

Питание и Защита Дрожжей

для

Хорошего Алкогольного Брожения

Оглавление

Питание и Защита Дрожжей для Хорошего Алкогольного Брожения	3
1. Вступление	3
1.1 Азот	4
1.2 Кислород /факторы выживания (стеролы)	5
1.3 Минералы.....	6
1.4 Витамины	7
2. Селекция и характеристика.....	8
Тестемония Dr Charles Edwards	8
2.1 Yseo® дрожжи	8
2.2 Характеризация селекционированных дрожжей:	9
Тестемония Dr Jean-Michel Salmon.....	11
2.3 Регидрация дрожжей.....	11
2.3.1 Стеролы: факторы выживания мембраны.....	12
3. Управление питанием дрожжей	15
Тестемония Dr Jean-Marie Sablayrolles.....	15
3.1 Важность применения комплексного питания, такого как Fermaid®	15
4. Остановившееся брожение	16
4.1 Подготовка недобродившего вина к возобновлению брожения.....	16
4.2 Подготовка дрожжей	16
4.3 Активация подготовленных «спасательных» дрожжей. Питание и сахар	16
4.4 Рестарт брожения и непрерывное добавление недобродившего вина.....	17
Библиография и словарь терминов	18
Словарь.....	20

Питание и Защита Дрожжей для Хорошего Алкогольного Брожения

Состояние Искусства

Lallemand, ведущий производитель энологических дрожжей, бактерий и питательных сред для них, является частной канадской корпорацией. Группа энологии, базируемая в г.Тулуза, Франция, сосредоточена на научных исследованиях в сотрудничестве с известными исследовательскими институтами. Цель этого документа состоит в том, чтобы обеспечить виноделов и энологов описанием текущего научного понимания питания и защиты дрожжей для хорошего управления алкогольным брожением.

Документ подготовили:

Anne Julien (Lallemand SAS, Франция), Didier Theodore (Lallemand SAS, Франция), Gordon Specht (Lallemand, Северная Америка), Ann Dumont (Lallemand Inc., Канада) и Cecile Brung (Lallemand SAS, Франция).

Признательность:

Dr. Charles Edwards - Washington State University (США)

Pr. Jean-Marie Sablayrolles - UMR Sciences pour l'oenologie - INRA - Montpellier (Франция)

Dr. Jean-Michel Salmon - UMR Sciences pour l'oenologie - INRA - Montpellier (Франция)

1. Вступление

Чтобы быть уверенным в полном и стабильном брожении виноградного сусла, необходимо иметь разумный баланс пищевой, физической и химической среды, которая позволит дрожжам размножаться и процветать. Важно иметь оптимальное развитие здоровых клеток дрожжей, чтобы уменьшить риск вялого и остановившегося брожения.

Следующие факторы - наиболее вероятные причины недоброда и вялого брожения:

-  Дефицит азота
-  Нехватка кислорода
-  Отсутствие регулирования температуры
-  Неправильная регидратация и обработка дрожжей
-  Нехватка факторов роста, таких как витамины и минералы
-  Сильно осветленное сусло
-  Ингибирующие метаболиты, произведенные дрожжами
-  Избыток диоксида серы или остатки агрокими

Некоторые факторы виноградарства могут влиять на брожение сусла. Среди этих факторов важно помнить:

- О Высокая степень зрелости винограда, приводящая к высокой концентрации способного к брожению сахара в сусле, связана с ограниченными уровнями доступного азота, что увеличивает риск медленного или остановившегося брожения;
- О Плохие санитарные условия винограда, заключающиеся в присутствии больших поселений нежелательных микроорганизмов (бактерии и дрожжи, botrytis), уменьшают доступность азота, припаяв росту дрожжей и их деятельности;
- О Агрохимические остатки также вовлечены в проблемы брожения. Некоторые из них ответственны за более длинную лаг-фазу, что задерживает начало алкогольного брожения (Suarez и др., 2000).

Эти факторы используются, чтобы оценить потенциальный риск затрудненного брожения, но когда как результат, требуется специфический винный стиль, вмешательство на винограднике не всегда возможно. Однако, виноделы могут компенсировать ситуацию, будучи превентивными во время брожения.

1.1 Азот

Азот, самое важное питательное вещество для дрожжей, является ключевым фактором, который оказывает существенное влияние на брожение. Это питательное вещество влияет и на кинетику брожения, и на конечное качество вина (Agenbach, 1977; Bezenger и Navarro, 1987). В общем, дефицит азота в сусле снижает рост дрожжей и скорость брожения (Bely и др., 1990).

Содержание азота в виноградном соке колеблется от 60 до 500 мг азота/л, (J.M Sablayrolles и J.M Salmon, 1996), в зависимости от сорта винограда, года изготовления вина и микроклимата (Рисунок 1). Виноградное сусло содержит азот в различных формах: белки, пептиды, ионы (NH_4^+) и альфа-аминокислоты. Азот, усваиваемый дрожжами (YAN) состоит из аммония и альфа-аминокислот, кроме пролина, который не усваивается дрожжами. Иногда YAN в сусле не измеряется, даже при том, что его уровень зачастую не является достаточным.

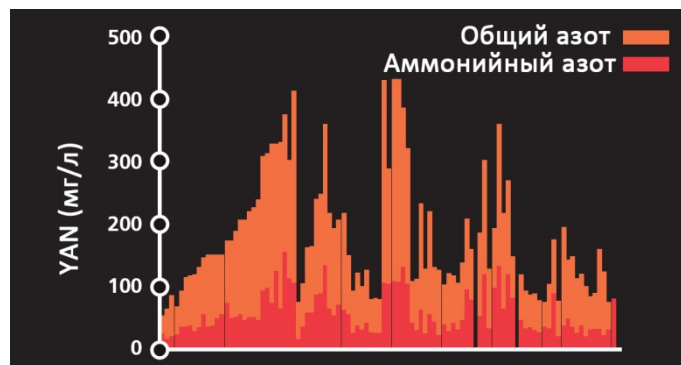


Рис.1. Различное содержание азота в сусле (из Sablayrolles и др., 1996)

Азотоусвоение дрожжами

Азот, как сущность для синтеза белка

Различные типы азота ассимилируются по-разному. Органический азот в форме аминокислот поступает в клетку через активный транспорт и может быть накоплен в клетках дрожжей (Bisson, 1991). Главная система - GAP (General Amino Permease, Основная Аминопермеаза), которая в состоянии транспортировать все альфа-аминокислоты. Различные группы были определены как функция их ассимиляции от "очень быстрого" к "частичному" (Henschke и др., 1993).

Попав однажды в дрожжевую клетку, эти альфа-аминокислоты могут быть объединены непосредственно в белки, дегредировать до аммония (NH_4^+), или преобразованы в глутамат. Их ассимиляция дрожжами более постепенна во время брожения, по сравнению с неорганическим азотом. Другой тип азота, аммоний, называемый неорганическим азотом, быстро потребляется дрожжами, но менее выгоден.

Воздействие азота на алкогольное брожение

Содержание YAN имеет большое влияние на брожение; воздействует на биомассу дрожжей, так же как на кинетику потребления сахара во время брожения. Как только азот сусла исчерпывается в конце фазы роста, наблюдаются резкие снижения синтеза белка и транспортной деятельности (Bely и др., 1994). Дополнение YAN к несовершенному в отношении азота суслу приводит к существенному сокращению длительности брожения. После дополнения YAN восстанавливается синтез белка и скорость транспорта сахара, что приводит брожение в норму.

Азот и ароматический профиль вина

Состав аминокислот сусла весьма важен для формирования ароматического профиля вина. Производство высших спиртов и эстеров (ацетат-эстеры и этил-эстеры) зависит от содержания аминокислот в сусле. Производство серы также связано с азотом. Когда усваиваемый азот исчерпан и/или есть дефицит метионина и его производных, создаются условия, способствующие синтезу H_2S . В общем, дополнение азота, снижает риск производства составов серы.

Сколько YAN необходимо?

Минимальное количество YAN – от 150 до 200 мг/л. Более низкие уровни в сусле рассматривают как «несовершенный азот». Этот минимальный уровень изменяется, основываясь на различных параметрах:

- О Температура: увеличение температуры стимулирует рост дрожжей, и более быстрое брожение требует увеличенного количества азота;
- О Кислород: большее добавление O_2 в сусло, способствует более быстрому захвату азота, и необходимо большее содержание азота по сравнению с брожением при анаэробных условиях (белое вино);
- О Начальное содержание сахаров: чем выше начальная концентрация, тем больше YAN требуется;
- О Мутность: в случаях чрезмерного осветления сусла большинство пищевых факторов для дрожжей будут удалены, поэтому необходимо добавить их с применением полных и сбалансированных питательных сред.

1.2 Кислород /факторы выживания (стеролы)

Кислород играет существенную роль в алкогольном брожении, помогая развитию адекватной популяции дрожжей и поддерживая их живучесть. Кислород необходим для синтеза факторов выживания, таких как стеролы и ненасыщенные жирные кислоты (Kirsop, 1973; Kirsop, 1978; Alexandre и др., 1994; Fornairon-Bonnefond и др., 2002), которые являются компонентами мембраны дрожжевой клетки. Они играют ключевую роль в структуре мембраны, помогая поддерживать ее текучесть, целостность и жизнеспособность клетки.

Кислород и затухающее брожение

В начале алкогольного брожения кислород быстро потребляется дрожжами и оксидазами, естественно присутствующими в сусле. Уменьшение доступности кислорода ответственно за угнетение процесса биосинтеза жирных кислот дрожжами.

Главные последствия:

- О Уменьшение роста дрожжей;
- О Уменьшение активности белков мембраны;
- О Уменьшение жизнеспособности дрожжей в конце брожения;
- О Увеличение уровня короткой и средней длины цепи жирных кислот.

Брожение

Увеличение уровня короткой и средней длины цепи жирных кислот.

Во время фазы роста дрожжей каждая мультипликация уменьшает содержание липидов клеток дрожжей. Когда количество липидов становятся недостаточными, мембрана не функционирует должным образом при ограниченном доступе кислорода. Стерины, расположенные вокруг белков мембраны и ответственные за селективность потока между внутренней и внешней средой, больше не синтезируются.

Смертность дрожжей увеличивается по мере накопления этанола во время брожения. Без адекватной концентрации стерола страдает пермеазная активность стенок дрожжей. Когда эти белки не функционируют соответствующим образом, при увеличенной концентрации этанола, начинается накопление H^+ ионов во внутриклеточной среде, и дрожжи, требуя энергии начинают экспульсировать ионы H^+ во внешнюю среду. Это приводит к быстрому окислению клетки (снижение внутриклеточного pH фактора), приводящему к смерти дрожжей и, как результат, недоброду. Так, чем больше стеролов синтезируется в мембране, тем лучше сопротивление клеток.

Добавление кислорода

Sablairolles и Barre (1986) показали эффективность дополнения 5 - 10 мг/л кислорода при брожении, когда O_2 добавляется в конце фазы роста клеток дрожжей. Большинство дрожжей все еще жизнеспособно в конце фазы роста и когда кислород поставляется после деления ячейки и растворения липида, кислород используется эффективно для дальнейшего синтеза стеролов (Kirsop, 1982). Blateyron и др., (1998), продемонстрировали, что броже-

ние всегда проходило до конца, когда O_2 был добавлен в этот момент.

Кислород может эффективно вноситься в сусло, например микросистемы кислородонасыщения учитывают очень точное количество и очень маленькие дозы. Также может использоваться перекачка сока или барботаж с соплами Вентури. Однако, последние два метода могут быть менее эффективными, так как сусло насыщаются и CO_2 . Поскольку дозами O_2 не всегда управляют на винных заводах, избегая отрицательного чрезмерного насыщения O_2 , которое может привести к окислению стеролов, можно использовать комплексные питательные вещества, содержащие дрожжи, поскольку дрожжи – естественный источник стеролов. Лучший момент для внесения этих питательных веществ - примерно $\frac{1}{3}$ алкогольного брожения (АБ, АФ), что приблизительно соответствует окончанию фазы роста дрожжей.

1.3 Минералы

Роли минералов в физиологии дрожжей и функции брожения не уделяли достаточно внимания в течении многих лет. Однако, минералы, такие как магний, являются абсолютно существенными для роста и метаболизма дрожжей, так же как и цинк, и калий.

Бионакопление в сусле этих полезных минералов низко, потому что они часто связываются с различными компонентами сусла, такими как белки и полифенолы. Также их уровень ниже в перезрелом винограде, и винограде, подвергнутому нападению грибов, которые потребляют большие количества минералов.

Тип почвы и методы виноградарства также влияют на содержание минералов. Однако, минералы могут быть добавлены в уравновешенном отношении; передозировка кальция может привести к подавлению эффективности магния (Walker, 1994).

Доказано, что при росте клеток дрожжей существует очень высокая потребность в магнии, который обязателен для гликолитических троп, а они требуются для гексокиназной и фосфофруктокиназной активности. Магний вовлечен также в активацию некоторых ферментов, этот элемент стабилизирует мембранную структуру, что может объяснить его

центральную роль в синтезе этанола. Ограниченная доступность магния ответственна за уменьшение роста дрожжей и снижение ферментативной активности (Dombek, 1986). Kunkee и Bisson (1993) отметили, что оптимальной концентрацией ионов магния, необходимой чтобы восстановить жизнеспособность дрожжей было 5мг/л. Другие авторы (Kudo и др., 1998) показали, что отношение калия к ионам водорода не затрагивает норму роста дрожжей или максимальной биомассы клетки, но действительно оказывает большое влияние на самобслуживание жизнеспособности клетки, поскольку дефицит калия может привести к остановившемуся брожению, особенно при низком рН-факторе.

Роль минералов:

- Кофакторы нескольких гликолитических ферментов;
- Увеличивают аденозинтрифосфатазную деятельность и перекачку составов через мембрану дрожжей;
- Увеличивают терпимость дрожжей к растущему этанолу и температуре (Рисунок 2);
- Оказывают антагонистический эффект на токсичность тяжелых металлов;
- Регулирование клеточного роста;
- Регулирование формирования алкоголя и эстеров.

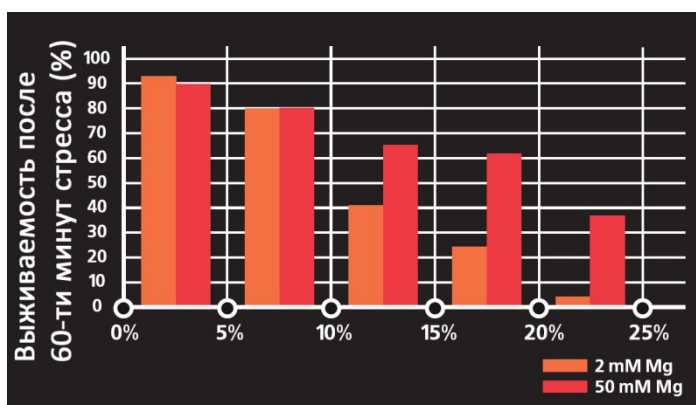


Рис.2. Положительный эффект концентрации магния на выживаемость дрожжей при различной концентрации алкоголя (Birch и Walker, 2000)

1.4 Витамины

Витамины - органические составы, важные для оптимального роста дрожжей и для их способности выжить в стрессовых условиях. Дефицит витаминов может вызвать внезапные изменения в кинетике брожения. Большинство их действует как ферментативные кофакторы, они могут также вмешаться в передачу энергии или в поддержку мембранной целостности.

Биотин, например, способствует производству эстеров и тем обеспечивает лучшую клеточную жизнеспособность для брожения. Недостаточная концентрация биотина существенно влияет на клеточный рост. Пантотеновая кислота (витамин B5) помогает избежать выработки H_2S , так же как и летучих кислот (Рисунок 3). Наконец, функция тиамина была предметом многочисленных исследований. Именно недостаточное содержание в сусле этого витамина может вызвать затухающее брожение.

Концентрация тиамина имеет большое влияние на кинетику брожения; его присутствие способствует производству биомассы дрожжей и увеличению скорости брожения (Bataillon и др., 1996).

Доступность витаминов в сусле

Большинство сусел изначально содержат основные витамины, необходимые дрожжам, но их концентрация значительно различается. Некоторые из них, такие как тиамин и биотин, поглощаются во время первой фазы брожения, тогда как другие, такие как пиридоксин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота и рибофлавин, остаются в сусле время постоянной фазы. Тиамин может вступить в реакцию с SO_2 , и поэтому не будет доступен для дрожжей. Кроме того, он может быть быстро усвоен. Было продемонстрировано, что в присутствии 10×10^6 клеток/мл *S. Cerevisiae*, фактически весь тиамин может исчезнуть в течение нескольких часов или еще быстрее в присутствии местной флоры (напр. *Kloeckera apiculata*). Во время стадии предброжения местные микроорганизмы потребляют большую часть основных витаминов, следовательно существует важность добавления ключевых ви-

таминов. Кроме того, дефицит часто связывается с определенными предферментативными обработками наряду с безудержными дополнением SO_2 и температурой.

В заключение превого раздела: питательный баланс виноградного сусла находится под влиянием параметров - здоровья винограда, урожая, уровня зрелости, почвы, климата и других методов виноградарства.

Каждый урожай винограда вносит свою собственную переменную, таким образом очень важно уменьшить риск вялого, остановившегося брожения или сенсорных отклонений в брожении. Один из ключей для надлежащего управления брожением - соответствующая пищевая стратегия.

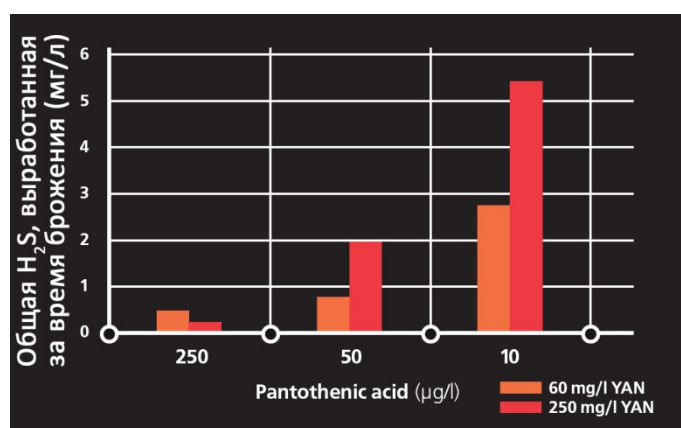


Рис.3. Влияние ассимиляционного азота и пантотеновой кислоты (синтетическое сусло) на выработку H_2S (сероводорода) *S. Cerevisiae* (C. Edwards, 2001)

2. Селекция и характеристика

«Приручение» дрожжей

Виноделы теперь могут выбрать соответствующие дрожжи, согласно особенностям сусла (то есть: алкоголь, усвояемое содержание азота, мутность, температура, и т.д...). Специальные дрожжи должны хорошо сбраживать при нормальных винодельческих условиях так же как и проявлять способность раскрыть потенциал винограда



Тестемония Dr Charles Edwards

Д-р Charles Edwards –Университет Штата Вашингтон: “Наша роль в появлении дрожжей YSEO® была ратификацией. В ходе первых, возможно двух лет, в нашей лаборатории мы провели множество испытаний по исследованию YSEO® при различных условиях, и мы повсюду получали подтверждение того, что процесс YSEO® улучшил качество работы дрожжей во

время брожения, особенно мы видели повышение полного выбраживания, а также изменения и в таких основных параметрах, как производство H_2S . Дрожжи, произведенные с использованием процесса YSEO®, по сравнению с тем же самым штаммом, произведенным стандартным методом, вырабатывали значительно меньше H_2S . Проводство в коммерческом масштабе мы начали с двух ферментеров для красных. Виноделам действительно нравилось качество вин, сброженных YSEO®, таким образом у нас была возможность продолжить исследование в следующих годах, и с каждым из лет объем вин, сброженных дрожжами, подготовленными по технологии YSEO®, увеличивался. Повсюду мы действительно видели сокращение времени до полного выбраживания, но, кроме того, виноделы действительно отмечали, что при использовании стандартно приготовленных дрожжей, иногда чувствовался запах сульфида, тогда как этого никогда не наблюдалось с дрожжами YSEO®.”

2.1 Yseo® дрожжи

В последние годы в виноделии стало широко распространенным применение селекционных дрожжей, что позволяет больше контролировать алкогольное брожение и уменьшает риск нежелательных сенсорных ошибок, которые следуют из-за роста и метаболизма диких дрожжей. Большинство аборигенных дрожжей не в состоянии закончить брожение, таким образом выбор дрожжей абсолютно фундаментален: это - дополнительный инструмент, позволяющий достичь требуемой специфики стиля вина. Выбор самых соответствующих штаммов дрожжей, основанный на параметрах сусла и типа винного стиля, является важным решением винодела. Ноу-хау Lallemmand сосредоточено на брожении. С 1970-ых опыт был успешно применен в энологии, используя характеристику и производство дрожжей. В сотрудничестве с национальными и региональными научно-

исследовательскими институтами они отобрали дрожжи, соответствующие потребностям виноделов, которые позволяют им управлять алкогольным брожением, выражать специфические вина, сохранять специфику терруара.

Сегодня Lallemmand производит более чем 150 штаммов энологических дрожжей, пытаясь не отставать от требований виноделия: наличие надежного брожения, раскрытие некоторых сортовых ароматов или ароматов, полученных во время брожения, воздействие на структуру, сохранение цвета, а так же другие специфические задачи в виноделии. Однако, сегодня виноделие становится более трудным для дрожжей из-за изменений климата, высоких уровней сахара, приводящих к высокому потенциальному алкоголю, увеличенному pH-фактору. Это принудило Lallemmand находить новые способы улучшить алкогольное брожение и способность дрожжей процветать при более трудных условиях.

YSEO® (Оптимизация Безопасности Дрожжей) является полностью оптимизированным процессом производства от мультипликации до сушки, с акцентом на том, как накормить дрожжи, чтобы сделать их более гибкими и приспособляемыми к более трудным энологическим условиям (Рисунок 7). В кратце, этот процесс оптимизирует выбор времени для внесения питательных веществ (азотсодержащие молекулы, витамины и микродозы минералов) во время роста дрожжей. Этот новый способ оптимизирует надежность алкогольного брожения с более короткой лаг-фазой (Рисунок 4), снижает риск выработки серы благодаря лучшей акклиматизации дрожжей в сусле (Bohlscheid, J. и др., 2007). Лабораторные и полевые испытания за предыдущие годы продемонстрировали, что в различных суслах, питательных условиях, дрожжи, произведенные процессом YSEO®, давали устойчивое и полное брожение наряду с уменьшением выработки H_2S и летучих кислот (Рисунки 5, 6). Кроме того, оказалось, что процесс YSEO® снижает антагонизм против яблочно-молочнокислых бактерий (ЯМБ), что приводит к более надежному яблочно – молочному брожению (ЯМБ).

Отметьте: YSEO® не заменяет хорошее питание дрожжей, надлежащую защиту дрожжей во время регидрации и приемлимых условий брожения, таких как температура, которая является основой оптимизации управления брожением, особенно при трудных условиях.

2.2 Характеризация селекционированных дрожжей:

Характеристика потребностей в азоте

Энологические исследования Lallemend затрагивают различные критерии выбора дрожжей и их адаптации к трудным условиям брожения. Особенно важны исследования стойкости дрожжей к различным факторам, с которыми они сталкиваются во время брожения, такими как высокий уровень этанола, низкий рН фактор, несбалансированное питание и температура. Ферментативная активность дрожжей при различных условиях является очень сложной переменной и для разных штаммов дрожжей (Jiranek

и др., 1991; Manginot и др., 1998; Julien и др., 2000).

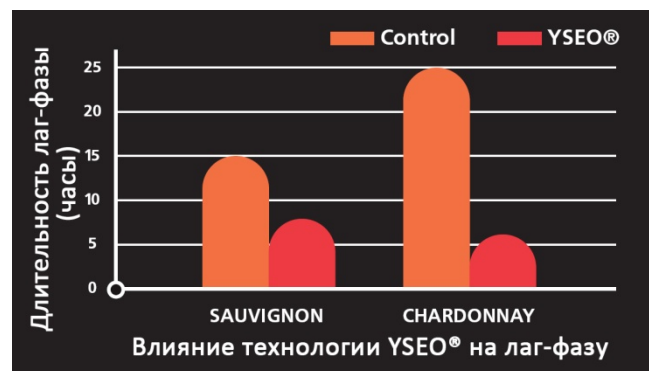


Рис. 4. Влияние YSEO® на лаг-фазу



Рис. 5. Влияние YSEO® на ход брожения

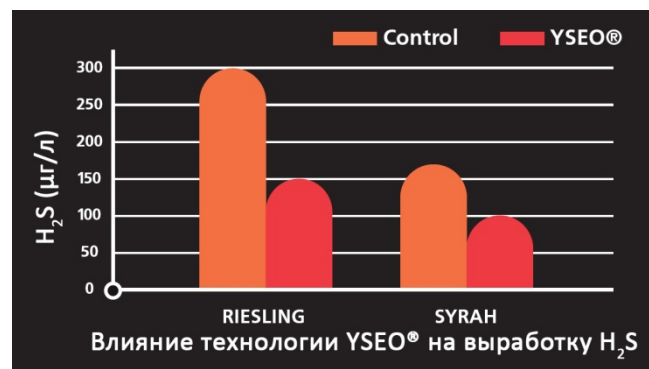


Рис. 6. Влияние YSEO® на производство серы

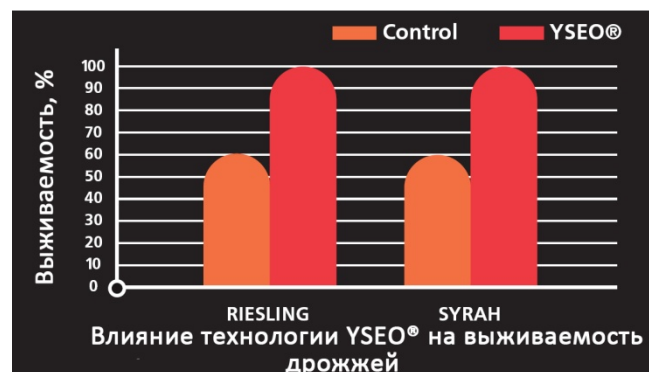


Рис. 7. Влияние YSEO® на выживаемость дрожжей

Начиная с 2001 года используется лабораторная система, контролирующая CO_2 , выработанный во время алкогольного брожения. Этот сильный инструмент позволяет Lallemend оценивать работу селекционированных дрожжей при различных условиях, например при недостаточном азоте. Потребность дрожжей в азоте оценивается во время постоянной фазы брожения, когда дополнения азота являются самыми эффективными (Bely и др., 1991). С помощью постоянного отслеживания кинетики брожения (по выработанному CO_2) можно сравнить количество требуемого азота для разных дрожжей с количеством азота, требуемого для брожения синтетического сусла при недостатке азота, при тех же самых показателях брожения. Свыше ста пятидесяти различных коммерческих винных дрожжей охарактеризованы по их относительной потребности в азоте; и при тех же самых условиях, некоторые штаммы требуют в три раза больше азота, чтобы получить одинаковый показатель кинетики брожения в обедненном азотом сусле.

Зная, что 1 грамм CO_2 , произведенного дрожжами соответствует 2,17 г потребленного дрожжами сахара, мы представили все результаты в мг азота, требуемых для потребления дрожжами 1 г сахара. Различия дрожжей в потребности азота видно на Рисунке 8. Согласно этим показателям дрожжи были сгруппированы и разбиты на шесть групп:

Группа 1: очень низкая потребность в азоте

Группа 2: низкая потребность в азоте

Группа 3: потребность в азоте от «низко» до «средне»

Эти 2 группы (2 и 3) представляют большую часть (более 50 %) изученных селекционированных дрожжей.

Группа 4: потребность в азоте от средней до высокой

Группа 5: высокая потребность в азоте

Группа 6: очень высокая потребность в азоте

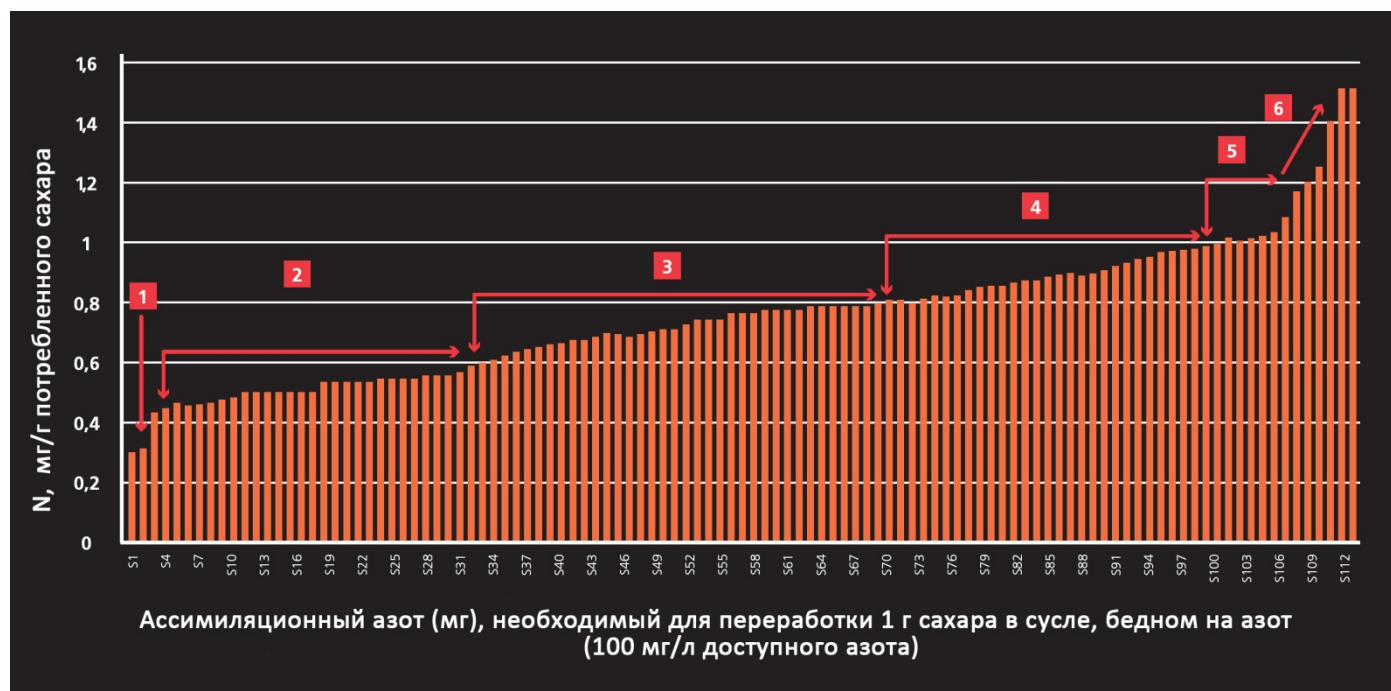


Рис. 8. Различия в относительной потребности в азоте у коммерческих расс дрожжей



Чтобы оценить уровень брожения и потребность в питании различных расс дрожжей Lallemend в тесном сотрудничестве с INRA Montpellier (благодаря экспертизе команды UMR-SPO) была создана система для онлайн - контроля брожения.



Тестемония Dr Jean-Michel Salmon

Д-р Jean-Michel Salmon - энолог UMR - Директор отдела Микробиологии и Технологии Брожения - Национальный Агрономический Исследовательский Институт (INRA - Montpellier - Франция): выживание дрожжей в условиях вина - постоянный вызов. Виноград и вино - чрезвычайно враждебные среды для дрожжей: очень высокая кислотность (один из самых высоких показателей среди растительности), высокое содержание алкоголя во время брожения, окружающая среда с относительно низким азотом, но богатая сахаром (самый высокий показатель среди растений). Дрожжи - лучший микроорганизм среди способных к сбраживанию, потому что приспосабливаются к окружающей среде. Плазменная мембрана, состоящая главным образом из липидов, включая стеролы и стерины, является первым барьером и играет ключевую роль в борьбе против неблагоприятных условий окружающей среды. Укрепление запасов стеролов дрожжей во время регидрации развивает ранних "защитников", и у дрожжей есть больше шансов сопротивляться враждебному окружению и полностью провести брожение сахара, поддерживая сенсорные свойства вина. Результатом исследований в сотрудничестве с Lallemand стало появление запатентованного процесса NATSTEP®.

2.3 Регидрация дрожжей

Оптимизация: Natstep® process
(PATENT WO/2006/053994)

Регидрация - решающая фаза для выживания и эффективности селекционированных дрожжей: часто случается, что половина популяции дрожжей умирает после плохой регидрации.

Что происходит во время регидрации?

Во время регидрации дрожжей активные сухие дрожжи поглощают воду и возвращают свою оригинальную форму (Рисунок 10). Органы в ячейке продолжают повторно гидратироваться, и часть их рассеивается в регидрационной воде. Эта часть может составлять 20-30% сухого веса дрожжей и может служить как микронутриентная среда.

Как любой живой организм, клетка дрожжей отделена от внеклеточной среды цитоплазматической мембраной. При энологических условиях отделяется интерьер клетки от сусла, затем от вина. Цитоплазматическая мембрана состоит из двуслойного чешуйчатого ламеллята, по большей части сделанного из липидов, которые создают

чрезвычайно гидрофобный барьер между интерьером клетки и внешним сбраживаемым суслом.

Однако, клетка должна быть в состоянии делиться, чтобы гарантировать ее численный рост: у этой цитоплазматической мембраны также есть белки, выполняющие роль пищевого транспорта, необходимого, чтобы поддерживать активный ферментативный метаболизм. Цитоплазматическая мембрана представляет чрезвычайно эффективный барьер к входу многих внешних молекул в ячейку, кроме маленьких гидрофобных или липофильных молекул и протонов (H^+). Чтобы бороться против пассивного распространения этих протонов от внешней среды в интерьер клетки, у цитоплазматической мембраны также есть очень важная для выживания ячейки в эно-среде ферментативная активность: аденозинтрифосфатный протон - насос. Как все живые организмы, клетка дрожжей должна поддерживать свою кислотность близкой к нейтральной (pH 7: низкий уровень протонов), тогда как ферментируемое сусло имеет очень сильную кислотность (pH 3: критически высокий уровень).

2.3.1 Стеро́лы: факторы выживания мембраны

Цитоплазматическая мембрана главным образом состоит из двух слоёв фосфолипидов, впитывающие радикалы которых ориентированы за пределы клетки, то время как их «хвосты» направлены внутрь клетки относительно мембраны, чтобы сформировать гидрофобную зону (Рисунок 9). Эта архитектура создается главным образом природой липида, который остается очень жидким и подвергается многим физическим и/или физико-химическим воздействиям внешней среды. Положение липидов стабилизировано маленькими молекулами, впитывающие «головы» которых также выставлены за пределы мембраны. Эти стеролы распределены неравномерно по площади мембраны и существуют зоны большей плотности вокруг транспортных белков, объединенных в пределах цитоплазматической мембраны. Ригидная структура этих стеролов окружает структурированные и менее склонные к текучести белки, что помогает им функционировать должным образом.

Молекулы этанола проявляют токсический эффект по отношению к цитоплазматической мембране

Во время алкогольного брожения способный к брожению сахар преобразуется в углекислый газ и этанол ферментативным метаболизмом дрожжей. Этанол - очень маленькая молекула, обладающая химическими свойствами, сходными с водой, и это позволяет вытеснять воду во многих ферментативных реакциях метаболизма. Эта молекула по ее физико-химическим свойствам распространяется чрезвычайно легко и свободно в цитоплазматической мембране, куда она попадает, замещая молекулы воды и таким образом участвует во взаимодействиях, существующих между белками и фосфолипидами в пределах этой мембраны. Интеграция этанола в цитоплазматической мембране в высоких концентрациях имеет тенденцию делать мембрану более проницаемую для протонов и уменьшает деятельность белков, таких как атфаза протонного транспорта (Рису-

нок 11.1). Клетка, чтобы поддержать хорошую жизнеспособность и дать компенсацию этому потоку протонов, должна потратить больше энергии в форме АТФ.

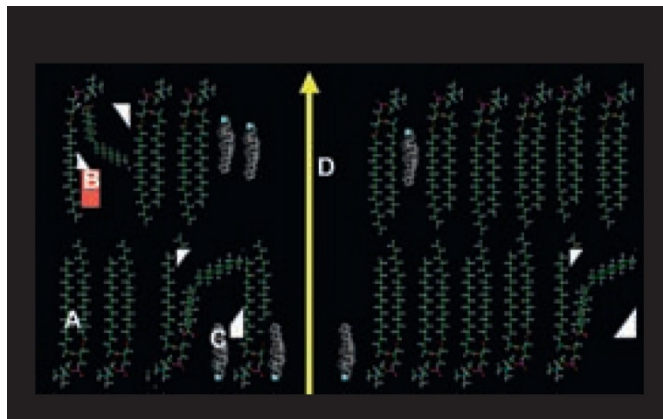


Рис. 9. Упрощенная схема, показывающая глобальный состав двойного липидного слоя мембраны и роли стеролов в стабилизации мембраны

А: фосфолипиды цепей насыщенных жирных кислот

В: фосфолипиды цепей ненасыщенных жирных кислот

С: стеролы/стерины

Д: транспортный белок, объединенный в цитоплазматической мембране.

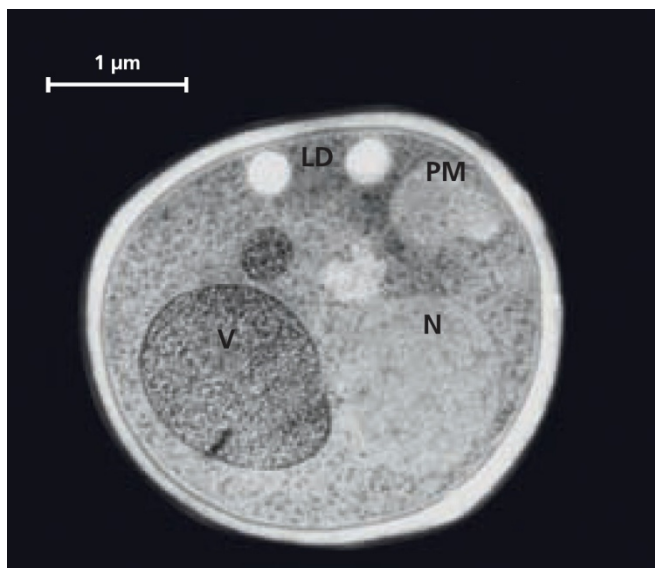


Рис. 10. Электронная микроскопия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* во время алкогольного брожения

PM: промитохондрия, N: ядро, V: vacuole, LD: включения липидов.

Плазменная мембрана состоит из двойного слоя липидов

Когда баланс между пассивными протонами (благодаря алкоголю) и активным выделением протонов (под влиянием клеточного метаболизма) больше не поддерживается, клетка умирает из-за внутриклеточного окисления (Рисунок 11.2).

Токсичность этанола оказывает прогрессивное и прямое влияние на метаболизм дрожжей и при высоких или низких температурах это воздействие более ощутимо.

Можем ли мы защитить дрожжи, и когда это необходимо делать?

Стероиды дрожжей, добавленные во время регидрации активных сухих дрожжей (ADY), особенно эффективны при возбуждающемся брожении. Полисахариды, стеролы и фосфолипиды, находящиеся в неактивных сухих дрожжах, принимают определенную форму, позволяющую объединение этих стеролов в мембрану клетки. Эти эмульсированные мицеллы необходимы приблизительно на середине процедуры регидрации в приблизительной концентрации 100 мг/л. При этой концентрации они быстро взаимодействуют с клеточной мембраной активных сухих дрожжей, изменяя мембранную клеточную плазму, тем самым увеличивая содержание стеролов в гидратированных дрожжах (Soubeyrand V и др. 2005; Luparia V и др. 2004).

Вносить дрожжи в агрессивное сусло и наблюдать, как они погибают, означает качественную и экономическую потерю. Защита дрожжей добавлением стеролов и полиненасыщенными жирными кислотами увеличивает их возможности выживания, оптимизирует сенсорное воздействие. Во время регидрации защищенные дрожжи поддерживают очень высокую жизнеспособность. Их мембрана в конечном счете в состоянии противостоять высоким концентрациям алкоголя и препятствовать тому, чтобы алкоголь проник в клетки. С этой защитой дрожжи могут потреблять весь сахар в сусле. Здоровые и не подверженные стрессу клетки дрожжей не производят чрезмерное количество нежелательных составов или летучих кислот. Микропитание (витамины и минералы) поглощаются дрожжами из регидрата-

ционной воды: сухие клетки действуют как губки, поглощая воду, их объем увеличивается в полтора раза. Это позволяет дрожжам быстро восстановить свой внутренний метаболизм. Микрозащитники, специфические стеролы и полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), постепенно интегрируются в мембрану дрожжей, усиливая ее и облегчая обмен с внешней средой, таким образом предотвращая потерю содержимого клетки. Во время взаимодействия с суслом дрожжи переносят осмотический шок из-за высокой концентрации сахаров в сусле. Особенные микропротекторы защищают дрожжи, помогая им сопротивляться шоку во время инокуляции в сусло: дрожжи могут акклиматизироваться лучше. В результате дрожжи меньше вырабатывают летучих кислот и серосодержащих составов, что влияет на итоговое качество вина. Во время фазы мультипликации дрожжей привитые дрожжи передадут часть собственного клеточного материала следующим поколениям дочерних клеток, постепенно уменьшая толщину мембраны клетки каждого последующего поколения.

Чтобы защитить дрожжи во время брожения, Lallemand в сотрудничестве с INRA разработали и запатентовали процесс NATSTEP® (WO/2006/053994). Этот процесс состоит из добавления специфических инaktivированных дрожжей во время регидрации селекционных дрожжей. Это дает более высокую норму выживания дрожжей, увеличивает их способность сопротивляться алкоголю и гарантирует полное выбраживание, ограничивая сенсорные отклонения, особенно при высоком потенциальном алкоголе или низкой мутности сусла. Защита дрожжей уменьшит их стресс во время брожения и позволит им лучше бороться против контаминационной флоры и избежать последующего риска развития *Brettanomyces* или других организмов, вызывающих порчу.

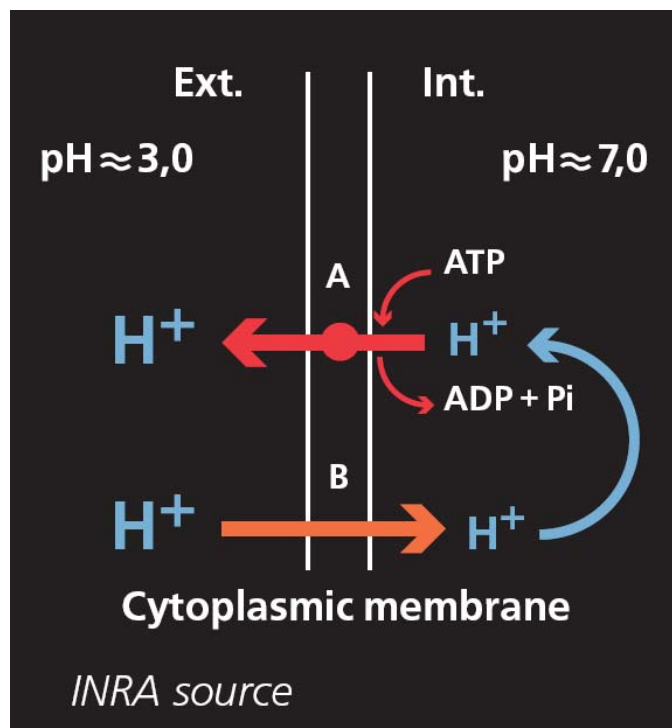


Рис. 11.1. Интеграция этанола в цитоплазматической мембране.

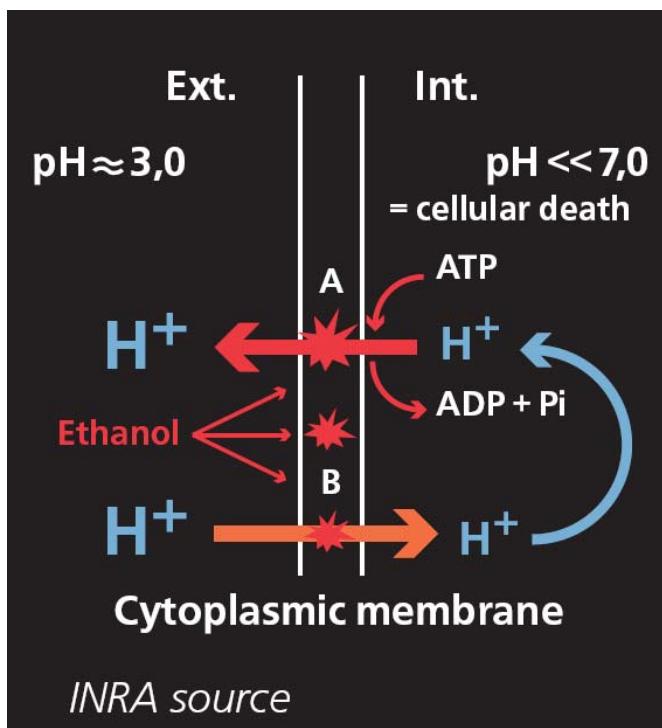
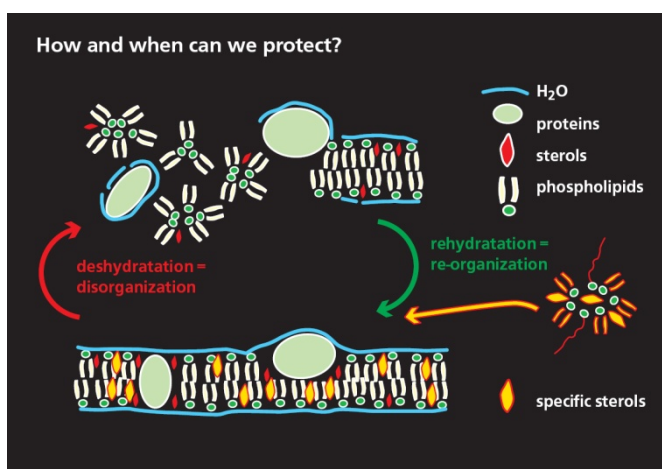
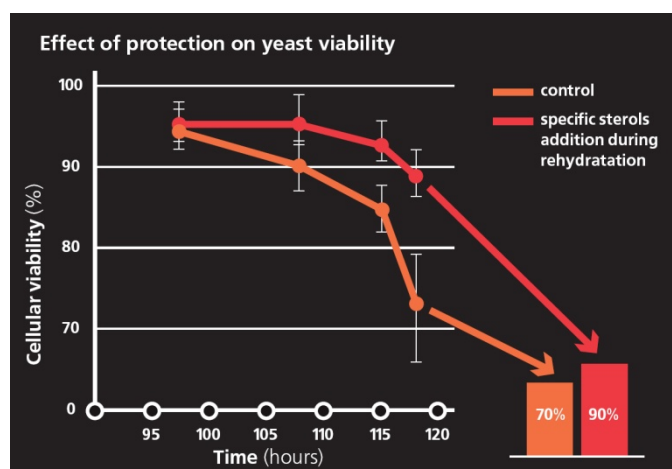
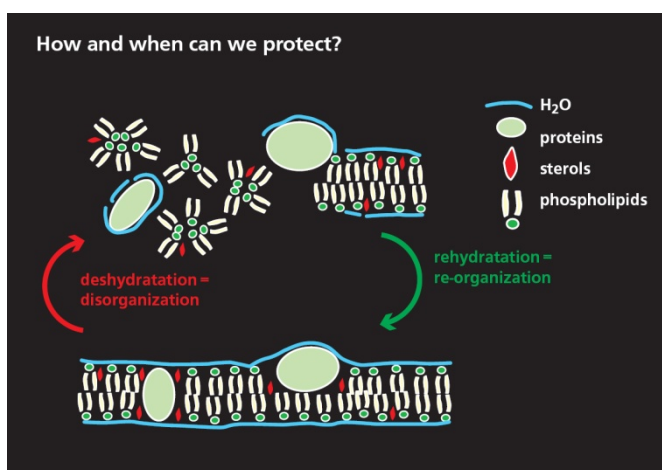
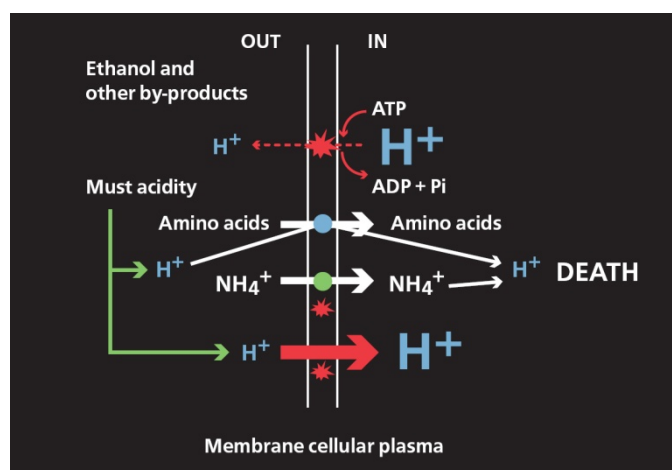


Рис. 11.2. Гибель клетки из-за внутриклеточного окисления.



3. Управление питанием дрожжей

Тестемония Dr Jean-Marie Sablayrolles



Д-р Jean-Marie Sablayrolles – энолог UMR – Директор отделения энологии – Национальный Агрономический Исследовательский Институт (INRA - Montpellier - Франция): “ В брожении содержание азота в сусле влияет не только на популяцию дрожжей, но также и на кинетику потребления сахара. Часто это фактор, ограничивающий кинетику брожения. Так, содержание азота непосредственно влияет на скорость брожения. При брожении доступный азот потребляется очень быстро и норма синтеза белка, как и норма транспорта сахара, быстро снижаются. Чтобы преодолеть эти недостатки, вносят азот или азотсодержащие вещества (такие, как комплексные питательные вещества), что приводит к очень существенному сокращению продолжительности брожения. Дополнение азота быстро восстанавливает скорость брожения, возобновляет синтез белка и транспортеров сахара. Важно отметить, что разовое дополнение азота, сделанное в начале брожения увеличивает популяцию дрожжей. С технологической точки зрения наилучшее время, чтобы выполнить это дополнение - приблизительно $\frac{1}{3}$ алкогольного брожения: это время также оптимально для того, чтобы добавить факторы выживания или кислород. В случаях чрезвычайного недостатка в доступном азоте, добавление половины азота на начале АБ и оставшейся части на $\frac{1}{3}$ АБ является эффективным решением. Наконец, важно отличить две связанных проблемы брожения: брожение и недоброд. Действительно, недоброд, вялое брожение - это зачастую результат дефицита доступного азота. Остановившееся брожение происходит, когда дрожжи погибают не только из-за дефицита азота, но нехватки факторов выживания, таких как стеролы и кислород.”

3.1 Важность применения комплексного питания, такого как Fermaid®

Комплексное питательное вещество - смесь солей аммония, тиамина, витаминов, минералов и специфических инактивированных дрожжей, которые являются естественным источником аминокислот. Lallemand, как производитель дрожжей, проверяет широкий спектр дрожжей, которые могут быть инактивированы, чтобы выбрать самые соответствующие, способные добавить естественным образом эти компоненты в сусло во время алкогольного брожения.

Цель этих сложных питательных веществ состоит в том, чтобы добавить интегрированную пищу для дрожжей в случае дефицита YAN в сусле. Усвояемый азот поставляется двумя источниками: альфа-аминокислоты и аммоний. В зависимости от содержания YAN и сахара (Таблица 1), рекомендуются одно или два дополнения. Если будет только одно дополнение, его надо

сделать на $\frac{1}{3}$ алкогольного брожения. Если планируются два дополнения, то одно внесение должно быть в начале, и затем при достижении $\frac{1}{3}$ АБ.

В случае одного дополнения, выбор времени дополнения предоставит селекционным дрожжам факторы роста, чтобы уверенно оживить синтез и активность транспортных белков, когда усвояемый азот в сусле исчерпан. Комплексные питательные вещества помогут росту дрожжей в начале алкогольного брожения, а также поддержат хорошую ферментативную деятельность, что уменьшает риск недоброда и вялого брожения, предотвращает формирование серосодержащих составов.

Подводя итоги, можно сказать: комплексные питательные вещества, такие как Fermaid®, будут оказывать эффект на клеточный рост и ферментативную деятельность, улучшая размножение дрожжей, потребление сахара и выражение аромата.

30 г/Гл	Natstep защита	Fermaid комплексное питание	Fermaid органическое питание	ДАФ неорганическое питание
YAN	8-10 мг/л	25-42 мг/л	12 мг/л	63 мг/л
Аминокислоты	+	+	+++	-
N ₂ неорганический	-	++	-	+++
Стероиды	+++	+	+	-
Минералы	++	++	+	-
Витамины	++	+++	+	-
Время внесения	Регидрация	Начало и/или 1/3 АБ	Начало и 1/3 АБ	1/3 АБ
Сенсорный эффект	+++	+++	+++	H ₂ S, VA
				- нет
				++ средне
				+ низко
				+++ высоко

Таблица 1. Сравнение питательных и защитных свойств различных источников

4. Остановившееся брожение

Д-р Paul Monk имел обыкновение говорить: “Лучшее решение для недоброда - предотвращение”, но это не походит в случае, если профилактические меры приняты, а проблемы все еще происходят. Для трудных условий используйте традиционный метод постепенной акклиматизации дрожжей к антагонистической винной среде. Какой бы метод возобновления брожения Вы не решили использовать, важно реагировать быстро, как только обнаружена проблема.

4.1 Подготовка недобродившего вина к возобновлению брожения

Выполните процедуры для предотвращения размножения бактерий порчи: внесите SO₂ и/или Lallzyme Lysozyme™. Внесение Nutrient Vit End™ в количестве 40 г/Гл помогает удалить потенциальные ингибиторы из вина. Разведите Nutrient Vit End™ в теплой воде, внесите в вино, не используя активного перемешивания, дайте выпасть осадку в течение 48 часов, затем декантируйте или профильтруйте вино.

4.2 Подготовка дрожжей

Выберите "спасательные" дрожжи, которые являются стойкими к алкоголю, мощным сбраживателем, имеют фруктофильный характер. Вычислите количество дрожжей, требуемых для полного объема недобродившего вина из расчета 50 г/Гл. Используйте двойную дозу, 100 г/Гл, если Вы не можете контролировать температуру. Вычислите ко-

личество требуемого защитного средства NATSTEP® (1.25 к весу дрожжей). Разведите NATSTEP® в 20 кратном по весу объеме чистой не хлорированной воды при t=43°C (приблизительно 2-литра воды на каждые 100 грамм NATSTEP®). Тщательно размешайте суспензию до полного растворения и дайте охладиться до 35-40°C. Когда суспензия хладилась, разведите в ней дрожжи. Аккуратно перемешивайте не допуская образования комков, избегая ударов и использования высокооборотистых мешалок. Оставьте суспензию на 15 - 30 минут прежде, чем внести дрожжи в смесь воды, вина и сахара. Разница температур дрожжевой разводки и суслу не должна превышать 8°C.

4.3 Активация подготовленных «спасательных» дрожжей. Питание и сахар

Содержание питательных веществ в недоброженном вине наиболее вероятно будет весьма низким и неспособным поддерживать рост дрожжей. Кроме того, спасательная культура дрожжей требует адаптации к содержанию алкоголя в вине. Подготовьте следующую стартовую смесь и доведите ее температуру до 25–30°C:

- 2.5 % объема недобродившего вина
- 2.5 % объема воды
- Комплексная подпитка 50г/Гл этой смеси
- Приведите сахар этой смеси к 5°Brix соком, концентратом или сахаром.

4.4 Рестарт брожения и непрерывное добавление недобродившего вина

- a) Медленно добавьте дрожжевую разводку в смесь вино/вода/сахар, перемешайте до полного распределения и поддерживайте температуру в пределах 20-24°C.
- b) Контролируйте уровень сахара стартового сусла. Когда уровень сахара снизится наполовину (приблизительно 2.5°Brix), начните добавлять недобродившее вино. Поддерживайте температуру 20-24°C.
- c) Добавьте 25 г/Гл Vit End™ в каждую порцию прибавляемого недоброжденного вина.
- d) Правильное время, чтобы добавить новую порцию - когда сахар от предыдущего дополнения уменьшился на половину. Только в последнем заходе сахар должен быть потреблен полностью.

Библиография и словарь терминов

Agenbach W. A. *A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity.* Proc. South African Soc. Enol. Vitic., Cape town, South Africa. Stellenbosch SA, 66-87. (1977)

Albers, E., C. Larsson, et al. *Influence of the nitrogen source on saccharomyces cerevisiae. Anaerobic growth and product formation. Applied and environmental microbiology.* 62:3187-3195. (1996)

Alexandre H.; Long T. N., Feuillat M. and C. Charpentier. *Contribution à l'étude des bourbes : Influence sur la fermentiscibilité des moûts.* Revue Française d'oenologie, 146, 11-19. (1994)

Amerine, M.A, H.W. Berg et al. *The composition of grapes and wines. In: the technology of winemaking* (4th ed.). Westport, Connecticut (1980)

Aries V and BH Kirsop. *Sterols biosynthesis by strains of saccharomyces cerevisiae in presence and absence of dissolved oxygen.* J. Inst. Brew. 84: 118-122. (1978)

Bataillon M., A Rico, JM Sablayrolles, JM Salmon And P Barre. *Early thiamine assimilation by yeasts under enological conditions : impact on alcoholic fermentation kinetics.* J Ferm. Bioeng. 82: 145-150. (1996)

Bely M, JM Sablayrolles and P Barre. *Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions.* J.Ferm. Bioeng. 70: 246-252. (1991)

Bely M., Sablayrolles J.M and P. Barre. *Description of alcoholic fermentation kinetics : its variability and significance.* American Journal of Enology and Viticulture. 41 (4), 319-324. (1990)

Bely M., J.M. Salmon and P. Barre. *Assimilable nitrogen additions and hexose transport activity during enological fermentations.* J. Inst. Brew. 100:279-282 (1994)

Bertrand A., et A. Miele. *Influence de la clarification du moût de raisin sur sa teneur en acides gras.* Conn. Vigne Vin, 18, (4), 293-297. (1984)

Bezenger M., Navarro J.M. *Influence de l'azote sur La fermentation alcoolique en milieu*

modèle simulant les conditions de l'oenologie. Sciences des aliments, 7, 41-60. (1987)

Blateyron L, E Aguera, C Dubois, C Gerland and JM Sablayrolles. *Control of oxygen additions during alcoholic fermentations.* Vitic. Enol. Sci. 53: 131-135. (1998)

Busturia A and R Lagunas. *Catabolic inactivation of the glucose transport system in saccharomyces cerevisiae.* J. Gen. Microbiol. 132: 379-385. (1986)

David MH and BH Kirsop. *A correlation between oxygen requirements and the products of sterol synthesis in strain saccharomyces cerevisiae.* J. Gen. Microbiol. 77: 527-531. (1973)

Dombek KM and LO Ingram. *Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol in yeast fermentation.* Appl. Environ. Microbiol. 52 : 975-981.(1986)

Echeverrigaray S., Tavares F.C.A, Gomes L.H., and F.C. Boscariol. *Inhibition of yeast growth by herbicides.* Ciencia e cultura, 43, (6), 457-459. (1991)

Eglinton J. M., Henschke P. A. *Can the addition of vitamins during fermentation be justified ?* The Australian Grapegrower and Wine-maker, 47-52. (1993)

Francisco F. Monteiro and Linda F. Bisson. *Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations,* Am. J. Enol. Vitic.; 42: 47 - 57. (1991)

Fornairon-Bonnefond C., Desmaretz V., Rosenfeld E., Salmon J.M. *Oxygen addition and sterol synthesis in Saccharomyces cerevisiae during enological fermentation.* J. Biosci. Bioeng., 93, 176-182.(2002)

Henschke P and V Jiranek. *Yeast metabolism of nitrogen compounds.* Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (Eds) 77-165. (1993)

Houtman A. And C. D Plessis. *Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation.* S. Afr. J. Enol. Vitic., 7,39-46. (1986)

Jiranek V, P Langridge and P Henschke. *Yeast nitrogen demand: selection criterion for wine yeasts for fermenting low nitrogen musts.* In: Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines. Rantz J. (Ed.), 266-269. (1991)

Julien A, JL Roustan, L Dulau and JM Sablayrolles. *Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences*. Am.J. Enol. Vitic. 51 (3). (2000)

Kirsop, B.H. *Developments in beer fermentation in topics Enz. Ferm. Biotechnology*, 6, 79-105. (1982)

Kunkee RE, Bisson LF. *Wine-making yeasts*. In: Rose AH, Harrison JS, editors. the yeasts. Volume 5, yeast technology. New York: Academic Press (1993)

Lafourcade S and E. Peynaud. *Sur les teneurs des vins et des jus de raisin*. Industr. Alim. Agr. 897-904.(1957)

Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M. *Assimilation of grape phytosterols by saccharomyces cerevisiae and their impact on enological fermentations*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65, 25-32. (2004)

Manginot C, JL Roustan and JM Sablayrolles. *Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. Enzyme and Microbial Technology*. 20:373-380. (1998)

Masayoshi Kudo, Paola Vagnoli, and Linda F. Bisson. *Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations*. Am. J. Enol. Vitic., 49: 295 - 301. (1998)

Ournac A and M Flanzly. *Localisation et évolution de la vitamine B1 dans le vin*. Ann. Techn. 3 :257-292. (1970)

Sablayrolles JM and P Barre. *Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions oenologiques stimulées*. Sci. Alim. 6 :373-383. (1986)

Sablayrolles JM, C Dubois, C Manginot, JL Roustan and P Barre. *Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations*. J. Ferm.Bioeng. 82: 377-381. (1996)

Sablayrolles JM, JM Salmon and P Barre. *Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'azote ammoniacal et d'oxygène*. Revue Française d'oenologie. 25-29. (1996)

Soubeyrand V., Luparia V., Williams P., Doco T., Vernhet A., Ortiz-Julien A., Salmon J.M. *Improvement of the fermenting capacity of active dry yeast (ADY) by solubilized sterols during rehydration*. J. Agric. Food Chem. (2005)

Suarez J.A., Barcenilla J., Apellaniz M.L., Navascues E., Dulau L., and A.T. Palacios. *Effectos de los tratamientos antibotriticos en la fermentacion de levaduras seleccionadas en espana*. (2000)

Walker GM. *The role of magnesium in biotechnology*. Critic. Rev. Biotechnol. 14: 311-354. (1994)

Правовая оговорка: Информация, предоставленная здесь, верна и предоставлена согласно лучшим нашим знаниям. *Lallemand* подготовил эту публикацию для использования профессиональными виноделами как резюме существующих научных знаний. Пользователь несет персональную ответственность за использование любой информации этого издания с целью получения выгоды. Информацию и методы, представленные в этой публикации, нельзя рассмотреть как технологический процесс производства ни в какой производящей вино стране. Все права защищены. Информация данной публикации не может быть воспроизведена ни в какой форме. Использование полностью или частично каким-либо образом – только с письменного разрешения *Lallemand Inc.*

Все торговые марки и зарегистрированные имена являются собственностью *Lallemand inc.* Право на использование русскоязычной версии принадлежит ООО «Биомастер», Украина. Перевод ©Филько Я.В., «Биомастер» ООО, 2011г.

Filko@biomaster.com.ua

Словарь

AA: Amino acids - Аминокислоты

ADY: Active dry yeast – Активные сухие дрожжи

AF: Alcoholic fermentation – Алкогольное брожение, АБ

DAP: Diammonium phosphate – Диаммоний фосфат, ДАФ

DAS: Diammonium sulphate – Диаммоний сульфат, ДАС

GAP: General amino permease – Главная аминокпермеаза

MCFA: Medium-chain fatty-acids – Жирные кислоты средней длины

MLB: Malolactic bacteria – Яблочно-молочная бактерия, ЯМБ

MLF: Malolactic fermentation – Яблочно-молочное брожение, ЯМБ

NTU: Nephelometric turbidity unit – Нефелометрическая единица мутности

PUFA: Polyunsaturated fatty acids – Полиненасыщенные жирные кислоты

VA: Volatile acidity – Летучие кислоты, ЛК

YAN: Yeast assimilable nitrogen – Азот, ассимилируемый дрожжами; доступный азот

Lallemand SAS

19, rue des Briquetiers - BP 59 - 31702 Blagnac Cedex
FRANCE



ООО «БИОМАСТЕР»

Тел.: +38 (044) 355-01-91

Факс: +38 (044) 423-12-18

E-mail: info@biomaster.com.ua

www.biomaster.com.ua

