

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ ХРАНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Л.В. Пермякова

*Важными этапами в процессе ведения дрожжевой культуры в производстве пива являются ее хранение и подготовка к следующему циклу брожения. От условий выполнения этих операций зависит жизнеспособность и активность популяции, процесс ферментации сусла и качество готового пива. С целью исследования влияния на семенные дрожжи традиционных для суспендирования сред (воды, молодого пива, 11 %-го пивного сусла) проведена оценка изменения физиолого-биохимических и технологических характеристик культуры в процессе ее длительного хранения (от 2 до 7 суток при температуре 2–4 °С). Установлено возрастание количества клеток нежизнеспособных, снижение клеток с запасом гликогена, активности ферментов (мальтазы и зимазы) дрожжей, ухудшение способности к оседанию, состава среды инкубации (увеличение аминного азота, рН и кислотности). Данные сдвиги проявляются в большей степени при суспендировании инокулята в воде, в меньшей мере – в молодом пиве в сравнении с пивным суслом, а также с удлинением срока хранения. Возможные причины этого – нарушение проницаемости клеточной оболочки дрожжей и автолитические процессы в условиях недостатка питания. Полноценность состава сусла нивелирует происходящие процессы, обеспечивая определенный рост активности ферментов и размножение дрожжей. Длительное нахождение культуры даже под слоем сусла приводит к негативным изменениям исследуемых показателей. Обновление (не реже одного раза в два дня) среды инкубации позволяет хранить семенные дрожжи более 2 суток без существенного ухудшения физиологической и ферментативной активности, технологических функций.*

*Ключевые слова: дрожжи пивные семенные, хранение, среда инкубации, вода, сусло пивное, молодое пиво, физиологическое состояние, активность ферментов, флокуляция.*

В пивоварении большое значение имеют условия жизнедеятельности дрожжей и их физиологическое состояние. Особое внимание в процессе ведения культуры в производстве уделяют хранению семенных дрожжей и подготовке инокулята к брожению. Не всегда в реальных условиях пивзаводов параметры осуществления данных операций отвечают необходимым требованиям. Причины отклонений могут быть обусловлены неправильной работой с дрожжами: несвоевременный съем после брожения, хранение при повышенной температуре и/или в дефицитной по питательным веществам среде, нарушение нормативных сроков хранения (не более 2 суток). Это способствует ухудшению физиолого-биохимических и технологических свойств культуры и, в конечном итоге, негативно отражается на ходе процесса ферментации сусла и качестве готового напитка [1–5].

В производственной практике в качестве среды хранения семенных дрожжей используют воду, молодое пиво или пивное сусло [1–3, 6]. Однако в литературе отсутствуют исследования по сравнительной эффективности сред инкубации дрожжей и процессов,

происходящих при длительном хранении культуры.

Цель работы – изучение влияния среды суспендирования дрожжей на изменение в процессе хранения физиологического состояния культуры, ее ферментативной активности, технологических характеристик.

Объект изучения – производственные пивные дрожжи низового брожения третьей-девятой генерации рас С34 и 129 (при исследовании ферментативной активности). Средами инкубации дрожжей служили вода, молодое пиво сорта «Жигулевское», 11 %-е охмеленное пивное сусло.

Постановка эксперимента заключалась в следующем: дрожжи, снятые после окончания брожения, смешивали со средой в соотношении 1:1 и хранили при температуре 2–4 °С от 2-х до 7-х суток.

Физиологическое состояние дрожжей оценивали по концентрации клеток: почкующихся – методом прямого счета в камере Горяева, нежизнеспособных – путем микроскопирования с окрашиванием метиленовым синим по Финку, гликогенсодержащих – методом окрашивания раствором Люголя. Сползуновский вестник № 1 2018

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ ХРАНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

способность дрожжей к флокуляции определяли методом Барна по объему осадка (в см<sup>3</sup>), образовавшегося через 10 минут отстаивания дрожжевой суспензии [7].

Активность дрожжевых ферментов α-глюкозидазы (мальтазы) и зимазного комплекса определяли поляриметрическим методом по скорости ферментативного гидролиза мальтозы и потребления глюкозы соответственно [8].

Определение в средах инкубации активной и титруемой кислотности, аминного азота проводили общепринятыми в пивоварении методами.

Результаты эксперимента, полученные не менее чем в трех повторностях, обрабатывали статистически по Фишеру-Стюденту при уровне надежности 95 %. Величины доверительных интервалов не превышали 5 %.

На первом этапе работы исследовали изменение состава среды инкубации семенных дрожжей в процессе хранения культуры. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изменение показателей среды инкубации дрожжей в процессе хранения

Среда инкубации	Хранение, сут	pH	Кислотность, к. ед.	Аминный азот, мг/100 см <sup>3</sup>
Вода	0	7,51	-	-
	1	6,73	2,10	8,42
	2	5,49	3,53	8,84
Молодое пиво	0	4,5	2,62	19,60
	1	5,1	5,00	30,81
	2	5,43	5,53	33,64
Пивное сусло	0	5,2	2,00	25,06
	1	5,3	3,94	31,00
	2	5,6	5,33	36,42

Характер трансформации исследуемых показателей связан с тем, в какой среде хранят дрожжи. Нахождение дрожжей под слоем воды в течение двух суток приводит к резкому снижению pH (на 2 ед. в сравнении с исходной величиной), значительному повышению кислотности и появлению аминокислот в среде инкубации.

При использовании молодого пива и охмеленного сусла происходит, наоборот, возрастание pH, причем в большей степени (на 0,9 ед.) при хранении дрожжей в молодом пиве. Кислотность среды увеличивается – в первом случае в 2,1 раза, во втором – в 2,7 раза.

Наблюдается нарастание аминного азота в среде суспендирования: более суще-

ственное при нахождении дрожжей под слоем молодого пива, чем сусла (соответственно на 71 и 44 % по отношению к исходному значению).

Происходящие изменения, очевидно, связаны с потерей проницаемости клеточной оболочки дрожжей в неблагоприятных условиях и начавшимся автолизом. Результатом этих процессов является выделение в среду содержащихся в клетке веществ (белков, аминокислот, ферментов и др.), которые оказывают в дальнейшем отрицательное влияние на фильтруемость пива, его коллоидную стойкость и пеностойкость [1, 3, 4].

В процессе хранения оценивали также показатели физиологического состояния (рисунок 1) дрожжевой культуры. Из используемых сред наиболее отрицательное воздействие на физиологические характеристики популяции оказывает вода. Количество клеток с гликогеном в сравнении с исходной величиной снижается на 50 %, а содержание мертвых клеток возрастает на 40 %.

Данный факт объясняется отсутствием в указанной среде хранения питательных веществ, а также быстрым расходом запасов внутриклеточного гликогена на поддержание жизнедеятельности клетки.

Пивное сусло – особенно благоприятная среда для инкубации дрожжей, что связано с полноценностью его состава: содержанием необходимого количества углеводов, являющихся субстратом для синтеза гликогена, азотистых веществ, а также микроэлементов, витаминов, обеспечивающих рост и размножение дрожжевой клетки. Хранение культуры в сусле в течение первых двух суток приводит к увеличению в 2 раза клеток гликогенсодержащих и резкому снижению (на 36 %) нежизнеспособных особей.

Однако дальнейшее нахождение дрожжевой культуры под слоем сусла без смены среды ухудшает исследуемые показатели. Более существенная трансформация произошла в содержании клеток с гликогеном: к четвертым суткам их количество снизилось до первоначальной величины.

Вероятная причина этого связана с тем, что в условиях высокой концентрации дрожжей происходит быстрое потребление сбраживаемых углеводов среды с образованием продуктов обмена веществ, неблагоприятно влияющих на жизненную активность культуры.

Аналогичные изменения физиологических показателей дрожжей наблюдаются при суспендировании в молодом пиве. Однако они менее выражены, чем при инкубации в

сусле. В первые сутки хранения количество клеток с гликогеном возросло на 55 % по отношению к исходной величине, содержание мертвых клеток снизилось на 40 %. Далее происходит ухудшение физиологического состояния популяции, что особенно наглядно проявляется в увеличении клеток нежизнеспособных.

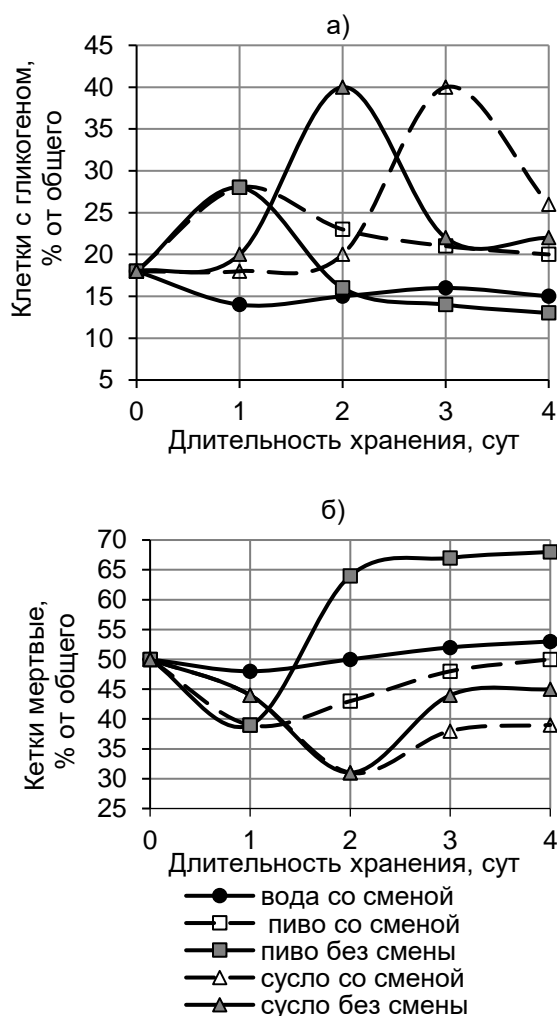


Рисунок 1 – Влияние среды и длительности хранения на содержание в дрожжевой суспензии клеток: а) с гликогеном, б) нежизнеспособных

В молодом пиве в сравнении с суслom питательных веществ недостаточно, хотя еще имеются несброженные сахара, аминокислоты, но в то же время содержится спирт, побочные продукты, подавляющие в определенной степени размножение и развитие дрожжей.

На состояние дрожжевой культуры оказывает влияние периодическая смена среды в процессе хранения. При ежедневной смене

среды качественные показатели дрожжей изменяются в меньшей степени, чем при нахождении культуры постоянно под слоем однотипной среды (рисунок 1).

Одним из важнейших технологических показателей пивных дрожжей является их способность к флокуляции [1, 3, 9]. Считается, что если объем осадка через 10 минут отстаивания дрожжевой суспензии больше 5 см<sup>3</sup>, то клетки хорошо флокулируют, если меньше 5 см<sup>3</sup>, то клетки оседают слабо [7].

Была определена флокуляционная способность дрожжей различных генераций и разных сроков хранения под слоем молодого пива в условиях пивзавода, причем температура в дрожжевом отделении составляла 6°С.

Результаты свидетельствуют (таблица 2) о более медленном оседании клеток при длительном инкубировании дрожжей, что наглядно видно на примере 8-й генерации, хранившейся 4 и 7 суток. Важно отметить, что на флокуляции клеток отрицательно сказывается и высокая температура хранения биомассы.

Таблица 2 – Способность дрожжей к флокуляции в зависимости от генерации и длительности хранения

Генера-ция дрожжей	Срок хранения, сут	Длительность осаждения, мин		
		3	5	10
Объем осадка, см <sup>3</sup>				
8'	4	4,0	4,2	4,6
8''	7	3,2	3,4	3,6
9	7	3,4	3,6	4,2

Использование таких дрожжей для сбраживания сусла может быть причиной плохого осветления пива и дальнейших проблем с его фильтрованием, биологической и коллоидной стойкостью. Кроме того, практика действующих пивзаводов подтверждает данный факт и показывает, что применение некоторых импортных рас дрожжей (например, 308, 129, 34), особенно в режиме теплого брожения, приводит к плохому оседанию клеток в конце процесса ферментации [10].

Помимо этого, при увеличении срока хранения дрожжевой культуры в отсутствие индуцирующих концентраций мальтозы или ассимилируемого азота происходит потеря мальтозопермеазной активности, отвечающей за перенос мальтозы внутрь клетки для последующего ее расщепления [11,12]. В подобных условиях длительность брожения увеличивается на время, необходимое клетке для синтеза новых ферментов.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ ХРАНЕНИЯ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Процесс спиртового брожения, как и его подготовительной стадии, катализируется различными ферментами дрожжевой клетки. Зимаза – основной ферментативный комплекс дрожжей, ответственный за процесс собственно спиртового брожения. Одним из ферментов подготовительной стадии гликолиза является  $\alpha$ -глюкозидаза (мальтаза), поэтому ее роль достаточно велика в подготовке сахаров среды к сбраживанию дрожжами.

Анализ влияния среды хранения на ферментативную активность дрожжей (раса 129) показывает следующее (рисунок 2).

В водной среде и в молодом пиве мальтазная активность снижается, причем в первом случае изменения более выражены. На третьи сутки нахождения дрожжевой биомассы под водой активность данного фермента составляет лишь 21 % от исходной величины, в то время как при хранении под слоем молодого пива 70 %.

Изменение мальтазной активности при использовании в качестве среды инкубации пивного суслу носит синусоидальный характер. В точке максимума, достигаемой на вторые сутки хранения дрожжей, активность фермента на 27 % больше, чем в исходной культуре. Дальнейшее нахождение инокулята в сусле приводит к снижению ферментативной активности, однако, несмотря на это, значение ее все же выше, чем в дрожжах, суспендированных в воде и молодом пиве.

Известно [1, 12], что мальтаза является адаптивным ферментом, то есть появляется в клетке только при наличии в среде необходимого субстрата. Исходя из этого, можно объяснить изменение активности фермента в процессе хранения дрожжей в различных средах.

Уменьшение активности фермента при инкубации дрожжевой культуры в воде связано с отсутствием в ней субстрата – мальтозы.

Менее выраженное снижение активности  $\alpha$ -глюкозидазы в дрожжах, суспендированных в молодом пиве, можно связать с присутствием в данной среде небольшого количества сахаров. Однако, наличие в пиве спирта и побочных продуктов брожения, вероятно, приводит к инактивации фермента.

Полноценный состав пивного суслу, в частности углеводный (в том числе, наличие мальтозы), способствует в полной мере проявлению активности исследуемого фермента. Азотистые вещества, микро- и макроэлементы, витамины и другие соединения, присутствующие в сусле, оказывают активирующий эффект на ферментативную систему дрожжевой клетки. Последующее снижение актив-

ности мальтазы, очевидно, связано с негативным влиянием образовавшихся при длительном инкубировании дрожжей продуктов метаболизма.

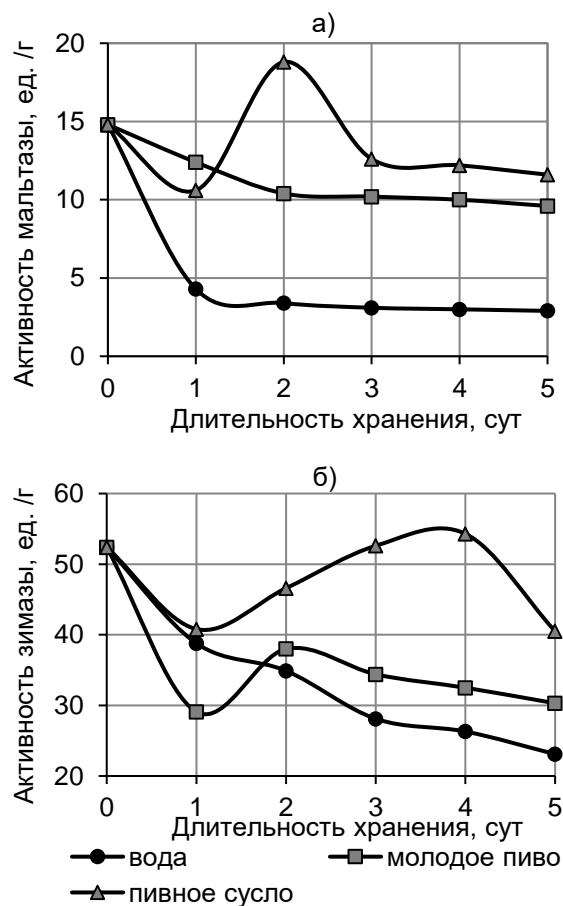


Рисунок 2 – Влияние среды хранения на активность: а) мальтазы, б) зимазы дрожжей

При хранении дрожжей в разных средах изменение зимазной активности, как и мальтазной, имеет неоднозначный характер.

Использование в качестве среды суспендирования воды и молодого пива способствует понижению ферментативной активности, причем в большей степени это проявляется в первом случае: на 3-и сутки хранения активность зимазы составляет соответственно 54 и 66 % от первоначального значения. Несмотря на то, что ферменты, ответственные за процесс спиртового брожения, всегда присутствуют в клетке независимо от наличия в среде субстрата [1, 12], дефицит последнего в рассматриваемых средах, очевидно, отражается на активности катализаторов.

У дрожжей, инкубированных в пивном сусле, активность зимазного комплекса возрастает с достижением максимума на 3–4

сутки. Дальнейшее хранение культуры приводит к спаду активности биокатализатора, но в меньшей степени, чем при использовании других сред.

Снижение активности зимазы на первые сутки хранения во всех исследуемых средах определяется, по-видимому, адаптацией дрожжевой культуры к составу среды и расходом внутриклеточного гликогена для поддержания своей жизнедеятельности.

Таким образом, пивные семенные дрожжи целесообразно хранить без существенного ухудшения их физиологического состояния, ферментативной активности и флокуляционной способности при рекомендуемой температуре 2–4 °С не более 1–2 суток в среде молодого пива или сусла. В случае перерывов в работе предприятия необходимо периодически (не реже одного раза в два дня) обновлять среду, в которой находится дрожжевая биомасса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нарцисс Л. Краткий курс пивоварения / Л. Нарцисс, при участии В. Бака; пер. с нем. А.А. Куреленкова. – СПб.: Профессия, 2007. – 640 с.
2. Бак, В. Практическое руководство по технологии пивоварения / В. Бак. – Druckerei Humburg, Бремен, 2013. – 429 с.
3. Boulton, C. Brewing yeast and fermentation / C. Boulton, D. Quain. – Oxford: Blackwell Science, 2001. – P. 120–126.
4. Меледина Т.В. Качество пива: стабильность вкуса и аромата, коллоидная стойкость, дегаустация / Т.В. Меледина, А.Т. Дедегкаев, Д.В. Афонин. – СПб.: Профессия, 2011. – 220 с.
5. Schneeberger, M. Der Einfluss des Aufbewahrungs – zeitraumes von Überschusshefe auf die Qualität des darin enthaltenen, wiedergewinnbaren Hefebieres / M. Schneeberger, M. Krottenthaler, W. Back // Handbook 37th Techn. Seminar Weihenstephan. – 2004. – Pp. 3/1–3/3.
6. Hulse, G. Optimisation of storage and propagation for consistent lager fermentations / G. Hulse, G. Bihl, G. Morakile, B. Axcell // Brewing yeast fermentation performance. – Oxford: Blackwell Science, 2000. – Pp. 161–169.
7. Качмазов, Г.С. Дрожжи броидильных производств. Практическое руководство / Г.С. Качмазов. – СПб.: Лань, 2012. – 224 с.
8. Польшалина Г.В. Определение активности ферментов / Г.В. Польшалина, В.С. Чередниченко, Л.В. Римарева. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
9. Шишков Ю.И. Некоторые аспекты оседания дрожжей / Ю.И. Шишков // Пиво и напитки. – 2006. – № 5 – С. 12–15.
10. Филимонова Т.И. Использование рас пивных дрожжей на российских предприятиях / Т.И. Филимонова, О.А. Борисенко // Пиво и напитки. – 2008. – № 1. – С. 12–13.
11. Rautio, J. Daily changes in maltopermease and maltase activities during normal and high gravity fermentations by ale and lager stains / J. Rautio et al. // Proc. EBC, 28<sup>th</sup> Congr., Budapest. – 2001. – Pp. 37/1–37/10.
12. Микробиология пива / Под ред.: Ф. Прист, И. Кемпбелл; пер. с англ. Т.В. Мелединой, Т. Сойдла. – СПб.: Профессия, 2005. – 368 с.

**Пермякова Лариса Викторовна**, к.т.н., доцент кафедры «Технология броидильных производств и консервирования» ФБГОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, г. Кемерово, Бульвар Строителей, 47, e-mail: [delf-5@yandex.ru](mailto:delf-5@yandex.ru), тел. 8(384-2)-39-68-55.