermentation temperature is 35–40 °C [21].

#### 3.2. Abbreviations

The following abbreviations were used to mark the samples: PW—pale wort, DW—dark wort, HPW—hopped pale wort, HDW—hopped dark wort, S04P—pale beer fermented with *S. cerevisiae*, S04D—dark beer fermented with *S. cerevisiae*, S23P—pale beer fermented with *S. pastorianus*, S23D—dark beer fermented with *S. pastorianus*, KVP—pale beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain, KVD—dark beer fermented with *S. cerevisiae* kveik strain, SAP—pale beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, SAD—dark beer fermented with *S. cerevisiae* var. *diastaticus*.

#### 3.3. Brewing Technology

The technological process for the production of dark and pale beers was carried out considering the following technological stages: infusion mashing, mash filtration, batch sparge with water (72 °C), hopping (60 min, 100 °C), cooling (20 °C), filtration, division into 2 L samples, inoculation and fermentation. The malt mash was composed of pale beer from 100% (3.3 kg) pilsner barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland) and for dark beer from 90% (3.1 kg) pilsner barley malt and 10% (0.34 kg) chocolate dark barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland).

For mashing, 3.5 L of water per kilogram of malt was used. Mashing was carried out as follows: 52 °C for 10 min, 63 °C for 40 min, 72 °C for 30 min and 78 °C for 10 min [11]. The temperature rise was achieved at a rate of 1 °C/min. Marynka bitter hops in a dose of 17 g for 60 min of boiling (Marxam, Krakow, Poland) and 17 g aroma hops Lubelski for 10 min (Marxam, Krakow, Poland) were used for wort hopping. After cooling, pale hopped wort (HWP, 8.39 ± 0.36 EBC, extract 10.78 ± 0.13 °Bx) and dark hopped wort (HWD, 85.71 ± 1.67 EBC, extract 11.45 ± 0.18 °Bx) were obtained.

The dried yeast biomass was rehydrated prior to wort inoculation. Worts with a volume of 2 L were inoculated with one of 4 selected strains of brewing yeast (1 g of dried biomass per 1 L of wort). Fermentation was carried out in a laboratory incubator for 7 days at the following temperatures: 18 °C for S04P and S04D, 12 °C for S23P and S23D, 35 °C for KVP and KVD and 18 °C for SAD and SAP. The beers were then decanted from above the sediment and placed in sterile fermentation tanks. Post-fermentation was carried out for 7 days. The beers were bottled in 0.5 L bottles with glucose (2 g/L) to allow refermentation. The ageing of the beer was carried out at 4 °C for 28 days.

### 3.4. Basic Physico-Chemical Parameters

Analysis of ethanol content, real attenuation degree (RDF, % *w/w*) and apparent attenuation degree (ADF, % *w/w*), wort extract content (% *w/w*) and apparent beer extract (% *w/w*), color (EBC), density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) and calorificity ( $\text{kcal}/100 \text{ mL}$ ) were performed using an oscillating densitometer with a beer analyzer DMA 4500 M (Anton Paar, Graz, Austria) [4]. The beers were shaken for 20 min before analysis using a 358 A laboratory shaker (Elpin Plus, Lubawa, Poland). Diatomaceous earth was added at a dose of 1 g/100 mL to the degassed beers and shaking was continued for 10 min. The samples were filtered using paper strainers. The results presented are the mean of two replications of the analysis. The pH of the beers was determined in triplicate using a Mettler Toledo MP 240 pH meter (Columbus, OH, USA). The analyzer determined by the analyzer based on density ( $\rho$ ), reak extract (Er) and alcohol content (A) according to the formula: Calorificity [ $\text{kcal}/100 \text{ mL}$ ] =  $7 \cdot A [w/w] + 3.5 \text{ Er } [w/w] \cdot \rho [\text{g}/\text{cm}^3]$ .

### 3.5. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Carbohydrates and Glycerol Content

Maltose, maltotriose, glucose, ethanol, and glycerol were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Prominence apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) [4]. Worts and beers were degassed by shaking using a 358 A laboratory shaker (Elpin Plus, Lubawa, Poland) and centrifuged (10 min, 5000 rpm, MPW-351R centrifuge). A three-fold dilution of worts and a two-fold dilution of beers were used. The diluted samples were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filters. Separation was carried out using a Rezex ROA-Organic Acid H+ column ( $300 \times 7.8 \text{ mm}^2$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), a temperature of 60 °C, a flow rate of 0.6 mL/min and an injection volume 0.02 mL. The mobile phase was a solution of 0.005 mol/dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The isocratic elution and the refractometric detection method were used. The analysis was performed in duplicate. The five-point calibration curve integrated in Chromax 10.0 software (Pol-Lab, Wilkowice, Poland) was used to determine the analyte concentration. The results were presented as g/L of wort or beer.

### 3.6. Total Polyphenols Content

The Folin-Ciocalteu (F-C) spectrophotometric method was used to determine total polyphenols (TPC) in worts and beers [22]. In plastic cuvettes, 0.1 mL of sample and 0.2 mL of F-C reagent were mixed. After 3 min, 1 mL of 20% aqueous sodium carbonate solution and 2 mL of distilled water were added. The samples were incubated for 1 h. The absorbance was analyzed spectrophotometrically using a UV-2401 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) at 765 nm. Distilled water was used as a blank. Results are presented as the average value of three replicates. A calibration curve in the range of 0.30–9.00 mg GAE/L was used to read the results. The results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) per liter of beer or wort.

### 3.7. Ability of Iron Ion Reduction (FRAP)

The analysis of ferric ion reducing ability was performed [23]. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) reagent was a mixture of 20 mL of aqueous ferric (III) chloride solution (0.1018 g FeCl<sub>3</sub>) with a solution of 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (0.0664 g TPTZ) in 40 mM hydrochloric acid (20 mL HCl) with acetate buffer (pH 3.6). Samples diluted in distilled water (1 mL) and 3 mL of FRAP reagent were placed in cuvettes. The absorbance was read at 593 nm using a UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Distilled water was used as a blank. The results were determined from a calibration curve in the range of 1.25–12.50  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$ . Results were presented as the average of three replicates in millimoles of Trolox (TE) per liter of wort or beer.

### 3.8. Ability of Radical Cation ABTS<sup>•+</sup> Reduction

Antioxidant activity was determined using the ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical reduction method [24]. Wort or beer (0.03 mL)



were mixed in cuvettes with a solution of ABTS<sup>•+</sup> with a measured absorbance value (0.700). The incubation was carried out for 6 min. The absorbance was measured using a UV-2401 PC spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) at 734 nm. Determinations were made in triplicate. The results were determined from a calibration curve drawn in the range of 1.70–21.70 µmol TE/L and presented in mmol Trolox (TE) per liter of wort or beer.

### 3.9. Ability of Radical Cation DPPH<sup>•</sup> Reduction

Antioxidant capacity analysis was performed using the DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method [25]. In cuvettes, 0.1 mL of wort or beer was mixed with 2 mL of a 0.04 mmol/L DPPH<sup>•</sup> solution in methanol and 0.4 mL of H<sub>2</sub>O. The samples were incubated for 10 min. Absorbance was measured with a spectrophotometer at 517 nm. During the DPPH<sup>•</sup> radical reduction reaction, the color of the solution changed from purple to yellow. A calibration curve was prepared using Trolox solution (2–10 µmol TE/L). The results were presented in millimoles of Trolox (TE) per liter of wort or beer. All measurements were made in triplicate.

### 3.10. Evaluation of the Morphological Characteristics of Yeast Cells

Analysis of the morphological characteristics and number of yeast cells after the fermentation process was performed using a Scepter Cell Counter cell analyzer equipped with 40 µm sensors (Merck, Darmstadt, Germany). The biomass of the brewery yeast was collected after the main fermentation process, then centrifuged 3 times (each time separating the supernatant and resuspending the cells in saline). A buffered saline solution was then prepared. To 100 mL of 0.9% NaCl was added 1 tablet of tris buffered saline (TBS) (Merck, Darmstadt, Germany). The diluted biomass (100 µL) was collected in a 1.5 mL Eppendorf tube, then 1 mL of TBS was added and centrifuged using a laboratory micro centrifuge for 10 min. Centrifugation was repeated 3 times; each time, the supernatant was separated and cells were resuspended in 1 mL of TBS. The sample was analyzed. The results were presented as cell size divided into classes according to the method described by Kawa-Rygieska et al. [16]. Cells were classified according to the following criteria: Class I (M1) cells with a diameter of 3.0–4.5 µm, Class II (M2) cells with a diameter of 4.6–8.0 µm, Class III (M3) cells with a diameter of 8.1–15.0 µm, Class IV (M4) cells with a diameter of 15.1–18.0 µm.

### 3.11. Statistical Analysis

A one-way analysis of variability (ANOVA) was performed for the data obtained. The significance of the differences between the mean values was tested using Duncan's test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed using the Statistica 13.5 program (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

## 4. Conclusions

The application of dark specialty malts in production technology plays a key role in shaping the characteristics of beer quality. The addition of dark malts in the production of brewing wort influenced the reduction in the total amount of carbohydrates, while the selection of microorganisms in the fermentation process influenced the composition of sugars in beer. The main carbohydrate identified in the worts and beers was dextrans, regardless of the yeast strain used for fermentation. The yeast *S. cerevisiae* var. *diastacicus* was distinguished from other yeast strains by its ability to attenuate dextrans, resulting in beers with exceptionally high ethanol content. However, the color of the beers affected the level of attenuation, which resulted in the content differences in ethanol and apparent extract, as well as caloric content between variants. Dark beers were characterized by a lower level of attenuation regardless of the yeast strain used compared to pale beers. As we know from the characteristics of the brewing yeast strains used, they had different flocculation abilities, which affected the level of attenuation and the final quality of the beers. The dark beers studied had a higher total phenolic compound content and antioxidant

potential than the pale beers. Furthermore, the beers differed in antioxidant potential depending on the yeast strain used. The dark color of the beers associated with the addition of special malts affected the distribution of cell size in the post-fermentation biomass of bottom-fermenting yeast and kveik yeast. The use of dark wort increased the number of large cells in the biomass of *S. cerevisiae* kveik yeast and decreased their number in the biomass of bottom-fermenting *S. pastorianus* yeast. Investigating the effect of the physiological state during fermentation on antioxidant activity and phenolic compound content when exposed to Maillard reaction compounds and ethanol stress conditions during fermentation is an interesting area for further research.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P. and J.K.-R.; methodology, J.K.-R.; software, J.P.; validation, J.P. and J.K.-R.; formal analysis, J.P. and J.K.-R.; investigation, J.P. and J.K.-R.; resources, J.P. and J.K.-R.; data curation, J.P. writing—original draft preparation, J.P.; writing—review and editing, J.P.; visualization, J.P.; supervision, J.K.-R.; project administration, J.K.-R.; funding acquisition, J.K.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Poland) as the Ph.D. research program “Innowacyjny Doktorat”, no. N070/0011/21. The APC/BPC is co-financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Not available.

## References

1. Coghe, S.; D'Hollander, H.; Verachtert, H.; Delvaux, F.R. Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. *J. Inst. Brew.* **2008**, *111*, 51–60. [\[CrossRef\]](#)
2. Shopska, V.; Denkova-Kostova, R.; Dzhevoderova-Zarcheva, M.; Teneva, D.; Denev, P.; Kostov, G. Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Malt Types. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Yahya, H.; Linforth, R.S.; Cook, D.J. Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. *Food Chem.* **2014**, *145*, 378–387. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kawa-Rygielska, J.; Adamenko, K.; Pietrzak, W.; Paszkot, J.; Głowacki, A.; Gasiński, A.; Leszczyński, P. The Potential of Traditional Norwegian KVEIK Yeast for Brewing Novel Beer on the Example of Foreign Extra Stout. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Krogerus, K.; Gibson, B. A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 3745–3756. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Gašior, J.; Kawa-Rygielska, J.; Kucharska, A.Z. Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules* **2020**, *25*, 3882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Dack, R.E.; Black, G.W.; Koutsidis, G. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. *Food Chem.* **2017**, *232*, 595–601. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Walker, G.M.; Stewart, G.G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages* **2016**, *2*, 30. [\[CrossRef\]](#)
9. Stewart, G.G. Yeast flocculation—Sedimentation and flotation. *Fermentation* **2018**, *4*, 28. [\[CrossRef\]](#)
10. Carvalho, D.O.; Guido, L.F. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chem.* **2022**, *372*, 131093. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Paszkot, J.; Kawa-Rygielska, J.; Anioł, M. Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants* **2021**, *10*, 763. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Castro, R.; Díaz, A.B.; Durán-Guerrero, E.; Lasanta, C. Influence of different fermentation conditions on the analytical and sensory properties of craft beers: Hopping, fermentation temperature and yeast strain. *J. Food Compos. Anal.* **2022**, *106*, 104278. [\[CrossRef\]](#)
13. Vieira, E.F.; Carvalho, J.; Pinto, E.; Cunha, S.; Almeida, A.A.; Ferreira, I.M. Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *J. Food Compos. Anal.* **2016**, *52*, 44–51. [\[CrossRef\]](#)
14. Harbah, R.A.; Meledina, T.V.; Morozov, A.A. The effect of yeast growth stages on the absorption of polyphenols. *Agron. Res.* **2020**, *18*, 1673–1679.
15. Fumi, M.D.; Galli, R.; Lambri, M.; Donadini, G.; De Faveri, D.M. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 568–573. [\[CrossRef\]](#)

16. Kawa-Rygielska, J. *Oddziaływanie Jonów Cr (III) na Dynamikę i Efekty Fermentacji Zacierów Kukurydzianych VHG*; Monografie; Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu: Wrocław, Poland, 2012.
17. Foszczyńska, B.; Dziuba, E.; Chmielewska, J. Ocena możliwości pomiaru średnicy komórek drożdży piwowarskich przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **2013**, *12*, 15–28.
18. Yeast Data Sheet. Available online: <https://fermentis.com/en/product/safale-s-04/> (accessed on 10 May 2022).
19. Yeast Data Sheet. Available online: <https://fermentis.com/en/product/saflager-s-23/> (accessed on 10 May 2022).
20. Yeast Data Sheet. Available online: [https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2019/12/TDS\\_LPS\\_BREWINGYEAST\\_VOSS\\_ENG\\_8.5x11.pdf](https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2019/12/TDS_LPS_BREWINGYEAST_VOSS_ENG_8.5x11.pdf) (accessed on 10 May 2022).
21. Yeast Data Sheet. Available online: [https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2017/03/TDS\\_LALBREW\\_PREM\\_BELLESAISON\\_ENGLISH\\_DIGITAL.pdf](https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2017/03/TDS_LALBREW_PREM_BELLESAISON_ENGLISH_DIGITAL.pdf) (accessed on 10 May 2022).
22. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
25. Yen, G.C.; Chen, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 27–32. [[CrossRef](#)]



OPEN

## Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast

Justyna Paszkot<sup>✉</sup>, Alan Gasiński & Joanna Kawa-Rygielska

To evaluate the differences in the volatile compound profile of dark and pale beers fermented by different strains of brewer's yeast, gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography mass spectrometry analysis of eight beers was carried out. The prevalent group of compounds in all the beers analysed were alcohols (56.41–72.17%), followed by esters (14.58–20.82%), aldehydes (8.35–20.52%), terpenes and terpenoids (1.22–6.57%) and ketones (0.42–1.00%). The dominant higher alcohols were 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbutanol, phenethyl alcohol, among aldehydes furfural, decanal, nonanal, and among esters ethyl acetate, phenylethyl acetate and isoamyl acetate. Beers fermented by the top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* had the highest volatile content. The addition of dark malt in wort production process had no effect on the total content of volatiles, but for some beers it caused changes in the total content of esters, terpenes and terpenoids. Variations in the total volatile content between beers fermented by different yeast strains are mainly due to esters and alcohols identified. Sensory analysis of beers allowed us to identify the characteristics affected by the addition of dark speciality malts in the production of wort and yeast strains used in the fermentation process.

Taste and aroma are important factors that shape consumers' perceptions of beer<sup>1–3</sup>. The main brewing raw materials are water, malt, and hop. Malt is a source of cereal, malt, caramel or roasted flavor compounds. Hops, in turn, add fresh citrus, fruit, or herbal notes to beer. An equally important factor that affects beer quality is the strain of brewer's yeast used in the technological process<sup>4,5</sup>. During the fermentation, in addition to ethanol and carbon dioxide, yeast produces a number of by-products that make the aroma profile of beer more complex compared to wort<sup>6</sup>. Therefore, it can be considered as a natural method of flavor and aroma enhancement—bio-flavoring, which involves the use of microorganisms to improve sensory quality<sup>7</sup>.

Brewing raw materials and the conditions of the technological process influence the chemical composition of beer, which shapes its taste, aroma, and colour<sup>3,6,8,9</sup>. Sensory characteristics depends on raw materials and the fermentation process<sup>1–3</sup>. During the thermal processing of malt, mash and wort, Maillard reactions, caramelisation, and pyrolysis occur<sup>8</sup>. Non-enzymatic browning reactions involve a number of transformations between reducing sugars and amino acids. Both groups of compounds are key in the metabolic processes of yeast, so a reduction in their availability is a reason for changes in the fermentation course. Compounds generated during heat treatment also have a direct effect on the metabolism of microorganisms by inhibiting the activity of enzymes involved in the alcoholic fermentation pathway. Fermentation of dark worts rich in Maillard reaction and caramelization products results in beers with a different volatiles profile from pale beers<sup>2,8</sup>. Specialty malts used in the production of dark beer styles introduce compounds with inhibitory effects on yeast metabolism (furfural, 5-hydroxymethylfurfural, and melanoidins) into beer<sup>5,10,11</sup>. Furfural and 5-hydroxymethylfurfural have been shown to inhibit glycolytic enzyme activity and induce cellular DNA damage<sup>12,13</sup>. Furthermore, they also inhibit the activity of pyruvate dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase, which are necessary for the synthesis of higher alcohols from amino acids (Ehrlich pathway)<sup>5</sup>. The final products of the Maillard reaction are macromolecular melanoidins. They exhibit chelating properties of magnesium ions, which play a key role

Department of Fermentation and Cereals Technology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 51-630 Wrocław, Poland. ✉email: justyna.pasz kot@upwr.edu.pl

in yeast metabolism due to their participation as cofactors of enzymatic reactions. Moreover, they counteract the effects of cellular stress, and participate in gene expression, growth and proliferation of yeast cells<sup>5,10,13</sup>. Such effects on metabolic processes may be the reason for changes in the content of volatile fermentation by-products. Although Maillard reaction compounds were shown to affect the synthesis of key flavor compounds by yeast, there is limited information in the literature on the effect of using dark speciality malts on fermentation by different strains of brewing yeast, including unconventional—*Saccharomyces cerevisiae* kveik type and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*.

The purpose of this study was to analyze the effect of dark speciality malts and brewer's yeast strain on the volatile compound profile and sensory characteristics of beers. The novelty of the research was the comparison of the volatile compound profile and sensory evaluation results of beers fermented by classic top-fermenting and bottom-fermenting brewing yeast strains, as well as unconventional yeast strains in the ethanol fermentation of pale and dark wort made with the addition of dark speciality malt. The results of this research have enabled the expansion of current knowledge in the design of sensory properties of fermented beverages through the selection of biological material, which can contribute to increasing the sensory attractiveness of food products. Additionally, our research has identified the potential for the use of *Saccharomyces cerevisiae* kveik type yeast and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in the production of dark beers, which has not been previously studied. The experimental material consisted of dark and pale beers fermented by bottom-fermenting yeasts *Saccharomyces pastorianus* and top-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, including unconventional kveik type brewing yeast and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* yeast. The volatile compound profile was analysed by gas chromatography with flame ionising detection (GC-FID) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Sensory attributes of the beers were evaluated using a proprietary questionnaire by panelists trained in sensory analysis.

## Results and discussion

In our research, we subjected pale and dark beers made with different strains of top-fermenting (ale) and bottom-fermenting (lager) brewing yeast to comprehensive chromatographic analysis. Table 1 shows the total content of higher alcohols, esters, aldehydes, terpenes and terpenoids, ketones, and other compounds in beers. The GC-FID (Table 2) and GC-MS (Tables 3 and 4) methods were used to evaluate the content of 58 volatile compounds: 16 higher alcohols, 15 esters, 9 aldehydes, 4 ketones, 1 fatty acid, 1 epoxide, 1 alkane, and 1 diene. The proportion of chemical groups in the profile of volatile compounds of beers was shown in Table 1. The dominant group of compounds in all the beers analysed were alcohols (56.41–72.17%), followed by esters (14.58–20.82%), aldehydes (8.35–20.52%), terpenes and terpenoids (1.22–6.57%) and ketones (0.42–1.00%).

Beers fermented by *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (SAP and SAD) had the highest total volatiles content (TV). The top fermented beers S04P and S04D also were characterised by high TV values, while the the bottom fermented beers S23P and S23D showed the lowest TV. The addition of dark malts in wort production

Volatile compounds		Higher alcohols	Esters	Aldehydes	Terpenes and terpenoids	Ketones	Other compounds	Total volatiles
S04P	mg/L	76.27 ± 6.21 <sup>1</sup> b	17.05 ± 0.37 d	8.83 ± 0.05 b	2.65 ± 0.18 bc	0.44 ± 0.07 a	0.45 ± 0.08 b	105.69 ± 6.60 bc
	% TV	72.17	16.13	8.35	2.51	0.42	0.43	-
S04D	mg/L	76.61 ± 12.67 b	19.81 ± 0.98 c	13.30 ± 2.37 ab	2.01 ± 0.11 de	0.84 ± 0.43 a	1.32 ± 0.58 ab	114.00 ± 10.07 b
	% TV	67.20	17.38	11.66	1.86	0.74	1.16	-
S23P	mg/L	45.83 ± 2.35 cd	10.57 ± 0.04 e	10.22 ± 2.29 b	4.77 ± 0.51 a	0.53 ± 0.02 a	0.59 ± 0.07 b	72.51 ± 0.07 d
	% TV	63.21	14.58	14.10	6.57	0.73	0.81	-
S23D	mg/L	39.07 ± 2.89 d	11.31 ± 0.24 e	14.21 ± 4.26 ab	2.40 ± 0.49 cd	0.69 ± 0.01 a	1.46 ± 0.26 ab	69.25 ± 1.88 d
	% TV	56.41	16.33	20.52	3.64	1.00	2.11	-
KVP	mg/L	58.89 ± 4.30 c	18.57 ± 0.05 c	11.62 ± 1.14 ab	2.96 ± 0.22 b	0.84 ± 0.03 a	0.88 ± 0.08 ab	93.81 ± five.45 c
	% TV	62.77	19.80	12.39	3.20	0.90	0.94	-
KVD	mg/L	58.26 ± 4.12 c	18.82 ± 0.50 c	13.82 ± 1.59 ab	2.38 ± 0.22 cd	0.62 ± 0.30 a	1.78 ± 1.54 ab	95.75 ± 8.27 c
	% TV	60.84	19.66	14.43	2.56	0.65	1.86	-
SAP	mg/L	95.81 ± 1.12 a	22.48 ± 0.60 b	11.44 ± 1.34 ab	2.13 ± 0.07 cde	0.91 ± 0.00 a	1.53 ± 0.34 ab	134.33 ± 0.01 a
	% TV	71.33	16.74	8.52	1.60	0.68	1.14	-
SAD	mg/L	91.87 ± 4.65 a	29.79 ± 0.93 a	16.02 ± 1.90 a	1.69 ± 0.14 e	0.87 ± 0.16 a	2.79 ± 1.70 a	143.08 ± 4.00 a
	% TV	64.21	20.82	11.19	1.22	0.61	1.95	-

**Table 1.** Total contents and percentage share of groups of volatile compounds in beers. <sup>1</sup>Values are expressed as mean (n = 2) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f) within the same column are statistically different (P < 0.05). S04P—pale beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* S04 yeast strain, S04D—dark beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* S04 yeast strain, S23P -pale beer fermented by *Saccharomyces pastorianus* S23 yeast strain, S23D—dark beer fermented by *Saccharomyces pastorianus* S23 yeast strain, KVP—pale beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* kveik type yeast strain, KVD—dark beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* kveik type yeast strain, SAP—pale beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* yeast strain, SAD—dark beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* yeast strain.



Compound	Chemical group	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
		mg / L							
1-propanol	Alcohols	11.12 ± 1.51 ab <sup>1</sup>	9.45 ± 1.31 bc	7.51 ± 0.02 de	5.75 ± 0.48 e	8.46 ± 0.04 cd	8.55 ± 0.72 cd	12.21 ± 0.29 a	10.73 ± 0.01 ab
2-metylo-propan-1-ol	Alcohols	21.84 ± 2.71 a	21.58 ± 1.86 a	9.36 ± 0.15 c	6.37 ± 0.43 d	11.56 ± 0.14 c	11.07 ± 0.74 c	14.65 ± 0.35 b	11.84 ± 0.14 c
2-methylbutanol	Alcohols	6.61 ± 0.75 c	6.63 ± 0.42 c	6.51 ± 0.08 c	4.99 ± 0.27 d	5.53 ± 0.01 d	5.39 ± 0.34 d	9.68 ± 0.30 a	8.81 ± 0.19 b
3-methylbutanol	Alcohols	17.49 ± 2.02 bc	16.55 ± 1.54 cd	14.55 ± 0.02 d	11.46 ± 0.92 e	18.39 ± 0.08 bc	19.54 ± 1.16 b	39.74 ± 0.64 a	37.52 ± 0.43 a
Phenylethyl alcohol	Alcohols	16.73 ± 0.89 a	18.80 ± 7.39 a	4.93 ± 1.93 b	5.62 ± 1.47 b	12.05 ± 3.92 ab	11.01 ± 0.71 ab	16.50 ± 0.28 a	20.15 ± 5.57 a
Acetaldehyde diethyl acetal	Aldehydes	0.95 ± 0.10 d <sup>1</sup>	0.64 ± 0.01 e	1.11 ± 0.01 c	0.60 ± 0.03 e	1.03 ± 0.05 cd	2.12 ± 0.05 b	1.04 ± 0.02 cd	2.23 ± 0.02 a
Furfural	Aldehydes	3.01 ± 0.34 d	2.60 ± 0.25 d	2.88 ± 0.53 d	3.79 ± 0.31 cd	6.32 ± 0.73 ab	6.88 ± 0.61 a	5.13 ± 0.01 bc	7.77 ± 1.40 a
Ethyl acetate	Esters	9.98 ± 0.19 d	10.2 ± 0.24 d	6.39 ± 0.01 e	6.01 ± 0.70e	13.83 ± 0.08 c	13.78 ± 0.29 c	16.54 ± 0.58 b	20.07 ± 0.93 a
Isoamyl acetate	Esters	0.64 ± 0.03 d	0.70 ± 0.01 c	0.54 ± 0.00 e	0.54 ± 0.02 e	0.57 ± 0.00 e	0.61 ± 0.00 de	0.88 ± 0.03 b	1.05 ± 0.04 a
Ethyl hexanoate	Esters	0.06 ± 0.01 d	0.08 ± 0.01 d	0.16 ± 0.00 c	0.10 ± 0.03 d	0.10 ± 0.00 d	0.11 ± 0.00 cd	0.30 ± 0.04 b	0.52 ± 0.04 a
Ethyl octanoate	Esters	0.62 ± 0.03 d	0.75 ± 0.02 cd	0.73 ± 0.01 cd	0.84 ± 0.11 bc	0.66 ± 0.00 d	0.75 ± 0.00 cd	0.98 ± 0.15 b	1.44 ± 0.01 a
Ethyl decanoate	Esters	nd <sup>2</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.60 ± 0.25 a

**Table 2.** Concentration of volatile compounds identified in beers by GC-FID. <sup>1</sup>Values are expressed as mean (n = 2) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f) within the same row are statistically different (P < 0.05). <sup>2</sup> nd -not detected.

did not have a statistically significant (P < 0.05) effect on total volatile content, but was the cause of differences in esters content in beers fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (S04), *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus* (SA) and terpenes and terpenoids in beers fermented by S04 and *Saccharomyces pastorianus* (S23) yeast. Dark beers had higher esters content in samples fermented by S04 and SA yeast. The ketones content did not differ between variants. On the contrary, the content of terpenes and terpenoids was significantly higher in pale beers than in dark beers fermented by the S04, S23 and *Saccharomyces cerevisiae* kveik type (KV) strain. The microorganisms used in fermentation strongly differentiate the compositions of volatile compounds in beers. On average, the ale beers S04P and S04D contained 1.5 times higher total volatiles, 1.8 times more aldehydes, and 1.7 times more esters compared to the lager beers S23P and S23D. A difference was also observed when comparing SAP and SAD with the classic bottom fermented beers S23P and S23D. Beers made with *S. cerevisiae var. diastaticus* contained more than 2 times higher TV, with 2.2 times more esters and 2 times more higher alcohols than lager beers.

A key factor in shaping the aromatic profile of beers is the yeast strain used in the alcoholic fermentation process<sup>5</sup>. Volatile compounds that shape the aroma of beer are formed as by-products during the metabolic transformation of the wort components, by which yeast cells are supplied with the compounds necessary for growth and development (amino acids, proteins, nucleic acids, lipids, and others)<sup>11</sup>. The top fermenting yeasts produce a higher total amount of volatile compounds than the bottom fermenting yeasts. Furthermore, ale yeasts can form more esters and higher alcohols than lager yeast, which was also confirmed in our study<sup>9</sup>. Castro et al.<sup>4</sup> observed that the volatile content in beers increases with increasing fermentation temperature. Each beer fermented by the top fermenting yeast strain, with higher optimal fermentation temperature (S04, KV, and SA), had a higher total amount of identified volatile compounds. Lasanta et al.<sup>14</sup> confirmed that conducting fermentation at higher temperatures leads to beers with higher concentrations of volatile compounds, including higher alcohols that can be converted to esters.

The content of coloured Maillard reaction compounds affects the sensory properties of beers both directly through the sensory activity of the chemicals generated and by affecting the yeast metabolism products profile. Dack et al.<sup>5</sup> showed that during the fermentation of dark worts, yeast produces more higher alcohols and fewer esters than during the fermentation of pale worts. They attributed lower ester synthesis to a reduction in enzyme activity or the expression of genes related to ester synthesis<sup>5</sup>. In our research, a significant difference (P < 0.05) in total ester content between pale and dark beer made with the same yeast strain was shown for S04, as well as SA. It can be assumed that the effect of malt colour compounds on the biosynthesis of volatiles depended on the yeast strain used in the fermentation.

Tables 2, 3, 4 shows the results of analyses of beers by gas chromatography methods (GC-FID and GC-MS). During the fermentation, higher alcohols and esters are formed concurrently as by-products<sup>15</sup>. Of the identified compounds, the dominant products, regardless of yeast strain and the wort, among the higher alcohols were 3-methylbutanol (11.46–37.52 mg/L), 2-methylpropan-1-ol (6.37–21.84 mg/L) and phenethyl alcohol (4.93–20.15 mg/L). These are the main higher alcohols in the aroma profile of beers fermented by *Saccharomyces* yeast<sup>11,16</sup>. We identified between 13 and 16 higher alcohols in the beers. More higher alcohols were identified in S04D and KVD than in the corresponding pale beers. Differences in higher alcohols content in beers fermented by different yeast strains are confirmed by Dack et al.<sup>5</sup>. The key nutrients for yeast in the wort are carbohydrates and amino acids. The amino acid content is closely related to the sensory characteristics of beers through their participation in the synthesis of higher alcohols by yeast<sup>3</sup>. Moreover, they are involved in Maillard reactions. Due to the use of dark malts, whose production technology includes a more intensive heat treatment, dark worts contain fewer amino acids than pale<sup>5</sup>. It could result in the reduction of higher alcohols in dark

Compound	Chemical group	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
		mg/L							
1-Hexanol	Alcohols	0.05 ± 0.00 c <sup>1</sup>	0.13 ± 0.17 ab	0.07 ± 0.02 bc	0.10 ± 0.03 a	0.06 ± 0.02 bc	0.12 ± 0.03 a	0.06 ± 0.02 bc	0.10 ± 0.00 ab
1-Heptanol	Alcohols	0.10 ± 0.01 a	0.12 ± 0.00 ab	0.13 ± 0.00 ab	0.12 ± 0.04 ab	0.08 ± 0.00 b	0.14 ± 0.03 ab	0.15 ± 0.02 ab	0.17 ± 0.06 a
1-Octen-3-ol	Alcohols	0.05 ± 0.00 ab	0.09 ± 0.01 a	0.05 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.07 a	nd <sup>2</sup>	nd	nd	nd
2-Propyl-1-pentanol	Alcohols	0.02 ± 0.02 a	0.03 ± 0.01 a	0.04 ± 0.06 a	0.01 ± 0.01 a	nd	0.03 ± 0.01 a	nd	nd
1-Octanol	Alcohols	0.66 ± 0.07 ab	0.89 ± 0.12 a	0.46 ± 0.07 bc	0.67 ± 0.20 ab	0.49 ± 0.02 bc	0.50 ± 0.23 bc	0.34 ± 0.06 c	0.42 ± 0.05 bc
2-Nonanol	Alcohols	0.29 ± 0.06 c	0.27 ± 0.02 c	0.55 ± 0.06 a	0.44 ± 0.10 ab	0.24 ± 0.00 c	0.46 ± 0.05 ab	0.37 ± 0.04 bc	0.30 ± 0.03 c
1-Nonanol	Alcohols	nd	0.33 ± 0.03 a	0.27 ± 0.06 a	0.15 ± 0.07 b	nd	nd	nd	nd
1-Decanol	Alcohols	0.24 ± 0.06 c	0.31 ± 0.05 bc	0.25 ± 0.06 c	0.55 ± 0.10 a	0.24 ± 0.03 c	0.21 ± 0.05 c	0.14 ± 0.03 c	0.45 ± 0.12 ab
2-Undecanol	Alcohols	nd	0.09 ± 0.00 d	0.31 ± 0.01 a	0.23 ± 0.04 b	0.13 ± 0.01 cd	0.20 ± 0.01 bc	0.11 ± 0.00 cd	0.20 ± 0.09 bc
1-Dodecanol	Alcohols	1.07 ± 0.10 cde	1.21 ± 0.41 bcd	0.66 ± 0.18 e	2.26 ± 0.26 a	1.41 ± 0.00 bc	8.40 ± 0.02 de	1.67 ± 0.17 b	0.94 ± 0.04 cde
1-Tetradecanol	Alcohols	nd	0.14 ± 0.01 b	0.18 ± 0.06 ab	0.24 ± 0.04 a	0.24 ± 0.01 a	0.20 ± 0.02 ab	0.21 ± 0.03 a	0.25 ± 0.01 a
Octanal	Aldehydes	0.32 ± 0.03 a	0.58 ± 0.35 a	0.35 ± 0.09 a	0.49 ± 0.23 a	0.31 ± 0.05 a	0.34 ± 0.13 a	0.35 ± 0.06 a	0.34 ± 0.00a
Nonanal	Aldehydes	1.72 ± 0.15 a	2.79 ± 0.88 a	1.96 ± 0.66	2.69 ± 1.48 a	1.42 ± 0.12 a	1.65 ± 0.27 a	1.66 ± 0.41 a	1.74 ± 0.01 a
Tetradecanal	Aldehydes	0.08 ± 0.02 a	0.07 ± 0.05 a	0.11 ± 0.04 a	0.12 ± 0.09 a	0.14 ± 0.04 a	0.06 ± 0.01 a	0.10 ± 0.04 a	0.14 ± 0.00 a
Decanal	Aldehydes	2.11 ± 0.40 b	5.61 ± 1.26 a	3.11 ± 1.98 ab	5.43 ± 2.52 a	1.79 ± 0.08 b	2.14 ± 0.44 b	2.46 ± 0.85 ab	2.94 ± 0.60 ab
Undecanal	Aldehydes	0.28 ± 0.07 b	0.56 ± 0.16 a	0.34 ± 0.11 ab	0.51 ± 0.19 ab	0.24 ± 0.07 b	0.32 ± 0.08 ab	0.36 ± 0.06 ab	0.42 ± 0.06 ab
Dodecanal	Aldehydes	0.27 ± 0.05 b	0.35 ± 0.03 ab	0.27 ± 0.03 b	0.45 ± 0.17 a	0.28 ± 0.07 ab	0.24 ± 0.02 b	0.26 ± 0.05 b	0.33 ± 0.01 ab
Tridecanal	Aldehydes	0.08 ± 0.04 a	0.08 ± 0.01 a	0.08 ± 0.03 a	0.14 ± 0.02 a	0.10 ± 0.04 a	0.08 ± 0.01 a	0.08 ± 0.02 a	0.11 ± 0.00 a
Methyl 4-methylidenehexanoate	Esters	0.10 ± 0.01 b	0.10 ± 0.02 b	0.14 ± 0.00 a	0.15 ± 0.03 a	0.06 ± 0.02 b	0.07 ± 0.00 b	0.10 ± 0.00 b	0.06 ± 0.02 b
Ethyl heptanoate	Esters	0.08 ± 0.03 b	0.10 ± 0.01 b	0.12 ± 0.00 ab	0.10 ± 0.02 b	0.07 ± 0.02 b	0.12 ± 0.03 ab	0.16 ± 0.02 a	0.16 ± 0.02 a
Ethyl phenylacetate	Esters	nd	nd	nd	nd	0.06 ± 0.04 a	0.06 ± 0.01 a	nd	0.05 ± 0.00 a
Phenethyl acetate	Esters	5.00 ± 0.04 b	7.03 ± 0.71 a	1.81 ± 0.15 d	2.34 ± 0.56 cd	2.63 ± 0.13 cd	2.57 ± 0.18 cd	2.47 ± 0.11 cd	2.91 ± 0.21 c
Ethyl 9-decanoate	Esters	0.15 ± 0.01 fg	0.25 ± 0.04 e	0.17 ± 0.00 f	0.65 ± 0.04 b	0.09 ± 0.01 g	0.32 ± 0.01 d	0.50 ± 0.05 c	0.97 ± 0.02 a
Ethyl dodecanoate	Esters	0.08 ± 0.02 b	0.17 ± 0.00 b	0.12 ± 0.03 b	0.15 ± 0.02 b	0.11 ± 0.01 b	0.10 ± 0.00 b	0.12 ± 0.02 b	0.54 ± 0.11 a
Isopropyl dodecanoate	Esters	0.17 ± 0.00 ab	0.17 ± 0.00 ab	0.18 ± 0.00 ab	0.16 ± 0.03 ab	0.19 ± 0.01 ab	0.14 ± 0.01 b	0.21 ± 0.07 a	0.14 ± 0.00 ab
Ethyl tetradecanoate	Esters	0.08 ± 0.01 d	0.11 ± 0.01 cd	0.15 ± 0.07 bc	0.20 ± 0.03 ab	0.14 ± 0.02 bcd	0.14 ± 0.00 bcd	0.15 ± 0.00 bcd	0.22 ± 0.00 a
Hexyl acetate	Esters	0.06 ± 0.02 ab	0.08 ± 0.03 a	0.01 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 abc	0.03 ± 0.00 bc	0.04 ± 0.00 bc	0.04 ± 0.00 bc	0.03 ± 0.00 bc
2-Methylbutyl isobutyrate	Esters	0.03 ± 0.05 ab	nd	0.05 ± 0.00 a	0.03 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.00 ab	0.03 ± 0.01 ab	0.03 ± 0.01 ab	0.02 ± 0.01 ab

**Table 3.** Concentration of alcohols, aldehydes and esters identified in beers by GC–MS. <sup>1</sup> Values are expressed as mean (n = 2) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f) within the same row are statistically different ( $P < 0.05$ ). <sup>2</sup> not detected.

beers. However, in our investigation, we did not confirm the effect of using dark speciality malt on total higher alcohols content. Higher alcohols directly affect the sensory qualities of the product and are also precursors to esters synthesis, which are highly flavour active compounds in beer<sup>11</sup>. They are an important part of the beer aroma composition, but they can also negatively affect the quality. Even if individual compounds in the beers analysed are below their sensory thresholds, they can affect the sensory profile of beers through the synergistic effect of volatile components<sup>3</sup>. Both the composition and the proportion of higher alcohols are important in shaping the quality of beer<sup>15</sup>.

Esters are a crucial group of compounds that shape the aroma of beer. They are formed during fermentation, storage and originate from hop cones<sup>17</sup>. Not only brewing raw materials are the source of esters in beer, they are also synthesized during fermentation by yeast<sup>5,17</sup>. At appropriate concentrations, they can impart desirable fruity and floral notes to beer. The synthesis of esters by yeast is related to both transformations during yeast growth and fat metabolism, as well as during fermentation. Among beer esters, we can distinguish a group of acetate esters (ethyl acetate, isoamyl acetate, phenylethyl acetate) and ethyl esters (ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate). Esters can penetrate the membranes of yeast cells and permeate beer, so an increase in their content is observed during fermentation<sup>11</sup>. Among the esters in the beers we tested, we detected ethyl acetate (6.01–20.07 mg/L), phenethyl acetate (1.81–7.03 mg/L), ethyl octanoate (0.62–1.44 mg/L) and isoamyl acetate (0.54–1.05 mg/L) in the highest concentrations. Lasanta et al.<sup>14</sup> found that the content of phenylethyl acetate in beers fermented at higher temperatures, regardless of the yeast strain tested, was significantly higher compared to beers fermented at lower temperatures. Our results confirmed that phenylethyl acetate was one of the main esters of beer. In addition, we observed that beers that were fermented with S04 (at 18 °C) yeast contained the highest amount of phenylethyl acetate (up to almost 4 times more) among the beers tested. In contrast, high temperature

Compound	Chemical group	S04P	S04D	S23P	S23D	KVP	KVD	SAP	SAD
		mg/L							
3-Octanone	Ketones	0.10 ± 0.01 a <sup>1</sup>	nd <sup>2</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	0.09 ± 13.07 b
6-Methyl-5-hepten-2-one	Ketones	0.16 ± 0.04 a	0.23 ± 0.06 a	0.19 ± 0.00 a	0.24 ± 0.05 a	0.16 ± 0.02 a	0.28 ± 0.17 a	0.16 ± 0.03 a	0.11 ± 0.01 a
2-Nonanone	Ketones	0.06 ± 0.01 a	0.09 ± 0.04 a	0.11 ± 0.04 a	0.10 ± 0.01 a	0.06 ± 0.02 a	0.07 ± 0.05 a	0.06 ± 0.00 a	0.04 ± 0.05 a
Neryacetone	Ketones	0.11 ± 0.01 c	0.52 ± 0.34 ab	0.23 ± 0.02 bc	0.35 ± 0.07 abc	0.62 ± 0.07 a	0.28 ± 0.07 bc	0.69 ± 0.03 a	0.64 ± 0.13 a
Caryophyllene	Sesquiterpenes	nd	nd	0.16 ± 0.01 a	nd	nd	nd	nd	nd
(E)-β-Farnesene	Sesquiterpenes	nd	nd	0.24 ± 0.01 a	nd	0.03 ± 0.02 b	nd	nd	nd
Humulene	Sesquiterpenes	nd	nd	0.48 ± 0.06 a	nd	nd	nd	nd	nd
Nerolidol	Sesquiterpenes	0.11 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.01 ef	0.06 ± 0.01 de	0.08 ± 0.01 cd	0.09 ± 0.00 bc	0.12 ± 0.01 a	0.04 ± 0.01 ef	0.03 ± 0.01 f
D-Limonene	Terpenes	0.20 ± 0.22 a	0.02 ± 0.03 a	0.10 ± 0.02 a	0.01 ± 0.01 a	nd	nd	nd	nd
Linalool	Terpenoids	1.63 ± 0.10 bc	1.53 ± 0.12 c	2.05 ± 0.12 a	1.70 ± 0.33 abc	1.94 ± 0.16 ab	1.59 ± 0.13 bc	1.56 ± 0.08 bc	1.15 ± 0.10 d
Citronellol	Terpenoids	0.71 ± 0.02 ab	0.32 ± 0.03 d	1.38 ± 0.06 a	0.57 ± 0.15 bc	0.80 ± 0.06 b	0.63 ± 0.08 abc	0.53 ± 0.12 bc	0.45 ± 0.05 cd
Cis-Geraniol	Terpenoids	0.07 ± 0.02 bc	0.11 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 d	0.12 ± 0.02 a	0.08 ± 0.08 b	0.07 ± 0.02 bc	0.04 ± 0.00 cd	0.05 ± 0.00 bcd
Methyl geranate	Terpenoids	nd	0.10 ± 0.08 b	0.31 ± 0.01 a	0.04 ± 0.02 bc	0.11 ± 0.06 b	0.04 ± 0.00 bc	nd	0.07 ± 0.06 bc
5-Methyl-2-furanmethanethiol	Thiols	nd	0.29 ± 0.02 b	nd	0.40 ± 0.08 a	nd	0.12 ± 0.01 c	nd	0.21 ± 0.06 b
Tetradecane	Alkanes	0.23 ± 0.03 a	0.14 ± 0.02 bc	nd	0.04 ± 0.05 de	0.13 ± 0.00 bc	nd	0.18 ± 0.05 ab	0.10 ± 0.01 cd
trans-3,5-dimethyl-1,6-octadiene	Dienes	0.04 ± 0.00 bc	0.06 ± 0.01 bc	0.05 ± 0.01 bc	0.02 ± 0.02 c	0.06 ± 0.01 bc	0.10 ± 0.02 a	0.07 ± 0.01ab	0.06 ± 0.00 b
Humulene epoxide I	Epoxides	0.04 ± 0.00 c	0.06 ± 0.00 bc	0.15 ± 0.02 a	0.10 ± 0.02 b	0.07 ± 0.04 bc	0.05 ± 0.02 c	0.06 ± 0.01 bc	0.05 ± 0.01 c
Octanoic acid	Fatty acids	0.14 ± 0.04 b	0.77 ± 0.53 ab	0.40 ± 0.10 ab	0.90 ± 0.09 ab	0.63 ± 0.06 ab	1.51 ± 1.49 ab	1.21 ± 0.29 ab	2.36 ± 1.65 a

**Table 4.** Concentration of ketones, terpenes and terpenoids and other compounds identified in beers by GC-MS. <sup>1</sup>Values are expressed as mean (n = 2) ± standard deviation. The mean values with different letters (a, b, c, d, e, f) within the same row are statistically different (P < 0.05). <sup>2</sup>nd—not detected.

(35 °C) of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* kveik yeast did not increase phenyl acetate content in beers. The volatile compound content of beers is affected by the yeast strain used and the fermentation temperature<sup>14</sup>.

Carbonyl compounds in beer are identified in relatively smaller amounts than the other discussed chemicals. They are formed as products of the Maillard reaction (including Strecker degradation), by lipid oxidation during wort production, and as an intermediate product during the conversion pathway of amino acids to alcohols. One of the most important aldehydes determined in beer is acetaldehyde, which is intermediate in glucose conversion to ethanol during fermentation<sup>11</sup>. In tested beers, furfural (2.60–7.77 mg/L), decanal (1.79–5.61 mg/L), nonanal (1.42–2.79 mg/L) and acetaldehyde diethyl acetal (0.56–2.23 mg/L) were the most abundant aldehyde. Among ketones, 6-methyl-5-hepten-2-one (0.11–0.28 mg/L) and neryacetone (0.11–0.69 mg/L) were dominant. The furfural content of beer increases with increasing storage time, so it is an important indicator used to analyse the ageing of beer<sup>19,20</sup>. The increase in furfural concentration in beers during ageing depends on the storage conditions and can be up to 50-fold<sup>21</sup>.

Carbonyl compounds are an important indicator of beer ageing. Among the most relevant are 2-furfural (formed by the Maillard reaction during storage) and 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and 2-phenylacetaldehyde, which are products of Stecker degradation or oxidation of higher alcohols<sup>22</sup>. In our beers, of the aforementioned aldehydes, we identified only furfural (2.60–7.77 mg/L). Dark and pale beers fermented by the S04, S23, and KV yeast strain did not differ statistically (P < 0.05) in furfural content. Nevertheless, the observed level of this aldehyde was high compared to its content in beers tested by other authors. Čejka et al.<sup>22</sup> determined that the content of furfural in beers was 5.2–452 µg/L, while Li et al.<sup>20</sup> observed 0.4–1.91 µg/L of furfural in fresh beer and up to a 470% increase during storage. Higher content of furfural was identified in dark wort than in pale wort. Gibson et al.<sup>23</sup> found that regardless of the use of dark malts in the production process, the same increase in furfural content was observed during beer ageing<sup>20</sup>.

The acetaldehyde diethyl acetal content in beers was statistically different (P < 0.05) for all samples depending on the malt composition. The pale beers S04P and S23P contained more acetaldehyde diethyl acetal than the corresponding dark beers, while KVP and SAP- fewer. The yeast *S. cerevisiae* kveik and *S. cerevisiae* var. *diastaticus* produced more acetaldehyde diethyl acetal in dark beers than in pale beers. Acetaldehyde is one of the key flavour ingredients in beers, whose effect on beer quality depends on its concentration. It can impart notes of green apple or an unpleasant pungent aroma to beer. Under acidic pH conditions, acetaldehyde reacts with ethanol to form diethyl acetaldehyde, whose aroma is described as fruity. Different brewing yeasts produced different amounts of acetaldehyde diethyl acetal, which was confirmed in our study<sup>24</sup>. Other authors point to the acetaldehyde diethyl acetal concentration in the range of 1.42 to 8.16 mg/L<sup>24</sup> and 2.72 to 11.63 mg/L<sup>25</sup>. Aldehydes in beer can be formed as a result of lipid and fatty acids oxidation, Maillard reactions, Strecker degradation, oxidation of isohumulones, aldol condensation of short-chain aldehydes, oxidation of higher alcohols, oxidation of long-chain aldehydes, and secretion by yeast<sup>26</sup>. One of the reasons we recorded fewer diethyl acetal acetaldehyde in dark beers may be the antioxidant activity of melanoidins, coloured macromolecular compounds formed at the final



stage of the Maillard reaction, which exhibit antioxidant properties<sup>10</sup>. As antioxidants, melanoidins can inhibit the oxidation reaction leading to the formation of acetaldehyde, which can be converted to acetal<sup>26</sup>.

The terpenes and terpenoids in beers are derived from hop. Among hop terpenes and their derivatives in beers, hydrophobic terpene hydrocarbons ( $\beta$ -myrcene, limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\alpha$ -humulene, and  $\beta$ -farnesene) and hydrophilic terpene alcohols (linalool, geraniol,  $\beta$ -citronellol and nerol) are identified<sup>27</sup>. The following compounds classified as terpenes and their derivatives were identified in the beers studied: D-limonene, linalool, citronellol, caryophyllene, (E)- $\beta$ -farnesene, humulene, and nerolidol. Linalool (1.15–2.05 mg/L), citronellol (0.32–1.38 mg/L) and nerolidol (0.03–0.12 mg/L) were identified in all beers tested. Other terpenes and terpenoids were identified in single samples. The D-limonene content was detected only for samples fermented by yeast S04 and S23. Moreover, pale beers contained more than 8 times the amount of this compound than dark beers. Differences in the content of terpenes and terpenoids between the analysed beers could be attributable to the potential of yeast strains to biotransformation of monoterpenes<sup>27</sup>.

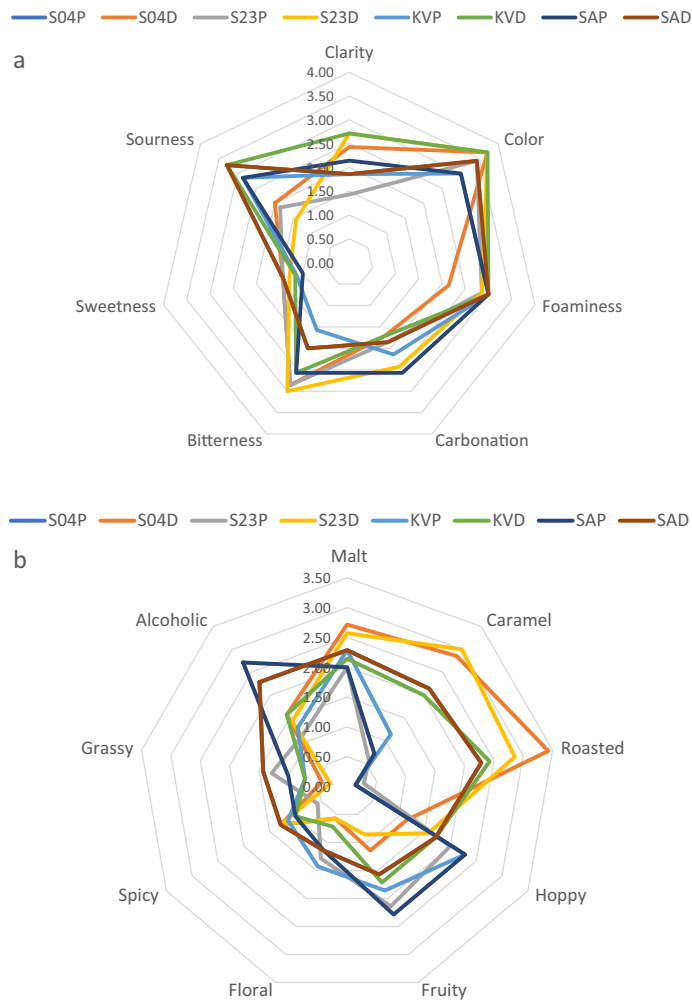
Linalool was considered as an indicator compound in the analysis of the aroma of hops. In addition to linalool, humulene and farnesene were identified in hop oils, as well as the oxidation products of these compounds, citronellol, geraniol, terpineol, which were compounds that shape the hop aroma. Caryophyllene, humulene, and  $\beta$ -farnesene are components of hop products, but their content decreases during the technological processing of wort<sup>28</sup>. As a result of boiling, the content of myrcene and linalool decreases rapidly. The compounds studied that are more resistant to transformation under boiling wort are humulene, humulene epoxide I,  $\beta$ -farnesene, caryophyllene and geraniol<sup>28</sup>. However, hopping is not the only technological step that affects the conversion and loss of terpenoids. These compounds also undergoes biotransformations with the participation of brewer's yeast. The main terpene hydrocarbons in hop essential oils ( $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -humulene, and  $\beta$ -caryophyllene) are usually almost completely reduced during the fermentation process by adsorption onto hydrophobic yeast cells and migration into foam during fermentation<sup>29</sup>. This phenomenon explains the absence or low content of hop terpenes and terpenoids in the beers analysed.

The beers produced were subjected to sensory analysis. The results were presented in radar graphs (Fig. 1) and added as Supplementary Table S1. All beers were characterised by medium to intense colour, typical of the raw materials used in the production process. The highest foaminess rating had the KVD beer, whose foam was described as good, persistent, fine, and dense. The lowest rating was given to the foaminess of the S04D beer. The beers did not differ ( $P < 0.05$ ) in terms of carbonation. The taste of the beers was analysed for intensity of bitter, sweet and sour taste sensations. The beers analysed were not statistically ( $P < 0.05$ ) different in sweetness. For all beers, it was rated from very weak to moderately perceptible. Dark beers were rated as more bitter than pale beers made with the same yeast strain. Dark specialty malts enhance the bitterness and astringency levels of beers<sup>8</sup>. However, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ) for each sample. The S23D was rated as the most, while KVP as the least bitter. The most varied ratings in terms of taste among all descriptors used were recorded for sour. The most sour beers were KVD, S04P, SAD, KVP and SAP. Regardless of the malt composition, kveik yeast and *S. cerevisiae* var. *distaticus* allowed the production of beers with perceptibly higher acidity described as well or even very well perceptible.

The following descriptors were used in the analysis of beer aroma: malt, caramel, roasted, hoppy, fruity, floral, spicy, grassy, and alcoholic. There were no statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the samples in the perceptibility of malt, hoppy, fruity, floral, spicy, grassy, and alcoholic aromas. However, some trends have been observed. Higher perceptibility of malty, caramel, roasted and spicy aroma was reported in dark beers, while hoppy, fruity, floral and grassy aroma in pale beers. Malt, caramel, and roasted aroma were also rated as well or intensely perceptible in the S04D and S23D beers. Roasted and caramel notes described as undetectable to weakly perceptible characterised pale beers S23P, KVP and SAP. The grassy aroma was very weak to moderately perceptible depending on the variant. S04P, SAP and SAD were identified as the most alcoholic. This is justified because of the highest ethanol content in SAP and SAD among the samples tested<sup>12</sup>.

Principal component analysis (PCA) and correlation analysis (Supplementary Table S2) were performed to better visualize the research results (Fig. 2). The first two principal components explained 64.21% of the total variation (PC1:40.03 and PC2:24.18%). Correlation analysis between volatile compounds groups showed that higher alcohols were mainly responsible ( $r = 0.870$ ) for the perception of the alcoholic aroma. There was a significant positive correlation between the content of higher alcohols and esters ( $r = 0.858$ ). However, there was a negative correlation between terpenes and terpenoids and esters content ( $r = -0.709$ ) and spice aroma ( $r = -0.823$ ). Correlations were also observed between the sensory descriptors of the beers. It was shown that the higher bitterness, the lower sensation of sourness ( $r = -0.724$ ). The caramel aroma was more noticeable with increasing beer colour intensity ( $r = 0.759$ ) and correlated ( $r = 0.874$ ) with malty aroma. The sensation of roasted aroma was related to the intensity of caramel aroma ( $r = 0.956$ ), malty aroma ( $r = 0.770$ ) and colour intensity ( $r = 0.860$ ). Roasted, caramel, and malt aromas and colour were strongly linked, forming a group of descriptors shaped mainly by the compositions of malts used in the production of wort. It was also observed that the mentioned group of aroma descriptors along with colour are negatively correlated with the perceptibility of hoppy aromas (hoppy, fruity, floral) ( $-0.962 < r < -0.657$ ). A significant correlation was also shown between foaminess and hoppy aroma ( $r = 0.724$ ) and clarity and floral notes ( $r = -0.874$ ).

The composition of the wort and the biochemical transformations that occur during fermentation determine the final quality of the beer. Depending on their concentration, certain flavour compounds can impart positive or negative sensory characteristics. Therefore, it is extremely important to control the fermentation process. The composition of volatile beer compounds depends on the profile of the ingredients of the wort, the conditions of the fermentation process, the yeast strain used, temperature, pressure, oxygen content, and the dose of microorganisms used<sup>9</sup>. The malt aroma is shaped by aldehydes, pyrazines, pyrroles, furans, ketones, acids, and alcohols. The formation of the sweet aroma is attributed to compounds from the aldehyde and furanone group<sup>8</sup>. Pyrazines and pyrroles are responsible for nutty, bread-like, burnt, and roasted aromas. Alcohols and ketones,



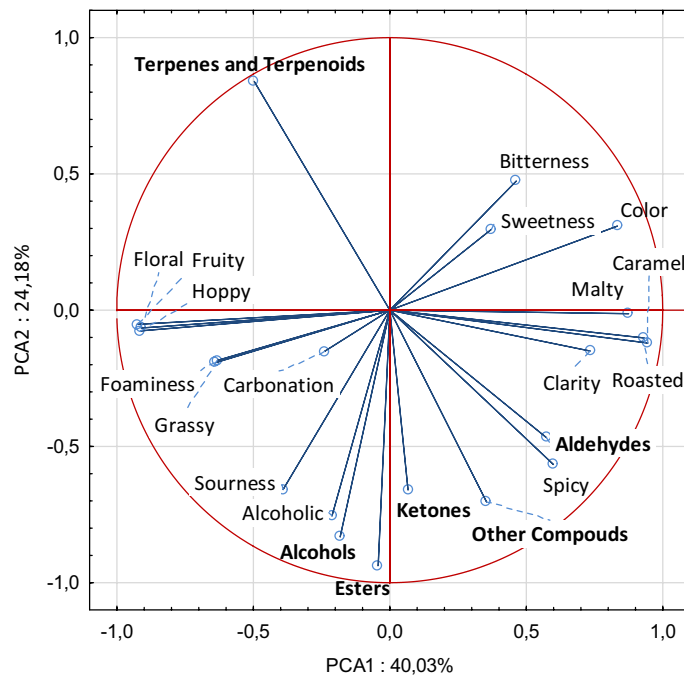
**Figure 1.** Sensory evaluation of beer, (a) Taste (bitter, sweet, sour) and clarity, color, frothiness, carbonation, (b) Aroma descriptors.

on the other hand, are involved in shaping the notes perceptible as pungent and sulphurous. Esters and phenols influence the perceptibility of floral, fruity, spicy, and woody notes<sup>8</sup>.

Our research allowed us to characterise the profile of volatile compounds of dark and pale beers fermented by different strains of brewer's yeast. On the basis of the results of chromatographic analyses, we obtained data enabling us to indicate similarities and differences in the distribution of volatile compounds between groups of chemical compounds in the analysed beers. The profile of volatile compounds in beers was found to consist of alcohols, aldehydes, esters, terpenes, terpenoids, ketones, as well as thiols, dienes, fatty acids, and epoxides. Among the beers obtained, the beers fermented by the top fermenting *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* strain and *Saccharomyces cerevisiae* S04 were characterised by the highest total volatile content, while beers fermented by the bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus* S23 exhibited the lowest. The malt composition did not affect the total content of volatiles, but for some beers it was the cause of significant differences ( $P < 0.05$ ) in the total content of esters, terpenes, and terpenoids. This allows us to conclude that the yeast strain used in the fermentation process influences the profile of volatile compounds of the beers to a greater extent than the malt composition. Differences in the amount of volatile compounds produced between strains are mainly due to variations in esters and alcohols. Beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* was characterised by an outstandingly high total volatile compound content. Groups of compounds and individual chemicals influence the perceptibility of aroma notes in beers. Therefore, the results obtained in our research will allow a better understanding of formation process of the aroma characteristics of beers.

## Materials and methods

**Biological material.** In the experiment, bottom-fermenting brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* Saflager S-23 (Fermentis, Lasaffre, France)<sup>30</sup>, and top-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04 (Fermentis, Lasaffre, France)<sup>31</sup>, *Saccharomyces cerevisiae* Voss kveik (Lallemand, Canada)<sup>32</sup> and *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* Belle Saison (Lallemand, Canada)<sup>33</sup> were used.



**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of groups of volatile compounds and beers sensory descriptors.

*S. pastorianus* Saflager S-23, *S. cerevisiae* Safale S-04, and *S. cerevisiae* Voss were characterised by high flocculation and sedimentation ability in contrast to *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Belle Saison. The yeast strains used varied in their attenuation capacity. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Belle Saison was characterised by a remarkably high ability to attenuate wort sugars 84–94%, due to its potential to ferment dextrins<sup>33</sup>. The attenuation level for the remaining yeast strains used was lower, ranging from 74–84%<sup>30–32</sup>. Moreover, a distinguishing feature of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* Belle Saison is also its ability to decarboxylate hydroxycinnamic acids, thus being classified as a POF+ (phenolic off flavor) yeast<sup>33</sup>.

**Raw materials.** The following raw materials were used in the technological process of beer production: pilsner barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland), dark chocolate barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland), Marynka hop (Polish Hops, Karczmiska Pierwsze, Poland) and Lubelski hop (Polish Hops, Karczmiska Pierwsze, Poland).

**Brewing Technology.** The technological process of beer production was carried out according to Paszkot & Kawa-Rygielska<sup>12</sup> considering the following technological stages: infusion mashing, gravity filtration of the mash, batch sparge with water, boiling of the wort with hops, cooling, filtration, division into 2 L samples, inoculation with brewer's yeast and fermentation. In the pale wort production process, 100% pilsner barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland) was used. Dark wort was produced with 90% pilsner barley malt and 10% chocolate dark barley malt (Viking Malt, Strzegom, Poland). The pale wort contained  $10.78 \pm 0.13\%$  w/w of extract and had a colour of  $8.4 \pm 0.36$  EBC, while the dark wort contained  $11.45 \pm 0.18\%$  w/w of extract and had a colour of  $85.7 \pm 1.7$  EBC. The worts tested were not statistically significant ( $P < 0.05$ ) different in the sum of identified carbohydrates (maltose, maltotriose, glucose and dextrins)<sup>12</sup>. The colour of the worts was analysed using by spectrophotometric method by measuring absorbance at 430 nm (DMA 4500 M, Anton Paar, Graz, Austria). The extract content of the worts was measured using a Densito 30PX densitometer (Metler Toledo, Columbus, USA). Worts were boiled with Marynka hop (7,9%  $\alpha$ -acids, dose 1 g/L, 60 min; Polish Hops, Karczmiska, Poland) and Lubelski hop (4%  $\alpha$ -acids, dose 1 g/L, 10 min; Polish Hops, Karczmiska, Poland). The worts (2 L) were inoculated with one of four selected strains of brewer yeast at a dose according to the manufacturer's recommendations (1 g of dried biomass per litre of wort). Fermentation was carried out at the temperature optimal for the yeast strain, in accordance with the manufacturer's recommendations and industry practice for 7 days at 18 °C for S04P and S04D samples, 12 °C for S23P and S23D samples, 35 °C for KVP and KVD samples, and 18 °C for SAD and SAP samples. After the separation of the yeast sediment, secondary fermentation was carried out for another 7 days. The beers were then bottled in 0.5 L bottles. During bottling, glucose was added at a dose of 2 g/L to allow refermentation. The maturation of the beer was carried out at 4 °C for 28 days. Basic physicochemical parameters of beers have previously been described<sup>12</sup>. The beers were characterised by the following ethanol content: S04P—4.51%v/v, S04D—4.71%v/v, S23P—4.73%v/v, S23D—4.66%v/v, KVP—4.80%v/v, KVD—4.58%v/v, SAP—5.60%v/v i SAD—5.79%v/v. The real extract of the beers was as follows: S04P—3.75%w/w, S04D—4.38%w/w, S23P—3.70%w/w, S23D—4.56%w/w, KVP—3.34%w/w, KVD—4.20%w/w, SAP—2.23%w/w,

SAD  $-2.58\%w/w^{12}$ . During the technological process, microbiological control was carried out in the following stages: inoculation, fermentation, maturation. No microbial contamination was found.

**Analysis of volatile compounds by gas chromatography.** *Gas chromatography with flame ionising detection (GC-FID).* The volatile compounds of the beers were analysed using gas chromatography coupled with flame ionisation detection (GC-FID) technique, using a GC2010 Plus apparatus with FID-2010 detector equipped with a headspace autosampler (HS-20) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and a CP-WAX 57 CB column (50 m  $\times$  0.32 mm ID  $\times$  0.2  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Before analyses, beers were degassed by shaking on an orbital shaker, mixed with diatomaceous earth (1 g/100 mL of beer) and filtered through a paper filter. Beer samples (10 mL) were transferred to glass headspace vials (20 mL). The vials were then conditioned and shaken in a headspace autosampler oven (40 °C, 20 min.) before 1 mL of the sample was transferred to the HS-20 headspace loop connected to the column, with the following parameters: holding time – 0.5 min, equilibration time – 0.1 min, loading time – 0.5 min, equilibration time – 0.1 min, injection time – 0.5 min, and the total GC analysis time – 60 min. The following temperature program was used for gas chromatography analysis: 40 °C (3 min), increase (5 °C/min) to 80 °C, maintain 80 °C (3 min), increase (10 °C/min) to 140 °C, maintain 140 °C (9 min), increase (20 °C/min) to 160 °C and maintain 160 °C (4 min). The total cycle time was 34 min. An initial pressure of 100 kPa was used, the initial flow 6.6 mL/min, the initial column flow 0.33 mL/min, the initial linear velocity 11.8 cm/s, and the purge flow was set at 3 mL/min. Helium was used as the carrier gas. The FID was operated at 280 °C with a sampling rate of 40 ms and a hold time of 34 min. H<sub>2</sub> flow into the FID was at a rate of 50 mL/min, the air flow was 400 mL/min, and the helium flow was 30 mL/min. Data were integrated and quantified in LabSolutions software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The identification of compounds was performed using analytical standards. Quantification was performed using external standards based on a standard curve with five calibration points (the coefficient of determination R<sup>2</sup> was greater than or equal to 0.999).

*Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).* The volatile compounds were adsorbed on solid phase microextraction fibre (SPME) according to Gasiński et al.<sup>34</sup> using 30  $\mu$ L of internal standard (IS) (1 mg of 2-undecanone per 1 dm<sup>3</sup> of cyclohexane) and 2 cm<sup>3</sup> of beer. The extraction of volatiles was performed for 20 min at a temperature of 40 °C. Volatile compounds were analysed by gas chromatography mass spectrometry using a GC-2010 Plus chromatograph coupled with a GCMS-QP2010 SE mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a ZB-5 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (30 m length  $\times$  0.25 mm inner diameter  $\times$  0.25  $\mu$ m layer thickness). Helium was used as the carrier gas (1.78 cm<sup>3</sup>/min, initial pressure 100 kPa). The injection port was maintained at 195 °C. The volatiles were desorbed from the fibre (1 cm long DVB/CAR/PDMS fibre with 50/30  $\mu$ m thickness of stationary phase; Supelco, Bellefonte, PA, USA) in the injection port for 2 min. The following oven temperature programme for the GC analysis was used: 40 °C for 1 min, ramp up (8 °C/min) to 195 °C; hold (5 min). The ion source temperature was 250 °C and the interface temperature was 195 °C. Scanning was performed in the range of 35–350 m/z using 70 mV electron ionisation, with an event time of 0.3 s (scan rate of 1111). Mass spectral analysis was used to identify volatile compounds. Identification was carried out by comparative analysis of retention indices with Kovats standards and NIST17 chemical standard libraries. Peak integration was performed using the Shimadzu PostRun Analysis software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

**Sensory analysis.** Sensory analysis of the beers was carried out using the author's questionnaire. The following characteristics of the beers were evaluated: clarity, colour, foaminess, and carbonation. Beers were evaluated for the perceptibility of bitter, sweet, and sour flavours. The aroma of the beers was evaluated for the detectability of malty, caramel, roasted, hoppy, fruity, floral, spice, grassy and alcoholic notes. The sensory panel was attended by 7 people, including two men and five women. All participants in the study were qualified and experienced in specialised sensory analysis of beers. A table showing the scores of the descriptors assessed in the sensory analysis is attached as Supplementary Table S3. Participation in sensory evaluation of products was voluntary. Each participant was informed of and agreed to the principles of the analysis. The data is confidential and will not be used without their knowledge.

**Statistics.** Parameters were compared with the one-way analysis of variance (ANOVA) at  $\alpha=0.05$  using Statistica 13.5 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Duncan's test ( $P<0.05$ ) was used to detect statistically significant differences between mean scores. The tables show the mean and standard deviation values. Principal component analysis (PCA) was also performed to compare the results of the gas chromatography analysis and the sensory characteristics of beer.

## Data availability

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Received: 1 December 2022; Accepted: 10 April 2023

Published online: 25 April 2023

## References

1. Díaz, A. B., Durán-Guerrero, E., Lasanta, C. & Castro, R. From the raw materials to the bottled product: Influence of the entire production process on the organoleptic profile of industrial beers. *Foods* **11**(20), 3215. <https://doi.org/10.3390/foods11203215> (2022).



2. Ocvirk, M., Mlinarič, N. K. & Košir, I. J. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **98**(10), 3627–3635. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8840> (2018).
3. Coghe, S., D'Hollander, H., Verachtert, H. & Delvaux, F. R. Impact of dark specialty malts on extract composition and wort fermentation. *J. Inst. Brew.* **111**(1), 51–60. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00648.x> (2005).
4. Castro, R., Díaz, A. B., Durán-Guerrero, E. & Lasanta, C. Influence of different fermentation conditions on the analytical and sensory properties of craft: Hopping, fermentation temperature and yeast strain. *J. Food Compos. Anal.* **106**(104), 278. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104278> (2022).
5. Dack, R. E., Black, G. W. & Koutsidis, G. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. *Food Chem.* **232**, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.043> (2017).
6. Alves, V. *et al.* Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chem.* **326**, 126856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126856> (2020).
7. Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquie-Moreno, M. R. & Thevelein, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**(3), 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041> (2019).
8. Prado, R., Gastl, M. & Becker, T. Aroma and color development during the production of specialty malts: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **20**(5), 4816–4840. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12806> (2021).
9. He, Y. *et al.* Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review. *J. Inst. Brew.* **120**(3), 157–163. <https://doi.org/10.1002/jib.145> (2014).
10. Gąsior, J., Kawa-Rygielska, J. & Kucharska, A. Z. Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules* **25**(17), 3882. <https://doi.org/10.3390/molecules25173882> (2020).
11. Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P. & Pillay, B. Flavour-active volatile compounds in beer: Production, regulation and control. *J. Inst. Brew.* **123**(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389> (2017).
12. Paszkot, J. & Kawa-Rygielska, J. Yeast strains and wort color as factors affecting effects of the ethanol fermentation process. *Molecules* **27**(13), 3971. <https://doi.org/10.3390/molecules27133971> (2022).
13. Liu, Z. L. *et al.* Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**(8), 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0148-3> (2004).
14. Lasanta, C., Durán-Guerrero, E., Díaz, A. B. & Castro, R. Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers. *J. Sci. Food Agric.* **101**(3), 1174–1181. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10729> (2021).
15. Kobayashi, M., Nagahisa, K., Shimizu, H. & Shioya, S. Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 549–558. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0516-1> (2006).
16. Larroque, M. N. *et al.* Effect of Saccharomyces and non-Saccharomyces native yeasts on beer aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **337**, 108953. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953> (2021).
17. Schubert, C., Thörner, S., Knoke, L. & Rettberg, N. Development and validation of a HS-SPME-GC-SIM-MS multi-method targeting hop-derived esters in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1994814> (2021).
18. Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Takayanagi, J., Kaneko, T., Watanabe, T., Matsumoto I. & Nomura, M. (2018) Behaviour of hop-derived branched-chain esters during fermentation and unique characteristics of Huell Melon and Ekuant (HBC366) hops. *BRSC*, **71**, 100–109. <https://doi.org/10.23763/BrSc18-14takoi>
19. Dennenlöhner, J., Thörner, S., Maxminer, J. & Rettberg, N. Analysis of selected staling aldehydes in wort and beer by GC-EI-MS/MS using HS-SPME with on-fiber derivatization. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **78**(4), 284–298. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1795478> (2020).
20. Li, M., Yang, Z., Yang, M., Shan, L. & Dong, J. Determination of furfural in beer by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. Inst. Brew.* **115**(3), 226–231. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00373.x> (2009).
21. Vanderhaegen, B. *et al.* Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J. Agric. Food Chem.* **51**(23), 6782–6790. <https://doi.org/10.1021/jf034631z> (2003).
22. Čejka, P., Čulík, J., Horák, T., Jurková, M. & Olšovská, J. Use of chemical indicators of beer aging for ex-post checking of storage conditions and prediction of the sensory stability of beer. *J. Agric. Food Chem.* **61**(51), 12670–12675. <https://doi.org/10.1021/jf403361h> (2013).
23. Gibson, B., Aumala, V., Heiniö, R. L., Mikkelsen, A. & Honkapää, K. Differential evolution of strecker and non-strecker aldehydes during aging of pale and dark beers. *J. Cereal Sci.* **83**, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.009> (2018).
24. Liu, C., Li, Q., Niu, C., Zheng, F. & Zhao, Y. Simultaneous determination of diethylacetal and acetaldehyde during beer fermentation and storage process. *J. Sci. Food Agric.* **98**, 4733–4741. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9008> (2018).
25. Kim, H. M. *et al.* Simultaneous determination of volatile organic compounds in commercial alcoholic beverages by gas chromatography with flame ionization detection. *J. AOAC Int.* **100**, 1492–1499. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0006> (2017).
26. Filipowska, W. *et al.* On the contribution of malt quality and the malting process to the formation of beer staling aldehydes: A review. *J. Inst. Brew.* **127**(2), 107–126. <https://doi.org/10.1002/jib.644> (2021).
27. Jiang, Z. *et al.* Potential enzymes involved in beer monoterpenoids transformation: Structures, functions and challenges. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1970510> (2021).
28. Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kagami, N. & Kawatsura, K. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar– sorptive extraction method with GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **53**(12), 4701–4707. <https://doi.org/10.1021/jf050072f> (2005).
29. Praet, T., Van Opstaele, F., Jaskula-Goiris, B., Aerts, G. & De Cooman, L. Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia* **36**(4), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2011.12.005> (2012).
30. Yeast Data Sheet. Belle Saison. Retrieved from: [https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2017/03/TDS\\_LALBR\\_EW\\_PREM\\_BELLESaison\\_ENGLISH\\_DIGITAL.pdf](https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2017/03/TDS_LALBR_EW_PREM_BELLESaison_ENGLISH_DIGITAL.pdf). Accessed on 15.02.2022.
31. Yeast Data Sheet. Retrieved from <https://fermentis.com/en/product/saflager-s-23/>. Accessed on 15.02.2022.
32. Yeast Data Sheet. SafAle™ S-04. Retrieved from <https://fermentis.com/en/product/safale-s-04/>. Accessed on 15.02.2022.
33. Yeast Data Sheet. SafLager™ S-23. Retrieved from: [https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2019/12/TDS\\_LPS\\_BREWINGYEAST\\_VOSS\\_ENG\\_8.5x11.pdf](https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2019/12/TDS_LPS_BREWINGYEAST_VOSS_ENG_8.5x11.pdf). Accessed on 15.02.2022.
34. Gasiński, A. *et al.* Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera indica*). *Molecules* **25**(13), 3033. <https://doi.org/10.3390/molecules25133033> (2020).

## Acknowledgements

This research was supported by the Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Poland) as the Ph.D. research program “Innowacyjny Doktorat”, no. N070/0011/21. The APC/BPC is co-financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

## Author contributions

J.P. and J.K.-R. conceived the experiment(s), J.P. and A.G. conducted the experiment(s), J.P. and J.K.-R. analysed the results. All authors reviewed the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33246-4>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to J.P.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

## **11. Oświadczenia współautorów publikacji będących przedmiotem rozprawy doktorskiej**

Mgr inż. Justyna Paszkot  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, ... 01.09.2023 .....

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Gąsior, J.**, Kawa-Rygielska, J. & Kucharska, A. Z. (2020). Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules*, 25(17), p. 3882.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu metodyki badań, wytworzeniu brzeczek laboratoryjnych stanowiących materiał badawczy, przygotowaniu materiału badawczego do analiz, współpracy przy wykonywaniu analiz chromatograficznych, przeprowadzeniu analizy zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu, aktywności przeciwutleniającej metodami FRAP i ABTS<sup>•+</sup>, analizie poziomu brązowienia metodą spektrofotometryczną, analizie i interpretacji wyników badań, w tym analizie statystycznej, sporządzeniu wykresów i schematów, jak również przygotowaniu tekstu manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
Justyna Paszkot  
data i podpis



Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 01.09.2023.....

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gąsior, J., **Kawa-Rygielska, J.** & Kucharska, A. Z. (2020). Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules*, 25(17), p. 3882.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, merytorycznym nadzorze i koordynowaniu wykonania części eksperymentalnej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
*Joanna Rygielska*  
data i podpis

Prof. dr hab. inż. Alicja Kucharska  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 04.08.2023.

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Gąsior, J., Kawa-Rygielska, J. & **Kucharska, A. Z.** (2020). Carbohydrates profile, polyphenols content and antioxidative properties of beer worts produced with different dark malts varieties or roasted barley grains. *Molecules*, 25(17), p. 3882.

mój udział polegał na wykonaniu analiz zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu metodą chromatografii cieczowej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

04.08.2023. Alicja Kucharska

data i podpis

Mgr inż. Justyna Paszkot  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, ...01.09.2023...

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Paszkot, J.**, Kawa-Rygielska, J. & Anioł, M. (2021). Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants*, 10(5), p.763.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu metodyki badań, wytworzeniu brzeczek i piw stanowiących materiał badawczy, analizie parametrów fizykochemicznych piw za pomocą gęstościomierza oscylacyjnego, analizie zawartości izo- $\alpha$ -kwasów w piwach, współpracy przy wykonywaniu analiz chromatograficznych, przeprowadzeniu analizy zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu, badaniu aktywności przeciwutleniającej metodami FRAP i ABTS<sup>++</sup>, analizie i interpretacji wyników badań, w tym analizie statystycznej, wykonaniu wykresów i schematów obrazujących wyniki, jak również przygotowaniu tekstu manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
*Justyna Paszkot*  
data i podpis

Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 01.09.2023...

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Paszkot, J., **Kawa-Rygielska, J.** & Anioł, M. (2021). Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants*, 10(5), p.763.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, merytorycznym nadzorze i koordynowaniu wykonania części eksperymentalnej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
*J. Kawa-Rygielska*  
data i podpis

prof. dr hab. inż. Mirosław Anioł  
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 04.07.2023.....

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Paszkot, J., Kawa-Rygielska, J. & **Anioł, M.** (2021). Properties of Dry Hopped Dark Beers with High Xanthohumol Content. *Antioxidants*, 10(5), p.763.

mój udział polegał na wykonaniu analiz zawartości ksantohumolu i izoksantohumolu metodą chromatografii cieczowej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

4.07.23 Mirosław Anioł

.....  
data i podpis

Mgr inż. Justyna Paszkot  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 01.09.2023

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Paszkot, J.,** Kawa-Rygielska, J. (2022) Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process. *Molecules*, 27, 3971

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu metodyki badań, wytworzeniu brzeczek i piw stanowiących materiał badawczy, analizie parametrów fizykochemicznych piw za pomocą gęstościomierza oscylacyjnego, analizie barwy piw, współpracy przy wykonywaniu analiz chromatograficznych, wykonaniu analizy zawartości związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu, badaniu aktywności przeciwutleniającej metodami FRAP, ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup>, badaniu cech morfologicznych komórek drożdży, analizie i interpretacji wyników badań, w tym analizie statystycznej, wykonaniu wykresów i schematów obrazujących wyniki, jak również przygotowaniu tekstu manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
Justyna Paszkot  
data i podpis

Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

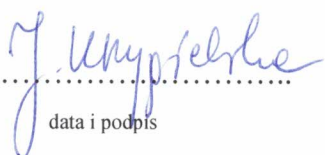
Wrocław, 01.09.2023...

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Paszkot, J., **Kawa-Rygielska, J.** (2022) Yeast Strains and Wort Color as Factors Affecting Effects of the Ethanol Fermentation Process. *Molecules*, 27, 3971

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, merytorycznym nadzorze i koordynowaniu wykonania części eksperymentalnej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
  
.....  
data i podpis



Mgr inż. Justyna Paszkot  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 01.09.2023.....

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Paszkot, J.,** Gasiński, A., & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast. *Scientific Reports*, 13(1), 6725.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu metodyki badań, wytworzeniu brzeczek i piw stanowiących materiał badawczy, współpracy przy wykonywaniu analiz chromatograficznych, analizie i interpretacji chromatogramów, analizie statystycznej wyników, zaprojektowaniu ankiety oceny sensorycznej piw, przeprowadzeniu panelu sensorycznego, wykonaniu tabeli, wykresów i schematów obrazujących wyniki badań, jak również przygotowaniu tekstu manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
Justyna Paszkot  
data i podpis



Prof. dr hab. inż. Joanna Kawa-Rygielska  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 01.09.2023.

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Paszkot, J., Gasiński, A., & **Kawa-Rygielska, J.** (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast. *Scientific Reports*, 13(1), 6725.

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, merytorycznym nadzorze i koordynowaniu wykonania części eksperymentalnej oraz współpracy przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

.....  
J. Kawa-Rygielska  
data i podpis

Mgr inż. Alan Gasiński  
Katedra Technologii Fermentacji i Zbóż  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 10.07.23

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Paszkot, J., **Gasiński, A.**, & Kawa-Rygielska, J. (2023). Evaluation of volatile compound profiles and sensory properties of dark and pale beers fermented by different strains of brewing yeast. *Scientific Reports*, 13(1), 6725.

mój udział polegał na współpracy przy wykonaniu analiz zawartości związków lotnych metodą chromatografii gazowej oraz przy opracowaniu i interpretacji wyników opublikowanych w postaci manuskryptu stanowiącego część rozprawy doktorskiej.

10.07.23 Gasiński Alan

data i podpis