

Министерство образования и науки Российской Федерации
ГОУВПО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Научно-образовательный инновационно-внедренческий центр
«Наука – Инновации – Пищевая индустрия города Москвы»

Индивидуальная подготовка кадров высшей квалификации

Научно-информационный материал (НИМ)

**Способы получения активных рас дрожжей с улучшенными
технологическими свойствами для производства пива на
высокопроизводительных заводах и на минипредприятиях**

Исполнители:
Бирюкова М.В.
Гернет М.В.
Ермолаева Г.А.
Ильяшенко Н.Г.
Каплин Л.А.
Кречетникова А.Н.
Лаврова В.Л.
Пономарева С.Н.
Строев В.В.
Суворов О.А.
Шаненко Е.Ф.

Москва 2010

1 Способы повышения физиологической активности дрожжей

Требования предприятий по производству пива, имеющих большую производительность и очень малую сходны: дрожжи должны быть сильно-сбраживающими с очень хорошим хлопьеобразованием с целью максимального сокращения продолжительности процесса сбраживания пивного сусла и эффективного отделения молодого пива от дрожжей.

Физиологическое состояние дрожжей зависит от содержания в сусле сбраживаемых сахаров и их соотношения с ассимилируемыми азотистыми соединениями, минеральных веществ (в т. ч. микроэлементов) и витаминов. Кислород, растворимый в сусле, тоже должен рассматриваться как необходимое для дрожжей питательное вещество.

Углеводный состав сусла существенно влияет на бродильную и флокуляционную способность дрожжей. При сбраживании дрожжами сусла с концентрацией сухих веществ не выше 14,5% интенсивность их размножения зависит от содержания сахара и ассимилируемого азота в сусле.

При пониженном содержании аминокислот в сусле они потребляются медленнее, чем обычно, и в этом случае большие количества их синтезируются самой клеткой, что приводит к появлению в пиве дополнительных количеств высших спиртов, диацетила и ряда других веществ, отрицательно влияющих на его вкус.

Жизнедеятельность дрожжей в значительной мере определяется минеральным составом сусла, который зависит, с одной стороны, от состава воды, а с другой – от состава затираемого солода.

Роль витаминов в жизнедеятельности дрожжей связана с тем, что они входят в состав разнообразных ферментных систем. Потребность различных рас пивных дрожжей в витаминах различна. Дрожжи низового брожения нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте и инозите, а дрожжи верхового брожения – еще в тиамине и пиридоксине.

Присутствие в сусле незначительных количеств спирта оказывает слабое стимулирующее действие на размножение клеток, но с увеличением концен-

трации спирта до 1,5 – 2% размножение клеток тормозится, а при 5% прекращается полностью.

Накапливающаяся в пиве углекислота также отрицательно сказывается на размножении дрожжей.

Наличие в сусле большого количества коллоидов приводит к адсорбции их на дрожжах, что затрудняет приток в клетку питательных веществ и отток продуктов обмена.

Основное следствие недостатка кислорода в сусле – это ослабление размножения дрожжей и снижение их жизнедеятельности, что объясняется отсутствием в сусле достаточного количества ненасыщенных жирных кислот, которые не синтезируются дрожжами в анаэробных условиях. Недостаточное аэрирование сусла в течение длительного времени может приводить и к дегенерации дрожжей.

С конца 19 в., когда традиционная технология различных бродильных производств сложилась, попытки ученых направлены на разработку ускоренных способов брожения, основанных на усилении жизнедеятельности дрожжей. Установлено, что возможны следующие пути:

- Увеличение нормы введения дрожжей, т.е. изменение соотношения субстрат/ количество дрожжевых клеток, но только до определенной концентрации (норма дрожжей 20 – 60 млн. клеток в 1 см³). Этот способ сочетается с повышенной температурой и перемешиванием.
- Ускорение реакции благодаря повышению температуры брожения (следствием чего является увеличение размножения дрожжей) и изменения других физических факторов (давление и т.п.).
- Применение штаммов дрожжей с повышенной ферментной активностью и активаторов брожения химической или другой природы.
- Перемешивание считается самым важным фактором среди других, т.к. увеличивается контакт дрожжевых клеток со средой и предотвращается возможность их оседания, усиливается тепло- и массообмен.

- Практикуется способ интенсификации процесса брожения введением в бродильную смесь активаторов брожения биологической и химической природы (азотистые вещества, особенно соли аммония, фосфаты, аминокислоты, витамины и т.д.), а также стимуляторов роста.

Способы интенсификации процесса брожения путем увеличения нормы введения дрожжей широко распространены. Обычно, увеличение нормы введения или повышение концентрации дрожжей сочетают с другими ускоряющими факторами – повышенной температурой, перемешиванием и т. п. Основной причиной ускорения брожения является значительное сокращение или даже отсутствие лаг-фазы. Кроме того, резко возрастает величина клеточной поверхности дрожжей в сусле.

Во МГУППе разработан способ ускоренного брожения пива с высокой начальной концентрацией дрожжей. Увеличивая норму введения дрожжей от 0,028 г/100 см³ до 5,108 г/100 см³, авторы повысили скорость сбраживания экстракта в 12 раз и сократили продолжительность брожения до 1,3 сут.

Однако применение повышенных концентраций дрожжей может привести к избыточному синтезу нежелательных продуктов брожения и снизить качество получаемых напитков. Накопление достаточного количества дрожжей зачастую сопряжено с повышенными затратами на их культивирование.

Важным фактором, ускоряющим брожение, является перемешивание. При перемешивании увеличивается контакт дрожжевых клеток со средой и предотвращается возможность их оседания, усиливается тепло - и массообмен в среде. Перемешивание усиливает размножение дрожжей, приводит к более полному использованию азота сусла, а также к повторному использованию дрожжами некоторых метаболитов анаэробного распада сахаров сусла. Однако использование этого способа обладает рядом существенных недостатков. Установлено, что при интенсивном перемешивании качество пива ухудшается, оно менее ароматично, имеет низкий рН, невысокое содержание летучих кислот, азота и большое количество высших спиртов. При усилении перемешивания усиливается образование ацетальдегида в пиве, α - ацетолак-

тата и диацетила, а также ускоряется редукция диацетила. В пиве накапливается больше сероводорода и меркаптанов. В то же время уменьшаются пеноустойчивость пива и содержание в нем свободных жирных кислот.

Интенсификация процесса брожения может быть достигнута повышением температуры. Температура влияет на скорость ферментативных реакций в клетке, интенсивность брожения и размножения дрожжей, а также на биосинтез метаболитов.

Применением теплого режима брожения (16°C и 20°C) удается сократить продолжительность брожения и дображивания на 50%, однако, при этом качество пива снижается. При температуре брожения свыше 12°C пиво приобретает дрожжевой запах, имеет, как правило, более низкий pH, содержит меньше белков и горьких веществ, обладает худшими пенящими свойствами, чем пиво, полученное при умеренных температурах.

Практикуется интенсификация процесса брожения применением повышенного давления CO_2 . Такая технология несколько тормозит размножение дрожжей и интенсивность брожения, но способствует сокращению длительности созревания вследствие естественного промывания пива CO_2 , выделяющимся после снятия давления. Кроме того, повышенное давление тормозит образование дрожжами некоторых побочных продуктов брожения.

Повышенное давление применяется почти во всех ускоренных способах, а также в схемах непрерывного производства пива

Применение давления и повышенной температуры при брожении пива предотвращают чрезмерное образование дрожжами высших спиртов и изэфиров, способствуют редукции диацетила, снижают потери горечи, однако пиво приобретает дрожжевой привкус.

Большой научный и практический интерес для биотехнологии пищевых и микробиологических производств, в которых применяются дрожжи, представляют электрофизические методы их обработки. Это новое научное направление включает в себя применение в настоящее время следующих воздействий на биологические объекты:

- ✓ Ультразвуковое воздействие электрических и магнитных полей;
- ✓ Обработка электромагнитными излучениями высоких и сверхвысоких частот (СВЧ);
- ✓ Обработка ультрафиолетовыми лучами;
- ✓ Обработка лазером;
- ✓ Воздействие световых волн различной интенсивности.

Используя эти методы можно управлять жизнедеятельностью микроорганизмов. Диапазон этих методов широк - от летального ингибирующего, мутагенного до стимулирующего. Поэтому с их помощью можно как активизировать процессы жизнедеятельности микроорганизмов, так и снизить обсемененность посторонними микроорганизмами производственного сырья, полупродуктов и готовой продукции и тем самым повысить их качество и расширить их сферу во всех отраслях.

Исследованиями последнего десятилетия, проведенными отечественными и зарубежными учеными, указывается перспективность воздействия на микроорганизмы магнитного поля. Наиболее эффективно магнитное поле, создаваемое постоянным магнитом или электромагнитом.

Специалистами КТИПП с целью увеличения выхода дрожжей и удешевления способа их выращивания, рекомендовано обрабатывать засевные дрожжи *S.cerevisiae* электромагнитными волнами миллиметрового диапазона. Такое облучение воздействует на гены роста дрожжевых клеток и ускоряет их размножение. Экспериментами, в которых выяснилось действие электромагнитного поля на культуру, также занимался С.А.Павлович. Суть его изобретения заключается в том, что культуру дрожжей выдерживают в магнитном поле в течение 2-х нед при 28°C, что обеспечивает значительную стимуляцию роста, повышает физиологические и антимикробные свойства. При выращивании дрожжей в однородном магнитном поле, возрастает биохимическая активность дрожжевых клеток и увеличивается (на 6.6%) накопление спирта по сравнению с брожением без обработки. Многие штаммы приобретают новые свойства, например восстановление нитри-

тов. Слабое магнитное поле вызывает слабую перестройку клетки, заметное увеличение активности и ускорение ферментативных реакций.

Максимальный эффект активации дрожжей можно получить при обработке их клеток в поле напряженностью 250-300 Э в течение 15 мин. Приобретенная активность нестабильна, максимум ее приходится на второй час после обработки. Обработка в магнитном поле в описанном режиме не оказывает существенного влияния на морфологические свойства клеток дрожжей. При исследовании влияния электромагнитного поля миллиметрового диапазона на клетки дрожжей *S. cerevisiae* обнаружен эффект увеличения в 2 раза биомассы после воздействия поля частоты 41.76 Гц. Особый научный и практический интерес для пищевой промышленности представляет гидроионная обработка (ГИО), являющаяся следствием совместного воздействия на микроорганизмы постоянного электрического поля, продуктов коронного разряда и потока ионизированных гидрочастиц, являющихся продуктами электролиза неорганических веществ - электролитов.

2 Влияние состава среды на жизнедеятельность пивных дрожжей

Для нормального развития дрожжей большое значение имеет углеводный и азотистый состав сусла, температура и наличие в среде кислорода.

Углеводный состав сусла определяется наличием в нем сбраживаемых и несбраживаемых сахаров. Содержание сбраживаемых сахаров в сусле составляет 70- 80 % сухих веществ. Из них, на долю мальтозы приходится 60 - 70 %, мальтотриозы - 14 - 20 %, глюкозы - 10 - 15 %. Другие моно- и полисахариды содержатся в небольших количествах.

Из углеводов образуются главные продукты обмена веществ - спирт и CO_2 , а также ароматические вещества и высвобождается необходимая для клетки энергия. Дрожжи в основном хорошо сбраживают моно- и дисахариды, хуже - некоторые трисахариды, а совсем не сбраживают - полисахариды.

Азотистые вещества необходимы клеткам для синтеза компонентов, обеспечивающих их рост и размножение. Наиболее ценным и важным источ-

ником азота являются аминокислоты, а также пуриновые и пиримидиновые основания. Более сложные азотистые вещества дрожжами не усваиваются.

Температура и наличие в среде кислорода определяют скорость размножения дрожжей. При холодном и анаэробном режимах размножение дрожжей замедляется. Клетки вырастают крупными, с большим запасом питательных веществ и высокой бродильной активностью. В условиях повышенной температуры и аэрации размножение ускоряется, размеры клеток уменьшаются и они вырастают более слабыми.

В среде, лишенной кислорода, преобладающим становится процесс брожения, в результате которого образуются продукты полураспада сахаров: спирты, сложные эфиры, а также многие другие.

Количество и качество высших спиртов в пиве зависит главным образом от состава сусла, от вида сбраживаемых сахаров, вида и количества аминокислот в сусле, и от типа используемых дрожжей. Различные высшие спирты по-разному влияют на вкус пива. Они появляются уже в начале брожения и объем их возрастает в зависимости от температуры брожения. Основной составной частью сивушного масла является изоамиловый спирт, который образуется из лейцина, и изобутиловый спирт, образующийся из валина. Изолейцин дает амиловый спирт.

Из альдегидов в пиве преобладает ацетальдегид. При низкой концентрации он не проявляется ни в запахе, ни во вкусе, но производные его, главным образом ацетон и диацетил, могут быть опасны. Диацетил образуется в пиве, инфицированном педиококками или молочнокислыми бактериями. Некоторые расы пивных дрожжей также способны его образовывать. Нормальное содержание диацетила в пиве составляет $0,2 \text{ мг/дм}^3$.

В стадии активного размножения дрожжи способны восстанавливать диацетил в 2, 3 - бутандиол. На практике запах диацетила можно удалить путем добавления свежих густых дрожжей от 0,5 до 1 л/гл.

Ацетон, уже в небольших количествах, является причиной затхлого привкуса пива. Считается нормальным содержание его в пиве до 1 мг/л.

Сложные эфиры являются главной составной частью запаха пива. Они образуются при брожении и дображивании пива из летучих и нелетучих кислот и спиртов. В процессе брожения большую часть эфиров захватывает улетучивающийся углекислый газ. Общее содержание сложных эфиров в пиве составляет от 30 до 63 мг/дм³.

В процессе брожения резко уменьшается количество горьких веществ в результате адсорбции изогумулонов на дрожжевых клетках вследствие увлечения их бродильными деками вместе с пузырьками диоксида углерода. Потери полифенольных веществ при брожении достигают одной трети.

Сернистые соединения - основная причина незрелого вкуса молодого пива. Если брожение идет медленно, то в бродильные газы переходит больше сероводорода. Дрожжи синтезируют сернистые соединения из сульфатов, сульфитов и азотистых соединений, содержащих серу.

Молодое пиво имеет более высокую кислотность по сравнению с сусликом. С одной стороны кислотность повышают органические кислоты (побочные продукты брожения), с другой - образующийся диоксид углерода. Нормальный pH пива находится в пределах от 4,4 до 4,0.

Суслик имеет более интенсивную окраску по сравнению с пивом, что связано с более низким pH бродящего суслика, при котором красящие вещества суслика приобретают более светлый цвет. Одновременно часть их адсорбируется на поверхности дрожжей и на пузырьках диоксида углерода.

3 Влияние различных добавок на физиологическое состояние дрожжей

Для интенсификации брожения используют внесение в бродильную смесь материалов с большой поверхностью (например, биологических стружек, полимерных материалов), способствующих поддержанию дрожжей во взвешенном состоянии и увеличению поверхности контакта фаз. Для усиления образования пузырьков CO₂ Гаенг вносил в бродильные емкости кольца Рашига, кусочки стали, активного угля и др. наилучшие результаты получе-

ны при внесении биологических стружек: при дозе 12 г/дм³ в вертикальных сосудах длительность главного брожения сокращалась на 24 ч. В начале брожения они равномерно распределяются в сбраживаемом сусле, частично поднимаясь на поверхность. С развитием брожения и связанным с ним постепенного уменьшения конвекционного движения биологические стружки вначале медленно, а затем быстрее оседают на дно. Это происходит из-за увеличения их массы за счет приставших дрожжевых клеток. Оседание дрожжей, таким образом, усиливается при использовании биологических стружек. В суспендированном состоянии остается на 25 – 30% дрожжей меньше. Происходит это после достижения конечной степени сбраживания.

Таким образом применение биологических стружек ускоряет не только процесс брожения пива, но и осветление пива.

Недостатком этого способа при производстве пива является трудность регенерации стружек, отделение их от дрожжей и замедление редукции ди-ацетила из-за слишком быстрого оседания дрожжей. Поэтому автор рекомендует применять этот способ в исключительных случаях.

Интенсификация процесса брожения может быть достигнута при введении в бродящую смесь активаторов брожения химической природы.

Обогащение питательной среды азотистыми веществами, особенно в виде солей аммония, микро- и макроэлементами, фосфатами, витаминами, аминокислотами и другими биологически активными веществами всегда сопровождается активацией процесса брожения.

Практикуется активация дрожжей промежуточными продуктами спиртового брожения – ацетальдегидом и пировиноградной кислотой. Добавляемые в сусло в небольших количествах они не только сокращают латентный период и возбуждают реакции гликолиза, но и способствуют синтезу белков и росту дрожжей. Используется также активация эргостерином и жирными кислотами. Эргостерин активирует брожение и рост дрожжей в анаэробии и придает им характеристики, свойственные условиям аэробии. Но эрго-

стерин нерастворим в воде. Его можно диспергировать в диатомите, но получаемый порошок обладает меньшей активностью.

К активаторам брожения также относятся различные ферментные препараты грибного и бактериального происхождения. Недостатком этого способа является сравнительно высокая стоимость ферментных препаратов.

Для жизнедеятельности дрожжей необходимы макро- и микроэлементы. Стимулирующее действие этих веществ зависит от полноценности питательной среды, наличия в ней необходимого минерального питания, витаминов и других биологически активных веществ. Практикуется внесение в сусло препаратов, представляющих собой комплекс витаминов, макро- и микроэлементов. Чем беднее среда микроэлементами, тем выше стимулирующий эффект добавок.

Можно считать, что солодовое сусло содержит и количественно и качественно достаточно минеральных веществ. Однако, исследователи отмечают, что обогащение питательной среды магнием, цинком и другими элементами, почти всегда вызывает увеличение бродильной активности дрожжей.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что различные способы интенсификации процесса брожения позволяют увеличить активность дрожжей и сократить длительность технологического цикла. Однако применение указанных способов на практике может привести к нарушению технологического режима брожения или изменению состава питательной среды, что почти всегда отрицательно влияет на качество (вкус, органолептические показатели, пищевую ценность) готового продукта.

Таким образом, для активации дрожжей, принимающих непосредственное участие в формировании вкусовых качеств пищевых продуктов, необходимо разрабатывать такие способы повышения жизнедеятельности, которые не влияют на параметры технологического процесса производства и не изменяют состав питательной среды.

В связи с этим, представляется целесообразным осуществлять активацию дрожжей не в процессе брожения, а в стадии посевного материала перед подачей на брожение.

Для повышения физиологической активности пивоваренных дрожжей предложено выдерживать посевной материал перед подачей на брожение в растворе фосфорнокислого калия. Установлено, что обработанные дрожжи образуют большее количество спирта при меньшем потреблении сахара, чем контрольные.

Также, в посевные дрожжи вносят водные вытяжки или экстракты солодовых ростков, водорослей, богатых биологически активными веществами и азотом

Предложено интенсифицировать жизнедеятельность микроорганизмов путем увеличения проницаемости клеточных мембран. Для этого суспензию посевного материала в питательной среде подвергают кратковременному воздействию высокого давления (20 – 250 атм.).

Предварительная обработка перекисью водорода мелассы в количестве 0,5 – 1,5 % по массе позволяет активизировать процесс биосинтеза в клетках биологически активным кислородом

Известен способ увеличения интенсивности размножения дрожжей путем обработки суспензии засевных дрожжей после культивирования H_2O_2 , концентрация которой в дрожжевой суспензии составляет 0,1 – 0,3%. Введение перекиси водорода приводит к повышению окислительно-восстановительного потенциала как внутри, так и вне клеток, частичному инактивированию дрожжевых протеолитических ферментов и подавлению инфицирования гнилостными бактериями. Перекись водорода изменяет проницаемость клеточной оболочки дрожжей

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей :Пищевая пром-сть,1979.- 120с.

2. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей.: Товарищество научных изданий КМК.2004. - 221 с.
3. Берри Д. Биология дрожжей. Пер с англ. – М.: Мир, 1985. – 96с.
4. Бодрова О.Ю. Интенсификация процессов дрожжегенерирования и брожения в технологии спирта с использованием ультразвуковой обработки засевных дрожжей. Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата технических наук.: М, 2006, - 24 с.
5. Бэмфорт, Ч. Новое в пивоварении /Ч. Бэмфорт (ред.) пер. с англ. И.С.Горожанкиной, Е.С.Боровиковой. – СПб.:Профессия,2007. – 520с., ил.,табл.
6. Ильяшенко Н.Г., Бетева Е.А., Пичугина Т.В., Ильяшенко А.В. Микробиология пищевых производств. – М.: КолосС, 2008, - 500с.
7. Микробиология пива /Прист Ф.Дж., Й.Кэмпбелл; пер. с англ. Под общ. Ред. Т.В.Мелединой и Тыну Сойдла. – Спб: Профессия,2005. – 368с.,ил.
8. Фараджева Е.Д., Федоров В.А. Общая технология бродильных производств. – М.:Колос,2002. – 408с.
9. Baker, C.D. (1991) Recommended Methods of Analysis, Institute of Brewing, London.
10. Boulton, C.,Quain,D.E. Brewing Yeast and Fermentation. – Oxford: Blackwell Science, 2001.
11. Kennedy, A. (editor) (2001) Analytica Microbiologica EBC, Fachverlag Hans Karl, Nuinberg.
12. Kreger-van-Rij N.J.W/General classification of the east. The yeasts; a taxonomic study. 3 Ed., - Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1984, 1082p.
13. Kunze,W. Technology Brewing and Malting. – 2nd end. – Berlin: VLB,1999.
14. Kurtzmain C.P.,Fell J.W. The yeasts, a taxonomic study – 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science b.v.,1998,1055p.
15. Lodder J. General classification of the yeast. The yeasts. A taxonomic study. – 2 End. Amsterdam: North-Holl. Publ. Co., 1970, 1385 p.