

Министерство образования и науки Республики Казахстан
ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МАГИСТРАТУРА

Кафедра «Прикладной биотехнологии»

Магистерская диссертация

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И
БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАС ДРОЖЖЕЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В
ПРИГОТОВЛЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ПИВА**

6N0701 «Биотехнология»

направление подготовки: научно-педагогическое

Исполнитель _____ Е.В.Беспалая
(подпись, дата)

Научный руководитель

Профессор _____ Е.Б.Никитин
(подпись, дата)

Допущена к защите:

Зам. зав. кафедрой «ПБТ»

к.т.н., профессор _____ М.С.Омаров
(подпись, дата)

Павлодар, 2006

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	4
1.	Обзор литературы	5
1.1.	Технологические аспекты приготовления пива	5
1.2.	Биологическая характеристика дрожжей, используемых в пивном производстве	23
1.3.	Способы культивирования и поддержания рас дрожжей в лабораторных условиях	41
2.	Собственные исследования	45
2.1.	Цель и задачи исследования	45
2.2.	Материалы и методы	45
2.2.1.	Материалы, аппаратура и реактивы	45
2.2.2.	Методы	47
2.3.	Выделение чистой культуры	51
2.4.	Определение эффективности сохранения биохимических свойств возбудителей спиртового брожения	57
	Заключение	59
	Выводы	60
	Практические предложения	61
	Список использованных источников	62

РЕФЕРАТ

Настоящая работа выполнена в объеме 63 страниц. Содержит 9 таблиц, 29 использованных источника литературы.

Ключевыми словами в работе явились следующие определения: пиво, дрожжи, солод, хмель, сусло, затер, спиртовое брожение, метаболизм, флокуляция, аэрация, фильтрование, экстракт, сбраживание, штаммы, расы, посев, культивирование, микроскопирование, изолированные колонии,

Объект исследования различные расы дрожжей используемые в производстве пива.

Цель работы сравнительное изучение морфологических и биохимических свойств рас дрожжей, используемых в приготовлении различных сортов пива.

Методы исследования микробиологические (определение дрожжей) и физико-химические (определение спирта, действительного экстракта).

В ходе исследования получены следующие результаты:

- при посеве из разных сортов пива выделяются разные расы дрожжей;
- сохранение свойств возбудителей спиртового брожения зависит от вида сусла;
- интенсивность спиртового брожения зависит от морфологических характеристик выделенных колоний дрожжей.

ВВЕДЕНИЕ

Пиво – насыщенный диоксидом углерода, пенистый напиток, получаемый в результате сбраживания пивного сусла специальными расами пивных дрожжей. Для приготовления пива требуется четыре вида сырья: солод, хмель, вода и дрожжи. Качество этого сырья оказывает огромное влияние на качество изготавливаемой продукции. Знание свойств сырья, его влияния на конечную продукцию является основой для сознательного управления технологическим процессом.

Производство пива включает ряд последовательных взаимосвязанных технологических стадий, характеризующихся строго регламентированными параметрами: получение пивного сусла, сбраживание сусла пивными дрожжами, дображивание и созревание пива, фильтрование пива, розлив.

В пивоварении главная роль принадлежит дрожжам. Основной биохимический процесс при производстве пива, формирующий букет напитка – спиртовое брожение сахаров сусла под действием ферментов дрожжей. Для производства пива используются пивные дрожжи различных рас, т.е. культур, обладающих устойчивыми признаками. Выбор расы определяется спецификой технологического процесса. Во время брожения в процессе метаболизма дрожжей возникают побочные продукты, многие из которых снова распадаются. Эти побочные продукты брожения наряду с составными частями хмеля в значительной мере определяют вкус и аромат пива, поэтому сведения об их образовании и расщеплении особенно важны. Компоненты, имеющие ценность для пива, могут возникать только тогда, когда создаются оптимальные условия для дрожжевой клетки, поэтому качество пива, скорость брожения и степень сбраживания в решающей степени зависят от дрожжей и их обмена веществ.

В связи с изложенным, изучение морфологических и биохимических свойств рас дрожжей, используемых в пищевой промышленности для приготовления различных сортов пива, является актуальным.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Технологические аспекты приготовления пива

Пиво – насыщенный диоксидом углерода, пенистый напиток, получаемый в результате сбраживания пивного сусла специальными расами пивных дрожжей. Для приготовления пива требуется четыре вида сырья: ячменный солод, хмель, вода и дрожжи /1/.

Основное сырье для приготовления пива – ячмень. Его применение основано на том, что в нем содержится много крахмала, даже после переработки в солод, содержатся оболочки зерна, которые способны формировать фильтрующий слой, необходимый в процессе производства. Перед использованием для варки пива ячмень должен быть переработан в солод. Его получают путем проращивания злаков в искусственных условиях при определенной температуре и влажности. По способу приготовления различают следующие типы солода:

- светлый;
- темный;
- карамельный;
- томленный;
- жженный;
- кислый;
- солод короткого ращения и наклюнувшийся солод;
- пшеничный.

Ферментативный потенциал солода достаточен, чтобы расщеплять добавочное количество крахмала, поэтому часть солода (15-20 %) заменяют несоложенными зернопродуктами – кукуруза, рис, сорго, ячмень, пшеница, может применяться сахар. Пшеница и сорго применяются также и в виде соложенного сырья.

Хмель – это высушенные шишки соцветия женских растений хмеля и приготовленные из них продукты, содержащие только основные компоненты хмеля. Состав хмеля оказывает решающее влияние на качество производимого из него пива. Он придает пиву горьковатый вкус и влияет на его аромат. От качества хмеля существенно зависит качество пива. Различают следующие сорта хмеля:

- ароматические;
- горькие, сорта с высоким содержанием α -кислоты.

Хмель в сухом виде состоит из:

- горьких веществ – 18,5 %;
- хмелевого масла – 0,5 %;
- дубильных веществ – 3,5 %;
- белка – 20,0 %;
- минеральных веществ – 8,0 %;

Остальное -- это целлюлоза и другие вещества, не имеющие особого значения для производства пива. Важнейшими для него являются горькие вещества и хмелевое масло.

В настоящее время пивоваренные производства вместо натурального шишкового хмеля широко применяют хмелепродукты – гранулированный хмель, экстракты хмеля.

Вода, участвуя во многих процессах приготовления пива, также влияет на его характер и качество.

Спиртовое брожение при приготовлении пива вызывается жизнедеятельностью дрожжей. Одновременно они оказывают влияние на качество пива через побочные продукты брожения.

Производство пива включает ряд последовательных взаимосвязанных технологических стадий, характеризуемых строго регламентированными параметрами: получение пивного сусла, сбраживание сусла пивными дрожжами, дображивание и созревание пива, розлив /2/.

Основным процессом при производстве пива является сбраживание содержащих в сусле сахаров в спирт и двуокись углерода. Чтобы создать для этого необходимые предпосылки, прежде всего необходимо превратить первоначальные нерастворимые составляющие солода в сбраживаемый сахар /1/. Это превращение и растворение составляющих является целью производства сусла. Тем самым создается исходная основа для сбраживания сусла в бродильном и лагерном отделениях.

Приготовление сусла

Приготовление сусла осуществляют в варочном цехе. Чтобы при затирании дать ферментам солода возможность воздействовать на вещества солода и их расщепить, солод следует измельчить, этот процесс называется дроблением.

Дробление – процесс механического измельчения, при котором, следует по мере возможности сохранить оболочки для последующего их использования как фильтрующего материала при фильтровании затора.

Перед дроблением солод очищается от примесей и пыли на ссолодополировочной машине. В зависимости от способа, принятого на предприятии, дробят сухой или частично увлажненный солод в ссолододробилке. Дробленый солод смешивают с водой (затирают) и в двух заторных емкостях – заторном чане и в заторном котле, где происходит расщепление его компонентов, они переходят в раствор и становятся веществами экстракта. При затирации решающее значение приобретает процесс превращения веществ. Качество помола влияет на:

- способ затирации;
- время осахаривания;
- фильтрование затора;
- выход экстракта в варочном цехе;
- степень сбраживания;
- фильтруемость пива;
- цветность, вкус и общий характер пива.

Большинство компонентов дробленого солода не растворимы сами по себе, а в пиво могут перейти только растворимые вещества. Поэтому необходимо перевести нерастворимые вещества помола а в растворимые. Все вещества переходящие в раствор называются экстрактом /3/.

Растворимыми веществами являются, сахара, декстрины, минеральные вещества и определенные белки. К нерастворимым веществам относятся крахмал, целлюлоза, часть высокомолекулярных белков и другие соединения, которые по окончании процесса фильтрования остаются в виде дробины.

Цель затирации состоит в том, чтобы расщепить крахмал в сахара и растворимые декстрины без остатка. При этом образуются и другие экстрактивные вещества. Основное количество экстракта образуется при затирации прежде всего благодаря действию ферментов, которые могут действовать при оптимальных для них температурах.

Процесс затирации состоит в том, что температуру затора поднимают до оптимальных температур для действия тех или иных ферментов, и затем выдерживается пауза. Паузы задаются при следующих оптимальных для ферментов температурах:

- 45-50 °С – белковая пауза;
- 62-65 °С – мальтозная;
- 70-75 °С – пауза для осахаривания;
- 78 °С – температура окончания затириания.

По виду повышения температуры различают две группы способов затириания:

1. Настоянный (инфузионный) – весь затор при поддержании пауз последовательно нагревается до температуры окончания затириания, причем части затора не кипятятся. Длительность затириания 1,5-2 часа. Преимущества настоянных способов заключается прежде всего в следующем:

- они допускают легкую возможность осуществить автоматизацию процесса;
- они способствуют более низкому потреблению энергии;
- они легче контролируемые.

Недостатком является несколько более затрудненное достижение нормальной йодной пробы и соответственно – несколько меньший выход варочного цеха при переработке солода плохого качества.

2. Отварочный (декоксионный) – температура повышается благодаря тому, что часть затора (отварку) отделяют и кипятят. При обратной перекачке к остальному затору температура всего затора повышается на следующую ступень температурной обработки. По числу отварок различают одно-, двух- и трехотварочные способы. Отбор и кипячение отварок оказывает следующее воздействие:

- из-за быстрого нагревания белки той части затора, которую кипятят, меньше расщепляется;
- повышается степень клейстеризации и разжижения крахмала;
- происходит более сильное выщелачивание веществ, содержащихся в мякинных оболочках;
- происходит уменьшение содержания ферментов в объединенном заторе;
- несколько увеличивается выход варочного цеха.

Длительность затириания до 3 часов.

При использовании несоложенного сырья в количестве более 15 % от общей массы зернопродуктов требуется внесение источников ферментов извне, в дополнение к ферментам солода, так как иначе процессы расщепления неоправданно затянутся или вообще прекратятся. Для этого

применяют ферментные препараты, полученные при культивировании некоторых микроорганизмов.

В конце процесса затирания затор состоит из смеси растворенных и нерастворенных в воде веществ. Водный раствор экстрактивных веществ называется суслом, а нерастворенная часть – дробина. Дробина в основном состоит из мяканных оболочек, зародышей и других веществ, не растворенных при затирании. Полученный осахаренный затор направляют на фильтрование, при котором дробина берет на себя роль фильтрующего материала. Фильтрование проходит в две отдельные фазы, следующие друг за другом:

- сбор первого сусла;
- выщелачивание дробины путем вымывания задержанных в ней экстрактивных веществ (промывные воды).

Проходящее через дробину сусло называется первым суслом. Когда первое сусло стечет с дробины, в ней еще остается экстракт. Чтобы предприятие могло работать экономично, этот экстракт нужно извлечь, и поэтому дробину после стекания первого сусла промывают, в ходе промывания дробины сусло разбавляется.

Для установления желаемой концентрации сусла в конце фильтрования затора необходимо, чтобы первое сусло содержало экстракта на 4-6 % больше, чем начальная экстрактивность производимого пива.

Получаемый из дробины экстракт вымывают горячей водой, и этот процесс называют промывкой пивной дробины. Стекающее более жидкое сусло называют промывными водами. Содержание экстракта в них убывает сначала быстро, а затем все медленнее, поскольку последний остаток экстрактивных веществ из дробины вымывается с трудом. Этот процесс является прежде всего диффузионным.

Количество воды для промывания дробины зависит от количества и концентрации первого сусла. Чем больше промывной воды проходит через дробину, тем интенсивней она выщелачивается и тем выше выход экстракта, однако чем больше воды проходит через дробину, тем больше воды придется снова испарять в процессе кипячения сусла.

Промывание ведут до тех пор, пока не получится желаемая концентрация. Стекающее в конце сусло с низкой экстрактивностью называется последней промывной водой. При нормальном пиве она еще имеет содержание экстракта

около 0,5-0,6 %. Иногда ее применяют в качестве воды для затирания или промывной воды для следующей варки.

Длительное промывание дробины и повторное использование последней промывной воды повышает выход экстракта, но ухудшает качество пива.

Фильтрацию проводят с помощью фильтрованных чанов или заторных фильтр-прессов. Температура затора и промывной воды должна быть 78-80 °C [4].

Полученное в процессе фильтрации сусло кипятят в сусловарочном котле в течение 1-2 часов с добавлением хмеля. При кипячении сусла в него переходят горькие и ароматические вещества хмеля, одновременно коагулируют белки. При этом важно знать дозировку хмеля, момент внесения той или иной порции хмеля, способ внесения хмеля в сусло. Применяют хмель в виде шишек или различные продукты его переработки (прессованный, брикетированный, гранулированный, хмелевые экстракты и др.).

При кипячении сусла происходит ряд следующих важных процессов:

- растворение и превращение компонентов хмеля;
- образование и коагуляция конгломератов белковых и дубильных веществ;
- выпаривание воды;
- стерилизация сусла;
- разрушение всех ферментов;
- повышение цветности сусла;
- повышение кислотности сусла;
- образование редуцирующих веществ.

При получении пива прежде всего важны следующие компоненты хмеля:

- хмелевые смолы или горькие вещества – они придают пиву горький вкус
 α -кислоты – в холодном сусле почти не растворяются. В кипящем сусле структура α -кислот претерпевает перестройку, называемую изомеризацией;

- хмелевое масло – при кипячении сусла обладает летучестью, и в тем более высокой степени, чем дольше ведется кипячение. На некоторых предприятиях, чтобы сохранить как минимум часть хмелевого масла, задают ароматический хмель лишь за 15-20 минут перед окончанием кипячения;

- дубильные вещества – растворимы в воде и сразу переходят в раствор. К этим веществам принадлежат антоцианогены, танины и катехины. Они заметным образом участвуют в образовании взвесей горячего сусла. В ходе дальнейшего производства пива дубильные вещества полимеризуются все

сильнее и могут ухудшить стойкость пива. Они участвуют в образовании полноты вкуса и горечи пива.

Дубильные вещества хмеля и солода полностью растворяются в сусле и связываются с его белками. Дубильные вещества солода при этом более активны, чем хмелевые. Так как дубильные вещества находятся частично в окисленной форме, а белковые вещества имеют к тому же различную величину молекул, образуются различные, отличающиеся своим поведением соединения. Соединения протеинов и дубильных веществ, а также соединения белковых веществ и окисленных дубильных веществ при высокой температуре выпадают в осадок при кипячении сусла в виде взвесей горячего сусла. Образованию взвесей горячего сусла способствуют:

- увеличение длительности кипячения;
- требуемая продолжительность кипячения для осаждения белков уменьшается с ростом давления и при одновременном повышении температуре;
- интенсивное движение кипящего сусла;
- низкая величина pH.

Комплексные соединения продуктов расщепления белка и дубильных веществ сохраняются в растворе при кипячении сусла, они осаждаются лишь при его охлаждении в виде взвесей холодного сусла.

Конечным продуктом после кипячения является горячее охмеленное сусло. Его необходимо контролировать. Для этого проводят контроль прозрачности сусла, йодную пробу на осахаривание, выхода сусла, экстрактивности горячего охмеленного сусла /5/.

Кипячение заканчивается перекачкой горячего сусла в вирпул (гидроциклонный аппарат) мощным сусловым насосом, где из горячего охмеленного сусла выделяют взвеси горячего сусла. Они состоят из крупных частиц и обычно хорошо осаждаются, если им дать для этого достаточно времени. Взвеси горячего сусла следует удалять, так как для дальнейшего производства пива они не только бесполезны, но и вредят качеству:

- «оклеивают» дрожжи;
- препятствуют осветлению сусла;
- увеличивают количество белкового отстоя и с ним потери;
- содержат жирные кислоты солода;
- затрудняют фильтрование пива, если их не отделить своевременно /6/.

Так как дрожжи способны сбраживать сусло только при низких температурах, сусло охлаждают до 5-6 °С или до 7-1 °С с помощью

пластинчатого холодильника в отделении охлаждения сусла. При охлаждении сусла происходит ряд процессов, решающим образом влияющих на скорость последующего брожения и созревания. К ним относятся:

- охлаждение сусла;
- интенсивная аэрация сусла;
- образование и оптимальное удаление взвесей холодного сусла.

Кроме того, изменяется экстрактивность и объем сусла. Также продолжают происходить процессы биохимических превращений веществ в сусле.

Во время этого процесса первоначально прозрачное сусло мутнеет из-за образования взвесей холодного сусла. В связи с очень малыми размерами частиц взвесей холодного сусла осаждаются с большим трудом. Они обладают свойством осаждаться на других частицах, например, на клетках дрожжей или на пузырьках воздуха, при этом снижается скорость брожения. Взвеси холодного сусла состоят из комплексных соединений белковых и дубильных веществ, которые в более холодной среде выделяются сильнее, а при нагревании частично снова растворяются.

Удаление осажденных взвесей холодного сусла является проблемой, которую пытаются решить различными путями. При этом их нежелательно полностью удалять, так как это вызывает появление в пиве пустого вкуса. остаточное содержание взвесей холодного сусла в сусле на уровне 120-160 мг/л сухого вещества является значением, к которому следует стремиться. При снижении содержания до этой величины следует ожидать:

- округление вкуса пива, особенно горечи;
- улучшение показателей качества пены пива;
- улучшение стойкости вкуса пива;
- более интенсивного брожения.

Для удаления взвесей холодного сусла можно использовать на выбор следующие способы:

- фильтрацию (через перлит);
- флотацию;
- седиментацию;
- сепарирование /7/.

Кроме того, для быстрого проведения брожения к дрожжам должно подводиться оптимальное количество воздуха. Дрожжи для размножения

нуждаются в кислороде. Отсутствие или запоздавшая аэрация, немедленно повлияет на скорость брожения и размножения.

Аэрация холодного сусла для снабжения дрожжей кислородом является единственным случаем во время всего производства пива, когда целенаправленно осуществляется подача кислорода. Этот кислород потребляется дрожжами за несколько часов и не вредит качеству сусла.

Чтобы растворить воздух в холодном сусле, его следует тонко распылить и перемешать. Для аэрации сусла применяются:

- свечи из керамики;
- смесительные форсунки;
- центробежный смеситель;
- аэрационные устройства со статическим смесителем.

Нагнетаемый воздух должен быть стерильным. Для стерилизации воздух предварительно пропускают через фильтр для стерилизации воздуха. Если воздух не фильтровать, то это будет надежный путь для внесения в дрожжи инфекции. Дрожжи должны интенсивно аэрироваться лишь при их внесении. Если их интенсивно аэрировать бродильную смесь уже сразу после съема, то они активируются. Но если они не найдут сбраживаемых веществ, то начнут разрушать собственные резервные углеводы. Это ослабит активность дрожжей, и к началу брожения у них будет отсутствовать необходимый запас резервных питательных веществ. Это затем проявится в повышенном количестве мертвых клеток и в худшем общем состоянии дрожжей. Введенный кислород потребляется за несколько часов, после этого аэрация больше не проводится /8/.

Производство пива (брожение, созревание и фильтрование)

Для превращения сусла в пиво, сахар содержащийся в сусле, должен быть сброжен ферментами дрожжей в этанол и углекислоту. В пивоварении используют дрожжи верхового и низового брожения. Дрожжи верхового брожения вида *Saccharomyces cerevisiae* используются для получения пива при повышенной температуре 12-15 °С, они вызывают быстрое и бурное брожение, в результате образуется много пены, клетки выносятся на поверхность сбраживаемой среды, где и находятся до конца брожения. Дрожжи низового брожения *Sacharomyces carlsbergensis* бродят при температуре 5-7 °С, развиваясь в сбраживаемом субстрате, не переходят в поверхностный слой, быстро оседают на дно, образуя плотный осадок за счет хлопьевидности. Для производства пива используются пивные дрожжи различных рас (культур, обладающих

устойчивыми признаками). Выбор расы определяется спецификой технологического процесса /9/.

Процессы, протекающие при сбраживании, условно делятся на процессы главного брожения и процессы созревания, так как они переходят друг в друга. При этом особую роль играет то, что во время брожения в процессе метаболизма дрожжей возникают побочные продукты, многие из которых снова распадаются. Эти побочные продукты брожения наряду с составными частями хмеля в значительной мере определяют вкус и аромат пива.

Для поведения брожения и созревания используются:

- открытые бродильные чаны и лагерные танки, где протекает классическое брожение и созревание;
- цилиндрикоконические танки (ЦКТ).

На предприятиях, оснащенных современным оборудованием брожение и созревание проводится в цилиндрикоконических танках (однотанковым или двухтанковым способом), в которые поступает сусло. Верхняя часть таких танков в виде цилиндра, а нижняя в виде конуса, что позволяет хорошо и полностью отделять от пива осевшие дрожжи.

Главное брожение начинается с внесения в сусло дрожжей. Сусло непосредственно перед внесением дрожжей называется начальным суслом. Сразу же после внесения дрожжей начальное сусло считается молодым пивом. Введение в сусло дрожжей проводят различными способами:

1. Из пластинчатого холодильника сусло поступает в аппарат предварительного брожения. Затем вносят дрожжи из расчета на всю емкость. Разбраживание продолжается 18-24 часа с доливом сусла последующих варок. Затем сусло перекачивают в бродильные емкости.

2. Дрожжи передают в специальную емкость (из расчета 0,5-0,8 л/гЛ), куда наливают от 2 до 6 литра сусла на 1 литр дрожжей и оставляют на 2-3 часа для разбраживания. Температура при этом не выше той, при которой сусло будет поступать в бродильные емкости.

3. Бродильную емкость до половины наполняют начальным суслом и вносят в него количество дрожжей, соответствующее норме для всей емкости. На следующий день, когда сусло забродит, добавляют вторую половину сусла.

4. При отсутствии емкостей предварительного брожения дрожжи вносят в бродильную емкость из расчета 0,4-0,8 л/гЛ сусла.

Количество вводимых дрожжей зависит от концентрации, температуры и состава сусла, расы дрожжей.

При внесении необходимо равномерно распределить их, чтобы размножение дрожжей и брожение пива начались незамедлительно, для этого необходимы перемешивание и аэрация. Нельзя допускать образования комков, каждая клетка должна быстро вступить в контакт с питательными веществами сусла - это важно для быстрого забраживания. Применяются различные специальные приспособления для лучшего распределения воздуха в сусле. Недостаточная аэрация сусла может привести к: вялому и длительному забраживанию, остановке брожения при охлаждении, медленному падению экстрактивности, вялому дображиванию, проблемам с качеством пива.

Главное брожение характеризуется повышением температуры, понижением содержания экстрактивных веществ, выделением CO_2 , оседанием дрожжей и осветлением пива /10/.

В пивоварении по применению дрожжей используют два типа брожения: низовое и верховое.

Низовое брожение

Процесс низового брожения можно разделить на четыре стадии:

1. Забел – появление белой пены (забела), покрывающей поверхность сусла. Продолжается 1-1,5 суток, при этом происходит интенсивное размножение дрожжей, а экстрактивность сусла снижается на 0,2-0,5 % в сутки.
2. Низкие завитки – образование низких завитков (пены), которые появляются по краям и постепенно подвигаются к середине. Этот период продолжается 2-3 суток.
3. Высокие завитки – брожение достигло своего пика, завитки стали выше и крупнозернистее. Длится 3-4 суток.
4. Спад завитков – размножение дрожжей прекращается, они оседают на дно, пиво осветляется. Завитки медленно опадают, и на поверхности образуется дека (темно-коричневый тонкий слой опавшей пены).

Режимы брожения и созревания, можно разделить на три группы:

1. Холодное брожение – холодное созревание;
2. Холодное брожение – теплое созревание;
3. Теплое брожение – теплое созревание.

При холодном режиме брожения дрожжи вводятся в начальное сусло с массовой долей сухих веществ (СВ) 10-13 %, при температуре 5-6 °С и дальнейшее протекание, при предельной температуре 8-9 °С. Для начального сусла с более высокой массовой долей сухих веществ предельная температура может достигать 11-12 °С. При этом режиме наблюдается постепенное

размножение дрожжей и сбраживание экстрактивных веществ, а приготовленное пиво характеризуется хорошей пеностойкостью, тонким ароматом и полноценным вкусом.

Теплый режим брожения протекает при 12-14 °С, а дрожжи вводят в начальное сусло с температурой 8-9 °С. Высокая температура способствует сокращению длительности брожения, приготовленное пиво имеет худшую пеностойкость, и содержит меньше горьких веществ. Помимо этого пиво приобретает дрожжевой привкус и медленно дображивает.

Длительность процесса при холодном брожении 7-11 суток, при теплом 5-6 суток.

Процесс главного брожения длится около 7-8 суток с момента введения дрожжей для сортов пива с массовой долей сухих веществ в начальном сусле 10-13 % и 9-11 суток для пива с более высокой массовой долей сухих веществ.

Главное брожение считается законченным, когда происходит осветление молодого пива, а за сутки сбраживается 0,1-0,2 % экстракта. Более точно окончание главного брожения устанавливают по значению видимого экстракта, который определяют сахарометром в присутствии спирта и CO_2 .

Верховое брожение

Начальная фаза проходит так же, как при холодном режиме брожения. Затем наступает период очень бурного образования высокой пены, что приводит к заполнению бродильных емкостей начальным суслом на 2/3 его объема. Брожение проводят при температуре от 14 до 20 °С, что позволяет в течение 4-6 суток провести процесс главного брожения.

После главного брожения дрожжевой остаток оседает на дне бродильных емкостей плотным слоем. Прирост дрожжевой массы составляет в среднем 2,0-2,5 л густых дрожжей на 1 г/л начального сусла. При их оседании образуются три слоя:

1. Верхний слой — коричневого цвета, содержит мертвые и незрелые дрожжевые клетки;
2. Средний слой — семенные дрожжи, состоит из самых здоровых и сильных клеток и имеет светлый цвет;
3. Нижний слой — темного цвета, состоит из частичек хмелевых смол, мертвых дрожжевых клеток и частиц взвесей /11/.

Сбор дрожжей проводится в несколько приемов. При применении ЦКТ дрожжи снимают из конуса до перекачки пива, а при классическом брожении -

после скачивания пива из чана. Дрожжи следует снимать так часто и столько раз, сколько это возможно, по причинам:

1. Дрожжи оседают не так, как хотелось бы. Из-за турбулентных потоков, возникающих в период главного брожения, на поверхности бродящего пива до конца фазы созревания наблюдается повышенная концентрация дрожжевых клеток, обусловленная подъемом активных дрожжей. Даже во время холодной выдержки встречается явление взмучивания дрожжей из более теплого, чем остальное пиво, осадка в конусе. Несмотря на это, основная масса дрожжей осаждается и отделяется в конусе, при этом высота танка имеет значительное влияние на время седиментации дрожжей. Уже осевшие дрожжи должны быть по возможности быстрее отделены от пива.

2. Дрожжи по ходу созревания выделяют в пиво низкомолекулярные азотистые вещества, которые не потребляются повторно и негативно влияют на стойкость пива.

3. По ходу созревания и холодной выдержки дрожжи выделяют в пиво протеиназу А, которая расщепляет положительно влияющие на пену субстанции и приводит к ухудшению пеностойкости. Рано собранные дрожжи обладают, по сравнению с поздно собранными, более слабой способностью выделять протеиназу, а у дрожжей, находящихся во взвешенном состоянии, эта способность еще более слабая, чем осевших дрожжей. Поэтому своевременное снятие дрожжей способствует улучшению качества пива.

4. Плохое состояние дрожжей приводит к появлению продуктов автолиза, что является недостатком для дальнейшего хода брожения. Образующиеся комплексы из протеинов, гликогена и маннана растворяются в пиве, и, при превышении порогового значения, приводят к помутнению пива и ухудшению его фильтруемости.

5. Дрожжи, лежащие в конусе, страдают от парциального давления CO_2 , из-за которого клетка насыщается этим клеточным ядром (особенно это имеет место в случае высоких танков). Давление дрожжевые клетки переносят лучше, чем CO_2 . Чем дольше дрожжи будут находиться в конусе, тем в большей степени они ослабнут, так как в толще слоя дрожжей нет достаточного количества питательных веществ. Старые дрожжи раньше всех расходуют свои резервные вещества, и в метаболизме переходят к потреблению своих составных частей. Внутриклеточные ферменты растворяют мембраны внутри и вокруг клетки; аминокислоты, жирные кислоты и ферменты начинают выделяться

наружу. Весь метаболизм выходит из-под контроля, клетка умирает. Выделившиеся вещества очень отрицательно влияют на качество, а именно:

- из-за аминокислот и протеолитических ферментов ухудшается вкус и пеностойкость;
- жирные кислоты, особенно ненасыщенные, отрицательно влияют на вкусовую стойкость пива;
- выделившиеся вещества являются питанием для инфицирующей микрофлоры;
- pH пива повышается, это свидетельствует о начале автолиза.

Количество мертвых клеток, которое можно легко определить методом окрашивания под микроскопом, должно быть максимально низким, составляя в среднем 3 %. Если количество мертвых клеток увеличивается, то существуют опасность все более значительного накопления в пиве продуктов автолиза. Все вышеприведенные причины свидетельствуют о том, что дрожжи должны отделяться от пива так скоро, как только это возможно.

После съема семенные дрожжи или используются для немедленного внесения в следующие варки, или должны храниться под слоем воды и соответствующим образом обрабатываться — азрироваться; чем дольше они хранятся, тем ниже должна быть температура.

Низовые дрожжи вносят повторно не чаще 5-6 раз. Дрожжи верхового брожения используют намного дольше, до 5-15 генераций.

Для созревания пиво перекачивают в лагерные танки. Это необходимо сделать вовремя, при перекачке в пиве должно оставаться еще достаточное количество экстрактивных веществ. Необходимо это для того, чтобы в пиве при дображивании под давлением могло накопиться достаточное количество CO_2 .

Момент готовности пива к перекачке и количество дрожжей в молодом пиве напрямую связаны друг с другом. В зависимости от количества дрожжей в перекачиваемом пиве различают:

- раннюю перекачку на дображивание, означающую, что в пиве осталось много дрожжей и экстракта;
- позднюю перекачку, означающую, что в пиве осталось мало дрожжей и экстракта для дображивания.

Выбор зависит от используемого штамма дрожжей и методов проведения дображивания [12].

Пиво в ходе приготовления дольше всего находится в отделении (цехе) дображивания. Основная цель дображивания — получение напитка с приятным

вкусом, характерным, специфическим для данного вида пива ароматом и достаточным насыщением диоксидом углерода. Это достигается в результате сложных физико-химических и биохимических процессов в молодом пиве при низкой температуре (0-2 °С) и избыточном давлении, при участии оставшихся осевших дрожжевых клеток. Продолжительность дображивания для пива каждого сорта различна.

Для отделения от пива остатков дрожжей, придания ему товарного вида и обеспечения стойкости при хранении пиво подвергают фильтрованию. Цель фильтрования – сделать пиво настолько стойким, чтобы в нем на протяжении длительного времени не возникало бы никаких видимых изменений и пиво сохранило бы свой внешний вид. Фильтрование происходит следующим образом: мутная жидкость (нефильтрат) благодаря фильтрующей перегородке разделяется на прозрачный фильтрат и фильтровальный остаток. В качестве фильтрующих перегородок могут служить сита всех видов, металлическая или текстильная ткань, фильтрующие слои, насыпные материалы, пористые материалы, мембраны (применяются в большей степени). На фильтровальную перегородку намываются вспомогательные фильтрующие средства – порошкообразные материалы (кизельгур или перлит), форма и структура которой делают фильтрование возможным. Фильтрование вообще возможно только благодаря их форме и структуре, однако вспомогательные фильтрующие средства не применимы без фильтрующей перегородки. Под кизельгуром понимают ископаемые одноклеточные инфузорные водоросли, состоящие из диоксида кремния. Он используется для фильтрования пива, скорость фильтрования зависит от его крупности, чем мельче кизельгур тем прозрачнее фильтрат, но тем ниже скорость фильтрования. Перлит – материал вулканического происхождения, состоящий в основном из силиката алюминия, используется для фильтрования сусла.

После фильтрования главным фактором оценки пива является прозрачность. За короткий срок пиво может испортиться и стать непригодным для употребления. Это может произойти при присутствии в пиве микроорганизмов вызывающие помутнение пива, содержания коллоидов, увеличивающихся со временем в размере и вызывающих помутнение, со временем пиво теряет вкус. Чтобы этого не произошло, необходимо провести стабилизацию пива – биологическую или коллоидную.

Биологическая стабилизация

После кипячения сусло стерильно. Вредные для пива микроорганизмы могут попадать в пиво только при несоблюдении санитарных условий на производстве, после чего они размножаются, образуя помутнение, и выделяя продукты метаболизма, которые могут сделать пиво непригодным для потребления. Биологическая стойкость пива уменьшается:

- при несоблюдении санитарных условий на производстве;
- при перегрузки фильтрационной установки;
- при высокой разнице между конечной степенью сбраживания и степенью сбраживания готового пива;
- при попадании в пиво кислорода;
- прежде всего при розливе;
- при теплом хранении;
- из-за взбалтывания, происходящего во время длительной транспортировки.

Так как пиво должно оставаться безупречным в течении его срока годности, все попавшие в пиво микроорганизмы должны быть удалены или уничтожены:

- пастеризацией розлитого пива – путем нагрева пива;
- пастеризацией в потоке – пиво нагревается в пластинчатом теплообменнике до 68-72 °С, эта температура выдерживается 50 секунд, затем пиво снова охлаждается;
- пастеризацией в туннельном пастеризаторе – бутылки или банки с пивом нагреваются до температуры пастеризации, а затем снова охлаждаются;
- холодно-стерильным фильтрованием – с помощью мембранных и модульных фильтров.

Коллоидная стабилизация

Образованию помутнения способствуют следующие факторы: повышенная температура, окисление пива, ионы тяжелых металлов, перемешивание пива, свет. Для достижения хорошей стойкости пива применяются технологические приемы, кроме них используются стабилизирующие средства.

К технологическим приемам относятся: отсутствие длительной белковой паузы, высокая конечная степень сбраживания, полное осахаривание, недопущение слишком сильного выщелачивания дробины, длительное и интенсивное кипячение сусла, контроль за образованием взвесей горячего сусла, подкисление готового горячего сусла, не ранняя задача хмеля, исключение

попадания кислорода, полное удаление горячего белкового отстоя и оптимальное отделение холодных взвесей, интенсивная аэрация суслу для скорейшего начала брожения, холодное и активное брожение, исключение контакта пива с воздухом.

В качестве стабилизирующих средств широко применяются:

- силикагели — связывают образующие помутнение белки, добавляются при перекачке пива в лагерную емкость или при фильтровании;
- поливинилполипирролидон (ПВП) — при прохождении пива через содержащие ПВП фильтрующие слои адсорбируются полифенолы;
- антиоксиданты — замедляют процесс старения карбониллов (старения вкуса), добавляют в пиво.

Обычно пиво сохраняет углекислоту до самого розлива в бутылки или кеги, однако если пиво потеряло углекислоту из-за низкого избыточного давления или повышенной температуры, может возникнуть необходимость восполнить перед розливом CO_2 . Этот процесс называется «карбонизацией», поток пива направляют через карбонизатор /13/.

Конечным результатом пивоваренных процессов является розлитое пиво.

Химический состав пива

Вода составляет большую часть пива. Важнейшим компонентом является спирт, его доля составляет в среднем 5 %. Алкоголь содержится не только в виде этилового спирта, он присутствует совместно с другими алифатическими спиртами (высшие спирты): n-пропанол 9,8 мг/л; изобутанол 9,6 мг/л; амиловые спирты 60,1 мг/л; 2-фенилэтанол 19,8 мг/л. Экстракт пива состоит примерно на 75-80 % из углеводов, особенно декстринов (мальтотетраозы, мальтопентаозы), на 6-9 % из белковых веществ: общий азот 600-1100 мг/л, коагулируемый азот 18-20 мг/л, осаждаемый азот 130-160 мг/л, α -аминный азот 80-120 мг/л, формольный азот 160-210 мг/л; на 4-5 % из глицерина 500-1600 мг/л; а также β -глюканов 220-400 мг/л; минеральных веществ: натрий 30-32 мг/л, калий 500-600 мг/л, кальций 35-40 мг/л, магний 100-110 мг/л, фосфаты 300-400 мг/л, сульфаты 150-200 мг/л, хлориды 150-200 мг/л, нитраты 10-80 мг/л; дубильных веществ; горьких веществ; органических кислот. В пиве содержатся витамины группы В (В1 В2) и много витамина РР (никотиновой кислоты) /14/.

Типы пива

В зависимости от применявшихся дрожжей и способов брожения выделяют две большие группы типов пива:

- Пиво верхового брожения;
- Пиво низового брожения.

Пиво верхового брожения отличается от низового важными особенностями поведения дрожжей, а также продуктами их обмена веществ, придающими пиву совершенно своеобразный характер /15/.

Контроль качества

Контроль качества готового пива проводится тремя основными методами:

- органолептического контроля;
- микробиологического контроля;
- физико-химического контроля.

Органолептический контроль

К методам органолептического контроля относят: аромат, вкус, хмелевую горечь, пеностойкость, прозрачность, цвет. Эти показатели индивидуальны для каждого сорта пива и являются критерием оценки его потребительских свойств. Все органолептические показатели качества пива определяются в процессе дегустации. Перед дегустацией определяется цвет /2/.

Аромат пива формируется в зависимости от расы дрожжей и образуемых ими побочных продуктов брожения, сорта хмеля и вносимого количества, органических сернистых соединений. Основным фактором, определяющим вкус, является экстрактивность начального сусла – чем выше массовая доля сухих веществ в начальном сусле, тем больше полнота вкуса пива, определяющаяся содержанием спирта и остаточного экстракта. На вкусовую чувствительность также влияет температура, с ее увеличением меняются свойства коллоидной системы пива. Температура подаваемого потребителю пива должна быть 8-12°C. Хорошее пиво должно иметь вкус и аромат, соединенные в гармоничное целое. Горечь пива определяется горькими веществами хмеля, дубильными и горькими веществами оболочек солода и ячменя, продуктами, выделяемыми дрожжами, самими дрожжевыми клетками с адсорбированными хмелевыми веществами. Чем больше в пиве содержится растворенного CO₂, тем больше образуется пены, но «высота пены» понятие не идентичное «стойкости пива», пена обладает стойкостью благодаря

присутствию поверхностно-активных веществ. Обильная, густая и стойкая пена является признаком хорошего качества пива /16/.

Цвет – отличительный признак типов пива (светлых или темных), но даже в пределах одного типа пиво отличается по цветовой интенсивности. Существенным недостатком для светлых сортов является зеленоватый цвет, а также красноватые и коричневые оттенки. Светлое пиво, помимо соответствующего цвета, должно иметь хорошую прозрачность, которая определяется по блеску.

Микробиологический контроль

В процессе приготовления пива вплоть до получения готовой продукции в них попадают посторонние микроорганизмы. Если они размножаются, то из-за образования несвойственных пиву продуктов обмена веществ оно становится непригодным к употреблению. Поэтому следует как можно раньше обнаружить присутствие посторонних микроорганизмов, найти места, откуда они попадают, и принять меры, предупреждающие их размножение.

Вредные для пива микроорганизмы могут размножаться в готовом пиве, когда для них возникают благоприятные условия. К вредным микроорганизмам относят: бактерии группы кишечной палочки (колиформы); дрожжи; плесени; патогенные микроорганизмы в том числе сальмонеллы; мезофильно аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus frigidus*, *Pediococcus damnosus*, *Streptococcus lactis*, *Enterobacteriaceen*, *Pectinatus cerevesiiphilus*, *Megasphaera cerevisiae*).

Физико-химический контроль

Для производства хорошего пива следует постоянно контролировать ряд показателей, к которым относятся определение экстрактивности начального сусла (массовая доля сухих веществ в схиеленном сусле), включающее в себя определение действительного экстракта и спирта в пиве, кислотность, цвет, стойкость пива, массовая доля двуокиси углерода /2/.

1.2 Биологическая характеристика дрожжей, используемых в пивном производстве

Дрожжи являются одноклеточными микроорганизмами, которые могут получать свою энергию в присутствии кислорода (аэробно) путем дыхания и в отсутствие кислорода (анаэробно) путем брожения.

Сахара сусла при производстве пива сбраживаются дрожжами в спирт. Для этого в пивоварении применяют дрожжевые грибы вида *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis*. Выбранные штаммы этих дрожжей систематически разводятся в виде чистой культуры и выращиваются. Другие штаммы этих дрожжей используются как пекарские, спиртовые или винные.

Так как дрожжи не только осуществляют спиртовое брожение, но своим обменом веществ оказывают и большое влияние на вкус и характер пива, то знание компонентов дрожжей, их метаболизма и размножения имеет большое значение. Различные виды и расы культурных дрожжей имеют ряд отличительных признаков /17/.

Строение и состав дрожжевой клетки

Дрожжи применяют в пивоварении в виде густой массы, состоящей из миллиардов дрожжевых клеток, существующих независимо друг от друга. Эти клетки имеют форму от овальной до круглой, длину – от 8 до 10 мкм и ширину от 5 до 7 мкм.

Дрожжевая клетка состоит примерно на 75 % из воды. Сухое вещество имеет состав, изменяющийся в определенных пределах, а именно:

- белковые вещества от 40 до 60 %;
- углеводы от 25 до 35 %;
- жиры от 4 до 7 %;
- минеральные вещества от 6 до 9 %.

Минеральные вещества состоят из (на 100 г СВ, приблизительно):

- 2000 мг фосфатов;
- 2400 мг калия;
- 200 мг натрия;
- 20 мг кальция;
- 2 мг магния;
- 7 мг цинка и следов железа, марганца и меди.

Кроме того, дрожжи содержат ряд витаминов (на 100 г СВ дрожжей), среди которых:

- тиамин 8-15 мг;
- рибофлавин 2-8 мг;
- никотиновая кислота 30-100 мг;
- фолиевая кислота 2-10 мг;

- пантотеновая кислота 2-20 мг;
- пиридоксин 3-10 мг;
- биотин 0,1-1 мг.

Каждая дрожжевая клетка состоит из клеточной плазмы – (цитоплазма, цитозол), которая окружена клеточной мембраной в которой находится ряд органелл, обеспечивающих реакции обмена веществ. При этом важнейшей органеллой является, клеточное ядро (нуклеус) – управляющий центр клетки. Оно окружено двойной пористой замкнутой мембраной ядра. Ядро клетки содержит основное вещество (плазму), матрицу ядра и хромосомы. В них каждая клетка хранит свой структурный план, закодированный в форме генов. Гены построены из полимерной молекулы, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), информационный объем которой составляет 10^9 - 10^{10} бит. ДНК управляет всеми процессами обмена веществ, роста и развития клетки. В ядре клетки размещено также ядрышко, состоящее из рибонуклеиновой кислоты.

Дрожжевая клетка содержит большое количество митохондрий. Митохондрии получают пируват, образующийся в цитоплазме, и разлагают его, в процессе дыхания на CO_2 и воду путем сложных ступенчатых превращений. При этом образуется аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ), которые представляют собой весьма важные носители энергии. Поэтому митохондрии называют «энергетическими станциями клетки».

Шероховатая эндоплазматическая сеть (ЭС) служит для синтеза протеина, а гладкая эндоплазматическая сеть синтезирует липиды и отвечает за процессы освобождения от ядовитых веществ. Образующийся протеин блокируется и перемещается в предусмотренное место в везикулах, снабженных оболочкой. Эту задачу берет на себя комплекс Гольджи, представляющий собой своего рода «сортировочную станцию». Секреторная везикула с ядовитым веществом (например, со спиртом) транспортируется таким образом к клеточной мембране и выносится наружу.

За переработку отходов клетки отвечают лизосомы, которые обеспечивают внутриклеточное пищеварение и разлагают высокомолекулярные структуры в низкомолекулярные. Рибосомы синтезируют протеин и распределяют его в клетке. Тем самым они отвечают за «поточное производство», заключающееся в соединении аминокислот с образованием

продуктов генного синтеза в соответствии с информацией, получаемой из ядра клетки.

Особенно важны клеточные мембраны, которые окружают не только всю клетку, но и ее многочисленные органеллы. Эндоплазматическая сеть осуществляет интенсивное производство этих мембран.

Важными структурными элементами клеточных мембран являются фосфолипиды. Они обладают весьма типичной структурой, имеющей значение для их функционирования.

Построение клеточной мембраны из молекул фосфолипидов обуславливает два взаимно противоположных свойства структуры: в то время, как глиcerиновый остаток с фосфором и аминокислотным остатком притягивает воду, хвосты кислотных остатков, расположенные в клеточной мембране плотно друг к другу, а в двух слоях друг против друга, отталкивают воду. В результате образуется непроницаемый двойной слой (мембрана) без наличия связей между фосфолипидными молекулами. Хотя клеточная мембрана дрожжевой клетки обладает толщиной 6 нм и составляет всего 1/1000 клеточного диаметра, но она окружает не только весь объем дрожжевой клетки, но и образует мембраны вокруг клеточных органелл и разделяет отдельные области клетки. Поверхность дрожжевой клетки составляет порядка 150 мкм².

При размножении дрожжей необходима очень высокая интенсивность синтеза жирных кислот, так как дрожжевая клетка должна заново построить клеточную субстанцию, объем которой в 4-5 раз превышает ее собственный объем.

Энергоемкое образование липидов, представляющих собой главные составные части мембран, зависит от наличия кислорода. При этом часть имеющихся жирных кислот превращается в ненасыщенные жирные кислоты, имеющие более низкую температуру плавления и соответственно обладающие более высокой текучестью. При недостатке кислорода построение клеток преждевременно прекращается.

Стенка клетки полупроницаема. Поступление растворенных веществ (например, сахаров, аминокислот и жирных кислот, минеральных веществ) происходит избирательно через нерастворимые транспортные протеины, находящиеся в мембране и пропускающие совершенно определенные вещества или группы веществ. Выделение наружу продуктов распада или ядов,

например, образованного спирта, происходит через мембрану при помощи везикулы Гольджи.

К внешней поверхности клеточной мембраны прикреплены гликолизированные полисахаридные остатки (гликокаликс). Они на 30-40 % состоят из маннана и на 30-40 % – из глюкана. Находящийся снаружи маннан связан сложной эфирной связью с фосфором, а находящийся внутри глюкан связан сложной эфирной связью с серой и интегрирован в общий комплекс белков и ферментов, которые обеспечивают расщепление веществ для прохода их через клеточную мембрану. Поэтому структура этих сложных образований играет большую роль.

На внутренней и внешней стороне мембраны находятся периферийные протеины; на внутренней стороне расположен еще слой трегалозы.

Совокупность оболочки, состоящей из клеточной мембраны, прикрепленных слоев и гликолизированных остатков (гликокаликса) называется стенкой клетки.

Цитоплазма (цитозол), занимающая более 50 % объема клетки, является важнейшей частью ее внутреннего содержимого. Это центральное реакционное пространство клетки, в котором располагается большинство путей обмена веществ при расщеплении питательных компонентов и при построении собственных элементов клетки. Весь промежуточный обмен веществ — гликолиз, синтез жирных кислот, биосинтез протеинов и многое другое протекает здесь в своей многообразии параллельно друг другу. В водной среде движутся рибосомы, ферменты и продукты расщепления — близко друг от друга в мощных потоках среды.

При избытке питательных веществ, например, после начала брожения, дрожжевая клетка запасает резервные вещества. Запасным веществом дрожжей является гликоген который растворяется в горячей воде и окрашивается йодом в темно-коричневый цвет, гидролизруется кислотами до d-глюкозы и α -амилазой до мальтозы и декстринов. Гликоген не проходит через поры клеточной оболочки. Содержание его колеблется от 0 до 40 % и прямо пропорционально содержанию углеводов в среде. Он помещается в аккумулирующих гранулах, расположенных в цитоплазме. Точно так же, как фосфаты и липиды, которые требуются дрожжам для построения новых веществ клетки, откладывается трегалоза (дисахарил).

В клетке можно обнаружить наполненные кислым клеточным соком и окруженные мембраной пространства — так называемые вакуоли. Здесь

откладываются определенные протеины и избыточные соли, частично – и в виде кристаллов. С помощью обратимой мобилизации кристаллов солей клетка может регулировать ее внутреннее давление (тургор), если осмотическое давление снаружи увеличится благодаря повышенному содержанию экстракта или спирта.

Дрожжевая клетка размножается путем почкования, после отделения дочерней клетки на материнской клетке остается почечный рубец /18/.

Превращения при брожении и созревании

Для дрожжевой клетки имеет значение только получение энергии для продолжения своего существования и образования клеточной массы. Компоненты, имеющие ценность для пива, могут возникать только тогда, когда создаются оптимальные условия для дрожжевой клетки. Таким образом, качество пива в решающей степени зависит от дрожжей и их обмена веществ.

После попадания в сусло дрожжевая клетка должна привыкнуть к новой среде (лаг-фаза). В течение нескольких часов она выделяет во внешнюю среду аминокислоты и нуклеотиды, однако вскоре она начинает потреблять некоторые из них обратно. Перед тем как клетка вступает в тесный контакт с новой средой, она расщепляет хранящиеся в ней запасные вещества, которые дают ей первую энергию.

Избыточное количество сбраживаемых сахаров в сусле стимулирует потребление сахара клеткой. Одновременно с поступлением растворенного кислорода начинается и дыхание, которое приводит к выделению в митохондриях большого количества энергии.

Благодаря такому энергетическому сдвигу у дрожжей появляется возможность не только начать брожение, но и одновременно образовывать новые клеточные вещества и размножаться. Вещества необходимые для образования клеточной субстанции, дрожжи получают из сусла. Поэтому в сусле должны быть необходимые компоненты:

- аминокислоты для образования клеточных веществ;
- фосфаты для образования АТФ и двойного фосфолипидного слоя клеточных и внутренних мембран;
- жирные кислоты для строительства клеточных мембран;
- сахар для создания запасных углеводов;
- соли и микроэлементы;

- кислород в достаточном количестве для дыхания и ряда других превращений.

Эти вещества всегда присутствуют в достаточном количестве если применяется нормальное сырье, а не заменяется несоложенным материалом в больших количествах или сахаром. Недостаток веществ приводит к проблемам при брожении.

В этой активной фазе, когда в сусле есть еще много питательных компонентов в форме сбраживаемых сахаров, дрожжи создают запас резервных углеводов, чтобы при недостатке питания иметь сырье для получения энергии.

Эта логарифмическая фаза (лог-фаза) является важнейшим этапом брожения, так как именно в ней исчезает вкус сусла, и благодаря метаболизму дрожжей определяются качественные параметры будущего пива.

Как только запасы кислорода становятся исчерпанными, дрожжи переходят на анаэробный гликолиз и обходятся минимальным количеством энергии, получаемой через сбраживание сахара в спирт и CO_2 .

Признак того, что лог-фаза подходит к концу – низкое содержание сбраживаемого сахара во внешней среде. Брожение считается законченным, когда сахара почти не остается. Дрожжи начинают флокулировать, размножение останавливается, спирт и CO_2 как клеточные яды все большей мере угнетают дрожжевую клетку. Дрожжи медленно оседают на дно, откуда их можно собрать. Теперь для них начинается самое грудное время, поскольку они начинают ощущать недостаток энергии и должны использовать свои собственные запасы. Дрожжи начинают медленно выделять во внешнюю среду продукты метаболизма и аминокислоты. Именно в этот момент они должны быть собраны.

Несмотря на низкие температуры во время дображивания, дрожжи для поддержания своей жизни нуждаются в энергии, правда, совсем в небольших количествах. Они начинают расщеплять резервные углеводы и другие вещества, и все больше продуктов метаболизма выделяется во внешнюю среду. Наконец клетка может умереть. Тогда ферменты начинают растворять ее изнутри, повреждают клеточную стенку и все содержимое растворенной (автолизированной) клетки попадает в пиво. Из-за этого существенно ухудшается вкус и пена, pH пива повышается, а перешедшие в раствор компоненты клетки являются прекрасной пищей для инфицирующей микрофлоры. Поэтому необходимо производить своевременное и повторное снятие дрожжей /19/.

Обмен веществ дрожжевой клетки

Знания о метаболизме имеют фундаментальное значение, так как они позволяют решающим образом влиять на качество пива. При этом особый интерес представляют:

- сбраживание сахара и метаболизм углеводов;
- метаболизм азотистых веществ;
- метаболизм жиров;
- метаболизм минеральных веществ.

Сбраживание сахаров

Для осуществления жизненно необходимых процессов обмена веществ дрожжи, нуждаются в энергии и питательных веществах. Это относится к таким процессам, как:

- образование нового клеточного вещества;
- прием и ассимиляция веществ из окружающей среды;
- расщепление и удаление ненужных и вредных соединений;
- транспортировка веществ внутри клетки.

Энергию они получают благодаря дыханию. Дыхание начинается с расщепления глюкозы — этот процесс проходит в цитоплазме (во всем объеме) и называется гликолиз. Получение энергии при дыхании весьма значительно, поскольку глюкоза разлагается без остатка. При дыхании полученные питательные вещества (например, сахара) полностью расщепляются на CO_2 и воду. При отсутствии воздуха дрожжи переходят на спиртовое брожение. После нескольких сложных промежуточных реакций возникает пируват (пировиноградная кислота) который затем превращается в спирт и CO_2 , практически в равной степени. При наличии кислорода брожение сильно замедляется или совсем прекращается. С другой стороны, если концентрация сахара в среде превышает 0,1 г/л, то замедляется работа дыхательного ферментного комплекса и вместе с дыханием происходит брожение. Путем брожения дрожжевая клетка получает несравнимо меньше энергии, чем путем дыхания. Поэтому при наличии кислорода дрожжи тотчас переходят к энергетически более выгодному дыханию.

Расщепление глюкозы до спирта или — при дыхании — до CO_2 и воды проводится путем большого числа последовательных реакций. При этом каждая из них осуществляется с помощью специального фермент-катализатора. В дрожжевой клетке эти ферменты связаны с определенными клеточными структурами. Так, ферменты для глюкозы и спиртового брожения

находятся в цитоплазме, тогда как дыхание осуществляется благодаря ферментам, локализованным в митохондриях.

Органические вещества, необходимые для процесса дыхания и для сбраживания, поглощаются интегрированными протеинами клеточной мембраны и транспортируются через нее. Поэтому дрожжевой клеткой могут быть поглощены лишь такие вещества, для которых имеются соответствующие транспортные механизмы. Это, в свою очередь, зависит от количества и типов ферментов дрожжевой клетки.

Метаболизм азотистых веществ

Дрожжевая клетка на 35-60 % состоит из белков, поэтому для строительства нового клеточного вещества ей необходим азот который представлен в сусле (в виде аминокислот). Дрожжи усваивают только низкомолекулярные аминокислоты с количеством углеродных атомов не более 4, причем эти аминокислоты потребляются дрожжами в определенной последовательности. Особое значение для дрожжей имеет NH_2 – группа – аминогруппа, которая отщепляется и используется для строительства клеточных белков. При этом из аминокислоты после дезаминирования, декарбоксилирования и восстановления возникает высший спирт, который выделяется во внешнюю среду как побочный продукт брожения. Потребление аминокислот происходит сквозь белки пор клеточной стенки. Предварительно аминокислоты собираются и накапливаются во внешней сфере, из которой они по мере необходимости транспортируются во внутреннюю сферу, имеющую постоянные размеры. Здесь происходит перестраивание аминокислот и строительство клеточных белков.

Таким образом, метаболизм азотистых веществ имеет большое значение для качества пива, так как возникающие в этом процессе продукты возвращаются во внешнюю среду и оказывают влияние на стабильность, вкус, пеностойкость и другие потребительские свойства пива.

Метаболизм жиров

Жиры возникают из протеинов и фосфора в форме фосфолипидов клеточных мембран, расположенных вокруг клетки и вокруг органелл внутри клетки. Дрожжи во время брожения в 4-6 раз увеличивают свою массу – должно быть синтезировано соответствующее количество липидов, при этом для синтеза липидов необходим кислород.

Дрожжи усваивают жирные кислоты из сусла, хотя могут их синтезировать самостоятельно. Синтез начинается с пирувата посредством

активации уксусной кислоты. Дрожжи также в состоянии образовывать и ненасыщенные жирные кислоты, имеющие большое влияние на гибкость клеточной мембраны; для этого синтеза также необходим кислород. Если у дрожжевой клетки слишком мало длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, то способность клеточной мембраны пропускать вещества из окружающей среды сильно уменьшается, а потребление аминокислот может вообще прекратиться.

Метаболизм азотистых веществ преобладает над метаболизмом жиров, который имеет место только тогда, когда источники азота для синтеза белков уже исчерпаны. Так как, с другой стороны, метаболизм жиров тесно связан с кислородом, то решающее значение для синтеза жирных кислот приобретает хорошее и достаточное аэрирование в начале брожения.

Синтезированные дрожжами длинноцепочечные жирные кислоты нельзя рассматривать как отрицательно влияющие на вкусовую стабильность пива, они крепко связаны с клеточными мембранами. Опасность ухудшения вкуса возникает только в случае автолиза (распад составных частей клетки), так как свободные ненасыщенные кислоты обладают высокой способностью вступать в реакцию.

Метаболизм углеводов

Дрожжи потребляют из сусла моносахариды (глюкозу и фруктозу), дисахариды (мальтозу и сахарозу), трисахарид мальтотриозу и сбраживают их именно в такой последовательности. Известно, что 98 % сахара уходит на брожение и только 2 % – на дыхание.

Очень небольшое количество мальтозы (около 0,25 %) дрожжи запасают как резервный углевод. Важнейший запасной углевод – это гликоген, полимер глюкозы, синтезирующийся и хранящийся в цитоплазме в форме характерных скоплений. Гликоген потребляется дрожжами перед началом брожения как первичный источник энергии, и поэтому его количество значительно уменьшается в первые 10-12 часов после введения дрожжей в сусло, а потом вновь возрастает. Масса накопленного в ходе брожения гликогена может составлять до 30 % массы клетки (в пересчете на сухое вещество). Во время хранения дрожжей перед последующим использованием количество гликогена значительно уменьшается, причем тем сильнее, чем дольше и чем при более высокой температуре хранятся дрожжи. При холодном хранении гликоген в значительной степени сохраняется, и это имеет большое влияние на жизненную силу дрожжей.

Наряду с гликогеном дрожжи накапливают до 6 % трегалозы (в пересчете на сухое вещество). Трегалоза – это резервный углевод, дисахарид, состоящий из глюкозных остатков. Трегалоза находится в цитоплазме дрожжевой клетки; часть трегалозы связана с клеточной стенкой и защищает ее от внешнего воздействия. Этот резервный углевод также спустя несколько часов после начала брожения претерпевает расщепление, а затем синтез и накопление, которое протекает быстрее и интенсивнее при высокой температуре.

Запасные углеводы, особенно гликоген, имеют для дрожжей огромное значение. Дрожжевая клетка потребляет этот запас, когда снаружи не остается питательных веществ; тем самым она может получать энергию и поддерживать обмен веществ на минимальном уровне. Это как раз и происходит в конце холодного дображивания, а также при хранении дрожжей до следующего использования.

Метаболизм минеральных веществ

Дрожжи в первую очередь нуждаются в фосфоре и сере, а также в незначительном количестве некоторых ионов металлов.

Фосфор поступает из солода в форме фосфатов и всегда присутствует в хорошо растворенном солоде в достаточном количестве. Фосфор необходим для:

- образования АТФ;
- создания двойной фосфолипидной мембраны вокруг клетки;
- поддержания буферности, препятствующей сдвигу рН.

Нехватка фосфора проявляется в: плохом брожении; отсутствии роста дрожжевой клетки.

Сера усваивается дрожжами из неорганических сульфатов, из серосодержащих аминокислот (метионин, цистеин) и в виде SO_2 участвует в метаболизме клеточных аминокислот. Когда рост клетки прекращается, образующийся SO_2 выделяется во внешнюю среду. Синтез SO_2 завершается только с остановкой обмена веществ.

Возникновению свободного SO_2 препятствуют все факторы, способствующие размножению дрожжей: сильная аэрация; многократный долив; использование активных дрожжей, богатых гликогеном.

Повышенная концентрация сульфитов возникает при высокой температуре, длительном дображивании и недостаточной аэрации.

Особенно важно то, что ацетальдегид совместно с SO_2 способен связывать карбонилы, тем самым препятствуя старению пива. Поэтому возникающий во время брожения SO_2 оказывает положительное влияние на вкусовую стабильность пива.

В метаболизме сернистых соединений наряду с образованием сульфитов важную, но отрицательную роль играет возникновение летучих сульфидов, в особенности диметилсульфида.

Калий особенно необходим для метаболизма углеводов и способствует протеканию всех связанных с АТФ ферментативных превращений. Также важна рН-регулирующая роль калия, связанная с обменом возникающих ионов водорода на ионы калия.

Натрий активизирует ферменты и одновременно играет существенную роль для транспортировки веществ через клеточную стенку.

Магний имеет решающее значение для реакций с фосфором, прежде всего при брожении. Эту функцию не могут выполнять никакие другие ионы.

Кальций замедляет дегенерацию дрожжей и способствует хлопьеобразованию. Недостаток кальция может компенсироваться магнием или марганцем.

Железо и марганец являются важнейшими микроэлементами, необходимыми для дыхания и почкования.

Цинк оказывает влияние на синтез белка и для брожения имеет огромное значение. Недостаток цинка приводит к вялому брожению; потребность в нем лежит в пределах 0,1-0,15 мг/л сусла. Цинк является тем микроэлементом, в котором чаще всего испытывают недостаток дрожжи, так как большая его часть остается в дробине.

Нитраты не потребляются дрожжами, но восстанавливаются в нитриты, которые являются клеточным ядом и вызывают вялое брожение и плохое размножение дрожжей. Нитраты поступают из воды, для дрожжей уже опасна их концентрация в размере 20 мг/л /20/.

Образование и расщепление побочных продуктов брожения

Во время брожения дрожжи выделяют в пиво целый ряд продуктов метаболизма, которые претерпевают количественные и качественные изменения, частично реагируя друг с другом. Побочные продукты брожения имеют решающее значение для качества готового пива. Различают:

1. Вещества, формирующие букет молодого пива (диацетил, альдегиды, сернистые соединения). Они придают пиву нечистый, зеленый, незрелый вкус и запах и при повышенной концентрации отрицательно влияют на качество пива. Эти вещества в ходе брожения и созревания могут быть удалены из пива биохимическим путем, в чем и состоит цель созревания пива.

2. Вещества формирующие букет готового пива (высшие спирты, эфиры). Они в значительной мере определяют аромат пива, их наличие в определенной концентрации является предпосылкой для получения качественного пива. Эти вещества, в отличие от первой группы, не могут быть удалены из пива технологическим путем /21/.

Влияние на дрожжи различных факторов

В периоды разведения чистой культуры, брожения и созревания, хранения дрожжей до следующего использования, на дрожжевую клетку могут оказывать неблагоприятное воздействие различные факторы. Они могут тормозить метаболизм или даже привести к ее гибели. Такие факторы являются стресс-факторами и приводят к различным нарушениям в обмене веществ дрожжей. К стресс-факторам относятся:

Высокая экстрактивность сусла

При сбраживании сусла с высокой экстрактивностью зачастую возникают проблемы, так как концентрация сахара слишком высока, а содержание аминокислот в пиве недостаточно. Замедление брожения можно устранить только внесением новых дрожжей или добавкой сбраживаемого сусла с дрожжами в логарифмической фазе роста (пива на стадии высоких завитков).

Высокая концентрация этанола

При производстве «нормального» пива низового брожения дрожжи без проблем образуют 4,7- 5,0 % объемной доли спирта. Большинство штаммов дрожжей также без труда сбраживает сусло до содержания спирта 6-7 % объемной доли; при более высокой концентрации спирта возникают большие трудности.

На метаболизм дрожжевой клетки спирт оказывает следующее воздействие: препятствует увеличению размеров клетки; убивает клетки; замедляет брожение.

С ростом концентрации спирта содержание некоторых жирных кислот в фосфолипидной мембране клеточной стенки существенно изменяется, что отрицательно отражается на качестве пива.

Наличие кислорода

Для нормального размножения дрожжи нуждаются в кислороде. При наличии кислорода образуются незаменимые липиды и ненасыщенные жирные кислоты, идущие на строительство клеточного вещества. Если сусло не аэрировалось или недостаточно аэрировалось, то:

- дрожжи испытывают нехватку этих веществ;
- стадия размножения завершается раньше времени;
- возникают нарушения брожения, удлиняется срок брожения;
- значительно возрастает количество мертвых клеток.

Поэтому крайне важно контролировать в начале брожения наличие кислорода в сусле.

Низкие температуры

Температуры, применяемые при низовом брожении, находятся существенно ниже температурного оптимума для ферментов дрожжей. Уже при разведении чистой культуры используют ступенчато понижающиеся температуры, которые все больше и больше соответствуют будущим температурам брожения.

Когда дрожжи без подготовки вносят в холодное сусло или сильно охлаждают, они «испытывают шок» и начинают выделять во внешнюю среду аминокислоты и нуклеотиды. Размножение их замедляется или совсем прекращается, и брожение затягивается или полностью останавливается.

Дрожжи очень чувствительны к скачкообразному понижению температуры (холодный шок).

Повышенные температуры

«Шок» от нагрева возникает у дрожжей при кратковременном повышении температуры до 37-40 °С. При этом начинается активный синтез определенных протеинов, но через несколько часов метаболизм возвращается к нормальному состоянию.

Повышенное давление

При брожении под давлением в танке поддерживается избыточное давление от 0,2-1,8 бар благодаря чему в пиве повышается концентрация CO_2 . при этом на дрожжи действуют стрессовые факторы – не только

повышенное статическое давление, но и возросшее парциальное давление CO_2 .

Из-за возросшей концентрации CO_2 замедляется восстановление собственных веществ клеток дрожжей. При этом расщепление этих веществ тоже замедляется, но не в такой степени, как их восстановление. Это позволяет сбраживать сусло при сравнительно высоких температурах, причем типичные для сильного размножения ароматические компоненты (такие, как эфиры и высшие спирты) образуются слабее /22/.

Размножение и рост дрожжей

Типичным способом размножения дрожжей является почкование, и поэтому их еще называют почкующимися грибами. При почковании из материнской клетки образуется маленькая пузырьковая выпуклость, в которую переходит часть цитоплазмы, а также дочернее ядро, образующееся путем деления. После отделения дочерней клетки на материнской клетке остается почечный рубец. По числу рубцов (от 4 до 6) можно узнать возраст клетки.

У одних некоторых штаммов дрожжей материнская и дочерняя клетки отделяются друг от друга, причем на материнской клетке остается почечный рубец. У других штаммов клетки остаются взаимосвязанными и образуют почечные сообщества. Отмеченный период времени от начала почкования материнской клетки до почкования дочерней клетки называется генерацией. За каждую генерацию количество дрожжевых клеток удваивается.

Если дрожжи перенести в свежий питательный раствор, как например, при засеве сусла дрожжами, то они начинают расти. Этот рост характеризуется определенными закономерностями – различают шесть фаз роста, протекающих с различной скоростью.

Латентная, или индукционная фаза. В этой фазе (разбега) – лаг-фаза, происходит активизация обмена веществ. Длительность этой фазы сильно варьирует, она зависит от вида дрожжей, возраста и от условий выращивания. Эта фаза, заканчивается с началом деления клеток.

Фаза ускорения. В этой фазе, примыкающей к латентной, скорость деления клеток возрастает с ускорением.

Экспоненциальная фаза. В этой фазе экспоненциального или логарифмического размножения – лог-фаза, скорость размножения постоянна и максимальна. Время генерации, то есть отрезок времени, за которое

число клеток удваивается, достигает в этой фазе своего минимума. Для дрожжей в типичных для пивоварения условиях размножения он составляет несколько часов.

Фаза замедления. В результате действия различных факторов — например, обеднения субстрата питательными веществами или насыщения тормозящими рост продуктами обмена веществ — лог-фаза ограничена по времени и переходит в фазу замедления с убывающей скоростью размножения.

Стационарная фаза. В заключительной, стационарной фазе число дрожжей остается постоянным. Устанавливается равновесие между числом вновь образующихся и отмирающих клеток.

Фаза отмирания. В этой, последней, фазе число погибающих клеток превышает число образующихся путем размножения, и общее число клеток сокращается.

На длительность и интенсивность отдельных фаз роста существенно влияют субстрат, температура и физиологическое состояние дрожжей. Субстрат должен содержать все необходимые для их роста питательные вещества. Так же существенны состав воды, pH и концентрация кислорода в субстрате. Дрожжи предпочитают расти в кислых растворах. Также росту дрожжей способствует аэрация сусла перед введением дрожжей.

На рост решающим образом влияет и температура, но он может происходить и в более или менее относительно широком диапазоне температур, от 0 до 40 °C, а оптимум составляет около 25- 30 °C.

Физиологическое состояние клеток: возраст, состояние питательной среды — все эти факторы сильно влияют на продолжительность латентной фазы. Очень быстрая активация обмена веществ происходит у тех дрожжевых клеток, которые в экспоненциальной фазе роста были перенесены в свежий субстрат. В условиях пивоваренного предприятия это означает, что быстрое наступление брожения легче всего достичь с дрожжами, которые отбираются в стадии главного брожения и без промежуточного хранения вводятся в готовое сусло [23].

Характеристика пивоваренных дрожжей

Среди дрожжей вида *Saccharomyces* применяемых преимущественно в пивоварении как культурные дрожжи, различают многочисленные штаммы. В пивном производстве эти штаммы по характеру брожения делят на две

большие группы – дрожжи верхового и низового брожения. Между ними существуют морфологические, физиологические и технологические различия.

Морфологические признаки

Дрожжи верхового и низового брожения можно отличить под микроскопом по картине их почкования. Дрожжи низового брожения представляют собой почти исключительно отдельные клетки или их пары, тогда как дрожжи верхового брожения образуют почечные сообщества.

У дрожжей верхового брожения материнская и дочерняя клетки, как правило, долго между собой связаны, благодаря чему образуются разветвленные сообщества клеток. У дрожжей низового брожения материнские и дочерние клетки после размножения отделяются друг от друга. Форма же клеток у тех и других дрожжей одинакова.

Физиологические различия

Важнейший физиологический отличительный признак дрожжей верхового и низового брожения состоит в сбраживании трисахарида рафинозы. Низовые дрожжи со своим набором ферментов могут полностью перерабатывать рафинозу, тогда как верховые дрожжи сбраживают трисахарид лишь на 1/3.

Другие отличительные признаки касаются обмена веществ при дыхании и брожении, а также способности к спорообразованию. В то время как низовые дрожжи в основном используют обмен веществ путем брожения, верховые дрожжи отличаются выраженным обменом веществ путем дыхания. В соответствии с этим после брожения прирост биомассы у верховых дрожжей больше, чем низовых. Низовые дрожжи беднее ферментами, чем верховые. У низовых дрожжей ограничена способность образовывать аскоспоры – по сравнению с верховыми они образуют споры реже, а спорообразование продолжается дольше.

Технологические различия при сбраживании

Название штаммов дрожжей верхового или низового брожения происходит от характерной картины их поведения при брожении. Верховые дрожжи в процессе брожения в основном поднимаются на поверхность, тогда как низовые по окончании брожения опускаются на дно.

Верховые дрожжи также опускаются на дно по окончании брожения, но значительно позже низовых.

Все культурные дрожжи по структуре накапливаемой дрожжевой массы подразделяются на пылевидные и хлопьевидные.

У пылевидных дрожжей клетки тонко распределены в бродящем сусле и медленно опускаются на дно лишь в конце брожения.

Клетки хлопьевидных дрожжей через некоторое время собираются в большие хлопья и затем быстро оседают. Способность дрожжей образовывать хлопья обусловлена генетически. Верховые дрожжи хлопья не образуют.

Способность штаммов дрожжей образовывать хлопья имеет большое практическое значение. Хлопьевидные дрожжи дают пиво лучше осветленное, но с более низкой степенью сбраживания, чем пылевидные и верховые дрожжи, тогда как верховые пылевидные дрожжи дают не такое прозрачное пиво, но с повышенной степенью сбраживания.

Верховые и низовые дрожжи различаются также по применяемым температурам брожения. Низовыми дрожжами сбраживают сусло при температурах от 4 до 12 °С, а с верховыми штаммами дрожжей работают при температурах от 14 до 25 °С.

Следовательно, при выборе штамма необходимо учитывать совокупность всех свойств, чтобы выбранные дрожжи имели высокие бродильную активность и флокуляционную (хлопьеобразование) способность, обеспечивали также хороший вкус и аромат пива. Выбор штаммов, которые выводятся как чистая культура и применяются для введения в сусло, определяется на основе определенных критериев. К ним относятся в основном:

- поведение при брожении (верховые или низовые дрожжи);
- хлопьеобразование (пылевидные или хлопьевидные);
- интенсивность брожения (скорость брожения и степень сбраживания);
- интенсивность размножения;
- образование и расщепление побочных продуктов брожения (образование аромата).

К виду дрожжей *Saccharomyces* относятся не только культурные штаммы, но также дикие дрожжи, опасные для пивоварения. Например, для пива вредителями являются винные дрожжи, а также дрожжи некоторых других видов и родов. Попадание таких микроорганизмов в пиво называется контаминацией (инфицированием).

Эти микроорганизмы, называемые, в отличие от культурных дрожжей, дикими дрожжами, попадают в пивоваренное производство главным образом с

сырьем и всегда нежелательны. Они могут вызывать в пиве неприятные вкус и запах, а также помутнение /18/.

1.3 Способы культивирования и поддержания рас дрожжей в лабораторных условиях

Дрожжи, необходимые для проведения брожения, могут быть получены при разведении чистой культуры дрожжей.

Принцип разведения чистой культуры состоит в том, что активные дрожжевые клетки изолируют и размножают в стерильных условиях так долго, пока их количества не хватит для использования в стандартной бродильной емкости.

При разведении чистой культуры различают три стадии:

1. Получение пригодных дрожжевых клеток;
2. Разведение чистой культуры в лаборатории;
3. Размножение чистой культуры на производстве до количества, вносимого в сусло при нормальных условиях.

Цель размножения чистой культуры дрожжей состоит в том, чтобы за кратчайшее время подготовить в стерильных условиях задаточные дрожжи с правильным метаболизмом, которые обеспечат нормальное брожение и хорошее качество пива. При этом решающее значение приобретают правильная обработка дрожжей и их разведение.

Для размножения дрожжей необходимы три фактора: наличие кислорода, аминокислот и микроэлементов.

Важнейший фактор, влияющий на размножение дрожжей – наличие кислорода. Благодаря начавшемуся дыханию дрожжи получают возможность активизировать обмен веществ и размножаться. Однако наличие сахара в среде препятствует дыханию и побуждает к брожению, в связи с чем нельзя усилить размножение дрожжей, все более увеличивая аэрацию.

С возникновением клетки начинается строительство и сохранение фосфолипидов, являющихся главными компонентами двойной клеточной мембраны. Благодаря кислороду часть жирных кислот переводится в ненасыщенные жирные кислоты, обладающие более низкой точкой плавления и благоприятствующие лучшему проникновению веществ сквозь мембрану.

Кислород необходим и для синтеза стерина. Синтез стерина, с одной стороны, тесно связан с ростом дрожжей, а с другой – с обогащением клетки гликогеном.

Между синтезом липидов и эфиров существует обратная зависимость: пока образуются липиды (при наличии кислорода), не происходит возникновения эфиров.

Содержащихся в сусле аминокислот и минеральных веществ достаточно для брожения, но когда дрожжи размножаются, они нуждаются в гораздо большем количестве аминокислот и микроэлементов. Этих веществ не хватает, так что даже при очень интенсивной аэрации размножение прекращается при достижении концентрации примерно в 100 млн дрожжевых клеток/мл среды. Лимитирующим фактором является, в первую очередь, содержание аминокислот в сусле (200-240 мг/л), из которых не все могут ассимилироваться дрожжами (например, пролин) /2/.

Требования к суслу и задаточным дрожжам

К суслу предъявляются следующие требования:

Сусло, в которое вносятся дрожжи (начальное сусло) должно:

- быть осахаренным;
- соответствовать по цвету и составу желаемому типу пива;
- содержать, по меньшей мере, 8-10 мг O_2 /л;
- pH - от 5,0 до 5,2;
- не быть инфицированным.

Задаточные дрожжи должны быть получены при разведении того штамма, который позволяет достичь желаемого вкуса пива. Кроме того, дрожжи должны:

- быть жизнеспособными;
- ни в коем случае не содержать инфицирующую микрофлору или дикие дрожжи;
- содержать не более 3 % мертвых клеток;
- обладать густой консистенцией.

Для разведения чистой культуры используют клетки тех штаммов дрожжей, которые хорошо зарекомендовали себя в опытах. Капли с одиночными дрожжевыми клетками изолируются под микроскопом. Изолируют много таких отдельных культур и дают им развиваться при температуре 8-10 °С – температура при которой дрожжи бродят в бродильном отделении. Под микроскопом можно наблюдать различные стадии роста дрожжевых клеток и отобрать самую сильную колонию. Если дрожжевая

культура не используется сразу, то клетки хранятся на твердой питательной среде (сусло-агар). Культура на косом агаре хранится под слоем парафинового масла, защищающего ее от высыхания в течении 6-9 месяцев при температуре 0-5 °С.

Для выращивания чистой культуры дрожжей важны следующие условия:

- вплоть до танка размножения должна соблюдаться стерильность;
- главной предпосылкой для быстрого роста дрожжей интенсивная аэрация стерильным воздухом;
- для разведения чистой культуры используют готовое охмеленное сусло, так как горькие вещества хмеля оказывают на постороннюю микрофлору тормозящее воздействие;
- при температуре 20-25 °С дрожжи размножаются быстрее, чем при более низких, однако для того чтобы дрожжи смогли нормально сбродить сусло при приготовлении, в ходе выращивания чистой культуры необходимо температуру постепенно приближать к значениям, используемым на производстве.

Лабораторная стадия предусматривает несколько последовательных пересевов.

Вначале чистую культуру дрожжей с помощью микробиологической петли переносят в колбу, содержащую 20 мл стерильного охмеленного сусла.

Посевы хранят при температуре 20-23 °С до момента интенсивного брожения 24-36 часа. Далее бродящее сусло переливают в колбу, содержащую 100 мл охмеленного сусла, и при температуре 8-10 или 18-20 °С (если нет холодильника) проводят брожение. Бродящую разводку из этой колбы переливают в тщательно вымытую спиртом или простерилизованную бутылку и доводят объем дрожжевой разводки до 500 мл суслом. Брожение сусла ведется при той же температуре. При последующем пересеве объем дрожжевой разводки доводят охмеленным суслом до 2500 мл и при той же температуре продолжают брожение. После энергичного брожения разводку дрожжей переносят в бутылку, в которую набирают охмеленное сусло до 10 литров и сбродивают в течении 5-6 суток. При температуре 7-8 °С. После этого пересева, который является пятым, заканчивается лабораторная стадия разведения чистых культур дрожжей. Дальнейшее разведение дрожжей проходит на производстве. Установки для выращивания чистой культуры состоят из закрытых емкостей различных размеров, в которых дрожжи размножаются до тех пор, пока их количества не будет достаточно для внесения в стандартный чан или танк/23/.

Таким образом, вопросы, связанные с технологическими аспектами пивоварения достаточно широко известны и описаны в научной и специализированной литературе, однако, до настоящего времени оставался не полностью раскрытым вопрос об изучении в сравнительном аспекте морфологических и биохимических свойств некоторых рас дрожжей, используемых в приготовлении различных сортов пива. Решению некоторых задач этого вопроса посвящена настоящая магистерская диссертация.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Цель и задачи исследований

Целью наших исследований было сравнительное изучение морфологических и биохимических свойств рас дрожжей, используемых в приготовлении различных сортов пива.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить чистую культуру дрожжей из некоторых сортов пива, реализуемых в торговой сети Павлодарского региона.
2. Сравнить морфологические признаки выделенных чистых культур.
3. Изучить биохимическую активность выделенных чистых культур.
4. Определить, в каком из сортов продукта сохраняются возбудители спиртового брожения, обладающие наибольшей физиологической активностью, свойственной данному виду микроорганизмов.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Материалы, аппаратура и реактивы

В процессе экспериментов были использованы следующие материалы, аппаратура и реактивы:

1. Автоклав ВК-30 для стерилизации питательных сред;
2. Баня водяная с терморегулятором;
3. Весы лабораторные ВЛКТ-500;
4. Весы аналитические ВЛР-200;
5. Дистиллятор электрический;
6. Микроскоп биологический;
7. Плита электрическая;
8. Сушильный шкаф с терморегулятором SUP-4 (от 0-200⁰С);

9. Термостаты, поддерживающие температуру $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (ТС-80 М-2);
10. Холодильник по ГОСТ 16317-87;
11. Бактериологическая петля;
12. Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-76;
13. Вага медицинская по ГОСТ 5556-81;
14. Воронка стеклянная по ГОСТ 25336-82;
15. Каплеуловитель по ГОСТ 10359-75;
16. Кастрюли разные;
17. Колба мерная вместимостью 100 см^3 ;
18. Колба коническая плоскодонная разной вместимости по ГОСТ 25336-82;
19. Марля медицинская по ГОСТ 9412-93;
20. Пикнометр по ГОСТ 22524-77 типа ПЖ2;
21. Пинцет по ГОСТ 21241-89;
22. Пипетки разной вместимости;
23. Пробирки;
24. Промывалка;
25. Спиртовка по ГОСТ 25336-82;
26. Стаканы стеклянные разной вместимости;
27. Стекла покровные по ГОСТ 6672-75;
28. Стекла предметные по ГОСТ 9284-75;
29. Термометр ртутный стеклянный лабораторный по ГОСТ 215-73;
30. Флаконы стеклянные вместимостью 250 см^3 ;
31. Холодильник стеклянный лабораторный по ГОСТ 9499-70;
32. Цилиндры мерные разной вместимости по ГОСТ 1770-74;
33. Чашки Петри бактериологические по ГОСТ 25336-82;
34. Штатив для холодильника;
35. Шпатели металлические;
36. Агар сухой питательный;
37. Агар сухой Сабуро;
38. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
39. Вода водопроводная сухая;
40. Теллурид калия;
41. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
42. Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962-67 /24/

В качестве объектов исследования было использовано нефильтрованное пиво:

1. «Классическое» (изготовитель АО «Роса», г Павлодар) - 1л;
2. «Остербрау» (изготовитель ТОО «Горизонт», г Павлодар) - 1л;
3. «Пшеничное» (изготовитель ТОО «Ирмад», г Павлодар) - 1л;
4. «Келлерс» (изготовитель ТОО «Гамбринус», г Екибастуз) - 1л.

И охмеленное сусло:

1. АО «Роса» (ячменное)- 1,5 л;
2. ТОО «Горизонт» (ячменное)- 1,5 л;
3. ТОО «Ирмад» (пшеничное)- 1,5 л.

2.2.2 Методы

Микробиологические

Метод определения дрожжей. ГОСТ 10444.12-88

Приготовление питательных сред, физиологического раствора

Питательный агар для культивирования микроорганизмов:

Состав в граммах на 1л воды: панкреатический гидролизат рыбной муки – 24,0; натрий хлористый – 4,0; агар микробиологический 12,0. рН $7,3 \pm 0,2$.

38,0 г порошка размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 1-2 минуты до полного расплавления агара, фильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 минут. При необходимости среду охладить до температуры $45-50^{\circ}\text{C}$, разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-6 мм. После застывания среды чашки подсушить при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 40-60 минут.

Агар Сабуро для выращивания дрожжей и плесневых грибов:

Состав в граммах на 1л воды: пептон сухой ферментативный для бактериологических целей – 10,0; ферментативный гидролизат казеина неглубокой степени расщепления – 10,0; экстракт кормовых дрожжей – 5,0; глюкоза – 40,0; агар микробиологический – 10,0. рН от 6,0 до 6,6.

76,0 г препарата размешать в 1л дистиллированной воды, кипятить 2 мин. до полного расплавления агара, профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и стерилизовать автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 минут. Среду охладить до температуры

45-50 °С, добавить в асептических условиях 5,0 мл 2% раствора теллурита калия.

Физиологический раствор:

8,5 г хлористого натрия растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 минут /25/.

Подготовка проб

Из каждой пробы продукта отбирают навеску для приготовления разведений. Навеску отбирают весовым или объемным методом непосредственно после вскрытия пробы. Навеску отбирают так, чтобы в ней были представлены все его компоненты и в том же соотношении, что и в анализируемой пробе. Для приготовления разведений навески продукта используют физиологический раствор. Соотношение между массой навески продукта и объемом физиологического раствора для исходного и последующих разведений составляет: 1:9 – для десятикратного разведения. Первое десятикратное разведение является исходным, из него получают последующие разведения. Последующее второе разведение готовят из одной доли исходного разведения и девяти долей физиологического раствора путем смешивания в пробирке /26/.

Проведение испытания

Из подготовленной пробы продукта отбирают навеску объемом (1±0,1) см³. Степень разведения навески продукта для посева глубинным методом в плотную среду выбирают так, чтобы общее количество колоний выросших на чашке Петри колебалось в пределах 5-50.

Продукт и его разведение высевают по ГОСТ 26670-91 параллельно в две чашки Петри для каждого вида разведения. Посевы заливают не позднее чем через 15 мин. расплавленной и охлажденной до температуры (45±1) °С питательной средой. Высота слоя питательной среды должна быть 4-5 мм. Среду немедленно равномерно перемешивают с посевным материалом круговыми движениями чашки так, чтобы среда не вытекла из чашки и не загрязняла крышку. После застывания среды чашки помещают в термостат. Параллельно с этим заливают чашку А Петри 15-20 см³ среды для проверки ее стерильности /27/.

Посевы термостатируют при температуре (24±1) °С в течение 5 суток, дном вверх.

Рост дрожжей на агаризованных средах сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем.

При необходимости проводят микроскопические исследования. Для этого из отдельных колоний готовят препараты методом раздавленной капли. На предметное стекло наносят каплю стерильной водопроводной воды. Затем в эту каплю прокаленной петлей вносится часть колонии. Полученная суспензия покрывается покровным стеклом. Результаты микроскопирования оценивают пользуясь характеристикой дрожжей:

Дрожжи – одноклеточные микроорганизмы, клетки круглой или овальной или продолговатой формы, длиной от 2,5 до 30 мкм и шириной от 2,5 до 10 мкм, часто почкующиеся.

При необходимости подтверждения принадлежности характерных колоний к выявляемым микроорганизмам отбирают не менее 5 отдельных колоний для получения чистой культуры. Каждую выбранную колонию микроорганизмов пересевают на неселективную питательную среду, для чего кончиком стерильной петли (диаметр до 2 мм) отбирают небольшое количество верхней части колонии микроорганизмов. Посевы инкубируют в условиях указанных в нормативно-технической документации, устанавливающей методы анализа. После инкубирования отмечают колонии одного типа /25/.

Физико-химические

Метод определения спирта, действительного экстракта и расчет сухих веществ в начальном сусле. ГОСТ 12787-81

Метод основан на отгонке спирта из навески пива и определении относительной плотности дистиллята и остатка после отгонки, доведенных водой до начальной массы.

Подготовка к испытанию

Освобождение пива от двуокиси углерода. 250-300 см³ пива наливают в колбу вместимостью 1000 см³, доводят температуру до 20 °С с погрешностью не более 1,0 °С, затем всряхивают, закрыв колбу ладонью, периодически приоткрывая ее, до тех пор, пока прекратится ощущение давления изнутри. Встряхивание повторяют два-три раза с интервалом в 5 мин. непрозрачное пиво фильтруют через бумажный фильтр.

Тарирование пикнометра типа ПЖ2

Пикнометр, тщательно вымытый и высушенный до постоянной массы, взвешивают с погрешностью не более 0,0001 г. Затем наполняют его немного выше метки дистиллированной водой температурой $(20,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ и погружают в водяную баню температурой $(20,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ выше уровня воды в пикнометре не менее чем на 15 минут. Затем, не вынимая пикнометр из водяной бани, устанавливают уровень воды в нем так, чтобы нижний край мениска находился вровень с меткой, но не пересекал ее. Избыток воды отбирают фильтровальной бумагой с ровно обрезанными краями, свернутой в тонкую трубочку. Горлышко пикнометра внутри вытирают фильтровальной бумагой. Пикнометр вынимают из воды, вытирают досуха и взвешивают с погрешностью не более 0,0001 г. Наполнение пикнометра водой, установку мениска и взвешивание повторяют четыре-пять раз и для вычисления берут среднюю арифметическую величину массы пикнометра с водой.

Проведение испытания

Определение массовой доли спирта

В сухую плоскодонную тарированную колбу взвешивают 100 г пива с погрешностью не более 0,1 г предварительно освобожденного от двуокиси углерода, добавляют 50 см³ дистиллированной воды. Затем колбу соединяют с холодильником через каплеуловитель и отгоняют 70-80 см³ пива в предварительно взвешенную с погрешностью не более 0,1 г приемную колбу, установленную в сосуд с холодной водой. В приемную колбу предварительно наливают 5-10 см³ дистиллированной воды. После отгонки к содержимому приемной колбы добавляют до 100 см³ дистиллированную воду, перемешивают и заполняют пикнометр испытуемым дистиллятом пива, предварительно ополоснув его 2-3 раза. Термостатирование, установку мениска и взвешивание проводят как при тарировании пикнометра.

Определение массовой доли действительного экстракта

Остаток после отгонки спирта доводят в колбе дистиллированной водой до первоначальной массы пива 100 см³, перемешивают, определяют плотность пикнометром.

Обработка результатов.

Относительную плотность дистиллята d , вычисляют по формуле

$$d = \frac{m_1 - m_2}{m_3 - m_2} \quad (1)$$

где m_1 — масса пикнометра с дистиллятом, г;

m_2 — масса пустого пикнометра, г;

m_3 — масса пикнометра с водой, г.

Массовую долю спирта в процентах в зависимости от относительной плотности дистиллята находят по справочному приложению.

Массовую долю действительного экстракта в процентах находят по справочному приложению.

Массовую долю сухих веществ в начальном сусле $M_{с.в.}$, %, вычисляют по формуле

$$M_{с.в.} = \frac{(m_{сх} \times 2,0665 + m_{э}) \times 100}{100 - m_{сх} \times 1,0665} \quad (2)$$

где $m_{с}$ — массовая доля спирта в пиве, %;

$m_{э}$ — массовая доля действительного экстракта в пиве, %;

2,0665 — количество экстракта, расходуемое на получение 1 г спирта, г;

1,0665 — количество веществ, удаляющихся при брожении с получением 1 г спирта, г /28/.

Объемную долю спирта $V_{с}$, %, рассчитывают по СТ РК 10-94 по формуле

$$V_{с} = \frac{m_{сх} d}{0,79067} \quad (3)$$

где $m_{с}$ — массовая доля спирта, %;

d — относительная плотность пива, 20 °С

0,79067 — относительная плотность безводного спирта при 20 °С;

Внешний вид, вкус и аромат определяют органолептически. Вкус и аромат — при температуре пива 12 ± 2 °С /29/.

2.3 Выделение чистой культуры

Из разведения пробы каждого сорта пива 1:10 (0,1), 1:100 (0,01) были взяты навески и посеяны параллельно в две чашки Петри для каждого вида разведения. Посевы залили агаром Сабу́ро, и инкубировали в термостате в

течение 5 суток, для выделения колоний дрожжей. Затем был сделан пересев разных колоний выросших дрожжей с агара Сабуро на Питательный агар, предварительно разлитый в чашки Петри для получения изолированных колоний дрожжей. Морфологические характеристики колоний дрожжей, взятых для посева, представлены в таблицах 2.1.-2.4.

Таблица 2.1 - Морфологическая характеристика колоний дрожжей, взятых для посева с пива «Классическое» (АО «Роса»)

№ чашки Петри	Характеристика колоний дрожжей взятых для посева	Разведение
1	Фигурная, средняя, белая, наполовину наружная колония	0,1
2	Круглая, большая, белая, наружная колония	0,1
3	Круглая, средняя, белая, наружная колония	0,1
4	Фигурная (звездочкй), большая, белая, наполовину наружная колония	0,01
5	Круглая, средняя, белая, наружная колония	0,01
6	Фигурная (звездочкй), средняя, белая, наружная колония	0,01

Таблица 2.2 - Морфологическая характеристика колоний дрожжей, взятых для посева с пива «Остербрау» (ТОО «Горизонт»)

№ чашки Петри	Характеристика колоний дрожжей взятых для посева	Разведение
1	Морщинистая, маленькая, белая, мучнистая, наружная колония	0,1
2	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,1
3	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,1
4	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,1
5	Неровно округлая, большая, кремовая с сердцевинкой, наружная колония	0,01

Продолжение таблицы 2.2

№ чашки Петри	Характеристика колоний дрожжей взятых для пересева	Разведение
6	Фигурная (зонтиком) с сердцевинной, средняя, кремовая колония	0,01
7	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,01

Таблица 2.3 - Морфологическая характеристика колоний дрожжей, взятых для пересева с пива «Пшеничное» (ТОО «Ирмад»)

№ чашки Петри	Характеристика колоний дрожжей взятых для пересева	Разведение
1	Круглая, большая, желтоватая, глянцевая, наружная колония	0,1
2	Круглая, маленькая, молочно-белая, наружная колония	0,1
3	Фигурная (зонтиком) с сердцевинной, средняя, желтоватая колония	0,1
4	Фигурная (зонтиком), средняя, желтоватая колония	0,1
5	Круглая, большая, желтоватая, глянцевая колония	0,1
6	Круглая, большая, желтоватая, глянцевая, наружная колония	0,01
7	Фигурная (зонтиком), средняя, желтоватая колония	0,01
8	Фигурная (зонтиком) с сердцевинной, средняя, желтоватая колония	0,01

Таблица 2.4 - Морфологическая характеристика колоний дрожжей взятых для пересева с пива Келлерс (ТОО «Гамбринус»)

№ чашки Петри	Характеристика колоний дрожжей взятых для пересева	Разведение
1	Круглая, средняя, белая, наружная колония	0,1
2	Морщинистая, мучнистая, маленькая, желтоватая, наружная колония	0,1
3	Круглая, маленькая, белая, наружная колония	0,1
4	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,1
5	Круглая, маленькая, белая, наружная колония	0,01
6	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,01
7	Круглая, средняя, белая, наружная колония	0,01
8	Круглая, большая, кремовая, глянцевая, наружная колония	0,01

В результате посева было установлено, что колонии, выросшие на агаре Сабуро, по морфологической характеристике соответствуют колониям дрожжей, что мы и хотели получить для проведения дальнейшего исследования.

Чашки Петри с пересевом инкубировали при температуре $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 3 суток.

Затем были проведены микроскопические исследования выросших изолированных колоний дрожжей методом раздавленной капли, результаты представлены в таблицах 2.5.-2.8.

Таблица 2.5- Описание результата микроскопирования изолированных колоний дрожжей взятых с пива «Классическое» (АО «Роса»)

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
1	Морщинистая, большая, светло розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие

Продолжение таблицы 2.5

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
2	Морщинистая, мелкая, светло розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
3	Морщинистая, средняя, светло розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
4	Морщинистая, средняя, светло розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
5	Морщинистая, большая, светло розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие, почкующиеся
6	Морщинистая, большая, светло розовая колония	Клетки круглой и овальной формы, мелкие

Таблица 2.6 - Описание результата микроскопирования изолированных колоний дрожжей взятых с пива «Остербрау» (ТОО «Горизонт»)

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
1	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие
2	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
3	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся
4	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
5	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
6	Круглая, большая, кремовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
7	Круглая, большая, розовая колония	Клетки круглой формы, мелкие

Таблица 2.7 - Описание результата микроскопирования изолированных колоний дрожжей взятых с пива «Пшеничное» (ТОО «Ирмад»)

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
1	Круглая, большая, кремовая колония	Клетки овальной формы, большие
2	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой и овальной формы, большие
3	Круглая, большая, кремовая колония	Клетки круглой и овальной формы, большие
4	Круглая, средняя, кремовая колонии	Клетки круглые и овальные, большие
5	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглые, большие
6	Круглая, большая, кремовая колония	Клетки круглой и овальной формы, большие
7	Круглая, средняя, белая колонии	Клетки круглой и овальной формы, мелкие
8	Круглая, средняя, молочно-белая колония	Клетки круглой и овальной формы, большие

Таблица 2.8 - Описание результата микроскопирования изолированных колоний дрожжей взятых с пива Келлерс (ТОО «Гамбринус»)

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
1	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, мелкие
2	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся
3	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся

Продолжение таблицы 2.8

№ чашки Петри	Характеристика изолированных колоний дрожжей взятых для микроскопирования	Результат микроскопирования
4	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся
5	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся
6	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся
7	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, средние
8	Круглая, средняя, кремовая колония	Клетки круглой формы, большие, почкующиеся

Как видно из данных, представленных в таблицах 2.5. – 2.8., в результате микроскопирования выросших изолированных колоний было установлено, что все они соответствуют группе микроорганизмов - дрожжи. Наиболее характерные колонии дрожжей, из которых были выделены дрожжевые клетки, были получены из пива «Келлерс».

2.4 Определение эффективности сохранения биохимических свойств возбудителей спиртового брожения

Выделенные изолированные колонии дрожжей с разных сортов пива были посеяны в охмеленное сусло разных сортов охлажденное до 6-7 °С. Посевы инкубировали 6 суток при температуре 10 °С. Затем в них определяли объемную долю спирта и рассчитывали массовую долю сухих веществ в начальном сусле, результаты представлены в таблице 2.9.

Таблица 2.9 - Содержание спирта и сухих веществ в опыте

Наименование сусла и дрожжей	Объемная доля спирта, %	Массовая доля сухих веществ, %
Сусло Роса дрожжи Роса	1,3	13,6
Сусло Роса дрожжи Остербрау	1,3	13,1
Сусло Роса дрожжи Ирмат	0,2	11,0
Сусло Роса дрожжи Келлерс	1,1	11,8
Сусло Остербрау дрожжи Роса	1,5	9,7
Сусло Остербрау дрожжи Остербрау	2,2	10,5
Сусло Остербрау дрожжи Ирмат	2,5	11,1
Сусло Остербрау дрожжи Келлерс	3,8	11,0
Сусло Ирмат дрожжи Роса	1,3	11,5
Сусло Ирмат дрожжи Остарбрау	0,2	10,3
Сусло Ирмат дрожжи Ирмат	0,2	10,8
Сусло Ирмат дрожжи Келлерс	1,3	12,1

В результате исследований было установлено, что возбудители спиртового брожения наиболее лучше сохранили свои свойства в сусле «Остербрау», меньше в сусле «Ирмат». Спиртовое брожение лучше всех вызвали дрожжи, полученные из пива «Келлерс», а хуже – дрожжи, полученные из пива «Ирмат». В процессе исследования из пива «Келлерс» выросли наиболее лучшие колонии дрожжей - круглой формы, среднего размера, кремового цвета, а при микроскопировании было видно, что клетки дрожжей круглой формы, большие, почкующиеся (размножающиеся). В производстве пива при выборе расы учитывается интенсивность размножения дрожжей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований было установлено, что колонии, выросшие на агаре Сабура, при посеве различных сортов пива по морфологической характеристике соответствуют колониям дрожжей. Из них были выделены изолированные колонии дрожжей, которые по результатам микроскопирования были различны для каждого сорта пива. Наиболее лучшие колонии дрожжей выросли у пива «Келлерс», при микроскопии было обнаружено много почкующихся клеток, что учитывается при выборе расы дрожжей при производстве пива.

После посева выделенных с различных сортов пива изолированных колоний дрожжей в сусло и определения объемной доли спирта было установлено, что возбудители спиртового брожения наиболее лучше сохранили свои свойства в сусле «Остербрау», меньше в сусле «Ирмад». Это означает, что сохранение свойств возбудителей спиртового брожения зависит от вида сусла. Спиртовое брожение лучше всех вызвали дрожжи, полученные из пива «Келлерс», а хуже – дрожжи, полученные из пива «Ирмад». Таким образом, интенсивность спиртового брожения зависит от морфологических характеристик выделенных колоний дрожжей. Чем больше почкующихся клеток, тем интенсивнее брожение.

Данных, подтверждающих или опровергающих полученные нами результаты в доступной нам литературе обнаружено не было, в связи с этим считаем, что полученные нами результаты имеют определённое научное и практическое значение.

ВЫВОДЫ

На основании проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. При посеве из разных сортов пива выделяются разные расы дрожжей.
2. Сохранение свойств возбудителей спиртового брожения зависит от вида сусла.
3. Интенсивность спиртового брожения зависит от морфологических характеристик выделенных колоний дрожжей. Чем больше почкующихся клеток, тем интенсивнее брожение.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

При выборе расы дрожжей для приготовления пива необходимо учитывать следующие показатели:

- форма и размер клеток;
- интенсивность размножения;
- бродильная активность;
- обеспечение требуемых вкусовых свойств пива.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Позняковский В.М. Экспертиза напитков. Новосибирск: Издательство Новосибирского университета, 2000 - 332с.
2. Кунце В. Технология солода и пива. Санкт-Петербург: Профессия, 2001 - 911с.
3. Мальцев П.М. Технология бродильных производств. Москва: Пищевая промышленность, 1980 - 560с.
4. Калунянц К.А, Яровенко В.Л., Домарецкий В.А., Колчева Р.А. Технология солода, пива и безалкогольных напитков. Москва: Колос, 1992 - 446с.
5. Главчек Д., Лхотский А. Пивоварение. Москва: Пищевая промышленность, 1977 – 623с.
6. Kelch, K. Brwlt 24/25 1998, 1050-1051s.
7. Калунянц К.А, Яровенко В.Л. и др. Производство солода, пива и безалкогольных напитков. Москва: Колос, 1994 - 680с.
8. Косминский Г.И. Технология ссолода, пива и безалкогольных напитков. Минск: Дизайн ПРО, 1998 – 352с.
9. Eils, H.-G., u. Herberg. W.-D.: Brwlt 14 1998, 601-607s.
10. Тихомиров В.Г. Технология пивоваренного и безалкогольного производств. Москва: Колос, 1998 - 448с.
11. Manager. H.-J.: Brwlt 18 1997, 696-701s.
12. Колчева Р.А., Ермолаева Г.А. Производство пива и безалкогольных напитков. Москва: Агропромиздат, 1985 – 264с.
13. Vegeser. G., u. Geiger, E.: Brwlt 24/25 1998, 1060-1063s.
14. Орешенко А.В., Берестень Н.Ф. Пиво и напитки// Пищевая промышленность. 1997. № 4. – с. 28, 34.
15. Довгань В.Н. Книга о пиве. Смоленск: Русич, 1995 - 576с.
16. Ананьева И.А., Шаловалова Е.Н., Чернобровкин М.Г., Шпигун О.А. Использование хроматографических методов анализа для контроля качества пива// Партнеры и конкуренты. 2002. №12. 36-40с.
17. Manager. H.-J.: Brforum 22, 24 1996; 2,4,6 1997
18. Жвирбянская А.Ю., Исаева В.С. Дрожжи в пивоварении. Москва: Пищевая промышленность, 1979 – 247с.
19. Zimmermann, H.: Brwlt 6 1998, 190-194, 207-209s.

- 20.Плевако Е.А. Технология дрожжей. Москва: Пищевая промышленность, 1970 – 300с.
- 21.Back. W., Diener. C., u. Sacher. B.: Brwlt 28/29 1998, 1279-1284s.
- 22.Wasmuth, K., u. Gattermeyer, P.: Brwlt 12 1998, 472-477s.
- 23.Семихатова Н.М., Малыгина М.В. Микробиология дрожжевого производства. Москва: Пищевая промышленность, 1970 – 152с.
- 24.ГОСТ 10444.1-84. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. Москва.
- 25.ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. Москва.
- 26.ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. Москва.
- 27.ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. Москва.
- 28.ГОСТ 12787-81. Пиво. Методы определения спирта, действительного экстракта и расчет сухих веществ в начальном сусле. Москва.
- 29.СТ РК 10-94. Пиво. Национальные сорта. Общие технические условия. Алматы.