

УДК 663.5

## Влияние времени дрожжегенерации на параметры сбраживания ячменного сула повышенной концентрации

К.А. Кузнецова, kuzy51@rambler.ru

канд. техн. наук Н.В. Баракова, n.barakova@mail.ru

канд. техн. наук М.А. Начетова, nachetova@gmail.com

*Университет ИТМО*

191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

*Исследована продолжительность дрожжегенерации сухих спиртовых дрожжей для получения оптимального физиологического состояния и высокой бродильной активности, необходимых для полного сбраживания сула повышенной концентрации. В эксперименте использовался ячмень урожая 2015 года, ферментные препараты фирмы Erbsloeh. Осахаривание сула проводили двумя способами: традиционным – внесение глюкоамилазы дозой 7 ед. ГлС/г крахмала после водно-тепловой обработки замеса и осахаривание при 60°C в течение 30 мин; и методом одновременного осахаривания и брожения (метод SSF) – внесение глюкоамилазы перед задачей дрожжей в начале брожения при температуре сула 30°C. Массовая доля растворимых сухих веществ в суле составляла 21,4%. Осмоляльность сула, поступающего на брожение при традиционном способе осахаривания, составила 851 ммоль/кг, а по методу SSF – 531 ммоль/кг.*

*Для дрожжегенерации использовались сухие спиртовые дрожжи DistilaMax® HT производства Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, доза внесения которых составила 1,0 г на 1 дм<sup>3</sup> ячменного сула. Оценку физиологического состояния дрожжей проводили по концентрации дрожжевых клеток, количеству выделившегося диоксида углерода в процессе сбраживания сула и крепости зрелой бражки. Отбор дрожжевого сула осуществляли через 6; 7; 8 ч дрожжегенерации. Экспериментально установлено, что наибольшая крепость в бражке достигается при сбраживании сула, осахаренного методом SSF и сброженного дрожжами, отобранными через 7 ч дрожжегенерации. При этом дрожжегенерацию также рекомендуется проводить на суле, приготовленном методом SSF.*

**Ключевые слова:** сухие спиртовые дрожжи; дрожжегенерация; ячменное суло повышенной концентрации; осахаривание; глюкоамилаза.

DOI: 10.17586/2310-1164-2016-9-2-40-48

## Propagation time impact of on the parameters of high gravity barley mash fermentation

Ksenia A. Kuznetcova, kuzy51@rambler.ru

Ph.D. Nadezhda V. Barakova, n\_barakova@mail.ru

Ph.D. Maria A. Nachetova, nachetova@gmail.com

*ITMO University*

191002, Russia, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

*The article aimed to find out the correct propagation time to get the most efficient fermentation of high gravity barley mash. Barley harvested in 2015 and commercial enzymes produced by Erbsloeh were used for the experiment. Two saccharification methods were used: conventional one, when 7 units of glucoamylase preparation per gram of starch were added after mashing, and then mash is held at 60°C for 30 min; and the method of simultaneous saccharification and fermentation (SSF), when glucoamylase was added in the mash just before yeast pitching at the temperature of 30°C. Mass fraction of soluble solids in the mash was 21.4%. Osmolarity of the mash fermented by conventional saccharification was 851 mmole/kg, by SSF method – 531 mmole/kg. DistilaMax® HT ethanol dry yeast by Lallemand Biofuels & Distilled Spirits was used in the experiment. Quality of propagated yeast was evaluated by yeast cell count, quantity of carbon dioxide during the fermentation, and by ethanol concentration in fermented beer. Yeast was propagated for 6; 7, and 8 h. Analyses of experimental data proved that the sample prepared with the use of SSF method and fermented by yeast propagated for 7 h. had the highest final ethanol content. It was also observed that it is more efficient to use SSF method for propagation.*

**Keywords:** ethanol dry yeast; propagation; high gravity barley mash; saccharification; glucoamyase.

## Введение

Технологическая операция – дрожжегенерация часто применяется на спиртовых заводах с целью экономии расхода сухих спиртовых дрожжей [1]. Дрожжегенерация – процесс накопления биомассы дрожжей [2, 3], необходимой для полной утилизации всех сбраживаемых углеводов, содержащихся в сусле, при этом дрожжи должны обладать высокой продуктивностью и бродильной активностью [4–6]. Восстановление жизнеспособности сухих спиртовых дрожжей и их дальнейшее физиологическое состояние будет зависеть от качественных характеристик питательной среды, и в частности, от ее углеводного состава [7, 8], который формируется либо степенью деструкции зерна [9], либо режимом внесения глюкоамилазы [10, 11]. Свойства дрожжей будут меняться в процессе их культивирования, поэтому актуальной задачей является определение продолжительности дрожжегенерации, которая позволит получить дрожжи в хорошем физиологическом состоянии и с высокой бродильной активностью, необходимыми для полного сбраживания сусла повышенной концентрации [6, 12, 14]. Условия, при которых проводится процесс дрожжегенерации – температура, время, качественный состав сусла – влияют впоследствии на физиологические показатели дрожжей в процессе брожения [4, 13]. В процессе дрожжегенерации в дрожжевой клетке проходят различные биохимические реакции, постоянно меняется состав питательной среды [1, 13], следовательно, важно установить время отбора дрожжевого сусла для последующего внесения его в сбраживаемую среду.

Цель настоящей работы – обосновать оптимальное время дрожжегенерации сухих спиртовых дрожжей на ячменном сусле повышенной концентрации.

## Объекты и методы исследования

Зерновой замес готовился из помола ячменя урожая 2015, характеризуемого 90% проходом через сито с диаметром отверстий 1 мм. Гидромодуль замеса 1:2,5. Водно-тепловую обработку (ВТО) замеса проводили по механико-ферментативной схеме [15]. Во время проведения ВТО вносились ферментные препараты фирмы Erbsloeh (Германия): ферментный препарат Дистицим БА-Т Специал, содержащий  $\alpha$ -амилазу (доза внесения  $\alpha$ -амилазы – 0,3 ед. АС/г крахмала) и ферментный препарат Дистицим GL, содержащий ксиланазу – (доза внесения ксиланазы – 0,3 ед. КС/г сырья). Осахаривание замеса проводили двумя способами с помощью ферментного препарата Дистицим АГ (доза внесения глюкоамилазы составляла 7 ед. ГлС/г крахмала):

– традиционный способ осахаривания, при котором глюкоамилаза вносилась на стадии ВТО при температуре 60°C, и продолжительность осахаривания составляла 30 мин [10, 15];

– метод SSF, при котором глюкоамилаза вносилась непосредственно перед брожением при температуре 30°C [9, 11].

Массовая доля растворимых сухих веществ в сусле составляла 21,4%. Осмоляльность сусла, поступающего на брожение при традиционном способе осахаривания, составила 851 ммоль/кг, а по методу SSF – 531 ммоль/кг. Для дрожжегенерации использовались сухие спиртовые дрожжи DistilaMax® HT производства Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, доза внесения которых составила 1,0 г на 1 дм<sup>3</sup> ячменного сусла.

Дрожжегенерацию сухих спиртовых дрожжей проводили в течение 8 ч при температуре 33°C. В ходе процесса определяли следующие показатели: концентрацию дрожжевых клеток и концентрацию почкующихся клеток.

Концентрацию дрожжевых клеток определяли согласно методу прямого подсчета под микроскопом с использованием камеры Горяева.

Прирост биомассы дрожжевых клеток во время дрожжегенерации на сусле, приготовленном при разных режимах внесения глюкоамилазы, представлен на рисунке 1.

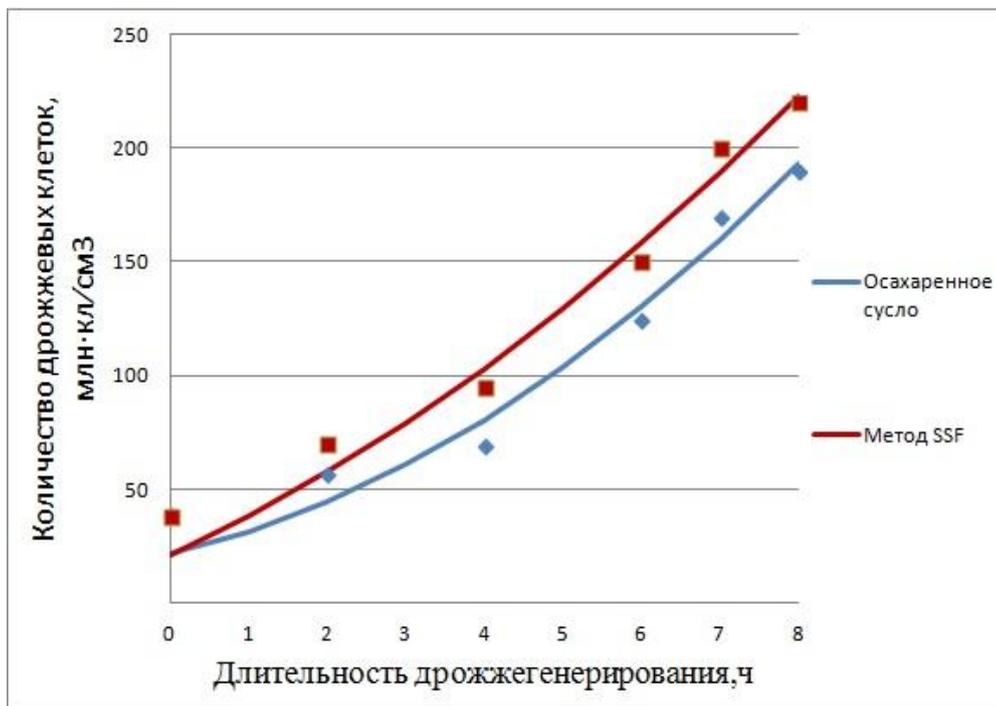


Рисунок 1 – Концентрация дрожжевых клеток во время дрожжегенерирования на сусле, приготовленном при разных режимах внесения глюкоамилазы

Из рисунка 1 следует:

- в течение всего процесса дрожжегенерации прирост биомассы дрожжей на сусле, подготовленном методом SSF, происходит быстрее, чем на сусле, осахаренном при 60°C;
- через 8 ч дрожжегенерации количество клеток в сусле, осахаренном по методу SSF, составило 220 млн кл/см<sup>3</sup>. Количество клеток в сусле, осахаренном при 60°C, составило 200 млн кл/см<sup>3</sup>, что на 15,8% меньше, чем в сусле, осахаренном по методу SSF.

Количество почкующихся клеток в сусле в процессе дрожжегенерации представлено на рисунке 2.

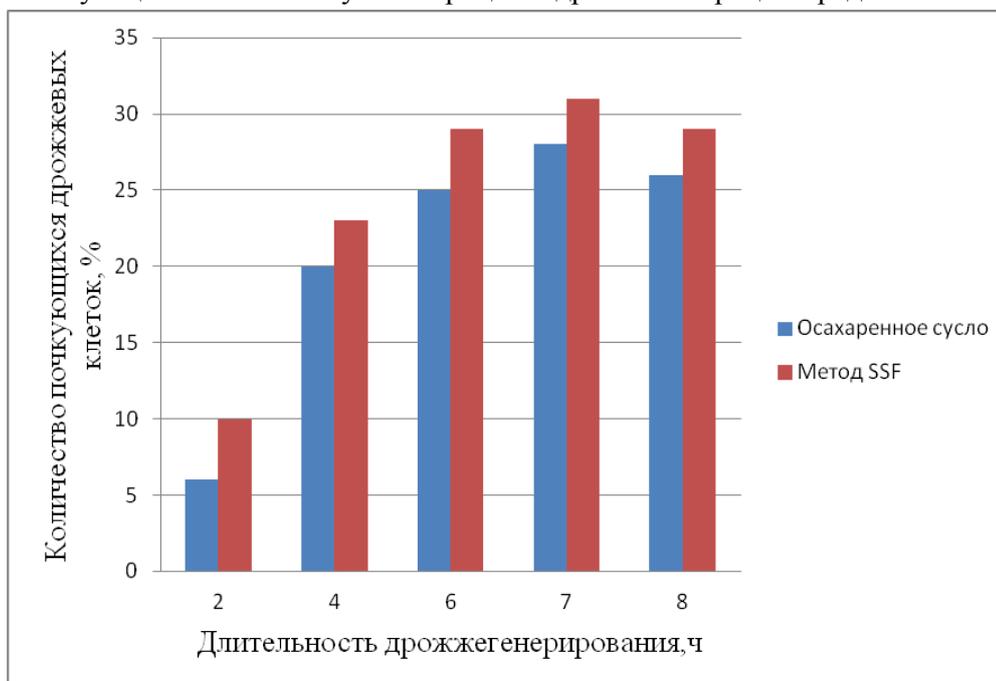


Рисунок 2 – Количество почкующихся дрожжевых клеток во время дрожжегенерации на сусле, приготовленном при разных режимах внесения глюкоамилазы

Из диаграммы, представленной на рисунке 2, следует:

- вне зависимости от способа подготовки сусла к сбраживанию, максимальное количество почкующихся клеток было обнаружено через 7 ч после начала дрожжегенерации и составило 28–31% от

общего числа клеток. При этом на сусле, подготовленном методом SSF, количество почкующихся клеток составляло – 31%, а на сусле осахаренном традиционным способом – 28%.

– поскольку после 7 ч дрожжегенерации количество почкующихся клеток снизилось, можно сделать вывод, что далее дрожжи перешли из фазы активного роста и размножения в стационарную фазу.

Для оценки бродильной активности дрожжей проводили их отбор в количестве 10% от объема сбраживаемой среды на 6-ом, 7-ом, 8-ом ч после начала дрожжегенерации. Отобранные дрожжи вносили в сусло, подготовленное для брожения, после чего определялась начальная концентрация дрожжевых клеток в сусле, подготовленном при разных режимах внесения глюкоамилазы. Брожение проводилось при температуре 30°C в течение 72 ч. Результаты подсчетов представлены в таблице 1.

Таблица 1– Начальная концентрация дрожжевых клеток в бродящем сусле

Режим внесения глюкоамилазы	Время отбора дрожжей		
	на 6-ом ч от начала культивирования	на 7-ом ч от начала культивирования	на 8-ом ч от начала культивирования
	начальная концентрация дрожжевых клеток, (млн/ см <sup>3</sup> )		
при 60°C после ВТО (Традиционный способ осахаривания)	22±2,2	24±2,4	23±2,3
при 30°C перед началом брожения (метод SSF)	19±2,1	24±2,4	24±2,4

Из таблицы 1 следует, что начальные концентрации дрожжевых клеток в сбраживаемом сусле, подготовленном при разных режимах внесения глюкоамилазы, а следовательно, с разным значением осмоляльности, составляют в среднем 23 млн/мл, и разница в концентрациях клеток находится в пределах погрешности измерений.

Время дрожжегенерации определяли по динамике накопления биомассы дрожжей в процессе сбраживания сусла (рисунок 3 и 4), скорости снижения концентрации сухих веществ, скорости выделения диоксида углерода в процессе брожения.

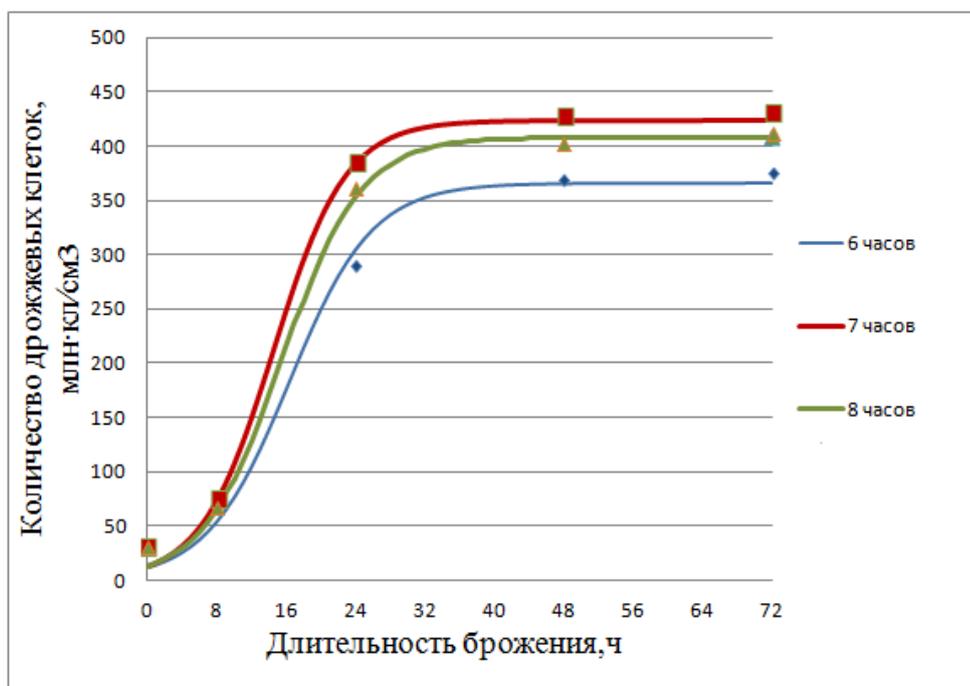


Рисунок 3– Прирост биомассы дрожжей, отобранных в разное время дрожжегенерации и внесенных в сбраживаемое сусло, осахаренное традиционным способом

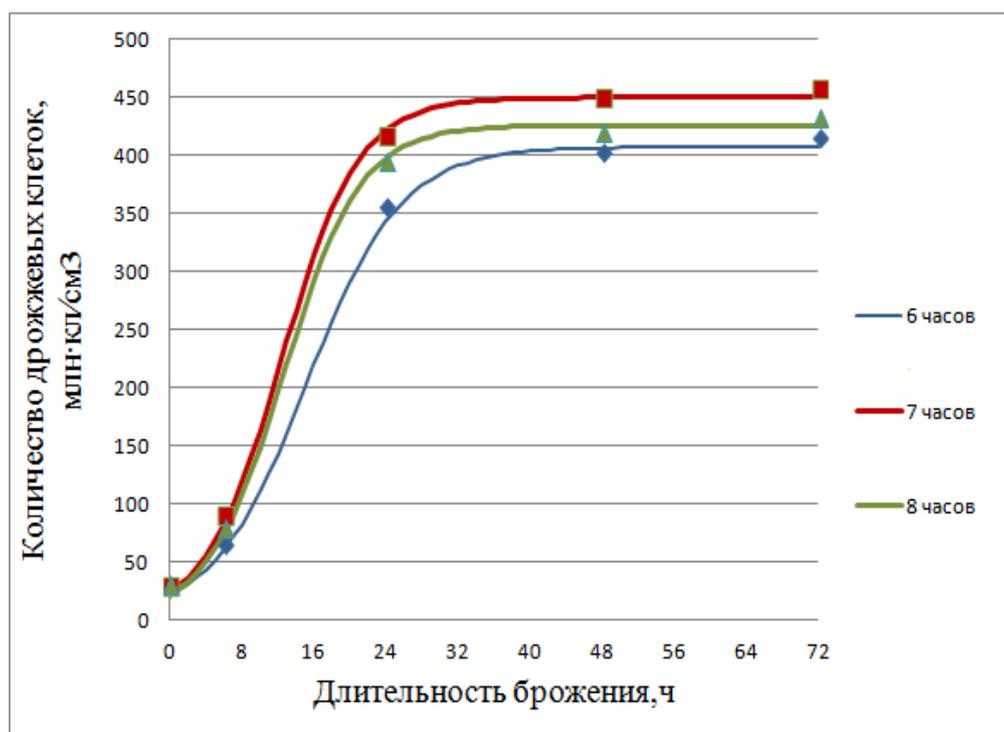


Рисунок 4 – Прирост биомассы дрожжей, отобранных в разное время дрожжегенерации и внесенных в сбраживаемое сусло, осахаренного по методу SSF

Из графиков, представленных на рисунках 3 и 4, следует:

– независимо от способа осахаривания сусла, концентрация дрожжей в бродящем сусле, внесенных в него на 7-ом ч дрожжегенерации, была выше, чем концентрация дрожжей, внесенных в сусло на 6-ом и 8-ом ч процесса;

– накопление биомассы дрожжей более активно идет на сусле, осахаренном по методу SSF, при этом общее количество клеток в этом сусле на момент окончания брожения составляет 458 млн кл/см<sup>3</sup>, в то время, как в сусле, осахаренном традиционным способом, общее количество клеток на момент окончания брожения на 6,6% меньше и составляет 425 млн кл/см<sup>3</sup>.

Динамика скорости снижения концентрации видимых сухих веществ в бражке и динамика скорости выделения диоксида углерода в процессе брожения представлены на рисунках 5–8.

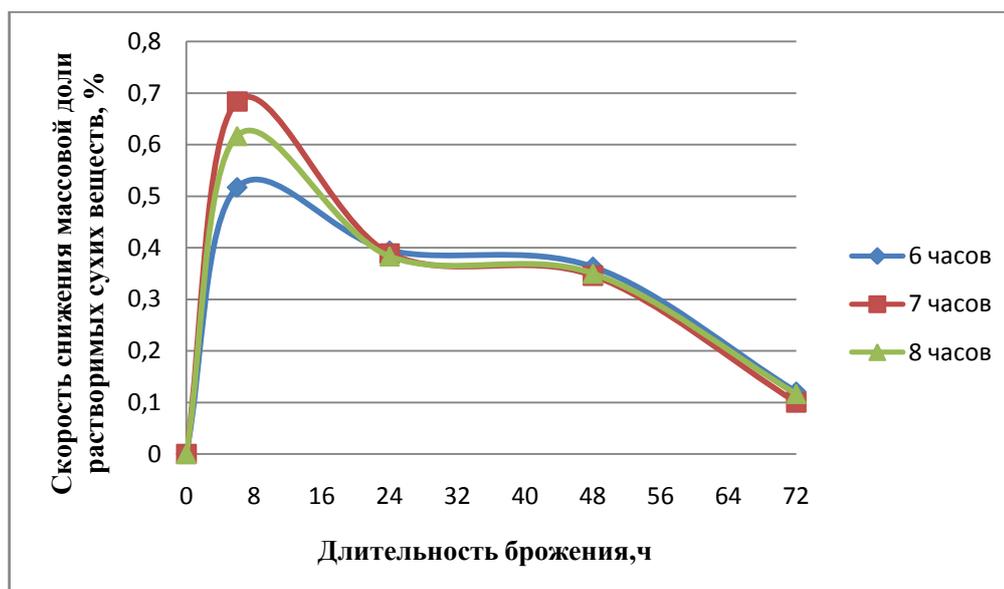


Рисунок 5 – Скорость снижения концентрации видимых сухих веществ в ячменном сусле повышенной концентрации, осахаренном традиционным способом и сбраживаемом дрожжами, отобранными в разные периоды дрожжегенерации

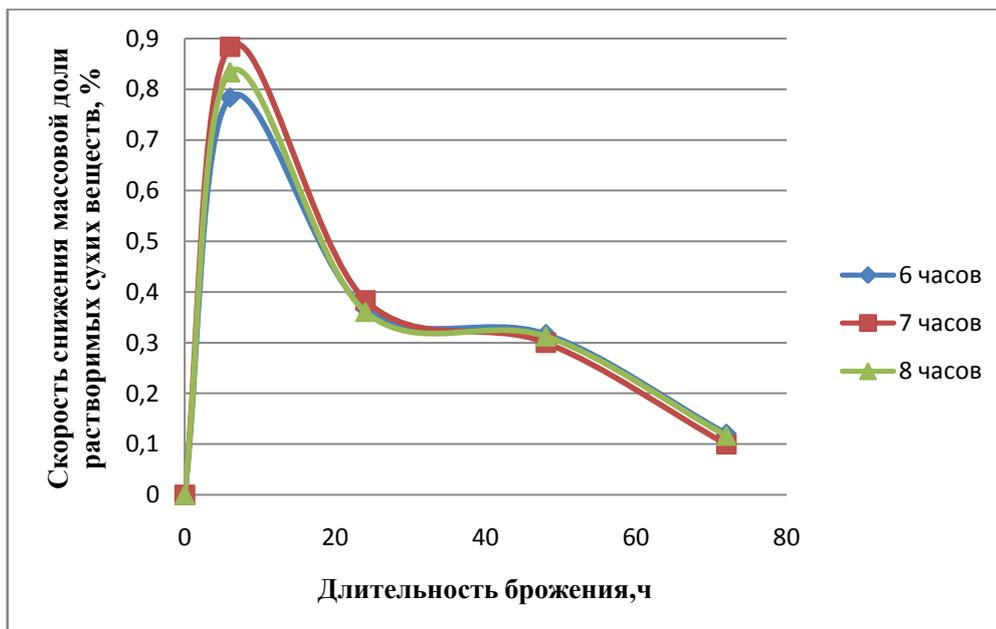


Рисунок 6 – Скорость снижения концентрации видимых сухих веществ в ячменном сусле повышенной концентрации, осахаренном по методу SSF и сброживаемом дрожжами, отобранными в разные периоды дрожжегенерации

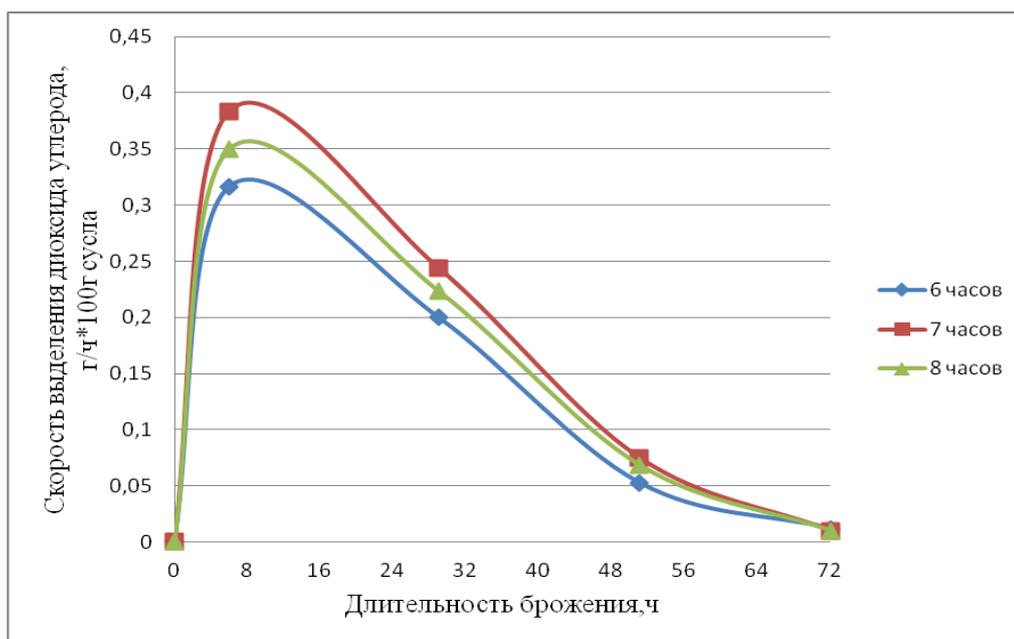


Рисунок 7 – Скорость выделения диоксида углерода в ячменном сусле повышенной концентрации, осахаренном традиционным способом и сброживаемом дрожжами, отобранными в разные периоды дрожжегенерации

Из графиков, представленных на рисунках 7 и 8, следует:

- независимо от способа осахаривания сусле скорость выделения диоксида углерода в процессе сброживания дрожжами, отобранными на 7-ом ч дрожжегенерации, была выше, чем у дрожжей, отобранных на 6-ом и 8-ом ч процесса;

- максимальная скорость выделения диоксида углерода при сброживании сусле была зафиксирована в образцах, дрожжегенерация которых проводилась на сусле, осахаренном согласно методу SSF;

- наибольшую бродильную активность имеют дрожжи, выращенные на сусле, осахаренном по методу SSF, на 7 ч дрожжегенерирования.

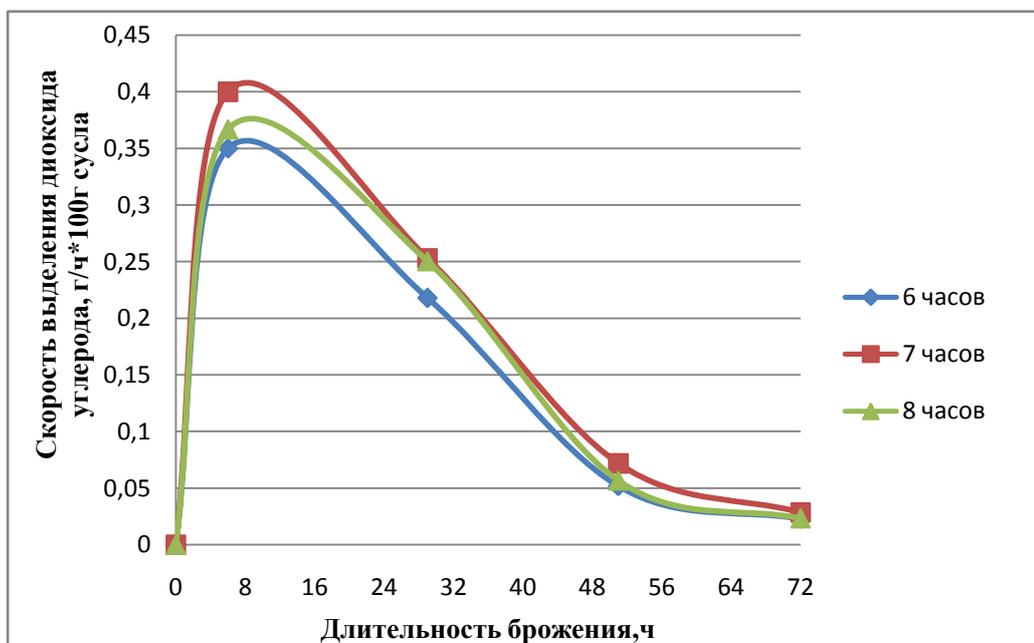


Рисунок 8 – Скорость выделения диоксида углерода в ячменном сусле повышенной концентрации, осахаренном по методу SSF и сброживаемом дрожжами, отобранными в разные периоды дрожжегенерации

Анализ зрелой бражки, полученной при сброживании сусле, полученного при разных способах внесения глюкоамилазы, и дрожжами, отобранными на 6-ом, 7-ом и 8-ом ч от начала дрожжегенерации, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели зрелой бражки

Режим внесения глюкоамилазы	Продолжительность дрожжегенерирования сухих спиртовых дрожжей	Крепость бражки, об.%	Выход спирта, см <sup>3</sup> /100г условного крахмала	Спиртовой коэффициент	Сод. несброж углеводов, г/100 см <sup>3</sup>
при температуре 60°C, после ВТО (Традиционный способ осахаривания)	6 ч	11,1±0,20	60,08±2,8	0,518	0,41±0,08
	7 ч	11,4±0,30	62,40±2,9	0,533	0,37±0,05
	8 ч	11,3±0,20	61,68±2,9	0,528	0,39±0,06
при температуре 30°C, перед началом брожения (Метод SSF)	6 ч	11,4±0,30	64,15±3,0	0,533	0,38±0,05
	7 ч	11,8±0,40	65,01±3,1	0,551	0,35±0,05
	8 ч	11,6±0,40	64,71±3,1	0,542	0,37±0,06

Из таблицы 2 видно, что наибольшая крепость бражки 11,8% была получена при сброживании сусле, осахаренного методом SSF и сброженным дрожжами, отобранными через 7 ч дрожжегенерации. При этом был получен наибольший выход спирта в количестве 65,01/100 г. крахмала в образце, сброженном дрожжами, дрожжегенерацию которых проводили 7 ч.

Более высокие показатели брожения и зрелой бражки, полученные при сброживании дрожжами, отобранными через 7 ч дрожжегенерации, могут объясняться тем, что к этому моменту была получена высокая концентрация дрожжевых клеток 170–200 млн/см<sup>3</sup> по сравнению с концентрацией 130–150 млн/см<sup>3</sup> через 6 ч дрожжегенерации. При этом через 7 ч дрожжи находились в фазе активного роста (высокий процент почкующихся клеток), в то время как через 8 ч дрожжегенерации, несмотря на более высокую концентрацию клеток 200–220 млн/см<sup>3</sup>, дрожжи начали переход в стационарную фазу.

Высокие концентрация клеток и процент почкующихся клеток через 7 ч дрожжегенерации, позволили сократить продолжительность лаг-фазы, увеличить скорость брожения, а также получить зрелую бражку с более высокими качественными показателями.

Таким образом, оптимальное время дрожжегенерации определяется совокупностью количества клеток и фазой роста дрожжей, т.е. концентрацией почкующихся клеток.

При этом осахаривание по методу SSF снижает воздействие осмотического стресса на дрожжевую клетку в процессе брожения за счет постепенного гидролиза декстринов до сбраживаемых углеводов. При осахаривании традиционным способом сусле, поступающее на брожение, содержит высокие концентрации глюкозы, оказывающие сильный осмотический стресс, в результате чего увеличивается продолжительность лаг-фазы, а также снижается скорость брожения.

### Выводы

1. В процессе проведения экспериментов установлено, что наиболее высокой бродильной активностью обладали дрожжи, дрожжегенерацию которых проводили на сусле, осахариваемом по методу SSF, с внесением глюкоамилазы непосредственно перед брожением при температуре 30°C.

2. Независимо от способа осахаривания сусле концентрация дрожжей в бродящем сусле, внесенных в него на 7-ом ч дрожжегенерации, была выше концентрации дрожжей, внесенных на 6-ом и 8-ом ч от начала процесса.

3. Дрожжегенерацию сухих спиртовых дрожжей рекомендуется проводить на сусле, осахаренном методом SSF в течение 7 ч.

### Литература

1. Мартыненко Н.Н. Биотехнологические основы высокоэффективных препаративных форм дрожжей рода *Saccharomyces*: автореф. дис. ... докт. биол. Наук. М., 2009. 49 с.
2. Римарева Л.В. Теоретические и практические основы биотехнологии дрожжей. М.: ДеЛи принт, 2010. 252 с.
3. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. С. 330.
4. Мартыненко Н. Н., Верченков В. В., Римарева Л. В. Влияние углеводного состава среды на реактивацию сухих винных и спиртовых дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2006. № 1. С. 34–35.
5. Зуева Н.В., Востриков С.В. Влияние ферментных препаратов различного действия на динамику накопления сбраживаемых углеводов // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2008. № 4. С. 7–9.
6. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физиологическое состояние дрожжей: учебное пособие. СПб.: ИТМО, 2013. 48 с.
7. Йенсер Э. Снижение вязкости при сбраживании сусле высокой концентрации // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2007. № 4. С. 23–26.
8. Сумина Л.И., Крикунова Л.Н. Влияние углеводного состава сусле на развитие спиртовых дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2009. № 3. С.10–11.
9. Устинова А.С. Разработка технологии сбраживания высококонцентрированного сусле из ячменя: автореф. дис. ... канд. техн. наук. М., 2013. 22 с.
10. Баракова Н.В., Тишин В.Б., Леонов А.В. Исследование влияния ферментных препаратов на вязкость высококонцентрированных замесов из ячменя при производстве этилового спирта // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2010. № 4. С. 24–26.
11. Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X. et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass and bioenergy*. 2009, V. 33, pp. 890–898.
12. Аннемюллер Г.И., Мангер Г.-Й., Литц П. Дрожжи в пивоварении. СПб.: Профессия, 2015. С. 428.
13. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И. Технологические аспекты использования сухих дрожжей в производстве спирта // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2011. № 3. С.15–16.
14. Ingledew W.M., Kelsall D.R., Austin G.D., Kluhspies C. *The Alcohol Textbook*. U.K. Nottingham University Press. 2009, pp. 140–135, 541–543.
15. Теоретические и практические основы совершенствования технологии спирта / под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. М.: ВНИИПБТ, 2008. 264 с.

### References

1. Martynenko N.N. *Biotehnologicheskie osnovy vysokojeffektivnykh preparativnykh form drozhzhej roda Saccharomyces* [Biotechnological principles of high-performance preparative forms of yeast race *Saccharomyces*]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Moscow, 2009, 49 p.
2. Rimareva L.V. *Teoreticheskie i prakticheskie osnovy biotehnologii drozhzhej* [Theoretical and practical principles of yeast biotechnology]. Moscow, DeLi print Publ., 2010, 252 p.
3. Pert S. Dzh. *Osnovy kul'tivirovaniya mikroorganizmov i kletok* [Basics of cultivation microorganisms and cells]. Moscow, Mir Publ., 1978, 330 p.
4. Martynenko N.N., Verchenov V.V., Rimareva L.V. Vliyanie uglevodnogo sostava sredy na reaktivatsiyu sukhikh vinnykh i spirtovykh drozhzhej [Effect of carbohydrate composition of the reactivation of dry wine and alcohol yeast]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2006, no.1, pp. 34–35.
5. Zueva N.V., Vostrikov S.V. Vliyanie fermentnykh preparatov razlichnogo dejstviya na dinamiku nakopleniya sbrazhivaemykh uglevodov [Effect of enzyme preparations of different actions on the dynamics of accumulation of fermentable carbohydrates]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2008, no. 4, pp. 7–9.
6. Meledina T.V., Davydenko S. G., Vasil'eva L.M. *Fiziologicheskoe sostoyanie drozhzhej* [The physiological state of the yeast]. Textbook. St. Petersburg, 2013, 48 p.
7. Ienser E. Snizhenie vyazkosti pri sbrazhivanii susla vysokoi kontsentratsii [Viscosity reduction of the wort fermentation high concentration]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2007, no. 4, pp. 23–26.
8. Sumina L. I., Krikunova L. N. Vliyanie uglevodnogo sostava susla na razvitie spirtovykh drozhzhej [Effect of wort carbohydrate composition in the advancing alcohol yeast]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2009, no. 3, pp.10–11.
9. Ustinova, A.S. *Razrabotka tekhnologii sbrazhivaniya vysokokontsentririrovannogo susla iz yachmenya* [Manufacturing development of technology for fermentation of highly concentrated wort of barley]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Moscow, 2013, 22 p.
10. Barakova N.V., Tishin V.B., Leonov A.V. Issledovanie vliyaniya fermentnykh preparatov na vyazkost' vysokokontsentririrovannykh zamesov iz yachmenya pri proizvodstve etilovogo spirta [Investigation of the effect enzyme preparations on the viscosity highly concentrated wort of barley in the production of ethanol]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2010, no. 4, pp. 24–26.
11. Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X. et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass and bioenergy*. 2009, V. 33, pp. 890–898.
12. Annemyuller G. *Drozhzhi v pivovarenii* [Brewer's yeast]. St. Petersburg, Professiya Publ., 2015. 428 p.
13. Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I. Tekhnologicheskie aspekty ispol'zovaniya sukhikh drozhzhej v proizvodstve spirta [Technological aspects of the using dry yeast in alcohol production]. *Manufacture of alcohol liqueur and vodka products*. 2011, no. 3, pp.15–16.
16. Ingledew W.M., Kelsall D.R., Austin G.D., Kluhspies C. *The Alcohol Textbook*. U.K. Nottingham University Press. 2009, pp. 140–135, 541–543.
14. *Teoreticheskie i prakticheskie osnovy sovershenstvovaniya tekhnologii spirta* [Theoretical and practical bases advances in technological productivity of technology of spirit]. In ed. V.A. Polyakova, L.V. Rimarevoi. Moscow, RRIFBT, 2008, 264 p.

Статья поступила в редакцию 03.05.2016