

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Северо-Осетинский государственный университет
им. К. Л. Хетагурова

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОТРАСЛИ

Курс лекций

Направление подготовки:
19.03.02 Продукты питания из растительного сырья

Владикавказ 2018

УДК 664.66

ББК 36

Биотехнологические основы отрасли: курс лекций для бакалавров 3 курса направления подготовки 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья / Сост.: А.В. Хмелевская; ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К. Л. Хетагурова». – Владикавказ: ИП Цопанова А.Ю., 2018. – 149 с.

ISBN 978-5-00081-191-7

Научный редактор – С. К. Черчесова, докт. биол. наук,
проф. ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный
университет им. К. Л. Хетагурова»

Рецензенты:

А. А. Баева, докт. с-х. наук, проф. кафедры «Технологии продуктов общественного питания» ФГБОУ ВО «Северо-Кавказский горно-металлургический институт (государственный технологический университет);

В. А. Гассиева, канд. с-х. наук, доц., зав. кафедрой «Технология продуктов общественного питания» ФГБОУ ВО Горский государственный аграрный университет;

Р. З. Бузоев, директор пекарни ООО «Ташкент»

Курс лекций по дисциплине «Биотехнологические основы отрасли» составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для бакалавров направления подготовки 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья. Курс лекций содержит теоретический материал по биотехнологическим процессам в производстве мучных изделий. Направлен на формирование у бакалавров знаний о роли биохимических и микробиологических процессов в хлебопечении, макаронном и кондитерском производствах.

ISBN 978-5-00081-191-7

УДК 664.66

ББК 36

© Хмелевская А.В., сост., 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Тема 1. Микрофлора полуфабрикатов хлебопекарного производства, типы брожения	7
1.1 Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.1.1 Морфология дрожжей.....	8
1.1.2 Химический состав дрожжей.....	30
1.1.3 Метаболизм дрожжей	35
1.1.4 Питание дрожжей.....	57
1.1.5 Стимуляторы жизненной активности дрожжей	69
1.1.6 Влияние физико-химических факторов внешней среды на энергетический метаболизм дрожжей и синтез клеточных компонентов	76
1.2 Расы и штаммы дрожжей, применяемые при производстве хлебобулочных изделий.....	79
1.3 Молочнокислые бактерии	82
1.3.1 Морфология бактериальной клетки	83
1.3.2 Молочнокислое брожение	84
1.3.3 Расы и штаммы молочнокислых бактерий, применяемые в хлебопекарном производстве	85
Вопросы для самоконтроля.....	87
Тема 2. Дрожжи хлебопекарные как рецептурный компонент теста	89
2.1 Виды хлебопекарных дрожжей и их свойства	89
2.2 Показатели качества хлебопекарных дрожжей и способы их улучшения.....	93
2.3 Методы стабилизации биотехнологических свойств дрожжей	98
2.4 Жидкие дрожжи	101
Вопросы для самоконтроля.....	111

Тема 3. Приготовление и применение заквасок	113
3.1 Способы приготовления ржанных заквасок	117
3.2 Роль дрожжей и молочнокислых бактерий при производстве ржаного хлеба.....	121
3.3 Способы приготовления пшеничных заквасок	126
Вопросы для самоконтроля.....	136
Тема 4. Применение ферментных препаратов микробиологического происхождения при производстве мучных изделий	137
4.1 Амилолитические ферментные препараты	138
4.2 Цитолитические ферментные препараты	143
4.3 Протеолитические ферментные препараты.....	145
4.4 Липолитические ферментные препараты	146
4.5 Окислительные ферментные препараты.....	147
Вопросы для самоконтроля.....	148
Список литературы	149

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это использование организмов, биологических систем или биологических процессов в промышленном производстве. К отраслям биотехнологии относятся генная, хромосомная и клеточная инженерия, клонирование сельскохозяйственных растений и животных, использование микроорганизмов в хлебопечении, виноделии, производстве лекарств и др.

Производство хлеба включает сложный цикл микробиологических и биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивающихся выпечкой. В сорта муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала в муке содержится до 0,7-1,8% (в пересчете на сухое вещество) сбраживаемых сахаров – глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы, существенно влияющих на первые стадии брожения теста. Образующиеся при гидролизе крахмала амилолитическими ферментами муки углеводы (мальтоза и др.) – основные субстраты, обеспечивающие процесс брожения и хорошее газообразование при изготовлении теста. Азотсодержащие вещества муки состоят главным образом из белков. В незначительном количестве содержатся и небелковые азотистые вещества – свободные аминокислоты и амиды. Кроме того, протеиназы муки обогащают тесто водорастворимыми азотсодержащими соединениями. В состав муки входит до 2% минеральных веществ, в том числе микроэлементы.

Важнейшую роль в брожении теста играют дрожжи и молочнокислые бактерии, для которых имеются все необходимые условия: влажность 40-50%, незначительное содержание молекулярного кислорода и наличие питательных веществ. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют пористость, окраску, прочность среза и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус и аромат.

Для создания высокоэффективных пищевых технологий, основанных на культивировании дрожжей, необходимо знать особенности их метаболизма и физиологии. На основании этих зна-

ний можно реализовать потенцию дрожжей в целях повышения эффективности процесса накопления биомассы в любой отрасли биотехнологии, где используются дрожжи сахаромицеты, в частности в производстве хлеба, пекарских дрожжей, пивоварении, виноделии и биосинтезе этанола.

Курс лекций по дисциплине «Биотехнологические основы отрасли» предназначен для бакалавров по направлению подготовки 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья. Курс направлен на формирование ключевых компетенций, необходимых для эффективного решения профессиональных задач и организации профессиональной деятельности на основе знаний, которые помогут правильно сориентироваться.

ТЕМА 1. МИКРОФЛОРА ПОЛУФАБРИКАТОВ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА И ТИПЫ БРОЖЕНИЯ

В основе технологии производства хлеба лежит совокупность сложнейших процессов, обеспечивающих необходимые изменения компонентов теста и получение изделий высокого качества. Основная роль принадлежит процессам, протекающим с участием микроорганизмов. На протяжении многих веков для разрыхления теста применялись закваски, полученные при спонтанном брожении, вызываемом природной микрофлорой муки.

В полуфабрикатах хлебопекарного производства возникают различные типы брожения, возбудителями которых являются микроорганизмы, присутствующие в муке или дополнительном сырье, или специально добавляемые бактериальные культуры в виде жидких дрожжей или заквасок. Различают семь основных типов брожения:

- спиртовое;
- молочнокислое;
- пропионовокислое;
- бутенглеколовое;
- ацетонэтиловое;
- ацетонбутиловое;
- мясное.

Основные представители микрофлоры пшеничного и ржаного теста – дрожжи и молочнокислые бактерии. Однако в полуфабрикатах проявляют свою жизнедеятельность еще целый ряд бродильных микроорганизмов, что вызывает необходимость осуществлять микробиологический контроль муки и отдельных видов сырья.

1.1 Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Дрожжи, применяемые в хлебопекарном производстве, относятся к виду *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи этого вида сбраживают глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, простые декстрины, но не сбраживают лактозу, крахмал, клетчатку. Они усваивают этиловый спирт, молочную и уксусную кислоты, в качестве источников азота используют аминокислоты и аммонийные соли.

1.1.1 Морфология дрожжей

Клетки *S. cerevisiae* имеют округлую, яйцевидную или эллипсоидную форму; размер их колеблется от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4,5 до 21 мкм в длину. Размер и форма клеток одного и того же штамма определяются генетически и могут варьироваться в определенных пределах в зависимости от условий культивирования и последующих операций получения коммерческих дрожжей (обезвоживание).

Клетки состоят из микроскопических (видимых в обычном микроскопе при увеличении в 600-900 раз) и субмикроскопических, видимых только в электронном микроскопе (увеличение от 15-20 тыс. раз), структур. Эти структуры можно подразделить на постоянно присутствующие и периодически обнаруживаемые в клетке. К первым относятся различные **органеллы** – клеточные структуры, выполняющие определенные функции. Это ядро с ядрышком, митохондрии, рибосомы, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум (сеть), аппарат Гольджи, лизосомы, хитосомы, гликосомы и целый ряд других мембранных структур (рис. 1). Все клеточные органеллы окружены мембранами. В состав мембран входит большое количество фосфолипидов, причем их содержание как в количественном, так и в качественном составе определяется природой органеллы.

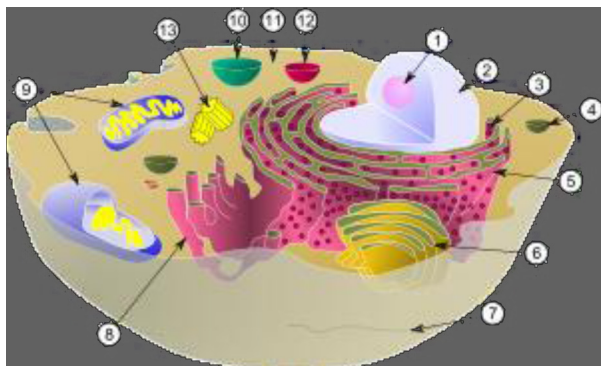


Рис. 1 Органеллы дрожжевой клетки:

1 – ядрышко; 2 – ядро; 3 – рибосома (маленькие точки); 4 – везикула;
 5 – шероховатый эндоплазматический ретикулум (ER); 6 – аппарат
 Гольджи; 7 – цитоскелет; 8 – гладкий эндоплазматический ретикулум;
 9 – митохондрия; 10 – вакуоль; 11 – цитоплазма; 12 – лизосома; 13 –
 центриоль и centrosома

Мембраны органелл имеют трехслойную структуру. Они состоят из липидов, белков и небольшого количества углеводов. Липиды представлены в основном моно-, ди- и триглицеридами, глицерофосфатидами и стеролами – эргостеролом и зимостеролом. Каждая молекула фосфолипида состоит из гидрофобной, т. е. отталкивающей воду, и гидрофильной, притягивающей воду, частей. Гидрофильные части молекулы находятся на внешней стороне мембраны, а гидрофобные – на внутренней. Молекулы белка размещаются на поверхности мембраны или проникают внутрь нее (рис. 2).

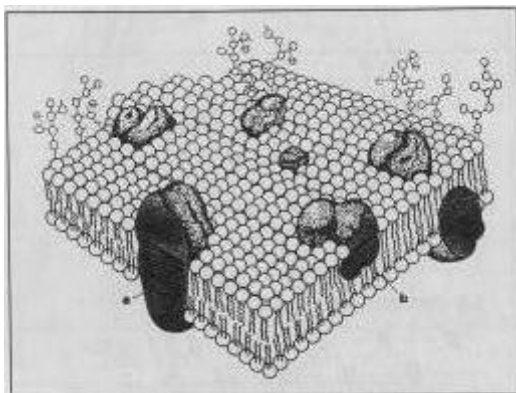


Рис. 2 Модель клеточной мембраны
 (фосфолипиды и транспортные протеины)

Непостоянные структуры – **включения** – в отличие от оргanelл то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клеток. Будучи продуктами метаболизма клетки, включения отражают различные стороны и этапы ее физиологической активности. Этими непостоянными структурами являются внутриклеточные запасные соединения: жиры, гликоген и полифосфаты.

Включения могут быть представлены в виде более или менее плотных частиц – гранул, кристаллов или капель. Они обычно представляют собой скопления, видимые под микроскопом, либо без специальной обработки, либо после обработки различными красителями. Так, низкомолекулярные полифосфаты обнаруживаются в виде гранул в вакуолях (волютин), жиры – в виде капель, гликоген выявляется при окрашивании клеток раствором Люголя.

Клеточная стенка является частью клеточной оболочки, в состав которой входит также периплазматическое пространство.

Клеточная стенка (КС) выполняет следующие основные функции:

1. Защита от воздействия окружающей среды.
2. Сохранение формы.
3. Участие в обменных процессах: регуляция поступления питательных веществ и выделение метаболитов.
4. Опосредованно участвует в процессах размножения.

Клеточная стенка представляет собой слоистую структуру толщиной около 25нм (рис. 3):

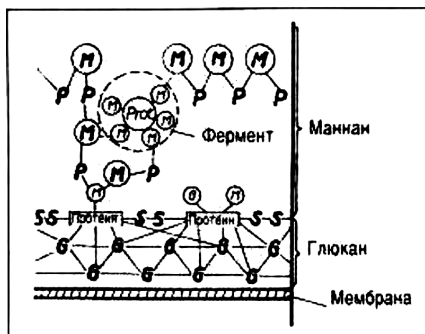


Рис. 3 Модель клеточной стенки

– 1-й (наружный) слой – это тонкая липо-протеиновая мембрана;

– 2-й слой – значительно более толстый слой – представляет собой маннано-протеиновый комплекс;

– 3-й слой состоит из глюкана, он имеет слоистую структуру.

При оптимальных условиях роста число слоев – три, но иногда их количество увеличивается в основном за счет глюканового слоя, толщина которого может возрасти с 20 до 200 нм, и клеточная стенка утолщается. Возникновение почки происходит быстрее в тех клетках, которые содержат больше маннана. При увеличении доли глюкана в КС последняя становится менее эластичной и образование почки затрудняется. От соотношения между глюканом и маннаном зависит форма клеток (при увеличении содержания глюкана наблюдается удлинение клетки). Возраст клетки, условия культивирования могут существенно повлиять на соотношение между этими компонентами. Например, при отсутствии инозитола (витамина В8) клеточная оболочка содержит меньше маннана, белка и фосфора, но больше глюкана и глюкозамина, чем в нормальных условиях культивирования.

На долю клеточной стенки приходится от 6 до 25% сухой массы клетки. Химический анализ клеточной стенки показывает, что она состоит в основном из глюкана и маннана; наряду с этими компонентами в стенке присутствуют хитин и белок.

В пересчете на сухие вещества (% СВ) клеточные стенки хлебопекарных дрожжей в среднем содержат: глюкана – 29, маннана – 31, белков – от 6 до 13%, липидов – от 2 до 9, хитина – от 3 до 5%, минеральных веществ – 3%. Почечные рубцы, изолированные из клеточных оболочек дрожжей, содержат около 85% маннозы, 4% глюкозы и 2,7% глюкозамина. В рубцах и примыкающих к ним зонах, кроме того, локализуется хитин.

Глюкан – это сложный полимер глюкозы (молекулы глюкозы соединены между собой β -1,6 и β -1,3 связями), располагающийся во внутреннем слое клеточной стенки, прилежащем к плазмалемме, или клеточной мембране. Глюкан – основной структурный компонент клеточной стенки, поскольку при его удалении она полностью разрушается.

Стенки сахаромикетов содержат, по крайней мере, три типа β -глюкановых полимеров (щелочерастворимый – 20,0%, щелоче-кислотонерастворимый 30-35%, щелоче-кислоторастворимый 5,0%).

Соотношение между фракциями зависит от условий культивирования.

Синтез глюкана практически заканчивается с завершением формирования почки. При этом участвует фермент глюкансинтаза. Она в мало- или неактивной форме доставляется в везикулах к плазмолемме, где активируется и синтезирует полисахарид.

Установлено, что синтез глюкана, также как и маннана, зависит от условий культивирования: режима подачи углеводного и азотного питания, температуры культивирования, аэрации и т. п.

Маннан – разветвленный полимер маннозы, находится главным образом во внешних слоях клеточной стенки. Маннозные звенья в маннани соединены между собой α –1,6 связями, а боковые ответвления образованы за счет α –1,2 и α –1,3 связей. Удаление маннана не изменяет общую форму клетки.

Третий углеводный компонент стенки, хитин, представляет собой полимер N-ацетилглюкозамина; он обнаруживается в участках клеточной стенки, ассоциированных с дочерними шрамами. В свою очередь глюканы и хитин образуют каркас, придающий КС необходимую форму. Известно, что рецепторами киллер-токсина являются β -1-6-глюканы.

Белок составляет 10% сухого веса клеточной стенки. Между глюканом и маннаном находятся структурные белки, связанные с полисахаридами дисульфидными мостиками, содержание которых варьирует в зависимости от условий культивирования и физиологического состояния дрожжей. Эти белки образуют на поверхности КС осмофильный белковый слой толщиной до 10 нм.

Часть белка клеточных стенок связана с ферментами. В основном это маннанопротеины, которые содержат в качестве составной части молекулы до 50% маннана. Также имеется небольшое количество глюканопротеинов.

Роль маннанопротеинов (МП) заключается в следующем:

1. Они выполняют функции рецепторов, воспринимающих многочисленные сигналы, поступающие в клетку из среды.
2. Участвуют в осуществлении контактов между организмами (входят в состав агглютининов).
3. Определяют иммунологические свойства дрожжей.
4. Многие из ферментов, находящихся в КС и периплазматическом пространстве, представляют собой маннанопротеины (ин-

вертаза, кислая фосфатаза, аспарагиназа, β -глюканаза, α -галактозидаза, хитиназа и др., всего их около 18).

5. На ранних стадиях своего созревания входят в состав килер-токсинов и феромонов.

6. Связаны с процессами полового размножения дрожжей.

7. МП, располагающиеся на поверхности клеточной стенки, являются цементирующими компонентами, связывающими остальные составные части КС в единую структуру.

Биосинтез МП протекает в различных клеточных структурах. Он начинается в эндоплазматическом ретикуле (ЭПР), продолжается в мембранных структурах типа аппарата Гольджи и секреторных везикулах, а завершается в цитоплазматической мембране (ЦПМ). При слиянии везикул с плазмолеммой важную роль играют такие элементы, как Ca, Mg, Mn.

Из ферментов, в состав которых входят гликопротеины, следует обратить внимание на инвертазу, кислую фосфатазу и трегалазу. Эти ферменты находятся как в КС, так и в периплазматическом пространстве (ППП) и могут секретироваться дрожжевыми клетками наружу в окружающую среду.

Инвертаза, или фосфофруктозидаза, гидролизует сахарозу – основной углевод мелассы – на глюкозу и фруктозу.

Известны щелочная и кислая фосфатазы. Максимальная активность наблюдается именно у кислой фосфатазы, так как процессы жизнедеятельности дрожжей в бродильных производствах происходят при pH менее 5,5, в то время как оптимум pH для щелочной фосфатазы составляет 7,0. Кислая фосфатаза гидролизует различные эфирные связи фосфорной кислоты, в частности освобождая ортофосфат из молекул АТФ. Дрожжи имеют две основные формы кислой фосфатазы – репресслируемую, синтез которой ингибируется ортофосфатом среды, и конститутивную, ее уровень не зависит от концентрации PO_4^{3-} в питательной среде.

Трегалаза – фермент, гидролизующий запасной дисахарид трегалозу с образованием двух гликозидных остатков.

Хитин – линейный полисахарид, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных между собой β -1,4 связями. Хитиновые цепи упакованы в фибриллы, нерастворимые в воде.

Он выполняет функцию целлюлозы, которая входит в состав клеточных стенок растений. Отличие заключается в том, что гидроксильные группы при втором углеводном атоме остатков глюкозы замещены на ацетилированные аминогруппы.

Содержание хитина зависит от вида дрожжей и условий культивирования. Локализован он исключительно в первичной септе (перегородке), образующейся при делении клетки, и только около 10% хитина распределяется по поверхности дрожжей.

Возникновение почки начинается с образования хитинового кольца, которое затем разрастается, образуя септу. Хитин первичной септы окружен другими углеводами – β -глюканом и манным протеином, составляющими вторичную септу. Хитин синтезируется из Г-6-Ф при участии хитинсинтазы. Биосинтез хитина не только сконцентрирован в определенном месте на поверхности клетки, но и осуществляется в определенный период клеточного цикла, включающий возникновение и формирование почки. Скорость синтеза хитина возрастает у клетки, достигшей 25% от размера материнской, а затем падает.

Хитинсинтаза (ХС) в клетках находится в двух формах – неактивной, или малоактивной (зимогенной), и высокоактивной.

Кофакторами фермента являются Mg, Mn, Co. Почти вся хитинсинтаза находится у сахаромикетов в плазмолемме (2/3). Небольшая активность проявляется в клеточных мембранах, в том числе мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Синтез фермента находится под строгим метаболическим контролем. Контроль осуществляется как на субстратном, так и на энергетическом уровнях. Высокие концентрации АТФ в клетке на первых этапах цикла почкования стимулируют ХС и начало синтеза хитина.

У дрожжей найдены специальные образования (органеллы) – хитосомы, содержащие хитинсинтазу в зимогенной форме. Предполагается, что хитосомы транспортируют фермент от места его синтеза, который осуществляется в ЭПР, в цитоплазматическую мембрану (ЦПМ).

В клеточной стенке содержится некоторое количество свободных аминокислот, гликогена и полифосфатов, поэтому ее можно

рассматривать как специальный компартмент, где клетка сосредоточивает в полимерной форме в качестве резерва полисахариды и активизированные полифосфаты. Гликоген используется дрожжами как запасной углевод.

Неорганические полифосфаты представляют собой линейный полимер, в котором остатки ортофосфорной кислоты соединены макроэргическими фосфоангидридными связями. При гидролизе этих связей высвобождается столько же энергии, сколько при отщеплении Р от АТФ. Высокомолекулярные полифосфаты участвуют при росте дрожжей в анаэробных условиях в транспорте сахаров через ПМ. Это легко утилизируемый резерв фосфора и энергии. Наибольшее содержание ПФ приходится на клеточную мембрану.

Периплазматическое пространство (ППП) находится между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной. Это активно функционирующая область органоидного типа.

Периплазма выполняет роль:

- барьера проницаемости;
- контроля транспорта растворенных веществ внутрь клетки и из нее;

- гидролиза некоторых компонентов среды (углеводов, белков и липидов) до структур, которые затем транспортируются через цитоплазматическую мембрану (ЦПМ) ферментами, связанными с этой мембраной. Так, в ППП находятся гидролазы, гидролизующие углеводы, белки и липиды. Например, инвертаза (β -фруктофуранозидаза), которая расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы; мелибиаза, гидролизующая дисахарид мелибиозу до галактозы и глюкозы; кислая фосфатаза, катализирующая отщепление двух остатков фосфорной кислоты от аденозинтрифосфата (АТФ); транслоказы; нуклеозиддифосфатазы;

- регулятора биосинтеза клеточной стенки у дрожжей. В частности, с участием полимераз происходит синтез олигосахаридов, которые затем используются в биосинтезе полисахаридов клеточной стенки маннана и глюкана.

В ППП происходит расщепление удаленных из клетки продуктов обмена. В этом пространстве с помощью электронного микроскопа даже можно увидеть остатки органоидов.

Объем периплазматического пространства зависит от фазы развития клетки и условий культивирования; он может увеличиваться при содержании в среде трудноусвояемых компонентов или повышении проницаемости клеточной стенки. Увеличение ширины ППП происходит также при увеличении концентрации субстрата, например мальтозы, которую клетка не успевает транспортировать посредством ферментов транспорта пермеаз в цитоплазму. Увеличение ППП наблюдается при регидратации сухих дрожжей. В этом случае в клетки активно входит вода, а из цитоплазмы удаляются поврежденные при дегидратации (обезвоживании) органоиды и их части.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), или плазмалемма, следует за ППП.

ЦПМ выполняет следующие функции:

- отделяет клеточную стенку и периплазматическое пространство от содержимого клетки (протопласта);
- создает осмотический барьер для поступления веществ в клетку и выхода из нее;
- участвует в транспорте веществ, энергии и информации внутрь клетки и из нее;
- регулирует биосинтез клеточной стенки, в частности, участвует в синтезе полисахаридов КС;
- содержит ферменты, расположенные с внешней поверхности мембраны, которые участвуют в усвоении сахаров, аминокислот и т. д.

ЦПМ клетки представляет собой типичную трехслойную структуру (см. рис. 2), состоящую из липопротеидов. Внутренние слои состоят из липидов, которые представлены, в основном, моно-, ди- и триглицеридами. Гидрофильные полярные части фосфолипидов, расположенные на поверхности мембран, соединены с белками электростатическими связями. Толщина мембраны обычно составляет около 8 нм.

В зависимости от возраста и физиологического состояния дрожжей ЦПМ может быть гладкой или складчатой, в последнем случае она образует инвагинации, обращенные внутрь цитоплазмы. Складчатость (фистончатость) мембраны увеличивается при

дегидратации дрожжей, а также при внесении их в плотные среды с высокой осмоляльностью питательных компонентов. Размер клетки уменьшается (плазмолиз). Складчатость увеличивается также и при старении клеток.

Цитоплазматическая мембрана дрожжей может осуществлять пиноцитоз, фагоцитоз и экзоцитоз. Пиноцитоз заключается в способности захватывать из среды капли белковых растворов, растворов липидов и углеводов. Фагоцитоз – захват твердых частиц, экзоцитоз – удаление шлаков из клетки в периплазматическое пространство.

Цитоплазматическая мембрана содержит от 5,4 до 6,4% фосфолипидов и 26% эргостерола от общего количества липидов. Для сравнения мембраны вакуолей содержат до 40% фосфолипидов и только 6% эргостерола от общего количества липидов в дрожжах. Соотношение между белками и липидами в вакуолярной мембране составляет 0,66.

Имеются данные, что при увеличении содержания стеролов и непредельных жирных кислот в дрожжах возрастают барьерные функции ЦПМ. Это, например, может повысить устойчивость дрожжевых клеток к повышенным концентрациям этанола.

Содержимое клетки (протоплазм) включает *ядро и цитоплазму*. Ядро является основным, но не единственным носителем наследственности, и контролирует все обменные реакции организма. Оно представляет собой довольно округлую структуру, покрытую мембраной. Это двойная мембрана, усеянная порами, что можно видеть только под электронным микроскопом. С ядерной мембраной ассоциирована структура, называемая *бляшкой (plaque)*. Характерный компонент бляшки – это многослойный диск, из которого в ядро и цитоплазму протянуты микротрубочки. Эти бляшки представляют собой составную часть веретена дрожжевого ядра, и по их поведению можно следить за различными этапами деления ядра, т. е. этапами клеточного цикла.

Морфология ядра меняется в зависимости от условий культивирования. Дрожжевая клетка в условиях анаэробно́за имеет ядро больших размеров с фестончатыми краями, тогда как в аэробных клетках этого не наблюдается.

Генетическая информация, содержащаяся в ядре, распределена между хромосомами – нитевидными структурами, состоящими из ДНК, основными белками – гистонами и некоторым количеством негистоновых белков. У *S. cerevisiae* 17 хромосом. Для сравнения: у бактерий – 1, у человека 46 хромосом. Размер каждой хромосомы у дрожжей приблизительно в два раза меньше бактериальной и в 100 раз меньше, чем у человека.

В ядре содержится ядрышко – органелла, богатая РНК. В нем синтезируется высокомолекулярная РНК, из которой потом образуются основные типы РНК, входящие в состав рибосом – рибосомальные РНК (р-РНК). Эти РНК и синтезируемые в других участках хромосом матричные РНК (м-РНК) выходят через ядерные поры в цитоплазму, где происходит сборка рибосом, и синтезируется основная масса клеточных белков. Поэтому у активно размножающихся клеток поры широко открыты.

У дрожжей три типа РНК:

- 1) самые большие молекулы РНК – в рибосомах;
- 2) матричная РНК (м-РНК) отвечает за перенос закодированной в ДНК генетической информации в цитоплазму, где она служит матрицей для синтеза белка (м-РНК образуется в ядре);
- 3) транспортная РНК (т-РНК). В клетке много различных т-РНК, каждая обладает специфичностью по отношению к одной из двадцати аминокислот.

Ядро дрожжевой клетки отличается по химическому составу от цитоплазмы: 60% сухого вещества ядра составляют нуклеиновые кислоты (НК), главным образом ДНК, 35% – белки и 5% – другие вещества, в том числе жиры, минеральные соединения и углеводы.

Цитоплазма, заполняющая клетку, представляет собой сложную коллоидную систему. Матрикс (цитозоль) цитоплазмы состоит из белков и РНК (коллоидная часть), а также аминокислот, жирных кислот, сахаров, органических и неорганических веществ, нуклеотидов, которые образуют истинные растворы. Ионный состав этих соединений определяет буферные и осмотические свойства матрикса. В цитоплазме протекают различные биохимические процессы: гликолиз, синтез жирных кислот, ну-

клеотидов, некоторых аминокислот и т. д. В матриксе располагаются все органоиды, которые связаны в единую систему.

Рибосомы – самые маленькие по размеру структуры (диаметр до 20 нм), содержат до 50% РНК клетки. Некоторая их часть связана с поверхностью мембран эндоплазматического ретикулума. Функция рибосом состоит в биосинтезе белка.

Рибосомы состоят из белка (50%) и РНК (42-50%). На их долю приходится около 15% сухой массы цитоплазмы.

Митохондрия (М) – полуавтономная клеточная структура, окруженная двойной трехслойной липопротеидной мембраной толщиной 6-10 нм каждая. Между ними находится перимитохондриальное пространство, приближающееся к 10 нм. Внутренняя мембрана образует складки – кристы. Внутри митохондрии находится матрикс, в котором сосредоточены ферменты ЦТК (рис. 4).

Чем более интенсивно протекают биосинтетические процессы в митохондриях, тем больше крист, за счет которых увеличи-

вается активная поверхность М, на которой локализуются дыхательные ферменты, поэтому митохондрии называют «легкими клетки».

В анаэробных условиях митохондрии деградируют, при этом уменьшается число этих структур, увеличивается их размер, но снижается количество крист. Эти деградирующие митохондрии называют промитохондриями. Однако при внесении дрожжей в среду с растворенным в ней кислородом произ-

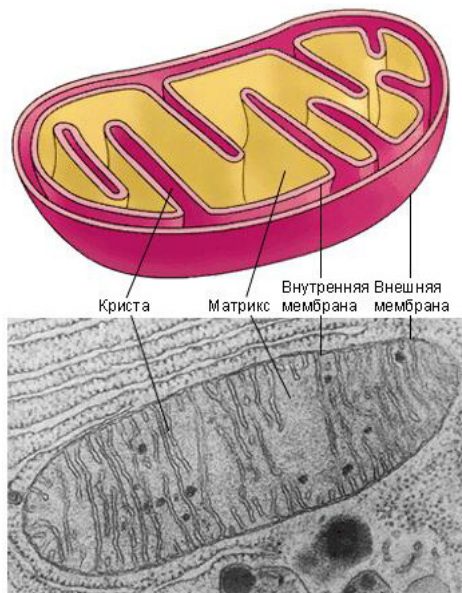


Рис. 4 Схематическое изображение строения митохондрии

ходит активное деление промитохондрий – изменение их структуры, т. е. увеличение числа крист. При этом важно, что скорость деления митохондрий превышает скорость деления ядра. Это объясняется тем, что данная структура обладает собственным генетическим аппаратом.

ДНК дрожжевых митохондрий, которая составляют 15-23% всей ДНК клетки, представляет собой кольцевую молекулу с молекулярной массой (ММ), в 5 раз большей, чем ММ ДНК в митохондриях высших животных. Своей кольцевой формой митохондриальные хромосомы напоминают хромосому бактерий, причем размножаются митохондрии подобно бактериям. Однако М – не обособленная от клетки структура: в митохондриях синтезируется только 1/4 митохондриальных белков. Основная часть белков митохондрий синтезируется на цитоплазматических рибосомах.

В митохондриях проходят важнейшие биохимические процессы, связанные с дыханием. Большая часть ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) находится в матриксе митохондрий. Ферменты, участвующие в транспорте электронов и окислительном фосфорилировании, локализованы на внутренней мембране митохондрии, в том числе и на кристах.

На развитие митохондрий влияют не только физико-химические условия культивирования (рН, температура, концентрация кислорода и т. д.), но и состав питательной среды. Так, добавление липидов, например олеиновой кислоты или эргостерола, приводит к образованию крист. На развитие митохондрии оказывает влияние также концентрация глюкозы в среде, которая вызывает проявление эффекта Креб-три. Активность митохондрий, связанная с ферментами ЦТК, зависит от наличия в среде культивирования факторов роста, макро- и микроэлементов и стимуляторов биосинтетических процессов. Так, при отсутствии в среде биотина снижается интенсивность процесса образования оксалоацетата, в результате чего замедляется работа цикла и уменьшается потребность в дыхательных ферментах, следовательно, снижается потребность в развитых мембранных структурах, на которых они локализуются. Поэтому снижается скорость деления митохондрий и уменьшается содержание в них крист.

Эндоплазматическая сеть (ЭПС), или эндоплазматический ретикулум (ЭПР), – это система канальцев, цистерн и пузырьков, которые пронизывают всю протоплазму клетки и соединены друг с другом и другими органеллами, в частности с ядром и рибосомами (рис. 5). От степени разветвленности этой сети зависит активность многих метаболических процессов, в частности синтез белков, жиров и углеводов. ЭПР развита больше в аэробных дрожжах, чем в анаэробных, а также в молодых клетках больше, чем в старых.

ЭПР представляет собой трехслойную липопротеидную мембрану, на которой находятся многочисленные ферменты (рис. 5). ЭПР обеспечивает синтез и передвижение различных метаболитов в клетке и играет роль временных хранилищ выработанных продуктов. Например, белки, синтезированные в рибосомах, проходят в каналы ЭПР и по ним переносятся в те участки клетки, для которых они предназначены. Во время перемещения белок может фосфорилироваться или превращаться в гликопротеид.

Таким образом, основными функциями ЭПР являются синтез белка, модификация белков, а также синтез липидов.

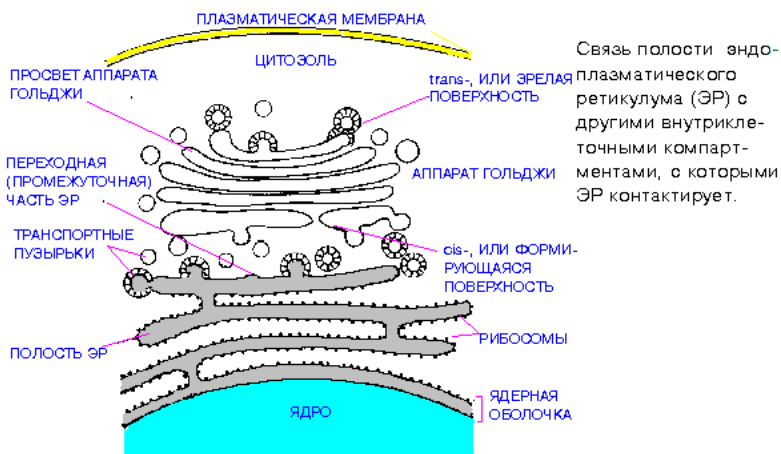


Рис. 5 Связь ЭПР с другими органеллами клеток

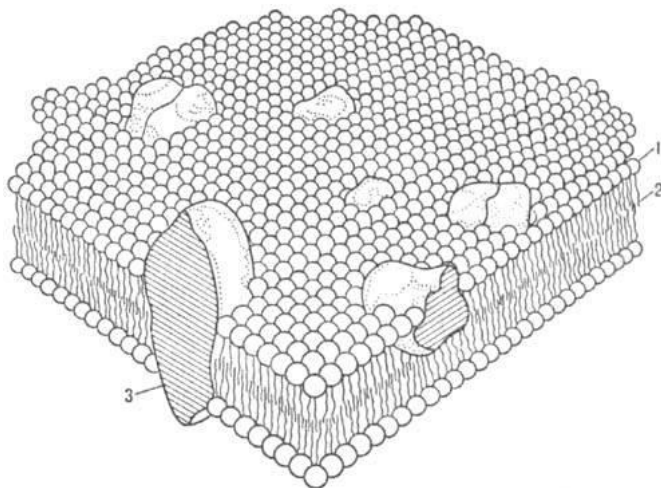


Рис. 6 Схема липопротеидной мембраны:
1, 2 – мембрана; 3 – белок

Эндоплазматический ретикулум у дрожжей делится на шероховатый и гладкий. В первом случае на поверхности мембраны, обращенной к цитоплазме, находятся рибосомы, на которых идет синтез белка (Рис. 6). Гладкий ретикулум (ГР) является производным от шероховатого. Он участвует в синтезе липидов, необходимых для формирования всех клеточных мембран, а также углеводов. Кроме того, ГР связывает шероховатый ретикулум с аппаратом Гольджи.

Морфология ЭПР зависит от условий культивирования, фазы роста дрожжей и физиологического состояния клеток. Интенсивно растущие клетки имеют хорошо развитый ретикулум, поэтому его можно обнаружить только с помощью электронного микроскопа. Однако по мере снижения метаболической активности дрожжей происходит уменьшение поверхности мембран и их разветвленности, в результате появляются вакуоли. Таким образом, наблюдается взаимосвязь между структурой ЭПР и физиологическим состоянием дрожжей.

Процесс возникновения вакуолей представляется следующим образом: каналцы и микроцистерны ЭПР утолщаются, соединя-

ются друг с другом, образуя более крупные полости (пузырчатая вакуоль), которые постепенно становятся все крупнее (рис. 7).

Представление о том, что вакуоли являются производными других мембранных систем клетки, подтверждается фактом их возрастного образования в клетках. При внесении дрожжей в свежую питательную среду эти вакуоли исчезают, а содержащиеся в них вещества используются в биосинтетических процессах. Ввиду активизации обмена веществ в клетках вновь возникает необходимость в хорошо развитой ЭПР сети, необходимой для синтеза и транспорта новых компонентов к различным органоидам клетки.

Поэтому уже в конце лаг-фазы роста популяции эта сеть развита и имеет значительную протяженность. Контролирует синтез новых мембран ядро. В фазе замедления роста вновь происхо-

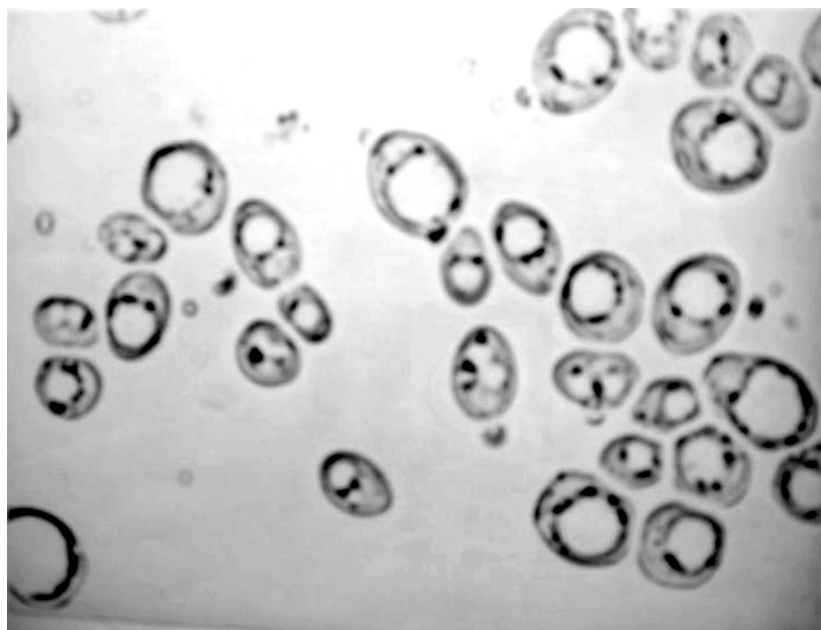


Рис. 7 Фотография дрожжей, содержащих вакуоли различного размера (увеличение 900 X). Темные гранулы, локализованные на поверхности вакуолей, – это жировые включения

дят морфологические изменения ЭПР, и в стационарной фазе уже можно наблюдать появление вакуоли.

Роль вакуоли, прежде всего, заключается в поддержании внутриклеточного давления. Осмотическая регуляция в клетке происходит постоянно, только в молодом возрасте ее осуществляют эндоплазматическая сеть и аппарат Гольджи, а в зрелом – вакуоль.

В вакуоли скапливаются низкомолекулярные продукты гидролиза, например, свободные аминокислоты, липиды, волютин, минеральные вещества

Аппарат Гольджи. Значительная часть гладких мембран отделена от ЭПР и организована в самостоятельные структурные образования, которые называются комплексом Гольджи, состоящим из системы пузырьков и дисков, соединенных друг с другом (см. рис. 5).

Основными функциями аппарата Гольджи являются модификация, накопление, сортировка и направление различных веществ в соответствующие внутриклеточные компартменты (отделения), а также за пределы клетки.

Аппарат Гольджи принимает участие в построении клеточной мембраны, в формировании лизосом, вакуолей и хитосом, он имеет непосредственное отношение к секреции белков и полисахаридов, а также выполняет функции транспорта секретируемых веществ в другие участки клетки и к ее поверхности.

Лизосомы – органеллы, окруженные однослойной мембраной, осуществляют «пищеварительные» функции. Они являются производными ЭПР и аппарата Гольджи. Различают первичные и вторичные лизосомы. В первичных лизосомах, локализованных в цитоплазме, ферменты находятся в неактивной форме. Их активность проявляется только тогда, когда они внедряются в вакуоль, образуя вторичную вакуоль.

Хитосомы грибов содержат фермент хитинсинтазу, которая катализирует синтез микрофибрилл хитина. Хитосомы переносят микрофибриллы к клеточной стенке, где происходит биосинтез рубцов.

Пероксисомы – органеллы, в которых аккумулированы окислительно-восстановительные ферменты, например, каталаза,

которая восстанавливает пероксид водорода до воды. Эти структуры имеют функционально-морфологическую связь с митохондриями, так как ферменты, содержащиеся в митохондриях и пероксисомах, дополняют друг друга в метаболизме дрожжей. Прослежена связь этих органелл также с ЭПР, аппаратом Гольджи, ядром и др.

Помимо органелл в цитоплазме находятся *запасные вещества* – включения. Это волютин, липиды, гликоген, белки.

Волютин, или метакроматин. Название метакроматин связано с тем, что он вызывает характерное изменение цвета у красителя метиленового синего.

Волютин у дрожжей локализован в вакуолях. Это кислоторастворимое соединение, состоящее из полифосфата, белка, РНК, ионов Mg^{+2} и Ca^{+2} . Волютин является резервом фосфора в клетке. Он накапливается при замедлении роста клеток, вызванного нехваткой питательных компонентов. Микроскопирование в обычном световом микроскопе не позволяет обнаружить волютин, так как он находится в вакуоли в аморфном состоянии, поэтому его определяют цитохимическим методом.

Помимо волютина в клетках содержатся высокополимерные полифосфаты (ПФ), локализованные на ЦПМ или вблизи от нее и обладающие большой метаболической активностью. Некоторое количество ПФ находится в клеточной оболочке. Именно эти ПФ принимают непосредственное участие в активном транспорте сахаров из окружающей среды в клетку и участвуют в синтезе маннана. Вакуолярная фракция ПФ метаболически малоактивна, и ее можно рассматривать только как запас фосфора, который используется в случае его недостатка в среде культивирования.

Липиды могут при определенных условиях культивирования накапливаться в дрожжевых клетках. В клетке липиды находятся как в свободном состоянии в виде капелек и частичек, видимых в обычном световом микроскопе при увеличении в 600-900 раз, так и в виде комплексов, которые входят в состав мембран.

Свободные липиды рассматривают в качестве запасных веществ клеток. В этом случае они вместе с фосфатами и белками образуют видимые под микроскопом гранулы (см. рис. 7).

Для *S. cerevisiae* нехарактерно большое накопление в клетках резервных липидов, поэтому в них обычно отсутствуют видимые капли жира. Однако при нарушениях в обмене веществ, вызванных, например, отсутствием биотина в среде культивирования, липиды могут накапливаться в протоплазме. Нарушение баланса между углеводами и усвояемого азота в питательной среде также может привести к образованию липидных гранул. Поэтому наличие липидов и их местоположение в клетке может служить показателем физиологической активности дрожжей.

Однако только небольшая часть липидов выявляется морфологически в виде различных клеточных включений. Большее их количество остается невидимым под микроскопом. Только с применением особой окраски они становятся видимыми.

Гликоген – полисахарид с молекулярной массой около 10 тыс. кДа. Для него характерна ветвящаяся структура за счет присоединения к основной цепи, в которой гликозидные остатки связаны между собой α -1,4 связями, и боковых гликозидных остатков, связанных между собой α -1,6 связями. Таким образом, он напоминает амилопектин ячменя и других злаков.

Морфологически он представляет собой гранулы размером до 9 нм. В обычном световом микроскопе после обработки клеток раствором Люголя эти гранулы окрашиваются в буро-коричневый цвет и воспринимаются под микроскопом не в виде отдельных образований, а в виде аморфной однородно окрашенной массы.

Биосинтез гликогена наиболее интенсивно происходит при культивировании клеток на средах, содержащих избыток сахаров, а также при брожении. Даже незначительная аэрация вызывает заметное снижение содержания гликогена в дрожжах.

Содержание гликогена в клетке подвержено значительным колебаниям в зависимости от условий культивирования. Гликоген активно используется дрожжами в лаг-фазе развития популяции и накапливается в фазе замедления ее роста.

Запасные белки обычно связаны с липидами и полисахаридами, однако при нарушении обмена веществ они могут выглядеть как кристаллы и занимать значительный объем в клетке.

Запасные вещества играют значительную роль в преодолении стрессов, вызываемых различными физико-химическими и механическими воздействиями при культивировании дрожжей. Содержание гликогена в клетке подвержено значительным колебаниям в зависимости от условий культивирования. Гликоген активно используется дрожжами в лаг-фазе развития популяции и накапливается в фазе замедления ее роста.

Запасные белки обычно связаны с липидами и полисахаридами, однако при нарушении обмена веществ они могут выглядеть как кристаллы и занимать значительный объем в клетке.

Запасные вещества играют значительную роль в преодолении стрессов, вызываемых различными физико-химическими и механическими воздействиями при культивировании дрожжей.

Осмотический стресс. Осмотическое давление возникает из-за стремления воды проникнуть через полупроницаемую мембрану в сторону более концентрированного из двух разделенных этой мембраной растворов. Такое давление прямо пропорционально концентрации молекул, которые не могут пройти через мембрану. Цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток характеризуется полупроницаемостью относительно воды и гидрофильных соединений с высокой молекулярной массой.

В настоящее время широко используется технология культивирования клеток в среде с высокой концентрацией углеводов. В этих условиях клетки испытывают гиперосмотический стресс. При этом дрожжи приобретают округлую форму и их поверхность становится морщинистой из-за утечки воды из клеток.

Реакция клеток на осмотический стресс зависит от плотности среды и ее углеводного состава, физиологического состояния дрожжей и стадии роста клеток. Размножающиеся клетки (лог-фаза роста) более чувствительны к стрессу, чем клетки, находящиеся в стационарной фазе роста. Это объясняется разным химическим составом дрожжей, в частности содержанием в них резервных углеводов гликогена и трегалозы.

В связи с гиперосмотическим стрессом, который испытывают клетки в момент их внесения в питательную среду, требуется некоторое время для адаптации их к данным условиям, прежде

чем дрожжи начнут размножаться. Эта стадия в развитии клеток называется лаг-фазой. В этот период существенно возрастает синтез глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации глицерина. Однако может пройти несколько часов до регистрации существенного увеличения содержания внутриклеточного глицерина.

В обычных условиях глицерин может проникнуть через цитоплазматическую мембрану, но при гиперосмотическом стрессе поры, через которые он выходит, закрываются и глицерин в период лаг-фазы не выделяется в среду. В процессе брожения стресс снимается и внутриклеточная концентрация глицерина уменьшается.

Этанольный стресс. Спирт образуется в процессе брожения, и влияние его на дрожжи определяется как этанольный стресс.

Токсическое свойство этанола – увеличение проницаемости и пористости клеточной мембраны, что приводит к проблемам с транспортом питательных веществ. Кроме того, наблюдается дефицит доступной воды в цитоплазме. Реакция клеток на воздействие этилового спирта в лабораторных условиях проявляется в увеличении степени ненасыщенности имеющихся в цитоплазматической мембране жирных кислот, в росте содержания эргостерина, синтезе трегалозы и продуцировании специфических белков термошока.

При содержании этанола в среде выше 1,2% происходит снижение удельной скорости роста дрожжей. Концентрация спирта в среде 2% и более приводит к уменьшению выхода биомассы. Полностью рост дрожжей подавляется при 8-9,5%-м содержании этанола.

Этанол влияет на продолжительность времени генерации дрожжевой клетки. Повышение концентрации этанола с 0 до 1% повышает время генерации примерно с 2,3 до 3,5 часов, а при концентрации этанола 3,8% она составляет уже 6,9 ч.

Промышленные дрожжи в случае плотного пивоварения подвергаются воздействию высоких концентраций этанола. При экстрактивности начального сусла 23% объемная доля спирта составляет более 9,0%. Образующийся спирт угнетает как скорость размножения дрожжей, так и процесс брожения.

Стресс, вызванный двуокисью углерода. При концентрациях, эквивалентных давлению газа выше 0,2 атм, данное соединение стимулирует рост клеток. При давлении около 0,5 атм цикл трикарбоновых кислот ингибируется, но спиртовое брожение продолжается вплоть до давления в 4,0 атм. Деление клеток прекращается при давлении около 2,5-3,0 атм. При этом клетки проходят через S-фазу (фазу синтеза ДНК), но не почкуются, и поэтому они характеризуются двойным составом ДНК и большими, чем обычно, размерами. Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению о биохимическом механизме действия двуокиси углерода.

Окислительный стресс. Относительно способности дрожжей противостоять окислительному стрессу проведено большое количество исследований. У клеток имеются защитные механизмы: например, на субстратном уровне – глутатион, полиамины, ионы металлов и др., а на ферментном уровне – это каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, тиоредоксинпероксидаза, а также редуктаза, метионинредуктаза и ДНК-восстанавливающие ферменты. В брожении хлебопекарных полуфабрикатов значение кислородного стресса не так велико, поэтому в ходе реакций, протекающих в митохондриях, в клетки поступает очень небольшое количество активного кислорода, способного отрицательно повлиять на жизнедеятельность дрожжей.

Как субстрат кислород очень важен для биосинтеза ненасыщенных жирных кислот и эргостерина, необходимых для роста клеток.

Температурный стресс. Температура оказывает значительное влияние на энергетический и конструктивный обмен клеток и, следовательно, воздействует на удельную скорость роста дрожжей и время генерации.

В определенных производственных условиях клетки могут испытывать температурный стресс (шок). Этот эффект проявляется, если дрожжи на короткий период времени подвергнуть воздействию достаточно высокой, но не губительной температуры. Устойчивость дрожжей к негативным внешним воздействиям связана с трегалозой, содержание которой в клетке определяется

штаммовыми особенностями дрожжей и условиями культивирования.

Установлено, что клетки, пережившие воздействие высоких температур, приобретают не только термоустойчивость, но и спирто- и осмоустойчивость.

На жизнедеятельности дрожжевых клеток отрицательно сказываются резкие колебания величины рН, гидростатический стресс, а также механический стресс в результате действия больших касательных напряжений (насосы, мешалки, регулировочные вентили).

Величина рН влияет на систему транспорта питательных веществ, на степень диссоциации компонентов среды, дисперсность, пространственную организацию и активность ферментных белков.

Оптимальной величиной рН для размножения клеток пивных дрожжей является 4,8, так как при этом значении рН фермент транспорта мальтозы в клетку – мальтозопермеаза – имеет максимальную активность. При более низких значениях рН ускоряется потребление аминного азота.

В целом, дрожжи живут и размножаются в широком диапазоне рН от 2 до 6. Однако резкие колебания этого параметра также могут сказаться на активности ферментов, нарушении биосинтетической активности дрожжей и увеличении количества мертвых клеток.

Механический стресс возникает в результате действия больших касательных напряжений во время перемешивания дрожжей, перекачивания их из одной емкости в другую с помощью насосов. Эти механические операции могут «обдирать» поверхностный слой клеточной оболочки дрожжей, что приводит к изменению поверхностного потенциала клеточной стенки.

1.1.2 Химический состав дрожжей

Наиболее существенными компонентами дрожжевой клетки являются вода, азотсодержащие соединения, углеводы, жиры и минеральные вещества.

В клетках вода образует дисперсную систему сложных растворов неорганических и органических веществ, концентрация которых может достигать от 15 до 25%.

Массовая доля воды в дрожжевой клетке составляет от 65 до 80%. Различают внеклеточную и внутриклеточную фракцию воды. Внутриклеточная вода, в свою очередь, может находиться в свободном и связанном состоянии.

Свободная вода служит средой, в которой протекают биохимические реакции. Эта вода принимает непосредственное участие в процессах дыхания и гидролиза (например, гидролиз сахарозы с образованием фруктозы и глюкозы).

Связанная вода входит в клеточные структуры (биомембраны) и клеточные компоненты, например, ДНК. Она трудно удаляется при сушке или замораживании дрожжей. В прессованных дрожжах содержится до 20% связанной воды, больше всего воды связывают белки (0,2-0,6 г/г белка), фосфолипиды (0,3 г/г фосфолипидов), нуклеиновые кислоты и углеводы (0,3 г/г).

Соотношение между свободной и связанной водой определяется технологическими режимами культивирования дрожжей, а также техникой сепарирования и прессования готовой продукции.

Азотсодержащие компоненты дрожжевой клетки представлены белками, свободными аминокислотами и нуклеиновыми кислотами.

Белки, входящие в состав дрожжей, делятся на четыре фракции:

- альбумины, растворимые в воде;
- глобулины солерастворимые;
- фракция белка, растворимая в этаноле;
- фракция белка, растворимая в щелочи.

Наиболее известными белками дрожжей являются зимоказин (фосфоглобулин) и цевизин.

Существуют два понятия при оценке количества белка в клетке – истинный белок и сырой протеин.

Истинный белок определяют спектрофотометрически по методу Лоури. «Сырой» протеин рассчитывают путем умножения

на коэффициент 6,25 показателя общего азота в клетках, определяемого методом сжигания пробы по Кьельдалю. Этот показатель всегда будет выше, чем содержание истинного белка, так как общий азот в клетке представлен азотом белка, аминокислот, нуклеиновых кислот, аммиачным азотом.

Содержание белка в клетках зависит от многих факторов и прежде всего от концентрации азота в среде культивирования и величины засева.

Фракционный состав дрожжевого белка также определяется источником углерода. У дрожжей, выращенных на этаноле, в отличие от дрожжей, выращенных на мелассе, общее содержание белков выше, главным образом, за счет увеличения солерастворимой фракции.

Нуклеиновые кислоты. Дрожжи богаты нуклеиновыми кислотами (НК): дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Соотношение РНК/ДНК в клетках составляет обычно около 25. В фазе интенсивного роста дрожжей количество РНК в клетках достигает 30%, коммерческие пекарские дрожжи содержат 26% от содержания белка в клетках.

Примерно 10% от общего азота клеток составляет азот пуриновых (аденин и гуанин) и 4% – азот пиримидиновых оснований (цитозин и тимин), входящих в нуклеиновые кислоты. Содержание ДНК в клетках, за исключением периода деления, достаточно постоянно, а количество РНК изменяется в зависимости от фазы роста.

Концентрация белков и НК в дрожжах зависит от температуры роста. При снижении температуры культивирования ниже оптимальной (30 °C) наблюдается увеличение содержания белка и РНК.

На примере хлебопекарных дрожжей показано, что во время хранения количество нуклеиновых кислот в дрожжах сначала возрастает, а затем уменьшается, что совпадает с началом автолиза клеток.

При дегидратации дрожжей также происходит уменьшение содержания НК, но при этом увеличивается количество нуклеотидов. Так, при дегидратации может разрушиться до 40% клеточных РНК, причем этот процесс идет более интенсивно у дрож-

жей, выращенных на солодовом сусле, чем у дрожжей, культивируемых на мелассе.

Свободные аминокислоты. Дрожжевые клетки имеют два внутриклеточных фонда (пула) свободных аминокислот (АК). Фонд, способный к увеличению, в котором происходит накопление АК. Эти аминокислоты могут выходить из клеток в результате осмотического шока, что довольно часто наблюдается при внесении клеток в свежую питательную среду, содержащую высокую концентрацию питательных веществ. Это явление чаще всего наблюдается при культивировании дрожжей по способу «простая периодическая культура».

Так называемый «внутренний» резервный фонд является более постоянным. АК этого фонда непосредственно участвуют в биосинтезе белков. В период интенсивного размножения на долю этих АК приходится более 10% от общего азота клеток.

Во внутриклеточном фонде преобладают глутаминовая кислота, аланин, лизин и аспарагиновая кислота.

На содержание свободных аминокислот в дрожжах влияют:

- количество утилизируемого азота в среде;
- источник углевода и его концентрация;
- концентрация биотина в среде;
- температура процесса;
- режим подачи питательных компонентов и т. п.

Обычно содержание свободных аминокислот в пекарских коммерческих дрожжах колеблется в пределах от 6 до 9%.

Углеводы составляют от 30 до 50% от массы сухих веществ дрожжей. Они представлены трегалозой, гликогеном, глюканом, маннаном и хитином.

Трегалоза – запасной углевод, который находится в цитоплазме дрожжей. Трегалоза состоит из двух D-гликозидных остатков, связанных между собой –1,1 гликозидной связью.

Гликоген находится в цитоплазме в дисперсном состоянии в виде гранул. Гликоген – высокомолекулярный полисахарид, в котором D-гликозидные остатки связаны –1,4- и –1,6 связями.

Различают две фракции гликогена – щелоче- и кислоторастворимые. Щелочерастворимая фракция гликогена входит в состав

протеинового комплекса, ответственного за гидролиз сахарозы и перенос глюкозы и фруктозы в цитоплазму. Кислоторастворимая фракция гликогена – это запасной углевод клетки.

Маннан – полимер маннозы, входит в состав клеточной стенки дрожжей, где он связан ковалентной связью с белками. Маннан, связанный с белком (маннанопротеин), обнаружен также в цитоплазматической мембране.

Глюкан содержится в клеточной стенке дрожжей. Он состоит из D-гликозидных остатков, связанных между собой связями.

Хитин входит в состав клеточных рубцов. Молекула хитина состоит из остатков N-ацетилглюкозамина. Он обладает высокой устойчивостью и растворим только в минеральных кислотах.

Дрожжевые клетки содержат связанные и свободные липиды. Связанные липиды входят в состав клеточных структур, свободные откладываются в клетке в виде жировых включений.

Количество липидов в дрожжах обычно не превышает 12%, в том числе массовая доля свободных жирных кислот составляет 1-2% от сухих веществ клетки. Свободные жирные кислоты являются запасными веществами. В клетках дрожжей имеются также другие компоненты, относящиеся к липидам: например, фосфолипиды, сквален и др. Их содержание невелико, но тем не менее они важны для жизнедеятельности дрожжей.

Условия культивирования, состав питательной среды и видовые особенности дрожжей во многом определяют их липидный состав в качественном и количественном отношении. Так, снижение температуры с 30 до 15 °С приводит к увеличению количества липидов в дрожжах до 14,5%, при этом возрастает доля непредельных жирных кислот и фосфолипидов.

Основная часть дрожжевых липидов представлена триглицеридами (20-50%) и фосфолипидами (15-60% от содержания липидов в клетке). В меньшем количестве в дрожжах представлены свободные жирные кислоты (1-20%), моно- и диглицериды (1-15%).

Линолевая, линоленовая, лауриновая, стериновая и целый ряд других кислот составляют следы от общего количества жиров дрожжевой клетки. Неомыляемая часть общих липидов представ-

лена стеринами; установлено, что из общего количества стеринов (80%) составляет эргостерин.

Массовая доля минеральных веществ (зола) в дрожжах *S. cerevisiae* колеблется от 2 до 10% СВ клетки. В основном они представлены фосфором, калием, магнием, кальцием и серой. Эти минеральные компоненты относятся к макроэлементам. Кроме этих элементов клетки содержат большое количество микроэлементов, среди которых следует обратить внимание на цинк, марганец, железо, медь, кобальт.

Витамины – это биологически активные соединения, которые играют важную роль в метаболизме дрожжей. Основная их роль заключается в том, что они являются кофакторами или простетическими группами ферментов.

Дрожжи содержат водорастворимые витамины группы В, эргостерол, который под влиянием УФ лучей превращается в витамин D2 (жирорастворимый). Содержание эргостерола в дрожжах превышает 2% от СВ биомассы.

Количество витаминов в дрожжах зависит от их генетических особенностей, от состава питательной среды и типа энергетического обмена. Аэробные дрожжи содержат больше витамина B5 (витамин PP) и B3 (пантотеновая кислота), анаэробные – B1 (тиамин) и эргостерол. В литературных источниках приводятся разноречивые сведения относительно содержания витаминов в дрожжах. Это, вероятно, связано с различными условиями культивирования клеток, в которых определяют витамины.

1.1.3 Метаболизм дрожжей

Метаболизм объединяет все ферментативные реакции, которые протекают в клетке, а также организацию и регуляцию этих реакций. С биохимической точки зрения обычно рассматриваются отдельные метаболические пути, однако в действительности они не существуют изолированно, а являются частью единого процесса.

Каждый биохимический путь состоит из ряда химических реакций, катализируемых ферментами. Фермент повышает скорость химической реакции и дает ей возможность протекать при физиологическом уровне температуры и pH. Экстремальные температура и/или pH инактивируют молекулу фермента, вызывая денатурацию белка.

Биохимические пути объединяют катаболические, анаболические, амфиболические и анаплеротические пути. Катаболические пути осуществляют распад более сложных соединений на менее сложные, при этом освобождается энергия в виде молекул АТФ. Анаболические (биосинтетические) пути потребляют энергию и синтезируют (обычно в процессе восстановления) простые молекулы, которые в дальнейшем участвуют в синтезе макровеществ. Амфиболические пути имеют как катаболические, так и анаболические функции: они являются центральными метаболическими путями, доставляющими от последовательных катаболических реакций промежуточные продукты, которые являются субстратами анаболических реакций. Когда во время действия катаболического ряда амфиболического пути промежуточные продукты удаляются для биосинтетических целей, катаболизм прекращается, пока снова не потребуются продукты для действия анаплеротических реакций. Функция анаплеротических реакций заключается в возмещении тех промежуточных продуктов, которые связывают катаболизм и анаболизм, таким образом обеспечивая продолжение действия амфиболических путей.

Энергия, образуемая в процессе окисления углеводов и потребляемая в биосинтетических реакциях, запасается в форме аденозин-трифосфата (АТФ). При гидролизе АТФ до аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфора освобождается при стандартных условиях около 30,5 кДж/моль. Эта величина является функцией pH, температуры и концентраций АТФ, АМФ и фосфора. Окислительные катаболические реакции включают перенос электронов от промежуточных продуктов. Этот процесс контролируется дегидрогеназами и часто включает участие кофактора – никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Электроны

переносятся к НАД⁺ в форме водородного иона [Н⁺] с образованием НАДН₂:



Биосинтетические реакции проходят при участии энергии АТФ.

Регуляция метаболизма осуществляется, прежде всего, за счет того, что биохимические реакции проходят в различных органеллах, которые локализованы в определенных местах клетки. Кроме того, контроль биохимических путей осуществляется с помощью других механизмов, таких как:

- регуляция количества синтезируемого фермента;
- регуляция деградации фермента;
- изменение скорости ферментативной активности с помощью аллостерического торможения или активации;
- использование ферментов при проведении одних и тех же реакций для разных целей. Например, алкогольдегидрогеназа (АДН) существует в виде двух форм: АДН1 используется, когда клетки растут на этаноле, превращая спирт в ацетальдегид, в то время как АДН2 используется клетками при росте на глюкозе и превращает ацетальдегид в этанол.

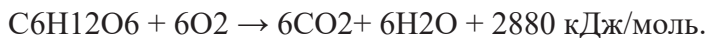
Далее будут обсуждены только основные аспекты метаболизма дрожжей, имеющих значение в технологии дрожжей.

Дрожжи сахаромикеты относятся к факультативным анаэробам, поэтому катаболизм глюкозы в клетке может проходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях, его основная функция – это синтез АТФ.

В обоих случаях глюкоза через ряд ферментативных реакций расщепляется с образованием двух молекул пировиноградной кислоты (пирувата). Этот процесс носит название гликолиза, или «путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (ЭМП)».

Аэробное окисление глюкозы

В аэробных условиях глюкоза окисляется до CO₂ и H₂O. Суммарное уравнение:



Этот процесс включает несколько стадий:

- аэробный гликолиз. В нем происходит окисление 1 молекулы глюкозы до 2 молекул пировиноградной кислоты (ПВК), с образованием 2 молекул АТФ (сначала 2 АТФ затрачиваются, затем 4 образуются) и 2 молекул НАДН₂;
- превращение 2 ПВК в 2 ацетил-КоА с выделением 2 CO₂ и образованием 2 НАДН₂;
- цикл трикарбоновых кислот. В нем происходит окисление 2 молекул ацетил-КоА с выделением 4 молекул CO₂, образованием 2 ГТФ (дают 2 АТФ), 6 НАДН₂ и 2 ФАДН₂.

Кроме того, после предварительного гидролиза до моносахаров дрожжи утилизируют сахарозу, мальтозу, мальтотриозу, а также внутренние углеводные резервы трегалозу и гликоген.

Гликолиз (рис. 9) начинается с фосфорилирования глюкозы и образования за счет макроэргической связи АТФ глюкозо-6-фосфата (Гл-6-Ф).

Источником D-глюкозы также служит гликоген, который является субстратом для фермента, отщепляющего гликозидные остатки с концов полисахаридных цепей гликогена. Следующая реакция на этом пути – изомеризация Гл-6-Ф во фруктозо-6-фосфат (Ф-6-Ф), осуществляемая глюкозофосфат изомеразой (ЕС 5.3.1.9). Эта реакция обратима.

Фр-6-Ф также образуется из фруктозы, поступающей непосредственно из питательной среды, а также при гидролизе сахарозы.

Третий фермент гликолитического пути, 6-фосфофруктокиназа, осуществляет образование Фр-1,6-дифосфата (Ф-1,6-Ф) из Фр-6-Ф и АТФ.

При этом на каждую молекулу глюкозы, вошедшую в цепь, потребляется две молекулы АТФ. Затем фруктозо-дифосфат-альдолаза – фермент, **содержащий цинк**, катализирует обратимое расщепление шестиуглеродной молекулы на две трехуглеродные – дегидро-ацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат. Только последняя молекула подвергается дальнейшим превращениям по пути ЭМП, и равновесие между двумя триозофосфатами поддерживается триозофосфатизомеразой.

Далее D-глицеральдегид-3-фосфат идет на образование 1,3-дифосфоглицерата при участии фермента глицеральдегид-фосфат дегидрогеназы. Для этой реакции требуется источник неорганического фосфата. Это первая реакция в гликолитической цепи, которая включает окисление субстрата. Более того, это первая реакция, в которой образуется макроэргическая связь и свободная энергия окислительного процесса запасается в этой связи. На следующей ступени происходит перенос энергии этой связи на АДФ, так что образуется АТФ и 3-фосфо-D-глицерат, реакция катализируется фосфоглицераткиназой. На этом участке цепи из каждой вошедшей в нее молекулы D-глюкозы или D-фруктозы образуются две молекулы АТФ и две молекулы НАДН₂.

С помощью фосфоглицеромутазы 3-фосфо-D-глицерат превращается в 2-фосфо-D-глицерат. Затем энолаза (ЕС 4.2.1.11) в качестве посредника способствует удалению воды из 2-фосфо-D-глицерата, что приводит к образованию фосфоэнолпировиноградной кислоты (ФЕП). Богатая энергией связь в фосфоэнолпировиноградате (до $= -61,9$ кДж/моль) используется затем для фосфорилирования АДФ, в результате чего образуются АТФ и пировиноградная кислота. В этой точке на каждую молекулу включенной в метаболизм глюкозы возникают две молекулы АТФ и 2 молекулы НАДН₂.

Таким образом, в результате прохождения гликолитического пути образуется запас энергии в виде двух молекул АТФ.

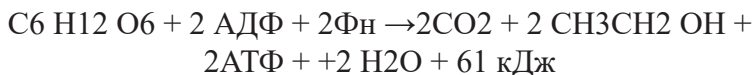
Глюкоза $2 \rightarrow$ Пируват + 2 АТФ + 2 НАДН₂

Спиртовое брожение

Гликолиз является первым этапом спиртового брожения. Образовавшаяся пировиноградная кислота декарбоксилируется при участии декарбоксилазы в ацетальдегид, который затем восстанавливается до этанола. Эта реакция осуществляется алкогольдегидрогеназой с участием НАДН₂. В ходе этой реакции НАДН₂ окисляется до НАД⁺, который далее вновь участвует в гликолизе. Именно за счет использования ацетальдегида в качестве конечного акцептора электронов клетка обеспечивает дальнейшее функционирование гликолитического пути и вследствие этого – даль-

нейшее образование АТФ для использования в биосинтетических реакциях.

Энергетический и химический баланс брожения:



Таким образом, выход АТФ в пути ЭМП составляет 2 молекулы на молекулу глюкозы (рис. 8). Эффективность брожения составляет 26%; 74% энергии не удерживается клеткой и в основном рассеивается в виде тепла, поэтому следует применять охлаждение аппаратов. Скорость брожения непостоянна, и наибольшая активность наблюдается первые 24-36 ч. Затем ввиду ингибирования клеток этанолом этот процесс замедляется.

Для протекания спиртового брожения в питательной среде должны присутствовать тиамин (витамин В1), а также ионы Zn^{+2} , Co^{+2} , Mg^{+2} и Mn^{+2} . Например, увеличение концентрации ацетальдегида вследствие замедления его восстановления в этанол происходит из-за недостатка ионов Zn^{+2} в среде, в результате Ф-1,6-Ф идет на биосинтез глицерин. Кислород является ингибитором брожения (эффект Пастера), механизм этого процесса будет рассмотрен ниже.

Гликолитическая последовательность реакций является примером амфиболического пути, в ходе которого в биосинтетических реакциях клеткой используются различные промежуточные продукты:

- фосфорилированная глюкоза (Гл-1-Ф) является предшественником в синтезе полимеров клеточной стенки и резервных углеводов;
- триозофосфаты используются в синтезе жиров;
- фосфоенолпируват и пируват являются предшественниками некоторых аминокислот.

Однако размножающиеся клетки требуют значительно больше промежуточных продуктов для биосинтетических реакций, чем может предоставить путь ЭМП. Это такие вещества, как сукцинат, 2-оксoglутарат, оксалоацетат, которые являются предшественниками в синтезе восьми аминокислот. У дышащих дрож-

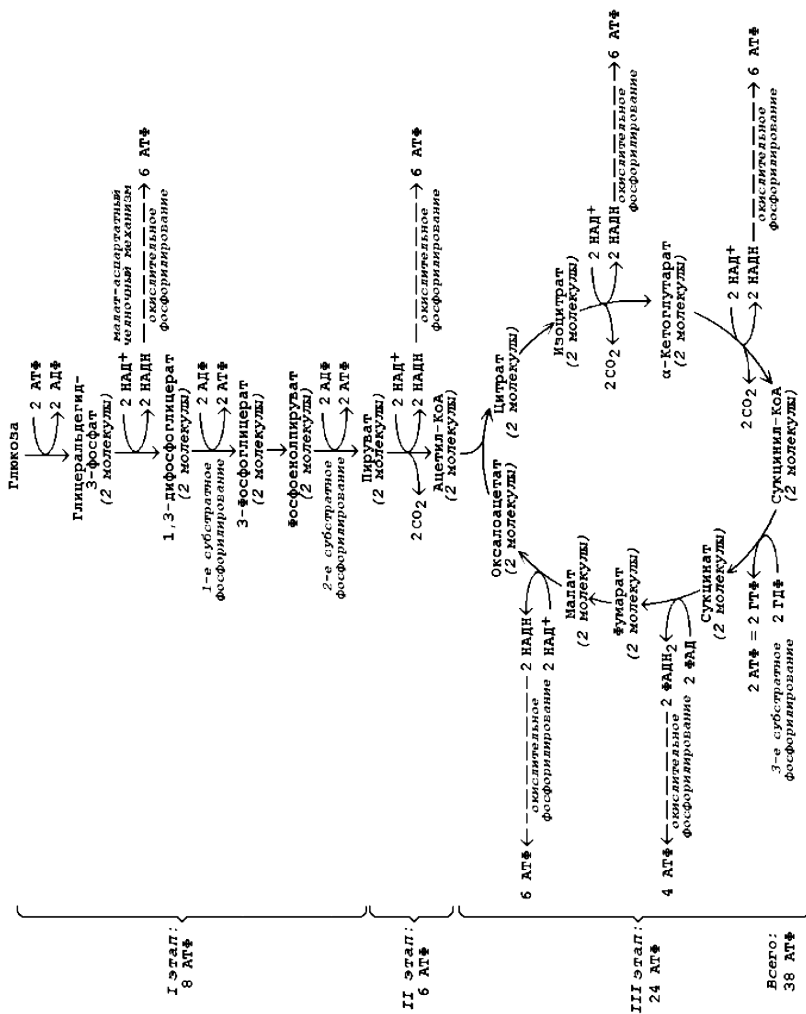


Рис. 8 Метаболизм этанола и глицерина

жевых клеток, т.е. таких, которые используют молекулярный кислород в качестве акцептора водорода и полностью окисляют глюкозу, синтез предшественников аминокислот протекает в цикле Кребса (ЦТК).

В анаэробных условиях активность ферментов цикла Кребса низкая. В результате из-за недостатка ключевого фермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, активность которого определяется концентрацией растворенного в среде кислорода, на участке сукцината – 2-оксоглутарат ЦТК разомкнут.

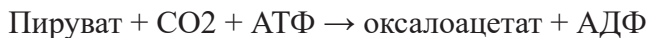
При недостатке в среде растворенного кислорода у дрожжей функционируют два механизма, которые обеспечивают клетку необходимыми метаболитами: первый предусматривает образование сукцината, фумарата, малата и оксалоацетата в окислительном процессе, в то время как второй включает синтез дополнительных ферментов для образования 2-оксоглутарата по восстановительному пути. Согласно обоим механизмам, пируват превращается в ацетил-КоА в реакции, включающей пируватдегидрогеназный комплекс, в состав которого входит пируватдегидрогеназа, дигидроамид-ацетилтрансфераза, дигидроамидредуктаза. В качестве коферментов комплекс содержит Mg^{+2} , тиаминпирофосфат, флавинадениндинуклеотид (ФАД) и никотинамиддинуклеотид (НАД).

Суммарная реакция имеет следующий вид:



Таким образом, обмен глюкозы при недостатке кислорода в среде соответствует ЦТК в аэробном метаболизме: окислительный путь ведет от оксалоацетата к 2-оксоглутарату, восстановительный – к сукцинату.

Вовлечение оксалоацетата в разорванный ЦТК предполагает дополнительный синтез оксалоацетата за счет протекания анаплеротической (восполняющей) реакции:



Катализирует эту реакцию АТФ и пируваткарбоксилаза – фермент, в котором биотин является простетической группой, а

цинк – коферментом. Это единственная реакция, которую можно рассматривать как анаплеротическую в ходе ЦТК, которая восполняет недостаток оксалоацетата, расходуемого для биосинтетических реакций.

Аэробный метаболизм углеводов так же, как и анаэробный, имеет одинаковый механизм вплоть до образования пирувата. Особое внимание в этой последовательности реакций следует уделить ЦТК, который выполняет следующие функции:

- энергетическую;
- биосинтетическую;
- регуляторную.

Энергетическая функция. В аэробных условиях пируват поступает в ЦТК, в котором, пройдя ряд превращений, полностью окисляется в последовательном процессе реакций дыхательной цепи. Энергетическая значимость ЦТК заключается в том, что при утилизации одной молекулы глюкозы образуются 36 молекул АТФ:



Биосинтетическая функция. Соединения, участвующие в цикле, образуют резерв промежуточных веществ, которые дают начало обратимым процессам в дрожжах. Эти процессы метаболизма связывают в единое целое различные реакции синтеза и распада. С этой точки зрения отдельные реакции ЦТК занимают центральное место. Это прежде всего биосинтез оксоглутарата, оксалоацетата и сукцинил-КоА.

Оксоглутарат является самым важным акцептором аминогрупп в реакциях переаминирования. В результате получается глутамат, далее глутамин, который является предшественником в синтезе пролина, орнитина, аргинина и других метаболитов. Кроме того, из глутамата образуется лейцин и -аминомасляная кислота, которая затем окисляется в яблочную.

Оксалоацетат является ключевым соединением в процессе гликонеогенеза (превращения жиров в сахарады). Обратимое переаминирование оксалоацетата приводит к образованию аспартата, который служит исходным соединением для синтеза других

аминокислот (метионин, треонин и изолейцин) и пиримидиновых нуклеотидов.

Большинство реакций переаминирования протекает в цитоплазме и лишь немногие в митохондриях.

Сукцинил-КоА играет большую роль в дыхательном метаболизме, так как способствует замыканию ЦТК. Производные сукцинил-КоА входят в состав окислительно-восстановительных ферментов (пероксидаза, каталаза) и цитохромы, которые переносят электроны от дегидрогеназ к кислороду, в результате выделяется энергия, которая запасается в АТФ.

Регуляторная функция. Вхождение в ЦТК соединений, находящихся на перекрестке важных метаболических путей, делает его существенным регуляторным фактором митохондриального и всего клеточного обмена.

Регулирование ЦТК осуществляется на двух уровнях – энергетическом и субстратном.

Регулирование ЦТК на энергетическом уровне. Вхождение в цикл Ац-КоА контролируется концентрацией АТФ в дрожжевой клетке. При высокой величине отношения АТФ/АМФ тормозится вхождение Ац-КоА в ЦТК, при этом в зависимости от наличия в среде факторов роста и интенсивности аэрации увеличивается синтез либо жиров, либо углеводов.

Уменьшение величины отношения АТФ/АМФ свидетельствует о высокой биосинтетической деятельности дрожжей. При этом наблюдается стимуляция реакций ЦТК через активирование таких ферментов, как цитратсинтаза, изоцитратдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, в результате чего от соответствующих субстратов отщепляется H^+ .

Регулирование ЦТК на субстратном уровне. Оно заключается в изменении биосинтеза цитрата и Ац-КоА. Концентрация цитрата в клетке определяет пастеровский эффект у дрожжей и регулирует начальный этап биосинтеза жиров. В тех случаях, когда скорость окисления в ЦТК ограничена концентрацией оксалоацетата, накопление Ац-КоА ведет к образованию оксалоацетата путем активации пируваткарбоксилазы. При высокой концентрации АТФ, когда цитратсинтаза ингибируется, накопление пирувата и

Ац-КоА стимулирует синтез оксалоацетата, а так как синтез цитрата заторможен, оксалоацетат при участии фосфопируваткарбоксикиназы превращается в ФЭП (фосфоенолпируват) и далее в углеводы. При этом важно отсутствие лимита по витамину В7 (биотин).

В присутствии кислорода дрожжи сравнительно быстро к нему адаптируются. Эту способность впервые обнаружил Пастер, и явление было названо пастеровским эффектом (ПЭ). Суть ПЭ заключается в подавлении брожения дыханием, снижении скорости потребления субстрата (глюкозы) и увеличении доли сахара, идущего на синтез биомассы.

Регулирование эффекта Пастера проходит на двух уровнях – энергетическом и субстратном.

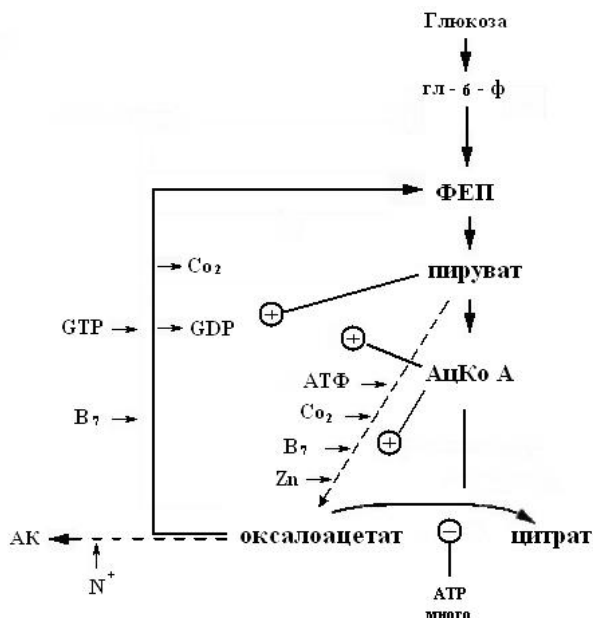


Рис. 9 Образование фосфоенолпирувата

Регулирование эффекта Пастера на энергетическом уровне заключается в повышении содержания АТФ в клетках, что при-

водит к замедлению скорости реакции превращения Фр-6-Ф во Фр-1,6-дифосфат, катализируемой ферментом фосфофруктокиназой, и, наоборот, АМФ интенсифицирует скорость этой реакции.

Регулирование эффекта Пастера на субстратном уровне можно рассматривать с точки зрения влияния ацетил-КоА и оксалоацетата, с одной стороны, и цитрата – с другой.

Так при недостатке в питательной среде биотина и ионов Zn^{+2} резко уменьшается скорость образования оксалоацетата, в результате чего работа цикла замедляется, следовательно, снижается выход биомассы и увеличивается синтез этанола. К такому же эффекту приводит недостаточное снабжение клеток витаминами В1 (тиамин) и В3 (пантотеновая кислота). Это приводит к снижению скорости синтеза ацетил-КоА, в результате чего уменьшается образование цитрата – исходного компонента ЦТК.

Цитрат представляет собой **второй аллостерический** (по принципу обратной связи) регулятор активности фосфофруктокиназы (ФФК): увеличение содержания цитрата в дрожжах приводит к торможению активности ФФК.

Еще одним активатором ПЭ является кислород. Так, в присутствии O_2 пируват преимущественно превращается в Ац-КоА, так как пируватдегидрогеназа имеет более выраженное сродство к пирувату, чем пируватдекарбоксилаза.

Особенность метаболизма сахаромикетов заключается в наличии у них **эффекта Кребтри** (либо глюкозный эффект, либо катаболитная репрессия), суть которого состоит в том, что, несмотря на интенсивную аэрацию в среде с высокой концентрацией сахара, часть субстрата сбрасывается на спирт, т.е. имеет место «аэробное брожение».

Для эффекта Кребтри характерно действие одновременно двух энергетических путей – аэробного и анаэробного. При этом выход биомассы изменяется в широких пределах в зависимости от массовой доли и природы углевода в среде.

Для *S. cerevisiae* установлено, что при концентрации глюкозы (фруктозы) в среде более 0,1% наблюдается репрессия синтеза ферментов ЦТК, цитохромов и ферментов дыхательной цепи

даже при отсутствии лимита по кислороду. Эффект Кребтри при использовании в качестве углеводного питания глюкозы и фруктозы выражен значительно сильнее, чем на мальтозе, мальтотриозе или галактозе.

Мальтоза и мальтотриоза не вызывают репрессивного действия на дыхание у штаммов дрожжей низового брожения.

В отсутствие репрессирующей концентрации глюкозы и при наличии в среде достаточного количества растворенного молекулярного кислорода дрожжи метаболизируют глюкозу дыхательным путем. В этом случае глюкоза полностью окисляется до CO_2 и воды. Это достигается через деятельность гликолитического пути и ЦТК. Образованный НАДН₂ окисляется до НАД⁺ с помощью цепи электронного транспорта с использованием кислорода в качестве акцептора водорода (таким путем образуется вода) и в процессе синтеза АТФ. Следовательно, именно массовая доля углевода в среде определяет преобладающий тип энергетического обмена в клетках, а значит, и выход биомассы. Во время катаболической репрессии наблюдается деградация митохондрий, количество их уменьшается в 3-5 раз, кроме того, изменяется их морфология: увеличивается размер и исчезают кристы.

Конструктивный обмен дрожжей. Метаболизм, или обмен веществ, включает в себя такие процессы, как:

- катаболизм – распад веществ до соединений с меньшей молекулярной массой;
- амфиболизм – синтез промежуточных веществ из этих соединений;
- анаболизм – образование из промежуточных соединений сложных веществ, например, белков, жиров и углеводов.

С целью регулирования химического состава дрожжей рассмотрим механизмы образования некоторых соединений: структурных, запасных углеводов, аминокислот, которые идут на синтез белка, и жиров.

Резервные углеводы представлены в клетках дрожжей тремя фракциями: трегалозой, гликогеном, растворимым в уксусной кислоте, и гликогеном, растворимым в хлорной кислоте.

Метаболически активные фракции накапливаются не одновременно. Содержание гликогена растет в фазе замедления роста, в то время как трегалоза аккумулируется при переходе культуры к стационарной фазе.

Гликоген. Гликоген находится в цитоплазме в виде гранул, некоторое его количество обнаружено в клеточной оболочке. Это осмотически неактивный полисахарид, способный быстро использоваться в процессе метаболизма дрожжей. Молекула гликогена представляет собой разветвленную структуру, в которой гликозидные остатки связаны между собой α -1,4 и α -1,6 связями.

Синтез гликогена начинается с образования уридиндифосфат-глюкозы (УДФГл), катализируемого ферментом глюкозо-1-фосфату- ϵ →ридилтрансферазой. Гликоген-синтаза-Д-фосфатаза катализирует последовательное присоединение глюкозного остатка УДФГл к полисахаридному акцептору:

Глюкоза → Глюкоза-6-фосфат → Глюкоза-1-фосфат → УДФ-Глюкоза → гликоген

Гликоген потребляется дрожжами как первичный источник энергии, поэтому его количество значительно уменьшается в первые 10-12 часов после введения дрожжей в питательную среду, а потом вновь возрастает. Масса гликогена может составлять до 30% массы клетки (в пересчете на сухое вещество). Во время хранения дрожжей содержание гликогена в клетках уменьшается в связи с его использованием для поддержания их жизнедеятельности (эндогенного дыхания). Чем выше температура, при которой хранятся дрожжи, тем интенсивнее снижается в них количество гликогена.

Гликогенолиз (распад гликогена) начинается с деградации гликогена под действием фосфорилазы. В присутствии фосфата от гликогена отщепляется глюкозо-1-фосфат, который превращается фосфоглюкомутазой в глюкозо-6-фосфат. Энергетический выход гликогенолиза выражается в синтезе трех молекул АТФ в расчете на одно звено глюкозы молекулы гликогена. **Трегалоза.** Трегалоза – резервный дисахарид, состоящий из двух гликозид-Трегалоза – резервный дисахарид, состоящий из двух гликозидных остатков. Трегалоза находится в цитоплазме дрожжевой

клетки; часть трегалозы связана с клеточной стенкой и защищает ее от внешнего воздействия. В отличие от гликогена трегалоза, наряду с ее энергетической функцией, участвует в поддержании структуры цитозоля, а также может служить осмотическим барьером для выхода из клеток воды в стрессовых условиях.

Содержание трегалозы варьирует в зависимости от степени аэробно-анаэробного брожения, в бродящих дрожжах ее может накопиться до 6%, в дышащих – до 18%.

Синтез трегалозы так же, как и гликогена, начинается с образования УДФГл, при этом трегалозо-фосфат синтезируется как из УДФГл, так и из Гл-6-Ф при участии, – трегалозофосфатсинтазы.

Направление потока Гл-6-Ф на синтез того или другого углевода регулируется его концентрацией внутри клетки. При высокой концентрации образуется гликоген, при низкой – трегалоза.

Первичным резервным веществом дрожжевой клетки является гликоген, так как во время хранения именно он используется в качестве эндогенного источника углеводного питания. Освободившаяся при этом энергия используется клеткой для поддержания собственных структур, при этом предотвращается распад структурных полисахаридов и ферментных белков, т.е. лизис дрожжей. Предполагается, что энергетические потребности клетки в процессе обезвоживания также удовлетворяются за счет гликогена. В период лаг-фазы метаболизм гликогена дает энергию и, вероятно, субстрат для синтеза стеролов, необходимых в процессе роста дрожжей. Следовательно, продолжительное хранение дрожжей может привести к истощению запаса гликогена без сопутствующего образования стеролов. В результате наблюдается ухудшение физиологического состояния дрожжей, следовательно, снижение скорости роста клеток и выхода биомассы.

В отличие от гликогена роль трегалозы как резервного вещества подвергается сомнению, так как в отсутствие источников углеводного и азотного питания она не метаболизируется. Однако неоспорима ее роль в лаг-фазе роста дрожжей. При наличии в среде необходимых для размножения субстратов трегалоза исчезает из клеток за 45 мин, после чего начинает утилизироваться глюкоза.

Синтез гликогена и трегалозы активизируется при переходе культуры из логарифмической фазы в фазу замедления роста, т. е. во время снижения удельной скорости роста дрожжей.

Скорость роста можно регулировать:

- путем ограничения размножения культуры дрожжей различными компонентами питательной среды (С, N, P, S и т.п.). Чаще всего эта цель достигается снижением дозировки либо азотного, либо углеводного питания, либо того и другого одновременно. Установлено, что при одной и той же скорости роста клетки, выращенные в условиях лимита глюкозы, содержат больше резервных углеводов, чем при недостатке азота;

- путем направления энергетического обмена дрожжей. Так, для преимущественного накопления трегалозы необходима высокая степень аэробности культуры, а главное – исключение катаболической репрессии;

- путем создания определенных физико-химических условий культивирования (температуры, pH, осмотического давления). Увеличению содержания трегалозы в растущей культуре способствует повышение температуры. Можно также дифференцированно управлять синтезом гликогена и трегалозы в покоящихся дрожжах с помощью температуры. Оптимум температуры для накопления гликогена 30 °С, для трегалозы 45 °С. При такой температуре накапливается до 20% трегалозы от абсолютно сухой массы клеток.

Структурные полисахариды. Клеточная стенка, состоящая из глюкана и маннанопротеидов, является активно функционирующей органеллой. Маннанопротеиды и глюканы синтезируются разными путями. Первые синтезируются внутри клетки и по мере синтеза экскретируются и откладываются на поверхности. Глюкан, вероятно, синтезируется при участии цитоплазматической мембраны. Отмечается высокая подвижность компонентов, входящих в клеточную стенку. Так, при пересеве в свежую среду количество глюкана и маннанопротеидов сначала снижается, а затем стремительно возрастает. При этом наблюдается четкая корреляция между динамикой глюкана и резервного гликогена. Когда снижается количество глюкана, накапливается гликоген и,

наоборот, накоплению глиюкана сопутствует падение уровня глиюгена в клетках.

Во время обезвоживания снижается содержание в дрожжах глиюгена и маннана, тогда как доля трегалозы и глиюкана возрастает. Это согласуется также с представлением о том, что соотношение между маннаном и глиюканом определяет форму клетки. Если величина этого отношения меньше единицы, то клетки приобретают округлую форму, вероятно, в результате их обезвоживания.

Биосинтез аминокислот. В состав белков дрожжей входят алифатические (глицин, аланин, серин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин, цистин и метианин), ароматические (тиразин, фенилаланин) и гетероциклические (пролин, гистидин и триптофан) аминокислоты.

Аминокислоты (АК) играют большую роль в процессе синтеза биомассы, а также в биосинтезе вторичных метаболитов, в частности высших спиртов и дикетонов.

Уровень ассимилируемого азота в среде определяет:

- скорость роста дрожжей;
- выход биомассы;
- скорость утилизации сахара;
- скорость брожения.

При наличии в среде утилизируемого азота дрожжи способны синтезировать все двадцать аминокислот, из которых строятся белки. *Дрожжи утилизируют аминокислоты, ди- и трипептиды, аммиачный азот.* Нитраты, нитриты, аминокислоты белков дрожжами не ассимилируются. При этом в качестве источника азота дрожжевые клетки предпочитают использовать аминокислоты, присутствующие в питательной среде или составляющие *аминокислотный пул*. В последнем случае аминокислоты находятся в вакуолях.

Состав аминокислот и их количество в аминокислотном пуле постоянно изменяется и зависит от внешних факторов, особенно концентрации ассимилируемого азота на предыдущих стадиях культивирования. Отсутствие лимита по азоту способствует повышению концентрации АК в посевном материале. Это тормозит

приток их из внешней среды и предполагает выделение АК из клетки. Таким образом, даже при отсутствии в среде ассимилируемого азота могут происходить процессы, связанные с синтезом биомассы и вторичных метаболитов, однако эти процессы быстро завершаются. Второй причиной увеличения АК в дрожжах может быть автолиз клеток, который происходит при исчерпании экзогенного утилизируемого азота сусла. Например, увеличение содержания свободных АК в клетках связано с активацией внутриклеточных протеолитических ферментов. Обычно это происходит при попадании гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах, и образовании так называемых вторичных вакуолей, которые занимают более 2/3 объема клеток. Во избежание автолиза дрожжей питательную среду наряду с другими источниками питания необходимо дополнить утилизируемыми источниками азота в виде аминокислот и аммиачного азота.

Свободные аминокислоты, находящиеся в питательной среде, иногда не подвергаются изменениям и в небольшом количестве используются непосредственно в биосинтезе белка. Последовательность аминокислотной ассимиляции может значительно меняться от условий культивирования. Например, подъем давления приводит к снижению потребления валина, метионина, изолейцина, лейцина и гистидина. Однако большинство поступающих в клетку аминокислот подвергается действию трансаминазы, которая удаляет их аминогруппы, оставляя углеводный скелет, который метаболизируется. Основное место в системе трансаминирования у дрожжей занимает 2-оксоглутарат как акцептор аминокислот; образующийся при этом глутамат может быть использован в качестве донора аминогруппы для построения других аминокислот из остатков, образованных при протекании анаболических путей.

Биосинтез нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды участвуют в синтезе нуклеиновых кислот, они входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, аминокислот, компонентов клеточной стенки и липидов. Исходным метаболитом для их синтеза служит рибозо-5-фосфат.

Жировой обмен. Липиды дрожжей представлены триацилглицеридами, фосфолипидами и стеринами. Триацилглицериды являются предшественниками длинноцепочечных жирных кислот и глицерина. Дрожжевые липиды содержат преимущественно жирные кислоты с 16 и 18 углеродными атомами.

Жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными (с одной или двумя связями). В дрожжах преобладает содержание таких ненасыщенных аминокислот, как пальмитиновая (C 16:0) и стеариновая (C 18:0). Ненасыщенные жирные кислоты в основном представлены пальмитолеиновой (16:1), олеиновой (C 18:1) и линолевой (C 18:2) кислотами.

Фосфолипиды являются замещенными диацилглицерофосфатами, наиболее обычные заместители – холин, этаноламин, серин или инозит.

Липиды участвуют в регулировании окислительно-восстановительных процессов при дыхании клеток, входят в состав мембран всех органоидов клетки, в том числе мембран митохондрий, образуют липопротеиновый комплекс с белками, входящими в состав протоплазмы и т. д. При гидролизе одной молекулы АТФ в дрожжевой клетке может освободиться до 52 кДж.

Кроме того, липиды выполняют роль запасных веществ клеток дрожжей. Распад нейтральных липидов и фосфолипидов происходит за счет гидролитического действия липаз, в результате образуются глицерин и жирные кислоты. Глицерин далее фосфорилируется до глицеро-1-фосфата, дегидрируется до диоксиацетон-фосфата, который участвует в процессе гликолиза. Жирные кислоты подвергаются -окислению в матриксе митохондрий. Жирные кислоты с короткой углеродной цепочкой, содержащей от 4 до 10 атомов углерода (ЖКК), проникают в митохондрию. Для длинноцепочечных жирных кислот (ЖКД) внутренняя мембрана непроницаема, они переходят в матрикс в виде ацилкарнитинов, которые образуются во внутримембранном пространстве. В результате полного окисления пальмитиновой кислоты образуется 8 молекул Ац-КоА, которые далее поступают в ЦТК. Общий выход АТФ составляет 17 молекул на каждый фрагмент из двух углеродных атомов.

Преобладающие стерины – эргостерин и зимостерин, обнаружены также другие стерины и их эфиры. Все три вида липидов являются важными компонентами клеточной мембраны дрожжей. Так как клеточная мембрана контролирует проникновение в клетку питательных веществ и выделение метаболитов из клетки, её функция необходима для роста и размножения клетки. Синтез стеринов также включает участие НАДФ⁺-зависимой смешанно-функциональной оксидазы. Потребность дрожжей в молекулярном кислороде более актуальна для синтеза стеринов, чем для образования жирных кислот. Недостаточная концентрация растворенного в среде кислорода уменьшает выход биомассы и снижает их жизнеспособность, так как клетки в этом случае не могут синтезировать ненасыщенные жиры для построения клеточной мембраны.

Дрожжи могут усваивать жирные кислоты из питательной среды либо синтезировать их самостоятельно.

Исходным метаболитом в синтезе насыщенных жирных кислот является цитоплазматический Ацетил-КоА и диоксид углерода, которые под действием фермента Ацетил-КоА-карбоксилазы, содержащего простетическую группу биотин, превращаются в малонин-КоА – непосредственного предшественника 14 из 16 атомов углерода молекулы пальмитиновой кислоты. Коферментом ацетил-КоА-карбоксилазы является Mn^{+2} .

Реакция, катализируемая Ацетил-КоА-карбоксилазой, является лимитирующей стадией всего процесса синтеза жирных кислот. Биотин служит переносчиком молекулы CO_2 в двухступенчатой реакции.

Первая ступень:

$CO_2 + АТФ + Биотин-фермент \rightarrow Карбоксибиотин-фермент + АДФ + Ф$

Реакция катализируется также ионами марганца (Mn^{+2}).

Вторая ступень:

$Карбоксибиотин-фермент + Ацетил-КоА \rightarrow Малонин-КоА + Биотин-фермент$

Ацетил-КоА образуется в митохондриях либо из пирувата (реакции 1 и 2), либо при окислении жирных кислот, содержащих

в углеродной цепи от 4 до 10 атомов углерода. Эти низкомолекулярные жирные кислоты свободно проходят через мембрану митохондрий (перенос облегчается соединением их с карнитином). Исходными метаболитами в образовании Ац-КоА могут быть также аминокислоты (рис. 11).

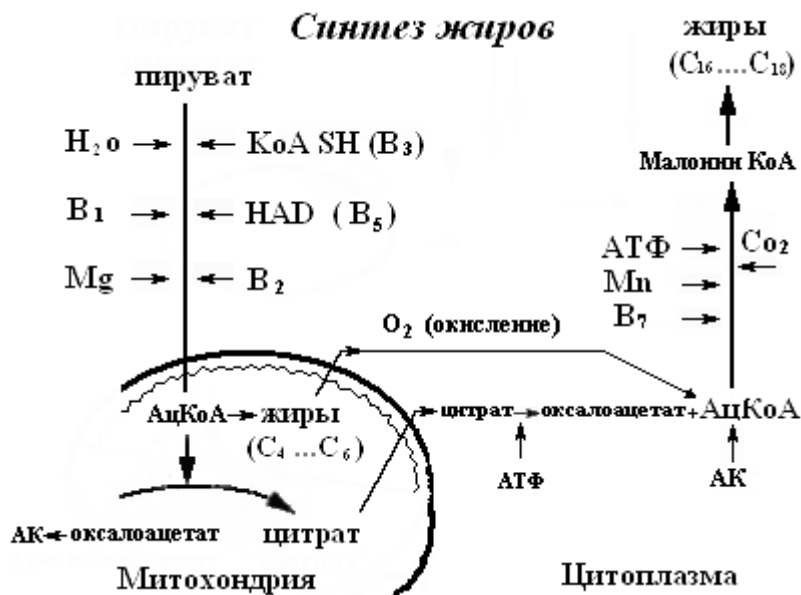


Рис. 10 Биосинтез жирных кислот

Следует обратить внимание, что синтез жиров происходит в цитоплазме. Между тем внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-КоА. Поэтому он сначала конденсируется с оксало-ацетатом с образованием цитрата, который легко проникает в цитоплазму. В цитоплазме цитрат при участии АТФ распадается под действием цитрат омыляющего фермента на оксалоацетат и исходный ацетил-КоА. Именно в этом заключается регуляторная роль цитрата в синтезе жиров.

Метаболизм жиров тесно связан с кислородом, поэтому хорошее и достаточное аэрирование питательной среды имеет решающее значение для синтеза жирных кислот. Кроме того, в среде

должно быть достаточное количество витамина В1, В3, а также ионов Mg и Mn.

При недостатке кислорода и несбалансированности питательной среды наблюдаются нарушения в процессах метаболизма клеток. Так, например, при возрастании концентрации Ацетил-КоА в дрожжах происходит накопление кетосоединений (ацетоацетата, β -оксибутирата и ацетона). Ацетил-КоА также служит донором ацетильной группы в синтезе различных эфиров. Поэтому появление запаха этих соединений свидетельствует о нарушении технологических процессов с участием дрожжей.

Ненасыщенные жирные кислоты образуются из насыщенных в ходе ферментативной реакции, в которой молекулярный кислород действует в качестве акцептора водорода. Эта реакция осуществляется оксидазой со смешанной функцией, использующей в качестве акцептора НАДФ⁺.

Если у дрожжевых клеток слишком мало длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, то способность клеточной мембраны пропускать вещества из окружающей среды сильно уменьшается, а потребление аминокислот может вообще прекратиться. В результате снижается не только выход биомассы, но и ухудшается физиологическое состояние дрожжей.

Биосинтез стерина. Синтез зимостерина тесно связан с ростом и размножением дрожжей. В аэробно выращенной дрожжевой биомассе содержится до 5 мг/г СВ. При этом следует учитывать, что с использованием 1 мг стерина может образоваться 1000 мг дрожжей в пересчете на 100% СВ.

Исходным метаболитом в синтезе стерина является ацетил-КоА, из которого образуется сначала сквален. Далее сквален в присутствии кислорода окисляется в сквален-2,3-эпоксид, который затем циклизуется в эргостерин. Синтез стерина идет при участии НАДФ⁺-зависимой смешанно-функциональной оксидазы. Потребность дрожжей в молекулярном кислороде для синтеза стерина больше, чем для образования жирных кислот. Отсутствие в питательной среде витамина В3 также отрицательно влияет на синтез эргостерина в дрожжах.

Существует связь синтеза стерина с метаболизмом гликогена. Гликоген расходуется в первые часы после внесения дрожжей в питательную среду. На каждый грамм израсходованного гликогена образуется 69 мг стерина.

1.1.4 Питание дрожжей

Жизнедеятельность дрожжей заключается в процессах питания, дыхания, роста и размножения. Одновременно с этими процессами идет синтез вторичных метаболитов, которые представляют большой интерес для пивоварения и виноделия, так как они обуславливают вкус и аромат напитков.

Источники питания, необходимые любому организму, в том числе и дрожжам, можно разделить на следующие группы:

- основные элементы: С, Н, О и N;
- элементы, требующиеся в небольших количествах (макроэлементы): Р, К, S, Mg;
- микроэлементы (Zn, Mn, Co, Ca, Fe, Cu и др.);
- витамины.

Потребность дрожжей в питательных компонентах может различаться качественно и количественно в зависимости от условий культивирования, в частности может изменяться потребность в факторах роста при изменении температуры, pH и осмоляльности среды. Известно, что при небольшом количестве посевного материала требуется более богатая среда, чем для начала роста популяции с высокой плотностью. Это связано с тем, что многие элементы и витамины могут накапливаться в клетках при их культивировании в средах с высоким содержанием элементов и затем использоваться в биосинтезе. Использование такого посевного материала приводит к снижению требований к питательной среде, в которую он вносится. Например, биосорбция ионов цинка в среде, содержащей 800 мг Zn^{+2} /л, может составлять 52,5 мг/г абсолютно сухой биомассы (АСБ), в то время как обычно дрожжи содержат всего 0,039 мг/г АСБ. В дрожжах также могут накапли-

ваться витамины. Например, содержание биотина в клетках может достигать 0,6 мкг/г АСБ.

Дрожжи потребляют только растворенные в воде компоненты. Поступление веществ в клетки осуществляется путем пассивной диффузии, облегченной диффузии при участии специальных систем переноса, состоящих из белков – переносчиков (пермеаз), и путем активного транспорта при участии специфических пермеаз и затрате энергии в виде молекул АТФ.

Химический состав питательных веществ должен соответствовать химическому составу организма.

Источники углерода. По типу питания дрожжи относятся к гетеротрофным организмам, усваивающим углерод из органических соединений.

Углерод используется для синтеза клеточных компонентов, дыхания и образования вторичных метаболитов.

Источники углерода включают моносахариды, такие, как D-глюкоза, D-манноза, D-фруктоза, D-галактоза, из пентоз – D-ксилоза. Дисахариды сахароза и мальтоза и трисахарид мальтотриоза утилизируются дрожжами, в то время как лактоза (молочный сахар) – нет.

Сахароза гидролизуется инвертазой (β -D-фрукто-фуранозидазой). Обнаружены две основные формы инвертазы, одна репрессируемая, синтез которой ингибируется глюкозой (она локализована в ППП). Вторая лишена углеводной части, расположена внутри клетки, и ее синтез протекает независимо от содержания глюкозы в среде.

Под действием инвертазы сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу, которые поступают в клетку (рис. 12). Транспорт облегчается благодаря ферменту переносчику (пермеазе), который находится в цитоплазматической мембране. Скорость переноса глюкозы в клетку при участии пермеазы в миллион раз быстрее, чем это могло бы произойти путем простой диффузии через мембрану.

Мальтоза сначала поступает в клетку при участии специфических индуцибельных пермеаз. И только в клетке происходит гидролиз этого дисахарида ферментом α -глюкозидаза (мальта-

за), который индуцируется одновременно с пермеазами и гидролизует мальтозу до глюкозы внутри клетки. По такой же схеме происходит потребление трисахарида мальтотриозы. Трисахарид раффиноза в зависимости от штаммовых особенностей дрожжей либо сбраживается полностью (штаммы пивных дрожжей низового брожения), либо на 1/3 (пекарские дрожжи и пивные дрожжи верхового брожения).

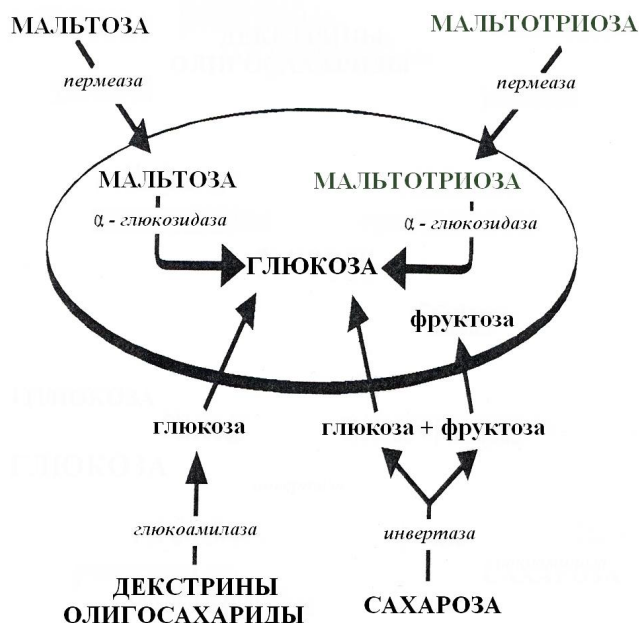


Рис. 11 Схема потребления сахаридов дрожжами *S. Cerevisiae*

Присутствующие в питательной среде глюкоза, фруктоза и сахароза используются дрожжами в первую очередь, затем потребляется мальтоза и далее мальтотриоза, олигосахариды с числом гликозидных остатков более трех и декстрины дрожжами не утилизируются (рис. 12).

Такие органические соединения, как глицерин, этанол и лактат, не сбраживаются, но в аэробных условиях ассимилируются дрожжами.

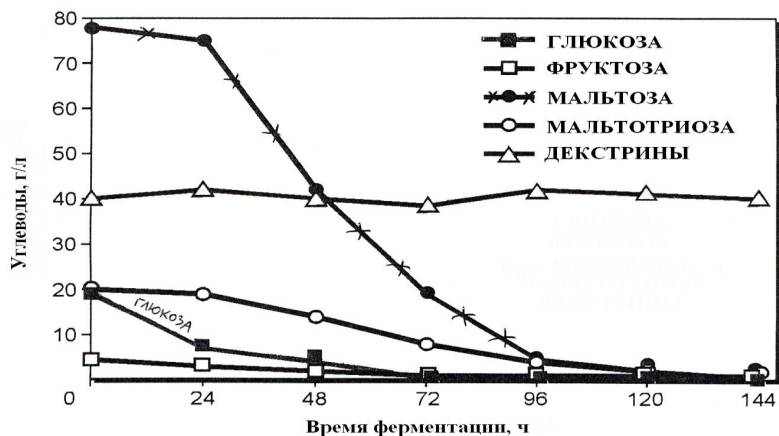


Рис. 12 Последовательность сбраживания сахаридов

Источники азота. Содержание азота в клетках может достигать 10% на СВ. Источниками азота для синтеза белка являются ионы аммония и аминокислоты. Однако рост клеток происходит быстрее, если в питательной среде содержатся аминокислоты, а не ионы аммония. Аминокислоты в процессе брожения потребляются последовательно. Это определяется свойствами и специфичностью пермеаз, локализованных в клеточной мембране дрожжей. Большинство поступающих в клетку аминокислот сначала подвергается действию трансаминаз, отщепляющих аминогруппы, при этом остается углеводный скелет, который далее метаболизируется.

Дрожжи не могут ассимилировать азот из органических соединений (кроме мочевины), нитратов и нитритов.

В дрожжевой промышленности и в виноделии в качестве источника азотного питания используют сульфат аммония (ГОСТ 10873-73), диаммонийфосфат марок А и Б (ГОСТ 8515-75) и раствор аммиака (ГОСТ 9-77). Очень редко в качестве источника азотного питания используется мочевина (ГОСТ 2081-75).

Минеральные компоненты. Активность некоторых ферментов может зависеть только от структуры самого белка, для других требуется также присутствие определенных групп небелко-

вой природы – **кофакторов**. В роли кофакторов могут выступать ионы металлов или сложные органические соединения, называемые **коферментами**. Иногда для проявления активности фермента необходимо присутствие как тех, так и других.

Ниже приведены сведения о некоторых ферментах, коферментами в которых являются ионы металлов:

Zn^{+2} – кофермент алкогольдегидрогеназы, карбоксипептидазы;

Mg^{+2} – кофермент пируватфосфокиназы, фосфогидролазы и фосфотрансферазы;

Mn^{+2} – кофермент фосфотрансферазы;

Fe^{+2} и Fe^{+3} – коферменты каталазы, пероксидазы и цитохромов;

Cu^{+2} и Cu^{+} – коферменты тирозиназы и цитохромоксидазы;

K^{+} – кофермент пируватфосфокиназы;

Na^{+} – кофермент плазматической АТФ-азы.

К макроэлементам относятся фосфор, калий, магний, натрий и сера.

Потребность дрожжей в фосфоре. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, АТФ, фосфолипидов, полимеров клеточной стенки, в мембраны органоидов клеток. Он способствует поддержанию буферности, препятствующей сдвигу рН в цитоплазме клеток. Нехватка фосфора проявляется в замедлении скорости брожения и роста клеток.

Количество P_2O_5 в клетках определяется условиями культивирования, содержанием солей фосфора в среде и может достигать 5,5% от СВ дрожжей.

Потребность дрожжей в калии. В хлебопекарных дрожжах содержание калия в пересчете на K_2O в пределах от 1,4 до 4,3% от АСБ, в пивных дрожжах – в среднем 2,4% от СВ. Калий активирует около 40 различных ферментов, в том числе оксидазы и дегидрогеназы. Ионы калия выполняют роль не только коферментов, но также входят в состав некоторых структур клетки, в частности, рибосом. Калий также участвует в регуляции транспорта ионов через клеточную стенку и через митохондриальную мембрану. В связи с увеличением скорости роста дрожжей потребность в калии увеличивается.

Ионы K^+ определяют транспорт в клетки ортофосфата, играющего большую роль в энергетическом обмене дрожжей. Скорость этого процесса зависит как от вида микроорганизма, так и от условий культивирования. При энергетическом обмене, стимулируемом глюкозой, экзогенный калий поступает в клетку одновременно с фосфатом, при этом происходит отток ионов H^+ из дрожжей. Этот процесс является энергозависимым и происходит при участии фермента АТФ-азы.

Следует обратить внимание на обмен ионов K^+ и H^+ через ми-тохондриальную мембрану. В данном случае, помимо K^+ , в этом обмене участвуют также ионы Na^+ и ионы двухвалентных металлов Ca^{+2} , Mn^{+2} и Sr^{+2} . Переход этих ионов в митохондрию сопровождается выбросом эквивалентного количества H^+ .

Для дрожжей экономический коэффициент по калию равен 54. Это означает, что 1 г элемента входит в состав 54 г АСБ.

Потребность дрожжей в магнии. Магний необходим как для энергетического, так и конструктивного обмена дрожжей, так как он является кофактором многих ферментов. Он стимулирует утилизацию мальтозы и мальтотриозы.

Экономический коэффициент в расчете на ионы потребленного магния составляет 540 г сухой биомассы на 1 г магния и обратно пропорционален количеству РНК в биомассе.

При составлении питательных сред следует учесть следующее соотношение между макроэлементами в пересчете на их оксиды: $MgO: K_2O: P_2O_5$, которое равняется 1:10:20.

Потребность дрожжей в сере. Сера необходима, главным образом, для синтеза серосодержащих аминокислот цистеина и метионина. Кроме того, небольшое количество серы требуется для образования сульфогрупп в некоторых коферментах, таких как биотин, кофермент А, липоевая кислота, тиамин и пиридоксин.

Было установлено, что в дрожжах при недостатке этого компонента в среде культивирования наблюдается снижение дыхательной активности клеток, как и при ингибировании роста дрожжей недостатком железа. Сера усваивается дрожжами из неорганических сульфатов, из серосодержащих аминокислот. Эко-

номический коэффициент в расчете на ионы SO_4^{2-} для пекарских дрожжей составляет 100 г сухой биомассы на 1 г.

Микроэлементы участвуют в метаболизме дрожжей и влияют на их химический состав, рост и размножение.

К микроэлементам, которые в первую очередь необходимы для роста дрожжей, относятся Zn, Cu, Ca, Mn, Fe, Co.

Элементы, редко требуемые для роста: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, I.

Микроэлементы могут накапливаться в клетках при культивировании их в среде с высокой концентрацией элементов. Так, биосорбция цинка в среде, содержащей 0,8 мг Zn^{2+} /мл, составляет 52,5 мг/г СВ.

Цинк входит в состав около 70 ферментов дрожжей. Он является кофактором ферментов клеточной стенки, стимулирует дыхательный метаболизм дрожжей, биосинтез белка, обмен нуклеиновых кислот, углеводов, вследствие этого он влияет на рост и размножение клеток. Ввиду участия цинка в высвобождении глюкозы (в виде гл-1-Ф) из гликогена увеличивается стрессоустойчивость дрожжей при их внесении в плотные питательные среды, в результате чего сокращается длительность лаг-фазы роста клеток.

Содержание ионов цинка в клетках должно быть на уровне 6 мг/100 г. Ввиду того что цинк может аккумулироваться в клетках, дополнительное внесение этого элемента на этапе получения посевного материала гарантирует хорошие результаты при последующем размножении дрожжей в бедных питательных средах.

Расчет дополнительного внесения цинка можно сделать исходя из того, что экономический коэффициент для него составляет приблизительно 20 мг/г АСБ дрожжей, или для прироста 100 г АСБ требуется 0,005 г цинка.

Медь является коферментом оксидаз и влияет на дыхательный метаболизм дрожжей. Коферментами пептидаз могут являться ионы меди или ионы цинка.

Экономический коэффициент прироста биомассы в расчете на медь составляет 100 кг АСБ/г, т. е. для прироста 100 г АСБ требуется 0,001 г меди.

Марганец активизирует целый ряд ферментов: декарбоксилазы, дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, пептидазы, киназу. Вместе с железом, цинком и молибденом ионы марганца могут нивелировать вредное действие меди. Этот микроэлемент стимулирует процесс брожения даже в том случае, когда в сусле содержится недостаточное количество ионов цинка. Для биосинтеза 100 г АСБ требуется 0,005 г Mn^{+2} .

Факторы роста дрожжей. Помимо элементов минерального питания, источников углерода и кислорода дрожжи нуждаются в некоторых дополнительных веществах, называемых факторами роста, или ростовыми веществами.

Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофными. Им противопоставляют организмы, которые не зависят от факторов роста, – это прототрофы.

К факторам роста относятся такие соединения, как аминокислоты, пурины и пиримидины, а также витамины. Аминокислоты, пурины и пиримидины – составные части белков и нуклеиновых кислот; витамины входят в состав коферментов, как правило, это простетические группы фермента, т.е. коферменты, прочно связанные с ферментом.

В состав коферментов дрожжей входят многие витамины группы В, а также не относящаяся к витаминам липоевая кислота.

Витамины по растворимости можно объединить в две группы – водорастворимые и жирорастворимые. Водорастворимые: В1, В2, В3, В5, В7, В8, В9, В12, С; жирорастворимые: А, D, Е, К.

Витамин В8 (инозит, или мезоинозит, для дрожжей) не относится к витаминам, хотя его роль и очень велика в росте и размножении клеток.

В метаболизме дрожжей не участвуют витамины С и В12, дрожжи также не нуждаются в жирорастворимых витаминах. Рост в отсутствие витаминов указывает на тот факт, что витамины синтезируются самими клетками.

Витамины. Аэробный метаболизм дрожжей, при котором имеет место максимальное накопление биомассы и отсутствие синтеза этилового спирта, не может протекать в отсутствие или недостатке таких витаминов, как В1, В2, В7 и В8. Эти же витами-

ны необходимы дрожжам в условиях брожения, когда часть глюкозы идет на синтез биомассы, а другая часть – на образование спирта и других продуктов брожения.

Тиамин (В1) входит в состав пируватдекарбоксилазы и играет положительную роль в процессах, связанных с образованием спирта. Вместе с тем этот витамин необходим в аэробном метаболизме дрожжей. Это связано с тем, что он входит в состав пируваткарбоксилазного комплекса, который контролирует синтез ацетил-S-КоА, исходного компонента дыхательного метаболизма дрожжей. Кроме того, тиамин необходим для работы ЦТК, он является одним из факторов, способствующих замыканию этого цикла, т.е. превращения 2-оксоглутарата в сукцинат, благодаря чему возможен аэробный обмен у дрожжей и высокий выход энергии, необходимой для синтеза биомассы.

Пантотеновая кислота (В3) входит в состав Ко-А-SH (кофермента ацелирования). Этот кофермент участвует во многих ферментативных реакциях, в которые вовлечены не только ацетильные, но и любые другие ацильные группы, при этом Ко-А-SH выполняет функции промежуточного переносчика ацильных групп. Большинство штаммов пекарских, винных и пивных дрожжей являются ауксотрофами по витамину В3.

Прежде всего следует остановиться на двух практически необратимых, выполняющих регуляторную функцию, реакциях, в которых участвует КоА-SH.

Первая реакция. Реакция декарбоксилирования пирувата с образованием ацетил-S-КоА, который является исходным рядом с оксалоацетатом и субстратом в цепи реакций ЦТК. Этот процесс идет под контролем сложной полиферментной системы, носящей название пируватдегидрогеназный комплекс, который содержит пируватдегидрогеназу с простетической группой – тиаминпироглутаматом и коферментом – Mg^{+2} ; дигидролипоилтрансацилаза с простетической группой – липоевая кислота и дигидролипоилтрансацилаза, которая содержит флавиновый кофермент. Кроме того, в этой реакции участвует НАД. Таким образом, для осуществления этой реакции необходимы витамины В1, В2, В3 и В5, а также Mg^{+2} . Активатором является кислород, т.е. недостаток

кислорода приводит к образованию неактивной формы фермента.

Вторая реакция. Это декарбоксилирование 2-оксоглутарата с образованием сукцинил-S-КоА, замыкающая ЦТК в условиях аэробноза. Этот процесс проходит при участии полиферментной системы 2-оксоглутаратдегидрогеназы, которая по составу входящих в него коферментов и простетических групп напоминает пируватдегидрогеназный комплекс.

Система состоит из трех ферментов: α -кетоглутарат-декарбоксилазы дигидролипоилтрансацилазы и дигидролипоилде-гидрогеназы.

В этой реакции так же, как и в первой, помимо ферментных белков участвуют тиаминпирофосфат, липоевая кислота, флаavin, КоА-SH, Mg^{+2} и НАД.

Участие витамина В3 в биосинтезе жиров связано с ацетил-КоА. Ацетил-КоА является исходным соединением для синтеза жирных кислот и, следовательно, жиров. Особенно важны непредельные жирные кислоты, которые входят в состав всех мембран органоидов клетки, следовательно, они определяют интенсивность процесса роста и размножения дрожжей.

Для синтеза жиров из ацетил-КоА необходим также глицерофасфат, образующийся в процессе метаболизма сахаров. Кроме того, ацетил-КоА участвует в образовании стероидов.

В синтезе непредельных жиров также необходимы витамин В7 и ионы марганца Mn^{+2} .

Следует отметить, что отсутствие в питательной среде витамина В3 отрицательно влияет на синтез эргостерина в дрожжах, который используется для получения витамина D.

В производственных питательных средах содержание пантотеновой кислоты не всегда достаточно для синтеза биомассы, особенно это касается солодового сула.

Биотин. Практически все штаммы пекарских, винных и пивных дрожжей являются абсолютными ауксотрофами по биотину, т. е. неспособны расти и размножаться в его отсутствие.

Биотин входит в состав шести карбоксилаз. Он играет роль переносчика карбоксильных ($-COO-$) групп во многих реакциях ферментативного карбоксилирования, протекающих с участием АТФ.

Наибольший интерес с точки зрения регулирования обмена в дрожжах представляют пируваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза.

Биотин является активным компонентом биоцитина – простетической группы пируваткарбоксилазы – фермента, катализирующего реакцию превращения пирувата в оксалоацетат. Помимо биотина для протекания этой реакции необходим Zn^{+2} , который является коферментом. Это наиболее важная реакция, которая обеспечивает работу ЦТК, она носит название анаплеротической (возмещающей).

Пируваткарбоксилаза – аллостерический фермент. Скорость катализируемой ею реакции образования оксалоацетата в отсутствие ацетил-КоА очень низка, когда же ацетил-КоА имеется в избытке, стимулируется синтез оксалоацетата. Поэтому при дефиците биотина наиболее уязвим именно этот участок метаболизма, однако это не влияет на скорость гликолиза. В результате в клетках накапливается пируват, который частично выделяется в среду даже при наличии достаточного количества растворенного в среде O_2 . Если же концентрация растворенного кислорода невелика, идет образование спирта.

Пируваткарбоксилаза участвует и в другом процессе – образовании фосфоенолпирувата. В этом случае она действует в комплексе с другими ферментами, в частности с карбоксикиназой. Карбоксикиназная активность зависит от многих причин, в том числе от содержания сахарозы в среде: чем выше ее концентрация, тем ниже активность фермента.

Биотин играет большую роль в синтезе длинноцепочечных жирных кислот, входящих в клеточные мембраны. Исходным метаболитом в синтезе жирных кислот являются цитоплазматический Ац-КоА и диоксид углерода, которые под действием ацетил-КоА-карбоксилазы, содержащей в качестве простетической группы биотин, превращаются в малонин-КоА – непосредственного предшественника 14 из 16 атомов углерода молекулы пальмитиновой кислоты.

Таким образом, недостаток биотина в среде культивирования влечет за собой нарушение всех видов обмена – белкового, жирового, углеводного, а также синтеза нуклеиновых кислот.

Нарушение синтеза жирных кислот приводит к увеличению проницаемости клеток и выходу жизненно важных метаболитов в среду культивирования. Также меняется химический состав запасных веществ дрожжевой клетки: вместо гранул гликогена откладываются гранулы низкомолекулярных липидов из короткоцепочечных жирных кислот. В результате снижаются интенсивность размножения дрожжей и выход биомассы.

Обычно для возмещения недостатка биотина в сложные питательные среды, такие как меласса и солодовое сусло, этот витамин вносят из расчета 0,25 мг на прирост 1 кг дрожжей с массовой долей сухих веществ 25%. При этом следует иметь в виду, что дрожжи обладают способностью накапливать внутриклеточные запасы биотина, однако в ферментах количество связанного биотина всегда постоянно. В связи с этим имеющийся резерв витамина может быть использован дрожжами на следующих стадиях культивирования.

Избыток биотина также нежелателен, так как при этом наблюдается замедление его транспорта в клетку, поэтому при количественном расчете биотина на осуществление процесса культивирования следует учитывать его содержание в среде и в самих дрожжах.

Инозит (В8.) Для дрожжей только один из изомеров – мезоинозит (миоинозит) – является фактором роста. Содержание этого витамина в дрожжах может колебаться в пределах от 200 до 500 мг/100 г АСБ. Установлено, что мезоинозит играет важную роль в жировом обмене сахаромикетов, в частности, клеточные мембраны дрожжей содержат до 20% фосфотидилинозита – фосфолипида, в состав которого входит инозит. При его недостатке нарушается синтез фосфолипидов, а также РНК белка, и происходят изменения в структуре клеточных мембран (они становятся более хрупкими), при этом увеличивается содержание низкомолекулярных липидов в клетках. При недостатке В8 в клетках содержание жиров может достичь 4,5%, в то время как в обычных условиях – 1,6%. Все это приводит к снижению интенсивности размножения клеток, нарушению обмена, задержке цитокинеза (почки не отделяются от материнских клеток), в результате падает выход биомассы и снижается их бродильная активность.

Содержание этого витамина в производственных средах достаточно велико, поэтому он не является лимитирующим рост дрожжей фактором.

1.1.5 Стимуляторы жизненной активности дрожжей дрожжей

Стимуляторы жизненной активности дрожжей условно подразделяются на физические, биологические и химические. Общим для них является характер наблюдаемых эффектов: увеличение концентрации биомассы или синтеза вторичных метаболитов при использовании стимуляторов в малых дозах.

Физические стимуляторы роста микроорганизмов. В настоящее время в микробиологии используют ряд факторов физической природы, оказывающие влияние на репродуктивные и метаболические функции. Это прежде всего температура, давление, ультразвук, электрический ток, электрические и магнитные поля, различное физическое состояние воды в питательных средах, малые дозы радиации.

Наиболее изученным фактором является температура. Значительно реже для ускорения процессов биосинтеза используют давление.

Как правило, позитивный эффект от факторов физического характера наблюдается либо после кратковременного воздействия на микробные клетки, либо после их воздействия в умеренных дозах. Так, под влиянием ультразвука (УЗ) средней интенсивности накопление биомассы и скорость размножения дрожжей рода *Saccharomyces* заметно повышается. Подобная обработка культуральной жидкости сопровождалась заметным повышением бродительных свойств хлебопекарных дрожжей и увеличением выхода конечного продукта.

Достаточно глубоко изучено действие электрического тока на рост и размножение микроорганизмов. Выявлены зависимости между силой тока и скоростью размножения, электропроводимостью среды культивирования и воздействующим напряжением.

Стимулирующим действием обладает также импульсное электрическое поле. Причем и здесь параметры ростовых эффектов полностью зависят от вида микроорганизмов и условий их культивирования. Активно воздействует на рост и размножение клеток магнитное поле различной мощности. При этом биохимическая активность микроорганизмов зависит от величины и направленности потока.

Привлекает внимание исследователей и электромагнитное поле, также способствующее ускоренному росту микроорганизмов и изменению их ферментативной активности. Так, после обработки дрожжей в поле СВЧ их бродильная активность возросла в 6,6 раз. В то же время увеличение диапазона электромагнитного поля губительно влияет на микроорганизмы.

Имеются сведения о стимулирующем влиянии УФ излучения, которое, по мнению некоторых авторов, ускоряет биосинтетические процессы. Однако следует иметь в виду, что УФ лучи оказывают и мутагенное действие на микроорганизмы.

Стимулируют рост микроорганизмов и малые дозы радиации. Эксперименты на вирусах, бактериях, водорослях и грибах показали стимулирующую роль облучения, которое выражалось в ускорении митоза, сокращении времени генерации и увеличении биомассы.

Биологические стимуляторы роста микроорганизмов.

Стимуляторы роста биологической природы, как правило, являются сложными соединениями с широким спектром действия. К ним относятся вещества, содержащиеся в растительных и животных экстрактах, а также в автолизатах микроорганизмов. Природа их воздействия на микроорганизмы во многом остается неизвестной. Доказано, что лишь в некоторых из них стимулирующая активность обусловлена одним из факторов – либо содержанием витаминов, либо низкомолекулярными соединениями небелковой природы. Хорошими стимуляторами роста являются экзогенные нуклеазы. Имеются также сведения о стимулирующем эффекте различных отходов сельскохозяйственного, пищевого, микробиологического и других производств. С этой точки зрения интересны разработки по использованию отходов пивоваренного

производства: белкового отстоя, который подвергают гидролизу серной кислотой, вытяжки из ростков ячменя, автолизатов остаточных пивных дрожжей.

В качестве стимулятора роста дрожжей может применяться отход производства белка из соевого шрота.

Химические стимуляторы роста микроорганизмов. Среди стимуляторов химической природы можно выделить:

- предшественников синтеза макромолекул и вторичных метаболитов;
- химические соединения, не являющиеся метаболитами, но способные стимулировать синтетическую и репродуктивную активность клеток.

К первой группе относятся некоторые аминокислоты. Стимулируют рост и синтез ферментов гистидин, глутаминовая кислота, цистин, аланин и другие.

Ко второй группе можно отнести гиббереллины и ауксины. Стимулирующий эффект гиббереллинов наблюдается не только в растениях, но и в микроорганизмах. Так, в концентрации 0,01% они стимулируют выход кормовых дрожжей и сокращают время накопления биомассы на 17-27% в зависимости от состава среды. Эффект гиббереллина зависит от концентрации соединения и величины засева, причем зависимость эта носит обратно пропорциональный характер.

Индолилуксусная кислота (ИУК), или гетероауксин, образуется в результате жизнедеятельности дрожжей, грибов и бактерий. Ранее ИУК использовали только в сельском хозяйстве. Сейчас установлено стимулирующее влияние ИУК на целый ряд микроорганизмов, в том числе на сахаромикеты. Механизм действия ИУК пока не выяснен, доказано только, что кислота связывается с ДНК и РНК, причем количество связанного материала зависит от скорости роста клеток.

Для повышения скорости роста и выхода дрожжевых культур, в частности сахаромикетов, используют карнитин, либо его производные. Это соединение является переносчиком ацетильных групп из цитоплазмы в митохондрии и в то же время способствует синтезу соединений, являющихся предшественниками в образовании биотина.

Высокой стимулирующей активностью обладает *p*-аминобензойная кислота (ПАБК). Это соединение является предшественником тетрагидрофолиевой кислоты, которая служит кофактором, участвующим в переносе одноуглеродных единиц, и является предшественником цитохромов.

С начала 70-х годов интенсивно изучается влияние на микроорганизмы поверхностно-активных соединений (ПАВ), способных оказывать воздействие на энергетический обмен клеток через изменение мембранного механизма проницаемости, что в конечном счете приводит к стимулирующей рост активности.

Повышения выхода биомассы можно добиться путем применения водорастворимых каротиноидов, в частности, кроцетина или кроцина. Предполагается, что действие этих химических стимуляторов роста, являющихся активными переносчиками кислорода, обусловлено их участием в окислительно-восстановительных процессах.

Химические и биологические стимуляторы применяются более широко, чем физическое воздействие на клетки.

Одним из широко используемых средств изменения физиологических и технологических свойств дрожжей в практике пивоварения, спиртовой, хлебопекарной, дрожжевой промышленности является применение так называемого «питания для дрожжей». Краткая характеристика некоторых препаратов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика добавок – «питания для дрожжей»

Наименование препарата/ Производитель	Состав препарата
Сульфат цинка / Великобритания	98,5% гепагидрата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
Родия зумесит / Великобритания	Смесь фосфата диаммония и метабисульфита калия
Истекс / США	Смесь фосфата диаммония, сульфатов марганца и цинка

Тиамин / Институт Энологии, Франция	Витамин В1
Истфилд / Румыния	Смесь неорганических веществ (фосфата диаммония, метабисульфита калия, сульфатов марганца и цинка), аминокислот (аланина, лейцина, серина), дисперганта
Алкотен / Великобритания	Смесь аминокислот и витаминов группы В
Витамон Комби / Германия	Фосфат диаммония и тиамин
Иноферм / Институт Энологии, Франция	Сульфат аммония и тиамин
Витамон Ультра / Германия	Смесь автолизата дрожжей, фосфата диаммония и тиамина
Хай-Вит / Германия	Смесь неорганических веществ (фосфата диаммония, сульфатов марганца и цинка), витаминов группы В, аминокислот и пептона
Ист-Вит / Великобритания	Смесь неорганических веществ, микроэлементов (цинка, марганца, калия, магния, йода), витаминов (В1, В2, В6, Н), миоинозита, производных витаминов РР и В5, аминокислот
Истлайф экстра / Великобритания	Смесь пептонов, 13 аминокислот, минералов и 7 витаминов
Помощь для дрожжей / Великобритания	Экстракт автолизированных дрожжей с цинком и медью
Фермивит В / Франция	Инактивированные дрожжи, целлюлоза и инертные оболочки
Экстра Хидер / Великобритания	Смесь неорганических солей, витаминов и микроэлементов в сочетании с пропиленгликольальгинатом
Витамон СЕ / Германия	Фосфат диаммония, витамин В1, клеточные стенки дрожжей, целлюлоза
ВитаФерм Ультра Ф3 / Германия	Дезактивированные дрожжи, фосфат диаммония, витамин В1

Препараты способствуют стимулированию размножения и роста дрожжей, повышению их активности, улучшению транспорта питательных веществ и др. За счет сбалансированной подачи минеральных компонентов происходит активация ферментов дрожжей. Присутствие в некоторых препаратах дрожжевых оболочек или волокон целлюлозы улучшает массообмен между клеткой и питательной средой, способствует адсорбции токсичных для дрожжей веществ.

Наряду с подкормками, выпускаемыми в промышленных масштабах, предлагается использование и других стимуляторов и активаторов метаболизма дрожжей.

Источником ростовых веществ и биостимуляторов для дрожжей является в большинстве случаев сырье растительного, реже животного, происхождения, включая гидробионты (в частности, морские водоросли). Помимо исходного сырья как такового, часто используются отходы (или продукты их переработки) различных отраслей промышленности: солодовенной (вытяжка

из солодовых ростков), пивоваренной (пивная дробина, избыточные пивные дрожжи и получаемые из них препараты – гидролизаты, ферментоллизаты,

автолизаты, плазмоллизаты и т. п.), спиртовой (послеспиртовая барда, гидролизная барда, остаточные дрожжи), крахмало-паточной (кукурузный экстракт, картофельный сок), консервной (капустный и морковный отвары, выжимки яблок, шиповника, арбуза и т. п.), винодельческой (семена, кожица винограда), молочной (сыворотка творожная или подсырная), чайной (экстракты из отходов чая), птицеперерабатывающей (мясо-перьевая мука), продукты и отходы пантового оленеводства, сельского хозяйства (экстракт из фасоли, гидролизат пшеничной соломы и отрубей и т. п.) и др.

Обеспечивают термо- и осморезистентность, а также развитие защитных реакций (преадаптацию) на стресс, интенсификацию клеточного обмена дрожжей применение химических аналогов микробных ауторегуляторов С7-АОБ, С12-АОБ, относящихся к алкилоксибензолам. С этой же целью другие исследователи применяют перекись водорода, внеклеточную щелочную РНКазу (бактериальную или панкреатическую).

Олигосахарид пизамин, являющийся природным антивитамином пантотеновой кислоты, способствует увеличению синтеза биологически активных веществ, в том числе и глутатиона, стимулирующих рост культуры с сокращением лаг-фазы и инактивирующих антивитамины.

В качестве дополнительного источника в первую очередь минеральных веществ разные исследователи предлагают использовать как природное сырье – цеолитсодержащие туфы и глинистые минералы (самостоятельно или совместно с другими стимуляторами), кремнистые породы (песок бархана Сарыкум), геотермальную минеральную воду нефенольного класса, так и химические соединения – в виде солей (сульфатов аммония, цинка, железа, селена, хлорида калия, фосфата диаммония, наночастиц меди, цинка, железа) или металлоорганических комплексов (аквакомплексов: цинка с глутаминовой кислотой, магния с аспарагиновой кислотой, марганца с метионином, кальция с фосфатом; селеноцистеина).

Широкое применение находят органические кислоты, особенно янтарная кислота, являющаяся природным метаболитом живых организмов, повышающим энергетические и антиоксидантные возможности клетки.

В качестве активных антиоксидантов (ингибиторов свободно-радикального окисления) фенольной природы, обладающих ростостимулирующим действием, предлагается использовать фенозанкислоту и ее соли (натриевую, калиевую) или источники полифенольных соединений – экстракты аралии, облепихи.

Создание благоприятных условий для жизнедеятельности дрожжевой культуры возможно и на основе эффективного подавления посторонней для данного производства микрофлоры, в частности, добавлением в сусло-дрожжевую суспензию коллоидного раствора наночастиц серебра.

Изменение состава питательной среды может идти не только обогащением какими-либо добавками непосредственно перед проведением ферментации, но и другими приемами, причем на более ранних стадиях технологического процесса: частичной или полной заменой основного исходного сырья на нетрадиционное

для данного производства (использование амаранта, топинамбура), обработкой сырья механическим или биохимическим способами.

Изменение физиологических, биохимических, технологических свойств дрожжей может идти по такому направлению, как включение непосредственно в микробную клетку каких-то химических элементов (цинка, меди, йода, селена).

Применение добавок способствует: улучшению физиологических показателей дрожжевой культуры (количество клеток почкующихся, нежизнеспособных, с запасом резервных веществ), ее технологических свойств (бродильной активности, флокуляционной способности, скорости сбраживания); повышению ферментативной активности клеток; перестройке направленности обмена веществ клеток (с конструктивного на энергетический и наоборот, аэробного на анаэробный); адаптации дрожжевой популяции к неблагоприятным или стрессовым факторам среды; интенсификации процессов брожения (потребление сахаров, образование спирта, сокращение длительности стадии); изменению показателей готовой продукции (количественного и качественного состава вкусоароматических веществ, уровня безопасности).

1.1.6 Влияние физико-химических факторов внешней среды на энергетический метаболизм дрожжей и синтез клеточных компонентов

Температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы, на уровень РНК, белка, липидный и углеводный состав клеток, например, при одной и той же скорости роста содержание РНК в дрожжах при снижении температуры увеличивается в несколько раз. В зависимости от температуры также колеблется содержание белка в дрожжах. Эти изменения обусловлены природой лимитирующего субстрата. При повышении температуры снижается содержание ненасыщенных жирных кислот (ННЖК). Поэтому при переходе на новые технологии перед началом процесса главного

«теплого» брожения возникла необходимость изменения технологии получения ЧК и аэрирования сусла.

Изменение температуры роста может оказать влияние на условие превращения глюкозы, т. е. на химический состав культуральной жидкости. Отмечалось, что с уменьшением температуры снижается экономический коэффициент, рассчитанный по магнию, калию и фосфатам, что объясняется увеличением содержанием РНК в биомассе. Изменение температуры часто сопровождается изменениями потребности микроорганизмов в факторах роста, которые являются, как правило, активной частью ферментов.

Установлено, что для *S. cerevisiae* при температуре 38 °С потребность клеток в пантотеновой кислоте значительно превышает потребность дрожжей в этом витамине, чем при температуре 30° С.

Температура влияет также на синтез вторичных метаболитов, что особенно важно в пивоварении и виноделии, причем этот процесс может отличаться от влияния температуры на рост и размножение дрожжей.

Скорость химических реакций связана с температурой, что отражено в уравнении Аррениуса, которое после логарифмирования имеет следующий вид:

$$\ln K = \ln A - E/RT,$$

где K – скорость реакции; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура; A – константа, зависящая от частоты образования активированных комплексов реагирующих соединений; E – константа, называемая энергией активации.

Ввиду того что скорость протекания реакций в дрожжевой клетке прежде всего отражается на удельной скорости их роста, а величины A , E и R постоянные, можно считать, что $\ln \mu = f(1/T)$. Очень важным является показатель энергии активации, значение которого постоянно в пределах оптимальной температуры роста для каждого вида микроорганизма, но увеличивается при переходе к низким и высоким температурам. Показано, что температурный диапазон роста грибов, к которым относятся и дрожжи, составит около 30 °С.

Как и температура, *величина рН* оказывает влияние на метаболизм дрожжей, что отражается на выходе биомассы, скорости роста клеток и синтезе вторичных метаболитов. Значение рН влияет на природу конечного продукта сбраживания сахаров: при кислых значениях рН образуется этиловый спирт, при щелочных – глицерин и уксусная кислота. При оксидативном метаболизме, также как и при гликолизе, на среде с сахарозой оптимальным значением рН можно считать то, которое способствует проявлению максимальной активности фруктофуранозидазы 4,6. В солодовом сусле эта величина должна соответствовать значению рН для ферментов пермеаз, осуществляющих перенос мальтозы и мальтотриозы в клетку.

Величина рН влияет на диссоциацию кислот и оснований, следовательно, она оказывает влияние на перенос питательных веществ внутрь клетки, а также на степень токсичности ингибиторов роста. Недиссоциированные вещества, например, органические кислоты, обладают более высокой растворимостью в липидах, чем ионизированные формы, и поэтому снижение рН способствует большему проникновению кислот в клетку. Следовательно, увеличение содержания летучих кислот, которые являются показателем качества мелассы, отрицательно сказывается на интенсивности размножения дрожжей. Величина рН также может воздействовать на конформацию молекул ферментов и изменять как первичный, так и вторичный метаболизм дрожжей.

Показатель концентрации водородных ионов может существенно изменяться в процессе культивирования, что определяется буферностью питательных сред: она максимальна для мелассного сусла стандартного качества, затем идет солодовое сусло, очень сложно поддерживать уровень рН при культивировании на синтетической среде. Снижение рН и увеличение титруемой кислотности наиболее интенсивно происходит при аэробном культивировании дрожжей. Для того чтобы этого избежать, необходимо в процессе культивирования дозировать вещества, которые могут стабилизировать уровень изменения рН в желаемых границах. Обычно для этой цели при производстве хлебопекарных дрожжей используется аммиачная вода (раствор NH_4OH) и ортофосфорная кислота, а при производстве пива – молочная кислота.

1.2 Расы и штаммы дрожжей, применяемые при производстве хлебобулочных изделий

Расой или штаммом называют отдельные разновидности микроорганизмов в пределах одного и того же вида, различающиеся между собой второстепенными признаками. При этом расы имеют стойкие второстепенные признаки, а штаммы нестойки и могут быть утрачены при росте на новой среде. Производственные культуры дрожжей должны обладать высокой удельной скоростью роста и высокой активностью ферментов, что особенно важно при многофазных технологических режимах приготовления хлеба, предусматривающих длительное приготовление полуфабрикатов. Однако используемые расы и штаммы дрожжей отвечают этим требованиям в неодинаковой степени. Показателями активности ферментов хлебопекарных дрожжей является *зимазная и мальтазная активность*. Методика определения ферментной активности дрожжей основана на учете времени, в течение которого суспензия дрожжей выделяет заданное количество диоксида углерода из соответствующего раствора сахара – глюкозы или мальтозы. Количественным критерием активности мальтазы, или зимазного комплекса, служит время в минутах. Суммарная сбраживающая способность дрожжей определяется их *подъемной силой*.

Штаммы дрожжей, применяемых в хлебопекарном производстве:

- раса Томская 7 характеризуется устойчивостью к составу мелассных сред, требовательностью к ростовым веществам, в частности к витаминам. Прессованные дрожжи, полученные на этой расе, обладают стойкостью при хранении, высокой – фруктофуранозидазной активностью, но слабой α -глюкозидазной активностью (мальтазная активность более 160 мин};

- раса Одесская характеризуется высокой генеративной активностью. Дрожжи, устойчивы к высушиванию, в прессованном виде стойки при хранении. Мальтазная активность составляет 95 мин, зимазная – 45 мин. Культура требовательна к составу питательных сред, особенно к ростовым веществам. Благодаря высо-

кой урожайности и ферментативной активности она нашла широкое распространение в промышленности и служит основой для селекции новых штаммов;

- штамм Л-441 характеризуется высокой продуктивностью, сбрасывает раффинозу, устойчив к вредным примесям и патогенным микроорганизмам, имеет высокую удельную скорость роста и обеспечивает получение товарных хлебопекарных дрожжей с высокими показателями качества: подъемная сила – 44-45 мин, мальтазная активность – 92-95 мин, стойкость при температуре 35°C – свыше 96 ч;

- штамм Я-1 обладает высокой генеративной активностью и устойчивостью к повышенной температуре выращивания (37–38° С), что очень важно для заводов, находящихся в южных районах страны. Зимазная активность – 32-44 мин;

- раса Киевская не требовательна к ростовым веществам, хорошо переносит высушивание, обладает хорошей зимазной (60 мин) и мальтазной (100 мин) активностью.

На базе высокопродуктивных рас и штаммов выведены новые виды, которые характеризуются более высокими показателями качества:

- гибридные расы 176, 196-6 и 262 отвечают основным требованиям, предъявляемым к производственным дрожжам (мальтазная активность – 65-75 мин, зимазная – 42-57 мин, высокая скорость роста), и рекомендованы для использования в промышленности. Раса 262 рекомендована для получения сушеных дрожжей;

- новые штаммы 739, 743, 608, 616, 722 отличаются высокой активностью ферментов.

Выведен штамм ЛВ-7, используемый для производства пресованных и сушеных дрожжей. Штамм характеризуется повышенной устойчивостью к примесям мелассы и микрофлоре, инфицирующей дрожжевое производство, отличается повышенной продуктивностью концентрацией трегалозы.

Штамм дрожжей 616 используется для производства сушеных дрожжей, характеризуется высокой активностью ферментных систем дрожжей. Мальтазная активность дрожжей составляет 67 мин, зимазная – 55 мин.

Штамм 722 отличается хорошей мальтазной (54 мин), зимазной (43 мин) активностью, подъемной силой (46 мин) и осмочувствительностью (5-10 мин). Штамм 739 характеризуется высокой продуктивностью, повышенной ферментной активностью. Дрожжи полностью сбраживают глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу, галактозу. Зимазная, мальтазная активности и подъемная сила дрожжей составляют соответственно 54, 61 и 56 мин;

- штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 39/15 обладает хорошей бродильной активностью, его применение позволяет сократить продолжительность брожения теста на 35 мин;

- для производства сушеных дрожжей используется штамм *Saccharomyces cerevisiae* 93, обладающий высокой продуктивностью, активным комплексом ферментов. Зимазная активность составляет 45 мин, мальтазная – 53 мин;

- гибридный штамм 512 получен скрещиванием расы XII и штамма *Saccharomyces diastaticus*, является триплоидом и характеризуется повышенным синтезом витаминов Д (эргостерина) – 2,8; В1-34; В2-20; В6-46, РР – 36 (мкг/клетка). Показатели зимазной, мальтазной активности и осмочувствительности составляют 70, 200 и 14 мин соответственно;

- штамм 5 получен в результате скрещивания клеток штамма дрожжей «Яблочный-3», применяемого для сбраживания яблочного сока, и штамма 722, используемого в производстве сушеных хлебопекарных дрожжей. Отличительной особенностью штамма является высокая бродильная активность. Показатели зимазной, мальтазной активности и осмочувствительности составляют 85, 95 и 15 мин соответственно;

- штамм 69 получен в процессе скрещивания расы дрожжей «Джамбульская-60» и штамма 10, выделенного из сушеных дрожжей французского производства. Он обладает высокой скоростью роста, зимазной и мальтазной активностью соответственно 45 мин и 80 мин, а также устойчивостью к повышенной температуре (40–45°C).

В ржаных заквасках встречаются представители другого вида рода *Saccharomyces* – дрожжи *Saccharomyces minor*. Это мелкие дрожжи круглой или слегка овальной формы, впервые выделен-

ные и описанные в 1872 г. Энгелем. Они сбраживают и усваивают глюкозу, фруктозу, сахарозу, галактозу, раффинозу, не сбраживают и не усваивают лактозу, ксилозу, арабинозу, глицерин, маннит, не расщепляют крахмал и клетчатку. Характерная особенность данного вида заключается в том, что он не сбраживает и не усваивает мальтозу и простые декстрины. Температурный оптимум составляет 25-28°C, повышение температуры до 35°C угнетает клетки. Дрожжи *Saccharomyces minor* отличаются большей кислотоустойчивостью (хорошо развиваются при кислотности 14-16 град и рН 3,0-3,5) и спиртоустойчивостью, в отличие от *Saccharomyces cerevisiae*.

В Санкт-Петербургской лаборатории технологии дрожжей ВНИИПБТ создана коллекция, которая насчитывает более 96 штаммов отечественных и зарубежных музейных культур. Коллекция культур предназначена для снабжения дрожжевых заводов производственными культурами и обеспечения ученых исходным материалом для селекционирования новых штаммов. В настоящее время продолжаются работы по выведению новых штаммов дрожжей с применением современных методов: индуцируемого мутагенеза, гибридизации, адаптации. Это способствует эффективной селекции чистых культур микроорганизмов с закрепленными качественными признаками, необходимыми для реализации современных технологий приготовления хлебобулочных изделий.

1.3 Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии являются постоянными спутниками муки, дрожжей, молочных продуктов и др. Они оказывают влияние на вкус, аромат и усвояемость хлеба. Способность молочнокислых бактерий образовывать молочную кислоту объединяет их в отдельную группу микроорганизмов, которая по практической значимости занимает одно из первых мест. Существует несколько классификаций молочнокислых бактерий, основные из которых предложены Кнудсенем, Селибером, Шпихером, Ауэрманом. Все

микроорганизмы, вызывающие молочнокислое брожение, подразделяются на две большие группы: гомоферментативные и гетероферментативные. **Гомоферментативные** молочнокислые бактерии вызывают брожение с образованием молочной кислоты. **Гетероферментативные** молочнокислые бактерии кроме молочной образуют уксусную, яблочную, пировиноградную, янтарную и другие кислоты, этанол, диоксид углерода и др. По отношению к температуре бактерии делят на 3 группы:

- психрофилы – температурный оптимум – 10 оС;
- мезофилы – температурный оптимум – 30 оС;
- термофилы – температурный оптимум – 50-70 оС.

1.3.1 Морфология бактериальной клетки

Молочнокислые бактерии – это прямые палочки различных размеров от коротких (2-5 мкм) до длинных (12-15 мкм) шириной 0,5-1 мкм с закругленными концами. Расположены они одиночно, попарно или небольшими цепочками. Молочнокислые бактерии обычно неподвижны, размножаются простым делением, чаще всего спор не образуют. Бактериальная клетка покрыта мелкопористой оболочкой, состоящей из белков и углеводов, поверх которой имеется слизистая оболочка, называемая капсулой.

Оболочка бактерий составляет 20-30% от сухой массы клеток и обладает достаточной механической прочностью. Она определяет форму организма, защищает его от внешних воздействий, проницаема для солей и других низкомолекулярных веществ и играет важную роль в обмене веществ между клеткой и окружающей средой.

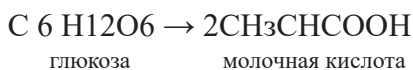
Цитоплазматическая мембрана, прилегающая к клеточной стенке, содержит разнообразные ферменты, принимающие активное участие в метаболизме бактерий, а также липиды и белки. Внутри клетка заполнена **цитоплазмой**, состоящей в основном из белков. В цитоплазме располагаются нуклеотид, рибосомы и мезосомы.

Ядро выполняет организующую роль, управляет жизненными процессами клетки, регулирует обмен веществ, размножение, является носителем наследственной информации.

Рибосомы являются центрами синтеза белка. В **мезосомах** содержатся ферменты окислительно-восстановительного действия и происходят энергетические процессы. Резервные вещества, накапливаемые в процессе жизнедеятельности бактерий, локализуются в виде зерен волютина.

1.3.2 Молочнокислое брожение

Типичное **гомоферментативное** молочнокислое брожение можно выразить в следующем виде:



При **гетероферментативном** молочнокислом брожении образуются несколько органических веществ. Суммарное уравнение сбраживания глюкозы:



глюкоза → молочная кислота + янтарная кислота + уксусная кислота + этиловый спирт + диоксид углерода + водород

При гомоферментативном брожении образуется 85-90% молочной кислоты, при гетероферментативном – около 20-40%.

Молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами. Из углеводов они преимущественно сбраживают гексозы и дисахариды. Гетероферментативные молочнокислые бактерии и некоторые виды *Lactobacillus plantarum* сбраживают пентозы. Согласно современным представлениям гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии отличаются по механизму сбраживания углеводов. Гомоферментативные виды содержат фермент альдозазу, но лишены пентозофосфокетолазы. В связи с этим молочнокислое брожение протекает по гликолитической

схеме Эмбдена-Мейергофа. Гетероферментативные виды молочнокислых бактерий содержат пентозофосфокетотлазу, но отсутствуют альдозазы и триозо-фосфатизомеразы, поэтому расщепление углеводов происходит исключительно по пентозофосфатному пути. Эти бактерии сбраживают также пентозы. Способность некоторых молочнокислых бактерий сбраживать пентозы имеет определенное технологическое значение при брожении ржаных и ржано-пшеничных полуфабрикатов, которые содержат значимое количество пентозанов и продуктов их гидролиза. Активность молочнокислых бактерий проявляется наиболее интенсивно в слабокислой среде и для большинства их видов оптимальная активная кислотность среды составляет pH 5-6. В полуфабрикатах хлебопекарного производства бактерии активны при pH 3-3,5. Повышенное осмотическое давление (при концентрации сахара в среде более 15% и соли более 6%) вызывает снижение интенсивности молочнокислого брожения. Высокие концентрации спирта (до 18-24%) не оказывают отрицательного действия на жизнедеятельность бактерий.

1.3.3 Расы и штаммы молочнокислых бактерий, применяемые в хлебопекарном производстве

К молочнокислым бактериям относятся представители родов *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. Представителями рода *Lactobacillus* являются: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti*. Вид *Lactobacillus delbrueckii* относится к подгруппе термобактерий. Характерной особенностью бактерий данного вида является способность сбраживать глюкозу без образования диоксида углерода. Оптимальная температура роста – 45-50° С. Из других углеводов они сбраживают сахарозу, мальтозу, галактозу, но не сбраживают лактозу, раффинозу, декстрины. Бактерии требовательны к содержанию в среде азотистых соединений. Они хорошо развиваются в мучных средах и обладают большой интенсивностью образования кислоты. Этот вид бактерий широко

ко используются в хлебопекарном производстве при выведении жидких дрожжей. Штамм 30-1 отличается повышенной ацидо и термотолерантностью при кислотности от 17 до 22 град и температуре 48-70° С. Использование этого штамма позволяет сократить продолжительность заквашивания заварки до 6 ч и повысить содержание в ней глюкозы и аминного азота. Закваска при этом имеет приятный медово-яблочный аромат.

Штамм 30-2 получен путем выращивания культуры 30-1 на среде, содержащей молочную сыворотку. Штамм устойчив к колебаниям температуры от 40 до 60°С и кислотности от 10 до 20 град. Продолжительность приготовления закваски сокращается до 4,5-5,0 ч.

Штамм 40 получен облучением ультрафиолетовыми лучами с последующим селекционированием на среде, в состав которой входит натрий лимоннокислый. Он отличается интенсивным кислотообразованием и повышенным синтезом ароматобразующих веществ (ацетальдегида и диацетила).

Штамм Д-76 кроме молочной кислоты образует 0,5% уксусной кислоты. Культура выпускается в виде сухого лактобактерина. Штаммы 30-1, 30-2, 40 селекционированы в ГосНИИХП, а штамм Д-76 – в Санкт-Петербургском филиале ГосНИИХП.

Вид *Lactobacillus plantarum* принадлежит к гомоферментативным видам из подгруппы стрептобактерий. *L. plantarum* играет основную роль в процессе кислотонакопления при производстве пшеничных и ржаных заквасок. *L. plantarum* сбраживает многие сахара, в том числе мальтозу и сахарозу. Он требует для своего развития богатые среды, содержащие разнообразные углеводы, витамины, аминокислоты. Оптимальная температура для его развития 30° С. Отличается спиртоустойчивостью, выдерживая концентрацию спирта до 20%.

Вид *Lactobacillus casei* относится к подгруппе стрептобактерий и является гомоферментативным по характеру брожения. По морфологическим, культуральным и физиологическим признакам он очень близок к *L. plantarum*. В пределах вида *L. casei* различают три подвида: *L. casei* var. *casei*, *L. casei* var. *rharnosus* и *L. casei* var. *alactosus*. Первые два из них отличаются тем, что

могут развиваться при более высокой температуре – до 45°C, чем *L. plantarum*. Бактерии вида *L. casei* обнаружены в заквасках и тесте и принимают участие в кислотонакоплении полуфабрикатов.

Бактерии вида *Lactobacillus brevis* являются гетероферментативными. Они сбраживает мальтозу, сахарозу, галактозу, арабинозу, нуждается в тиамине и фолиевой кислоте. Оптимальная температура роста бактерий – 30°C, но они могут расти и при более низких температурах (15° С). Отдельные штаммы данного вида хорошо развиваются при 34-37° С. Вид *L. brevis*, как и *L. plantarum*, является специфичным для ржанных и пшеничных заквасок. Продукты их брожения принимают участие в формировании вкуса и аромата хлеба.

Вид *Lactobacillus fermenti* является гетероферментативным. Отличительная особенность этого вида – высокий температурный оптимум роста – в пределах 37-40° С. При 15° С рост не наблюдается. *L. fermenti* часто встречается в заквасках и является специфичным для хлебопекарного производства.

Вопросы для самоконтроля:

1. Основные типы брожения?
2. Из каких морфологических частей состоит дрожжевая клетка?
3. Какие физиологические изменения могут происходить в дрожжевой клетке под воздействием внешних факторов?
4. Какие типы жизнедеятельности могут проявлять хлебопекарные дрожжи в зависимости от условий питательной среды?
5. Объясните эффект Пастера.
6. Какие ферменты дрожжей принимают участие в спиртовом брожении?
7. В чем существует различие между расой и штаммом микроорганизмов?
8. Как называются показатели качества дрожжей, характеризующие активность их ферментов?
9. Каким образом подразделяют молочнокислые бактерии по их отношению к температуре?

10. Каким образом подразделяют молочнокислые бактерии по видам продуктов, которые они продуцируют?
11. Сущность спиртового брожения?
12. Сущность молочнокислого брожения?
13. Какие типы брожения происходят в полуфабрикатах хлебопекарного производства, кроме спиртового и молочнокислого брожения?

ТЕМА 2: ДРОЖЖИ ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ КАК РЕЦЕПТУРНЫЙ КОМПОНЕНТ ТЕСТА

Технологическая роль хлебопекарных дрожжей, добавляемых при замесе теста, заключается в выделении диоксида углерода, разрыхляющего тесто и придающего ему пористую структуру, а также этилового спирта и промежуточных продуктов брожения, оказывающих влияние на свойства теста и принимающих участие в формировании вкуса и аромата изделий.

2.1 Виды хлебопекарных дрожжей и их свойства

Для приготовления хлебобулочных изделий применяются дрожжи хлебопекарные прессованные, сушеные, жидкие и дрожжевое молоко. *Прессованные* дрожжи – это технически чистая культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, сформированная в брикеты влажностью 67-75%. Культура выращивается на специальных питательных средах путем постоянного накопления биомассы маточных и засевных дрожжей в условиях интенсивной аэрации среды до получения товарных дрожжей прессованием или вакуумированием. В 1 г прессованных дрожжей содержится 10-15 млрд. клеток.

Сушеные дрожжи – это высушенные прессованные дрожжи до влажности 8-10% при определенных условиях. Их вырабатывают из прессованных дрожжей, которые характеризуются повышенным содержанием сухих веществ и трегалозы. Сушеные дрожжи с высоким содержанием трегалозы и низким содержанием свободного аммиака значительно дольше сохраняют свою биологическую активность. Их применяют после предварительной регидратации. Однако эти дрожжи имеют пониженную бродильную активность даже после активации в мучной среде с добавлением сахара, и дозировка их в два раза выше, чем прессованных.

Инстантные дрожжи – высокоактивные сушеные дрожжи. Технология получения этих дрожжей предусматривает применение определенных штаммов сахаромикетов и современных

условий культивирования. Кроме того, необходимо внесение в дрожжи перед высушиванием защитных добавок (антиоксидантов) – аскорбиновой кислоты, поверхностно-активных веществ или эмульгаторов, защищающих клеточные стенки и мембраны от повреждений. Дрожжи инстантные, упакованные в атмосфере диоксида углерода или азота под вакуумом в газонепроницаемые полимерные пленки, сохраняют свои свойства в течение 2 лет. Благодаря высокопористой структуре эти дрожжи используют без предварительного размачивания (регидратации). Дрожжи инстантные рекомендуется использовать при безопасном и ускоренных способах приготовления теста с содержанием сахара и жира 7% и более к массе муки. Соотношение расхода инстантных дрожжей и прессованных составляет не менее 1:5.

Дрожжевое молоко – полуфабрикат дрожжевого производства. Они представляют собой водную суспензию клеток *Saccharomyces cerevisiae*, полученную в результате размножения их в культуральной среде, сгущения на сепараторе, выделения на вакуум-фильтрах или фильтр-прессах. При хранении дрожжевого молока более суток происходят потери продукта. Это связано с тем, что клетки продолжают осуществлять дыхание, используя запасные углеводы. В результате уменьшается масса клеток, что ведет к снижению количества биомассы.

Жидкие хлебопекарные дрожжи – полуфабрикат хлебопекарного производства, приготовленный на заквашенной заварке для хлебопекарного производства путем размножения в ней хлебопекарных дрожжей. Мучную заварку заквашивают термофильными молочнокислыми бактериями типа *Lactobacillus delbrueckii*, в которой затем выращивают дрожжи вида *Saccharomyces*. В 1 мл жидких дрожжей содержится 70-120 млн. клеток. *Дрожжи для готовых смесей* (премиксов) способны храниться при доступе кислорода и влаги, а также не требуют предварительной гидратации. Такими свойствами дрожжи обладают из-за особенного строения защитных гранул, имеющих специальную оболочку и характеризующихся высокой пористостью структуры, что способствует быстрому растворению гранул в полуфабрикатах хлебопекарного производства.

Деактивированные дрожжи не обладают сбраживающей способностью, но имеют ферментативную активность. Эти дрожжи являются натуральным улучшителем восстановительного действия для теста, которому необходимо придать эластичные свойства и увеличить растяжимость. Хлебопекарная промышленность использует также прессованные дрожжи, полученные на спиртовых заводах, перерабатывающих свеклосахарную мелассу. Эти дрожжи интенсивно бродят в начальной стадии приготовления теста, в рецептуре которого не предусмотрен сахар. Затем выделение диоксида углерода резко снижается, особенно на стадии расстойки. Эти дрожжи имеют низкую активность фермента α -глюкозидазы, которая обусловлена свойствами чистых культур и их способностью адаптироваться к мальтозе. Эффективность применения различных видов дрожжей обуславливается их физиологическими, биологическими и технологическими свойствами.

При производстве и использовании хлебопекарных дрожжей учитываются следующие их свойства:

Термотолерантность – способность дрожжей сохранять свою жизнедеятельность в средах с высокой температурой.

Осмолерантность – способность дрожжей осуществлять спиртовое брожение при повышенных концентрациях хлористого натрия (около 2% к массе муки) и сахара (более 10%). Особенности осмотолерантных дрожжей заключаются в низком содержании β -фруктофуранозидазы, способности синтезировать трегалозу и глицерин, что позволяет снизить осмотическое давление и компенсировать потери внутриклеточной воды.

Криотолерантность дрожжей – устойчивость дрожжей к воздействию холода. Дрожжи полусухие замороженные предназначены для применения в технологии быстрозамороженных тестовых полуфабрикатов для булочных и сдобных изделий. Содержание сухих веществ в этих дрожжах составляет 75-77%. В процессе производства дрожжей после сушки их замораживают, что придает им большую стабильность при хранении. Дрожжи, чувствительные к холоду, характеризуются чрезвычайно низкой ферментативной активностью в температурном диапазоне от 4 до 12°C и стандартной активностью при температуре 30-40°C. Это

позволяет использовать их для приготовления теста, предназначенного для розничной торговли. Тестовые заготовки, приготовленные с использованием этих дрожжей, могут храниться в течение нескольких дней при температуре 3-7°C.

Кислототолерантность дрожжей – способность дрожжей сохранять свою жизнедеятельность в средах, имеющих высокую кислотность. При приготовлении жидких дрожжей и различных видов заквасок, используют кислотоустойчивые штаммы дрожжей.

Дрожжи, устойчивые к пропионату кальция, характеризуются повышенной кислототолерантностью и адаптивностью к тесту, приготовленному с добавлением пропионата кальция как средства предотвращения картофельной болезни хлебопекарных изделий.

Продолжительность и температура брожения полуфабрикатов являются важными факторами, определяющими количество дрожжей и их активность. При сокращении продолжительности процесса брожения теста количество дрожжей увеличивается. Существует прямая зависимость между температурой брожения и его интенсивностью: при повышении температуры от 25 до 35°C интенсивность брожения увеличивается примерно в 2 раза. Для достижения оптимальных свойств теста, приготовленного безопарным и опарным способом, и получения хлеба высокого качества, имеет значение высокая мальтазная активность дрожжей. В процессе брожения опары, продолжительность брожения которой составляет 180-240 мин, происходит адаптация дрожжевых клеток к сбраживанию мальтозы. Поэтому интенсивность газообразования в тесте, приготовленном опарным способом, в значительно меньшей степени зависит от исходной мальтазной активности дрожжей по сравнению с безопарным способом. Общая продолжительность созревания полуфабрикатов в ускоренных технологиях составляет 70-100 мин, поэтому индуцирование α -глюкозидазы дрожжами, которое начинается как правило через 70-90 мин от начала процесса брожения теста, не может являться лимитирующим фактором технологического процесса. Кроме того, рекомендуется использовать ускоренные технологии при

производстве изделий, в рецептуре которых предусмотрено не менее 2% сахара.

Количество дрожжей зависит от состава рецептуры, главным образом, от количества сахара и жировых продуктов. Сахаро- и жиросодержащие продукты влияют на ферментативную активность дрожжей. При внесении сахара-песка в количестве более 7% к массе муки в тесте начинаются процессы плазмолиза дрожжевых клеток, вызывающего снижение их жизнедеятельности.

Добавление в тесто жировых продуктов в количестве более 5% вызывает снижение газообразования, так как жир обволакивает поверхность дрожжевых клеток, что замедляет или останавливает прохождение питательных веществ через клеточную оболочку. Поэтому в рецептуре сдобных изделий предусмотрено увеличение количества дрожжей до 4-6% к массе муки и введение в технологический процесс операции отсдобки теста, предусматривающей внесение сахара и жировых продуктов в выбранное тесто.

2.2. Показатели качества хлебопекарных дрожжей и способы их улучшения

В мировой практике технологические свойства дрожжей оцениваются по различным показателям, наиболее важные из которых основываются на определении их ферментативной активности.

Действующий в настоящее время в нашей стране ГОСТ Р 54731-2011 «Дрожжи хлебопекарные прессованные» регламентирует следующие показатели их качества:

- органолептические (вкус, цвет, запах, консистенция);
- физико-химические (влажность, подъемная сила, кислотность в день выработки и через 12 суток хранения, стойкость при хранении).

Технологические свойства дрожжей оцениваются по показателю *подъемной силы* – продолжительности подъема теста, приготовленного по стандартной рецептуре, на определенную высо-

ту. Подъемная сила не может считаться достаточно объективным показателем, адекватно оценивающим активность всех ферментных систем дрожжевой клетки, в том числе активность α – глюкозидазы. Специалистами дрожжевой промышленности предложен ряд способов определения свойств хлебопекарных дрожжей по активности их ферментативного комплекса. Эти способы предусматривают определение *зимазной* и *мальтазной* активности дрожжей. Показатели подъемной силы и зимазной активности характеризуют по существу один и тот же процесс – сбраживание глюкозы зимазным комплексом дрожжевой клетки. Показатель активности зимазного комплекса дрожжей характеризует способность ферментов осуществлять превращение глюкозы и фруктозы в спирт и диоксид углерода и не учитывает сбраживание мальтозы. Направление и скорость биохимических реакций, вызываемых дрожжевыми клетками, могут подвергаться *адаптивному регулированию*. Для дрожжевых клеток характерны два типа адаптации:

- приспособление макромолекулярных клеток, при котором изменяется количество уже имеющихся типов макромолекул, например, фермента α -глюкозидазы;
- приспособление на функциональном уровне, когда изменение эффективности макромолекулярных систем, в частности ферментов, не связано с изменением их числа.

Адаптация второго типа характеризуется явлением метаболической регуляции – увеличением или уменьшением активности ферментов в связи с переходом от аэробной жизнедеятельности (период культивирования клеток) к анаэробной (период брожения в хлебопекарных полуфабрикатах). Эти регуляторные процессы зависят от состава и концентрации веществ в клетке и вне ее, присутствием активаторов и ингибиторов ферментов.

Исходная биологическая активность дрожжей и способность их адаптироваться к анаэробным условиям жизнедеятельности в полуфабрикатах влияют на ход технологического процесса и качество продукции. Прессованные дрожжи характеризуются малой активностью ферментов восстановительного действия, т. е. бродильного типа, так как аэрация культуральной среды и

отсутствие в ней мальтозы (индуктора) не стимулирует их синтез. В связи с этим бродильная активность дрожжевых клеток в начале брожения хлебопекарных полуфабрикатов проявляется недостаточно. Попадая в анаэробные условия, дрожжевые клетки начинают перестраиваться с дыхательного на бродильный тип. Применение прессованных дрожжей с пониженной активностью α -глюкозидазы отрицательно влияет на процесс брожения, особенно при безопарном способе приготовления теста, когда дрожжи должны проявлять свою бродильную активность тотчас после замеса теста. При опарном способе приготовления теста адаптация дрожжевых клеток к среде, содержащей мальтозу, происходит в опаре. Однако брожение опары при низкой активности фермента α -глюкозидазы протекает менее интенсивно. Поэтому перед работниками хлебопекарной промышленности стоит задача – исключить период адаптации дрожжевых клеток при созревании полуфабрикатов, что позволит интенсифицировать технологический процесс и улучшить качество продукции.

С целью создания оптимальных параметров для жизнедеятельности дрожжевых клеток в анаэробных условиях и обеспечения их высокой физиологической активности прессованные дрожжи необходимо выдерживать в специально приготовленных питательных смесях. Эта технологическая операция называется *активированием* прессованных или сушеных дрожжей.

Для активирования дрожжей наиболее целесообразно и эффективно использование жидких питательных смесей, содержащих углеводы, углеводороды, органические кислоты и минеральные соли. Предварительное выдерживание клеток дрожжей в питательной смеси создает благоприятные физико-химические условия и повышает активность ферментов, дополнительный их синтез, ускоряет и обеспечивает внутриклеточные биохимические превращения, без которых невозможен процесс брожения. Хлебопекарные дрожжи вносят в специально приготовленную питательную смесь, которая состоит из муки, воды, заварки, обогащенной неферментированным солодом и соевой мукой. Продолжительность активации дрожжей зависит от способа приго-

товления теста и составляет для безопасного способа 2-3 часа, для опарного – 1 час.

Предприятиям рекомендованы следующие компоненты при приготовлении питательных смесей:

- минеральные соли (сульфат аммония, магния, кальция, цинка, марганца, гидрофосфат калия, триполифосфат натрия и др.);
- сахарсодержащие добавки (сахар-песок, свекольный порошок, яблочный порошок, концентрат квасного сусла и др.);
- различные гидролизаты из пшеничной муки или крахмального молока, полученные путем внесения термостабильной бактериальной или грибной α – амилазы, глюкоамилазы;
- молочная сыворотка, предварительно гидролизованная галактозидазой;
- крахмал сырец, гидролизированный амилазой, с последующим внесением белковой добавки.

Инструкцией ГосНИИХП (Рекомендации по активации хлебопекарных дрожжей. Утв. 20.04.87 г.) предусмотрено проведение активации дрожжей в средах следующего состава:

- мука и вода;
- мука, вода, Амилоризин П10Х или комплексные хлебопекарные улучшители;
- мука, вода в смеси с высокоосахаренным ферментным полуфабрикатом;
- мука, вода, мучная заварка.

Опыт ряда хлебозаводов показал, что применение активированных хлебопекарных дрожжей позволяет снизить их расход на 25-40% при одновременном сокращении продолжительности брожения опары на 10-15%. *Для повышения биологической активности* микроорганизмов используют физические, химические, магнитные, термические, электрохимические, ИК-способы, способы обработки лазерным излучением и др.

Установлено, что значительное воздействие на микроорганизмы оказывает электрохимическая обработка. Механизм воздействия электрохимической обработки достаточно сложен. Он заключается в повышении активности биомембран, что приводит к более интенсивному действию ферментов. Электрохимическая обработка влияет на энергетическое состояние компонентов

биохимических реакций. Эффект электрохимической обработки снижает трансмембранный потенциал, который имеет место при переносе питательных веществ через клеточные стенки дрожжей. Энергия активации воздействует на скорость реакций, протекающих с преодолением энергетического барьера, а именно на реакции переноса веществ через биологические мембраны.

Известно, что наиболее эффективной является обработка дрожжевых клеток в питательной смеси с использованием ячменного и ячменно-кукурузного гидролизатов. Проведение электрохимической обработки дрожжевого молока, прессованных и сушеных дрожжей в зерновых гидролизатах приводит к увеличению подъемной силы дрожжей в 2-3 раза.

Использование комплексного воздействия сбалансированного состава питательной смеси и электрохимической обработки полуфабрикатов для улучшения биотехнологических показателей дрожжевых клеток позволяет значительно улучшить качество хлеба.

Поиск новых экономически целесообразных путей повышения биотехнологических свойств дрожжей в хлебопекарном производстве показывает перспективность использования такого физического фактора, как лазерный свет низкой интенсивности, эффективность применения которого подтверждена практическим использованием в некоторых областях промышленности и медицины. Изучена и обоснована целесообразность обработки хлебопекарных дрожжей лазерным излучением длинной волны 632,8 нм. Низкие суммарные дозы лазерного излучения повышают биотехнологические свойства дрожжей, более высокие – стимулируют их рост и размножение. Установлено, что лазерная обработка дрожжей при оптимальных параметрах способствует повышению активности их ферментных систем, ускоряет биосинтез белка и аминокислот.

В ряде отраслей пищевой промышленности применяется электронно-ионная технология, основанная на силовом воздействии электрических полей на электроразряженные частицы, что ускоряет производственные процессы, улучшает качество готовой продукции. Электронно-ионная обработка прессованных

дрожжей позволяет увеличить их зимазную активность. Многообразие способов повышения активности хлебопекарных дрожжей позволяет выбрать наиболее приемлемый способ для условий конкретного производства с учетом оптимального эффекта.

2.3 Методы стабилизации биотехнологических свойств дрожжей

Даже непродолжительное хранение прессованных дрожжей сопровождается снижением активности их ферментативного комплекса, разрушением клеток в результате автолиза и воздействия посторонней микрофлоры. В мире различают две основные группы способов повышения стабильности свойств дрожжей при хранении:

- воздействие на дрожжевые клетки в процессе их роста (использование особых штаммов дрожжей, оптимизация способов и технологических параметров дрожжерастительного процесса, поддержание стерильных условий);
- способы обработки дрожжей на последних стадиях технологического процесса их производства (перед прессованием, при формировании и т. д.)

Для стабилизации качества дрожжей при хранении, которые применяются на конечных этапах дрожжерастительного производства, используют вещества различного строения и механизма действия. По типу воздействия эти вещества можно классифицировать на следующие группы:

- вещества, регулирующие влажность дрожжей;
- поверхностно-активные вещества;
- антиокислители и их синергисты;
- вещества, регулирующие контакт клеток с окружающей средой;
- вещества, воздействующие на микрофлору дрожжей.

Некоторые соединения обладают комплексным механизмом действия, что усиливает их стабилизирующее влияние, и повышает эффективность использования.

Одним из простых способов стабилизации свойств хлебопекарных дрожжей является снижение содержания вне- и внутриклеточной влаги. Механическим путем нельзя достигнуть снижения влажности менее 70%. Наиболее эффективным путем создания постоянного соотношения между содержанием вне- и внутриклеточной влаги является внесение в дрожжевую суспензию гидрофильных, гидрофобных или осмотически активных веществ. Эти вещества приводят к выделению части клеточной воды во внеклеточное пространство, частичному обезвоживанию клеток и тем самым снижению их общей влажности. В качестве осмотически активных веществ, используемых для снижения доли внутриклеточной влаги дрожжей, применяются:

- неорганические (соли щелочных и щелочноземельных металлов);
- органические соединения (мочевина, глицерин, углеводы, не сбраживаемые дрожжами).

Эффективность обезвоживания дрожжевых клеток повышается добавлением в дрожжевую биомассу гидрофильных веществ, имеющих хорошо развитую поверхность. Гидрофильные вещества подразделяются на набухающие и увлажняющие. В качестве гидрофильных набухающих соединений используются метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, целлюлоза, пектин, экстракты льняного семени, белки сои, молока, соли альгиновой кислоты и др. Их оптимальная дозировка в среднем составляет 2-3 % к массе сухих веществ дрожжей.

Для улучшения сохранности прессованных дрожжей предложено добавлять к дрожжам тонко измельченные гидрофобные вещества, которые, распределяясь вокруг частиц дрожжевой биомассы, делают ее сыпучей, обладающей свойствами свободной текучести.

Жизнеспособность дрожжевых клеток увеличивается при совместном использовании гидрофильных и гидрофобных веществ в небольших количествах (0,01-5% к массе прессованных дрожжей).

Повышенная влажность прессованных дрожжей и наличие в их клетках липидов (триглицеридов, фосфатидов) приводит к

окислению клеточных структур, образованию перекисей и гидроперекисей, которые значительно ускоряют порчу дрожжей. Для предотвращения процесса окисления в промышленности широко применяют вещества антиокислительной природы. Антиоксидантами являются соединения, присутствующие в небольших количествах и способствующие ингибированию цепных реакций окисления путем устранения свободных радикалов. Вещества, обладающие антиокислительными свойствами, делятся на 4 группы: природные и синтетические, органические и неорганические. К наиболее известным антиоксидантам природного происхождения относится токоферол.

Наибольший эффект антиоксиданты оказывают при предварительном их растворении в эмульгаторах. Воздействие многих антиоксидантов может быть усилено добавлением так называемых синергистов. В качестве синергистов могут выступать неорганические и органические кислоты (фосфорная, лимонная, аскорбиновая, винная, тиопропионовая и др.) и их соли в количествах, сопоставимых с дозировками соответствующих антиоксидантов. Механизм действия синергистов в общем случае может быть объяснен инактивацией ионов тяжелых металлов, образованием комплексных соединений и регенерацией антиоксидантов.

Существенным фактором, снижающим качество дрожжей при хранении, является действие протеолитических ферментов клетки. Эти ферменты размягчают дрожжевую биомассу, что ведет к ее автолизу. Протеазы дрожжей активны в восстановленной форме и теряют свою активность при переходе в окисленное состояние. Для стимулирования этого процесса в промышленности используют соединения окислительного действия, например, перекись водорода.

Большое влияние на сохранность прессованных дрожжей оказывает pH среды. При обработке дрожжей растворами соляной и фосфорной кислот при pH 2,5-6,0 с последующей нейтрализацией раствором едкого натрия или калия наблюдалось значительное увеличение срока сохранности активных прессованных дрожжей. Однако резкое снижение pH среды негативно сказывается на хлебопекарных свойствах дрожжей, что обусловлено гибелью

дрожжевых клеток. Для поддержания рН среды на нужном уровне могут использоваться сухие бактериальные закваски, которые вносят в количестве 30-35% к массе дрожжей в смеси с мукой до достижения влажности композиции 20-25%.

Одним из перспективных направлений в технологии производства дрожжей стабильного качества является регулирование их контакта с окружающей средой посредством заключения дрожжевых клеток в микрокапсулы с полупроницаемыми стенками, что позволяет управлять ферментативной активностью клеток. Необходимым условием, помимо технологической эффективности использования микрокапсул, является отсутствие отрицательного их воздействия на органолептические свойства и пищевую ценность продукта.

Причиной снижения качества дрожжей при хранении является также наличие посторонней микрофлоры в товарной биомассе. Большинство стадий дрожжевого процесса ведут в стерильных условиях. На последней стадии стерилизацию больших объемов питательной среды не проводят вследствие экономической нецелесообразности. Для снижения инфицирования дрожжей перед их прессованием или в течение этого процесса используют различные приемы и методы:

- обработка пероксидом водорода суспензии дрожжей в течение 1-го часа перед их прессованием;
- применение различных антимикробных веществ, получаемых химическим и биологическим путем.

Биологический способ консервирования дрожжей – это введение в состав дрожжей молочнокислых бактерий, а также питательных веществ, обладающих гигроскопическими свойствами (крахмал, мука, сахароза).

2.4 Жидкие дрожжи

Жидкие дрожжи – это полуфабрикат хлебопекарного производства, приготовленный на заквашенной заварке путем размножения в ней дрожжей. Жидкие дрожжи применяют при пригото-

лении теста из муки обойной, второго и первого сортов. Расход жидких дрожжей в производстве зависит от сорта вырабатываемого изделия и составляет для приготовления хлеба:

- из пшеничной муки I сорта – 20-25% к массе муки в тесте;
- из пшеничной муки II сорта – 30-35%;
- из муки пшеничной обойной – 35-40%.

Многие хлебозаводы готовят пшеничное тесто на смеси прессованных и жидких дрожжей. При использовании жидких дрожжей в смеси с прессованными для улучшения качества хлеба, приготовленного опарным способом, расход их составляет:

- для хлеба из муки пшеничной I сорта – 15% к массе муки в тесте;
- для хлебобулочных изделий из муки пшеничной высшего и I сортов – 10%;
- для хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки – 10-12%.

Использование жидких дрожжей имеет свои достоинства и недостатки. Достоинства:

- бродительная активность дрожжевых клеток в 2 раза выше, чем в прессованных, мальтазная активность – в 4 раза;
- хлеб, приготовленный из муки высокого выхода характеризуется лучшими вкусовыми качествами и медленнее черствеет, чем хлеб, приготовленный на прессованных дрожжах;
- при переработке муки с пониженными хлебопекарными свойствами жидкие дрожжи являются улучшителем, так как в них содержится молочная кислота;
- предохраняют изделия от картофельной болезни;
- улучшаются реологические свойства теста, вкус и аромат изделий, замедляется черствение изделий.

Практика последних лет показала целесообразность использования жидких дрожжей в сочетании с прессованными или сушеными в ускоренных технологиях.

Недостатки:

- при выработке изделий из муки высшего и первого сортов на жидких дрожжах мякиш несколько темнеет. Этот недостаток менее заметен при комбинированном использовании жидких и прессованных дрожжей;

- дрожжи трудно сохранять при вынужденных длительных перерывах в производственном процессе;
- трудоемкость процесса приготовления дрожжей.

Известны различные схемы приготовления жидких дрожжей: Московская, Джамбульская, Ростовская, Ленинградская и др.

По Ростовской схеме «горькую» и традиционную заварки смешивают в соотношении 1:4 и используют для выращивания дрожжей.

Дрожжи, приготовленные по Ленинградской (Л-4) схеме, применяют для производства хлеба из муки пшеничной обойной и ржаной. В качестве кислотообразующих микроорганизмов используют мезофильные молочнокислые бактерии вида *L. planlarum* – А6.

Наиболее распространенной в промышленности является «рациональная» схема, разработанная в 30-х годах проф. А. И. Островским.

Сущность «рациональной» схемы состоит в использовании для выращивания дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* мучной осахаренной заварки, заквашенной термофильными молочнокислыми бактериями.

При приготовлении жидких дрожжей применяют следующие виды муки:

- для хлеба и хлебобулочных изделий из пшеничной муки второго сорта – муку пшеничную второго сорта;
- для изделий из пшеничной муки первого сорта – смесь пшеничной муки второго и первого сортов в соотношении 1:1;
- для ржано-пшеничных сортов хлеба – муку ржаную обдирную и смесь ржаной обдирной и пшеничной обойной в соотношении 1:1;
- для хлеба из обойной муки – муку обойную.

Рациональная схема приготовления жидких дрожжей включает следующие основные стадии:

- приготовление заварки из муки и воды и ее осахаривание с использованием солода белого неферментированного или комплекса ферментных препаратов амилалитического действия;

- заквашивание осахаренной заварки термофильными молочнокислыми бактериями;
- выращивание дрожжей на заквашенной заварке.

При производстве жидких дрожжей в основном используют активные штаммы термофильных молочнокислых бактерий вида *L. delbrückii* и штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, имеющие стабильные технологические показатели и обладающие кислото- и термоустойчивостью.

Процесс приготовления жидких дрожжей состоит из 2 циклов: разводочный и производственный.

Разводочный цикл. Разводочный цикл состоит из 4 стадий общей продолжительностью 70-130 часов. При этом происходит десятикратное увеличение объема заквашенной заварки в каждой стадии (кроме последней при приготовлении маточных дрожжей). При этом происходит постепенное размножение чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей. Сначала на солодовом сусле, а затем на мучной заварке. Разводочный цикл начинается с приготовления молочнокислой закваски, которая необходима для начального заквашивания заварки.

Закваску готовят на чистой культуре бактерий Дельбрюка или с использованием активного штамма термофильных МКБ условно называемого Э-1 (активный кислотообразователь). Первоначально культуру Дельбрюка пересевают в пробирку с солодовым суслом (рост 1-2 суток), затем в колбу с 100 мл сусла (рост 1-2 суток). Далее культуру последовательно размножают в емкостях с 1,5 и 100 кг заварки. Продолжительность роста каждой фазы – одни сутки, конечная кислотность – 12-14 град. Готовую молочнокислую заварку переносят в производственный чан. Через каждые 2 ч добавляют такое же количество заварки. Чан заполняется 14 ч. Температура выведения и размножения МКБ – 50-52°C.

Для приготовления *маточных дрожжей* применяют наиболее активные дрожжевые расы. Часто применяют смесь разных культур. Чистую культуру дрожжевых рас размножают в лаборатории на солодовом сусле (2 суток), затем готовят сладкую заварку и выливают в нее бродящее сусло. После 12-14 ч брожения маточные дрожжи переносят в производственный чан и туда же

добавляют закисшую охлажденную заварку. Через 2 ч после заполнения чана начинается отбор дрожжей на производство.

Производственный цикл. Цикл осуществляется по двум вариантам: приготовление жидких дрожжей на заквашенной заварке без разбавления водой и с разбавлением водой.

Стадии производства жидких дрожжей:

- приготовление заварки;
- заквашивание заварки;
- размножение дрожжей.

Приготовление заварки. Цель – накопление водорастворимых веществ (сахаров и белков), необходимых для заквашивания заварки и размножения дрожжей. Заварку готовят в заварочных машинах ХЗМ-300 при соотношении муки и воды 1:3 с использованием горячей воды (75-80 °С). При применении пара инактивируются ферменты муки, такая заварка требует дополнительного осахаривания. Влажность заварки – 70-75%, начальная температура – 65-67 °С. Для накопления большого количества сахара и водорастворимых белковых веществ заварку оставляют на осахаривание на 3-4 ч, добавляя при этом солод (1-2%). Вместо солода можно добавлять амилолитические ферментные препараты Амилоризин П10Х или Глюкаваморин Г20Х в сочетании с Амилоризином П10Х и их зарубежные аналоги, при этом содержание аминного азота увеличивается. При использовании ферментных препаратов отпадает необходимость в стадии осахаривания, т.к. оптимальная температура их действия и жизнедеятельности молочнокислых бактерий совпадают (48-50 °С).

Обеспеченность термофильных молочнокислых бактерий и дрожжей питательными веществами определяется химическим составом мучной заварки, которая зависит от вида используемого сырья, внесения добавок и степени биохимических превращений их компонентов. Содержание питательных веществ в мучной заварке зависит от следующих факторов: сорта муки, соотношения муки и воды, продолжительности заквашивания, количества накопленной кислоты. Целесообразно использовать муку ржаную, пшеничную второго сорта и обойную – сорта богатые витаминами и гидролитическими ферментами.

Заквашивание заварки. Цель – накопление большого количества молочной кислоты, которая обеспечивает оптимальные условия среды для последующего размножения дрожжей. Молочная кислота надолго задерживает развитие нежелательной микрофлоры в полуфабрикатах, стимулирует размножение дрожжей, улучшает свойства теста и качество хлеба. Приготовленную заварку направляют в чан для заквашивания при температуре 48-52о С. В заварке происходит молочнокислое брожение до кислотности 14-16 град в течение 8-14 ч. Затем через каждые 2 ч часть заквашенной заварки перед поступлением в чан для размножения разбавляют холодной водой до 28о С и влажности 90%. На продолжительность процесса заквашивания заварки влияет температура. При медленном накоплении кислотности (более 7ч) температуру заварки поддерживают на уровне 48о С, при ускоренном кислотонакоплении – 54-55 оС. Бактерии *L. Delbruckii* вместе с жидкими дрожжами попадают в тесто. Однако при температуре 30-32оС они не развиваются. Образованная ими молочная кислота препятствует развитию мезофильных видов молочнокислых бактерий.

Размножение дрожжей. После охлаждения до 30 оС заквашенная заварка и дрожжи, приготовленные в ней, становятся стабильными, так как термофильные и мезофильные бактерии оказываются недейтельными. Размножение дрожжей происходит при температуре 28-30 оС в течение 6-8 ч. Затем каждые 2 ч ¼ часть готовых дрожжей отбирают на производство, в оставшуюся часть добавляют соответствующее количество разбавленной заквашенной заварки. Большинство хлебопекарных предприятий применяют двухчасовой ритм отбора дрожжей на производство. На некоторых предприятиях происходит непрерывный процесс приготовления жидких дрожжей. Полученные жидкие дрожжи имеют подъемную силу 25-30 мин, кислотность 7-9 град, влажность 78-83%.

Адаптивное регулирование биотехнологических свойств жидких дрожжей.

Многочисленными научными коллективами проведены исследования по разработке способов улучшения биотехнологиче-

ских свойств жидких дрожжей на основе оптимизации составов питательных сред для их выращивания, а также параметров и условий их приготовления. В ГосНИИХП разработаны научные направления улучшения свойств жидких дрожжей. При производстве жидких дрожжей ранее использовались следующие штаммы бактерий: Э-1, БДА, Д-76, 60. Их применение не удовлетворяло в полной мере требования промышленности, так как длительность процесса заквашивания заварок составляла 10-12 часов, что приводило к увеличению продолжительности производственного цикла, снижению качества жидких дрожжей и соответственно качества хлеба. В результате проведенных исследований селекционированы более активные штаммы микроорганизмов: – штамм термофильных молочнокислых бактерий 30-1 отличается повышенной кислото- и термотолерантностью при кислотности от 17 до 22 град и температуре от 55 до 70° С. При его применении в производстве жидких дрожжей продолжительность заквашивания заварки сокращается до 6 ч, улучшаются свойства жидких дрожжей по подъемной силе, и повышается качество хлеба; – штамм термофильных молочнокислых бактерий вида *L. delbrückii* 30-2, полученный методом адаптации, который проявляет жизнедеятельность на субстрате, содержащем 25% молочной сыворотки. Этот штамм широко используется на предприятиях регионов России и СНГ в производстве жидких дрожжей и при приготовлении теста с молочной сывороткой;

– штамм дрожжей 69, полученный методом гибридизации, обладает высокой скоростью роста, высокой ферментативной активностью, а также устойчивостью к повышенной температуре (40–45°С),

– штамм 5, имеющий низкую осмочувствительность, благодаря чему используется в промышленности в качестве бродильной микрофлоры жидких дрожжей при приготовлении жидких соленых опар.

Применение сухих культур молочнокислых бактерий значительно упрощает и сокращает процесс приготовления жидких дрожжей, в том числе в разводочном цикле, за счет исключения стадий накопления культур на жидких питательных средах и пе-

ресевов чистых культур для поддержания их жизнеспособными в лабораторных условиях. Разработаны способы подготовки и выращивания чистых культур молочнокислых бактерий перед лиофилизацией, установлены оптимальные параметры замораживания и сублимации, подобраны режимы регидратации и реактивации сухих биопрепаратов. Срок сохранения активности сухих биопрепаратов при температуре 5-8°C составляет 12 месяцев.

Жизнедеятельность клеток при культивировании зависит от состава питательных сред, которые подбираются с учетом биохимических свойств и физиологических особенностей микроорганизмов, а также условий, определяющих протекание процессов обмена, в частности скорости поступления питательных веществ в клетку, температуры, pH среды, обеспеченности кислородом.

Заквашенная заварка, являющаяся питательной средой для размножения дрожжевых клеток, содержит до 30-34% на сухое вещество моно- и дисахаридов, при этом в заварках, осахаренных глюкоамилазой, содержание глюкозы достигает 23% на сухое вещество, в заварках с солодом –9,0%, в заварках осахаренных ферментным препаратом Амилоризином П10х – 6,5%. При заквашивании заварки происходит накопление значительных количеств свободных аминокислот, что связано с высокой протеолитической активностью термофильных молочнокислых бактерий.

Развитие и размножение дрожжей связаны с синтезом белков – наиболее важных компонентов клетки. Белки составляют основу структурного материала клетки. Этим определяется потребность дрожжевых клеток в азотсодержащих соединениях.

Для нормального течения физиологических процессов в дрожжевой клетке и обмена с окружающей средой необходимо, чтобы питательная среда для дрожжей была обогащена минеральными веществами. Они участвуют в активации ферментных систем клетки, регулировании осмотического давления, pH и окислительно-восстановительного потенциала.

На основании исследований многих ученых были рекомендованы следующие способы улучшения состава питательной среды для заквашивания заварки и размножения в ней дрожжей:

- применение мультиэнзимной композиции МЭК-ХП, содержащей в оптимальном соотношении амилалитические ферментные препараты грибного и бактериального происхождения, для обогащения заварок олигосахарами и доступным азотом;
- применение кукурузной, гороховой и ячменной муки в сочетании с ферментными препаратами из *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus awamori*;
- применение виноградного, абрикосового и других растительных шротов, содержащих ценные белковые и минеральные компоненты;
- применение размолотых семян томатов, содержащих 40% белка, витамины А, В1 и В2, микро- и макроэлементы Са, Р, Fe, К, Na и др.;
- применение специальных питательных смесей, состоящих из концентрата кислого вкуса, молочной сыворотки, муки и воды, как средство обогащения среды углеводами, легкодоступными для усвоения дрожжевыми клетками, веществами активизирующими размножение и жизнедеятельность микроорганизмов;
- применение питательной смеси для культивирования дрожжей, состоящей из муки, воды, соевой необезжиренной муки и порошка из яблочных выжимок. Применение соевой муки позволяет сбалансировать состав питательной смеси по содержанию углерода, азота и минеральных веществ;
- применение тыквенного порошка;
- применение яблочного порошка, гидролизованного ферментным препаратом, в количестве 5%, рисовой муки – 3%, а также инактивированной дрожжевой биомассы;
- применение осахаренных полуфабрикатов, приготовленных из муки, вторично перерабатываемого хлеба и другого крахмалсодержащего сырья, содержащих 50-70% глюкозы, 25-30% мальтозы и более 8% растворимых белковых веществ;
- применение молочной сыворотки. Для повышения кислотности среды также применяются яблочная и лимонная кислоты;
- применение комплексных дрожжевых ферментных препаратов, полученных путем обработки пивных осадочных дрожжей на ультразвуковой установке при температуре 56-58°C с сохране-

нием в них ферментов -фруктофуранозидазы, мальтазы, протеиназы, пептидазы в активном состоянии.;

- применение автолизата хлебопекарных дрожжей, влияющих на размножение дрожжевых клеток и их активность;

- применение гидролизата остаточных дрожжей спиртового производства (спиртовых дрожжей);

- применение инактивированной дрожжевой биомассы, которую получают термообработкой жидких дрожжей при температуре 80-85°C в течение 20-30 мин. Ее вносят в термофильную заквашенную заварку, при этом отмечено повышение интенсивности кислотонакопления на 30% и улучшение подъемной силы жидких дрожжей на 50% по сравнению с контролем.

На ряде предприятия южных районов в жаркий период года практикуется дозирование в жидкие дрожжи части поваренной соли (0,2% к массе муки в тесте), способной нейтрализовать низкомолекулярный белок пуротионин, обладающий токсическим действием.

Питательная смесь должна быть сбалансирована по минеральным компонентам. К числу ионов, активирующих ферменты дрожжей, относятся ионы калия, аммония, натрия, магния и др. Они могут входить в состав активного центра ферментов, стабилизирующих белковые структуры, а также являются соединительным звеном в системе фермент-субстрат. Установлена целесообразность внесения в питательную смесь для размножения дрожжей минеральных солей с анионами фосфора и хлора, от которых зависит проницаемость клетки.

Аэрация дрожжей в течение одного часа приводит к усилению роста дрожжевых клеток. После 3 ч выращивания количество их возрастает в 2,4-2,6 раза при одновременном улучшении подъемной силы.

Таким образом, усовершенствованная технология приготовления жидких дрожжей с улучшенными биотехнологическими свойствами имеет следующие технологические приемы:

- осахаривание мучной заварки ферментными препаратами глюкоамилазы и α -амилазы или использование высокоосахаренного полуфабриката при выращивании дрожжей;

- введение в заварку белоксодержащих продуктов – соевой муки, белковых концентратов из шрота хлопчатника и др., инактивированной дрожжевой биомассы;
- внесение минеральных солей $[\text{CaSO}_4, \text{MgSO}_4, \text{K}_2\text{HPO}_4, (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ в начальный период выращивания дрожжей;
- проведение аэрации среды в начальной стадии заквашивания дрожжей или дозирование в дрожжевую биомассу гомогенизированной заквашенной заварки.

Физико-химические способы улучшения качества жидких дрожжей. На ряде хлебозаводов применяется устройство, которое дает возможность отбирать верхний слой дрожжей из бродильного чана, так как дрожжи из верхних слоев, более активны, чем из нижних. Для поддержания стабильного количества дрожжевых клеток и их хорошего качества применяют сочетание механического перемешивания и аэрирования массы. Аэрирование среды воздухом проводят в течение 30 мин сразу после освежения дрожжей. Кислород воздуха значительно ускоряет размножение дрожжей. При аэрации количество клеток возрастает в 2-4 раза по сравнению с анаэробными условиями, что оказывает положительное влияние на качество полуфабрикатов и готовой продукции.

Эффективным средством улучшения качества жидких дрожжей может служить насыщение заквашенной заварки кислородом путем гомогенизации в высокоскоростном миксере.

ГосНИИХП совместно с МГУПП предложен способ улучшения качества жидких дрожжей путем обработки их ультразвуком в течение 1-3 мин при давлении 0,4-0,6 МПа.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие виды дрожжей применяются при производстве хлебобулочных изделий?
2. Какие свойства дрожжей необходимо учитывать при их производстве и использовании при производстве хлебобулочных изделий?
3. Показатели качества прессованных и сушеных дрожжей.
4. Методы повышения активности хлебопекарных дрожжей.

5. Методы стабилизации биотехнологических свойств хлебопекарных дрожжей.

14. Что представляют собой жидкие хлебопекарные дрожжи?

15. Стадии технологического процесса приготовления жидких дрожжей.

16. Преимущества и недостатки применения жидких дрожжей при производстве хлебобулочных изделий.

17. Способы улучшения биотехнологических свойств жидких дрожжей.

ТЕМА 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЗАКВАСОК

При производстве ржанных, ржано-пшеничных и пшеничных сортов изделий используют разнообразные технологические схемы культивирования микроорганизмов, обеспечивающих образование органических кислот и разрыхление полуфабрикатов. Процессы брожения ржанных и пшеничных заквасок осуществляются дрожжевыми клетками и молочнокислыми бактериями в симбиотических условиях.

Закваска – это густой или жидкий полуфабрикат, приготовленный из ржаной, ржано-пшеничной и пшеничной муки путем замеса и брожения, используемый частично для приготовления теста или опары и возобновления закваски путем ее освежения.

В хлебопекарной промышленности, перерабатывающей нестерильное сырье, особое значение имеет использование чистых культур. *Чистой культурой* называется совокупность микроорганизмов, выращенных из одной клетки и не содержащих посторонних микроорганизмов. Технически чистые культуры – культуры, содержащие незначительные примеси других микроорганизмов. Применения чистых культур молочнокислых бактерий позволяет:

- использовать определенные виды и штаммы бактерий, создавать оптимальные условия их жизнедеятельности в средах;
- комбинировать бактерии и получать продукты разнообразного вкуса, используя специфические свойства отдельных штаммов;
- обеспечивать приготовление заквасок высокого качества в наиболее короткий период времени и гарантировать подавление посторонней микрофлоры муки;
- повышать выход продукции за счет более экономного использования муки в процессе брожения;
- создавать условия для направленного управления технологическим процессом.

Сохранение чистых культур имеет большое практическое значение, поскольку жидкие культуры, обладающие большей актив-

ностью, чем сухие, не выдерживают длительного хранения, их использование ограничивается трудностями при транспортировке. Санкт-Петербургским филиалом ГосНИИХП разработана технология обезвоживания чистых культур методом лиофилизации.

В настоящее время для приготовления заквасок применяют стартеры. Стартеры – специально отобранные препараты молочнокислых бактерий в чистом виде или смешанные с дрожжами. Они инициируют брожение закваски. Выпускаются в виде жидких препаратов или сухих порошков. Главное преимущество стартеров заключается в легкости применения.

Использование стартеров позволяет:

- упростить выведение закваски и произвести закваску в один этап продолжительностью 18-24 часов.
- исключить трудоемкие фазы разведения и поддержания закваски, что необходимо по традиционной технологии.
- обеспечить стабильность показателей качества.

К недостаткам применения стартера можно отнести увеличение себестоимости продукта.

Различают следующие типы стартеров:

- стартер жидкий или закваска;
- сухой лактобактерин;
- стартер смешанный (лактобактерин и сухие дрожжи)

Состояние микроорганизмов в жидких стартерах из-за высокой активности не стабильно, поэтому их срок хранения ограничен.

Фирма Хансен разрабатывает сухой лактобактерин под маркой «Флорапан».

Французская фирма Лесафр производит стартеры марок Саф-Левен ЛВ1 и Саф-Левен ЛВ2 (табл. 2) Препараты содержат большое количество живых микроорганизмов (не менее 1 млрд. клеток дрожжей и 1млрд молочнокислых бактерий), отличаются композицией микроорганизмов по видовому составу и количеству. Стартер Саф Левен ЛВ1 содержит: дрожжи *Saccharomyces chevalieri*, молочнокислые бактерии *Lactobacillus brevis* и *Lactobacillus casei*. Стартер Саф Левен ЛВ2 содержит: дрожжи *Saccharomyces chevalieri* и молочнокислые бактерии *Lactobacillus brevis*.

Таблица 2

Рецептура густой и жидкой закваски с применением стартовой культуры Саф-Левен (при влажности ржаной обдирной муки 13,0%)

Наименование сырья	Расход сырья для закваски	
	густой	жидкой
Мука ржаная обдирная, г	500	500
Стартовая культура Саф-Левен, г	2,5	2,5
Вода, мл	371	954

Рекомендации по применения стартовых культур Саф-Левен следующие:

- Стартовая культура Саф-Левен ЛВ2 более активно накапливает кислоту в ржаных заквасках. Благодаря высокой кислотности предполагается расходовать ее в небольших количествах для достижения требуемой кислотности теста.

- Закваски, приготовленные с использованием стартовой культуры Саф-Левен ЛВ2, имеют большую кислотность (титруемую и активную), чем аналогичные закваски, приготовленные с использованием стартовой культуры Саф-Левен ЛВ1.

- Чем выше температура брожения заквасок, тем больше кислотность заквасок и хуже подъёмная сила заквасок, особенно ярко это проявляется при 35°C.

- Закваски, выведенные при 25°C, как густые, так и жидкие имеют хорошую подъёмную силу (до 20 и 22 минут соответственно), но оптимальная кислотность (11-14 для густых, 9-12 для жидких) достигается только после 24 часов брожения.

- Жидкие закваски, выведенные при 30°C, достигают оптимальную кислотность раньше, чем густые (жидкие -ЛВ2 уже к 18 часам, ЛВ1 к 21 часу, густые – к 21 и 24 часам соответственно), причём подъёмная сила заквасок, обладающих оптимальной кислотностью, хорошая.

- Закваски, выведенные при 35°C, как правило, уже после 21 часа теряют подъёмную силу при высокой кислотности.

- Подъёмная сила густых заквасок выше подъёмной силы жидких заквасок.

По ТУ 9383-006-11163857-97 ООО «М-ТЕХ ПЛЮС» г. Серпухов по разработке ГосНИИХП Россельхозакадемии (Санкт-Петербургский филиал) выпускает лактобактерин. Получение лактобактерина состоит из следующих операций:

- накопление бактериальных клеток на специальной питательной среде;
- добавление защитной среды (сахарозно-желатозной, молочно-желатозной);
- стерильное дозирование суспензии по 10 мл во флаконы;
- замораживание при температуре (-40) – (-50) °С;
- обезвоживание в вакууме до остаточной массовой доли влаги 4%;
- укупоривание в атмосфере азота.

Лактобактерин имеет вид мелкопористых таблеток кремового цвета и содержит в 1 дозе до 10 млрд живых бактериальных клеток.

Сухой лактобактерин выпускается трех видов:

- смесь штаммов *L. plantarum*-63, *L. brevis*-5, *L. brevis*-78 для густых заквасок; – смесь штаммов *L. plantarum*-30, *L. brevis*-1, *L. casei*-26, *L. fermenti*-34 для жидких заквасок;
- штамм *L. delbruckii*-76 для термофильных заквасок.

Сухой лактобактерин имеет срок годности до 12 месяцев при температуре хранения 4-6°С. Применение лактобактерина имеет следующие преимущества:

- упрощается и ускоряется приготовление заквасок в развочном цикле;
- обеспечивается стабильность свойств производственных заквасок;
- создаются благоприятные условия для развития необходимой микрофлоры;
- способствует широкому распространению в промышленности прогрессивных технологических процессов приготовления хлебобулочных изделий на чистых культурах микроорганизмов.

3.1. Способы приготовления ржанных заквасок

При выработке изделий из ржаной и ржано-пшеничной муки необходимо создание условия для интенсивного кислотонакопления. Образующиеся органические кислоты регулируют протекающие в полуфабрикатах биохимические, микробиологические, коллоидные и физико-механические процесса. Необходимая кислотность полуфабрикатов обеспечивается жизнедеятельностью специфической бродильной микрофлоры – молочнокислыми бактериями. Известно много способов приготовления заквасок. По консистенции они могут быть густыми и жидкими.

Традиционный технологический процесс производства ржаного и ржано-пшеничного хлеба, является многофазным и делится на две фазы: приготовление закваски, приготовление теста. Приготовление закваски состоит из разводочного цикла, включающего три фазы, и производственного цикла.

Разводочный цикл приготовления закваски состоит из трех фаз: дрожжевая, промежуточная и основная закваска. Целью приготовления заквасок разводочного цикла является получение определенного количества активных молочнокислых бактерий. При этом в процессе разводочного цикла увеличивается кислотность закваски. Готовую исходную закваску используют для приготовления теста. С этого момента, начинается *производственный цикл*, и дальнейшее выращивание микроорганизмов закваски проводится с отборами. От готовой исходной закваски отбирают $2/3$ или $3/4$ ее объема, а к оставшейся $1/3$ или $1/4$ добавляют такое количество муки и воды, чтобы восстановить прежний объем. Готовность заквасок определяется по конечной кислотности, подъемной силе и органолептическим показателям. В разводочном цикле может быть использована закваска предыдущего приготовления и прессованные дрожжи или чистые культуры микроорганизмов.

Тесто для хлеба из ржаной и смеси ржаной и пшеничной муки готовят на густой закваске, на жидкой закваске без заварки, на жидкой закваске с заваркой, на концентрированной бездрожжевой молочнокислой закваске. *Приготовление ржаного теста на гу-*

стой закваске Приготовление теста на густой закваске рекомендуется применять при приготовлении теста из ржаной обойной и обдирной муки, а также из смеси разных сортов ржаной и пшеничной муки. Густая закваска должна иметь влажность – 48-50%, кислотность -13-16 град из ржаной обойной или 11-14 град из ржаной обдирной муки и подъемную силу «по шарик» до 25 мин. В качестве чистых культур используют смесь Ленинградских штаммов молочнокислых бактерий *L. plantarum*-63, *L. brevis*-5, *L. brevis*-78 или сухой лактобактерин в сочетании со штаммом дрожжей *S. minor* «Чернореченский». Густую закваску, выведенную по разводочному циклу, накапливают до нужного количества и далее поддерживают в производственном цикле путем освежения с последующим выбраживанием до накопления требуемой кислотности в зависимости от сорта муки. При этом выброженную закваску в дежах делят обычно на 4 или 3 части, из которых одну часть, соответственно 25% или 33,3% в пересчете на муку, используют для воспроизводства закваски, а остальную массу расходуют на приготовление соответственно 3-х или 2-х порций теста.

При различных производственных ситуациях появляется необходимость консервации заквасок с последующей ее активацией. Существует несколько способов консервации густой закваски:

- охлаждение до 5-10 оС, при этом решающее значение имеет показатель ее готовности и скорость снижения температуры. При медленном охлаждении свежеприготовленной закваски начинают активно размножаться дрожжи. Следует охлаждать зрелую закваску кислотностью 12-14 град;

- добавление хлорида натрия (2%) или бикарбоната натрия (0,5%). Консервацию закваски на 10-12 ч можно использовать один раз, так как при добавлении консервантов ухудшается подъемная сила заквасок;

- разжижение холодной водой до влажности 70%. Температура закваски снижается до 16-20оС, а кислотность до 7-7,5 град. Уменьшение концентрации сбраживаемых сахаров тормозит микробиологические процессы. После освежения с восстановлением влажности закваски 49-50% и температуры 26-28 оС показатели брожения ее полностью восстанавливаются.

Приготовление ржаного теста на жидких заквасках. Основным преимуществом жидких заквасок является консистенция, которая позволяет транспортировать их по материалопроводам самотеком (или при помощи насосов) и создает возможность автоматизировать процесс тестоприготовления. Различают схемы приготовления жидких заквасок с мучной заваркой и без нее.

На жидкой закваске без заварки по унифицированной Ленинградской схеме можно вырабатывать хлеб из ржаной и смеси разных сортов ржаной и пшеничной муки. Сущность способа заключается в приготовлении закваски влажностью 69-75%, кислотностью 9-13 град (в зависимости от сорта муки) при подъемной силе до 35 мин. При замесе теста с жидкой закваской вносят 25-35% муки от общей массы в тесте с последующим брожением теста до накопления требуемой кислотности в зависимости от сорта хлеба. В разводочном цикле жидкую закваску выводят с применением смеси чистых культур дрожжей *S. cerevisiae* Л-1 и *S. minor* «Чернореченский» в сочетании со смесью жидких культур *L. plantarum*-30, *L. casei*-26, *L. brevis*-1, *L. fermenti*-34 или сухого лактобактерина для жидких хлебных заквасок из смеси этих же штаммов молочнокислых бактерий. В производственном цикле жидкую закваску влажностью 69-75% без заварки освежают по достижении кислотности 9-13 град через 3-5 ч (в зависимости от влажности закваски, сорта и качества муки) путем отбора 50% спелой закваски из бродильного в расходный чан и далее на замес теста и добавления в бродильный чан к оставшейся массе эквивалентного количества питательной смеси из муки и воды для воспроизводства закваски. При замесе теста с жидкой закваской влажностью $(70 \pm 1) \%$ вносят 30-35%, а влажностью 75% – 25% муки от общей массы.

На жидкой закваске с заваркой по унифицированной Ленинградской схеме вырабатывают преимущественно сорта хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки. Закваска с заваркой должна иметь влажность 80-85%, кислотность 9-12 град, подъемную силу до 30 мин. Для стимуляции жизнедеятельности дрожжей закваску освежают питательной смесью из муки и воды с добавлением заварки в количестве 20-35% к массе смеси. При замесе

теста с закваской вносят 15-20% муки от общего количества в тесте. Брожение теста продолжается до накопления требуемой кислотности в зависимости от сорта хлеба. В разводочном цикле жидкую закваску готовят с применением смеси чистых культур дрожжей *S. cerevisiae* Л-1 в сочетании со смесью чистых культур *L. plantarum*-30, *L. casei*-26, *L. brevis*-1, *L. fermenti*-34 или сухого лактобактерина для жидких хлебных заквасок из смеси этих же штаммов молочнокислых бактерий. В производственном цикле жидкую закваску с заваркой освежают по достижении кислотности 9-12 град через 3-5 ч брожения (в зависимости от влажности) путем отбора 50% спелой закваски в расходный чан и далее использования ее на замес теста и добавления в бродильный чан к оставшейся массе закваски питательной смеси из муки, воды и заварки для воспроизводства закваски. Содержание заварки в питательной смеси составляет 20 и 35% при влажности закваски соответственно 80 и 85%.

На концентрированной бездрожжевой молочнокислой закваске (КМКЗ) рекомендуется вырабатывать хлеб из ржаной муки и смеси ржаной и пшеничной муки на предприятиях, работающих в две смены или с перерывами в отдельные дни. Сущность способа заключается в приготовлении закваски влажностью 60-70%, кислотностью 18-24 град при температуре 37-40°C. Основную микрофлору представляют молочнокислые бактерии. При замесе теста с закваской расходуют 5-10% муки с последующим брожением теста до накопления требуемой кислотности в зависимости от сорта муки. В разводочном цикле КМКЗ выводят с применением смеси жидких культур *L. plantarum*-30, *L. casei*-26, *L. brevis*-1, *L. fermenti*-34 или сухого лактобактерина для жидких хлебных заквасок. Чистую культуру дрожжей не вносят ввиду высокой кислотности закваски. В производственном цикле КМКЗ освежают при соотношении спелой закваски и питательной смеси равном 1:9 отбором 90% КМКЗ кислотностью 18-22 град и добавлением эквивалентного количества питательной смеси из муки и воды.

В процессе производства хлеба путем систематического освежения закваски мукой и водой (питательной смесью) и поддержа-

ния оптимальной температуры создаются благоприятные условия для жизнедеятельности дрожжей и молочнокислых бактерий.

Для регулирования жизнедеятельности бродильной микрофлоры необходимо учитывать физиологические особенности вносимых культур и влияние на них отдельных факторов внешней среды. На развитие дрожжей и молочнокислых бактерий в ржаных и пшеничных полуфабрикатах влияет целый комплекс факторов, в частности, температура, влажность, кислотность среды, количество заварки, качество муки, микробиологическое состояние сырья и воды, а также санитарное состояние на предприятии.

Нарушения технологического процесса приготовления закваски вызывают изменения в составе микрофлоры закваски, в частности, снижение количества дрожжевых клеток и увеличение бактерий, быструю порчу закваски, ухудшение свойств теста и качества хлеба.

Важным условием производства ржаных и ржано-пшеничных сортов хлеба является строгий технологический и микробиологический контроль приготовления закваски и теста. При правильном ведении технологического процесса ржаные закваски можно готовить в течение 0,5-1 года без полного обновления заквасок.

3.2 Роль дрожжей и молочнокислых бактерий при производстве ржаного хлеба

Разнообразная микрофлора ржаных заквасок и теста представлена дрожжами *Saccharomyces* и молочнокислыми бактериями *Lactobacillus* в количественном соотношении 1:80. Наряду с *Saccharomyces cerevisiae* в тесте встречается и другой вид дрожжей – *Saccharomyces minor*. Так, при высокой кислотности (13-14 град) после 15-30 дней ведения заквасок на чистых культурах молочнокислых бактерий и дрожжах *S. cerevisiae*, используемые первоначально дрожжи не обнаруживаются. В заквасках присутствуют мелкие дрожжи *S. minor* – дрожжи, ставшие в результате естественного отбора специфическими для ржаной зак-

васки. Установлено, что дрожжи *S. minor*, не имеющие фермента α -глюкозидазы, хорошо развиваются в ржанных заквасках. Это можно объяснить высоким содержанием собственных сахаров в ржаной муке (5,5% в ржаной обойной и до 6,5% в ржаной обдирной муке). Кроме того, в результате действия ферментов муки и жизнедеятельности молочнокислых бактерий образуется некоторое количество сахаров, доступных для сбраживания данным видом дрожжей. В заквасках и тесте из ржаной муки обнаружено также некоторое количество диких пленчатых дрожжей. Молочнокислым бактериям принадлежит ведущая роль при брожении ржанных полуфабрикатов. Молочная кислота значительно влияет на реологические свойства ржаного теста. Кислотность способствует набуханию и пептизации белков ржаной муки, за счет чего увеличивается вязкость теста, возрастает его газодерживающая способность. Кроме того, содержащийся в ржаной муке активный фермент α -амилаза, обеспечивает накопление в тесте декстринов, что делает мякиш ржаного хлеба липким и заминающимся. Активность α -амилазы можно ограничить повышением кислотности закваски. Гетероферментативные молочнокислые бактерии участвуют в разрыхлении теста за счет образования диоксида углерода. Молочнокислые бактерии оказывают большое влияние на вкус и аромат ржаного хлеба. Принято считать, что вкус и аромат хлеба во многом определяются соотношением молочной и летучих кислот. Гомоферментативные виды молочнокислых бактерий образуют до 10% летучих кислот, в то время как у гетероферментативных количество летучих кислот в 2-3 раза больше (у отдельных штаммов количество кислот составляет до 34%). Гомоферментативные культуры образуют меньше органических ди- и трикарбоновых кислот, но несколько больше летучих карбонильных соединений. Гомоферментативные виды, как правило, являются более сильными кислотообразователями. Установлено, что хлеб на густых заквасках с применением одних гомоферментативных видов молочнокислых бактерий лишен специфического аромата. Развитие только гетероферментативных культур способствует большему накоплению уксусной кислоты, которая придает хлебу резкий запах и более кислый вкус. Наиболее хороший хлеб по

вкусу и аромату получается при совместном применении гомо- и гетероферментативных штаммов кислотообразующих бактерий в соотношении 1:2.

В густых ржанных заквасках присутствуют два вида молочнокислых бактерий – *L. brevis* и *L. plantarum*, что связано, очевидно, с температурным режимом приготовления густых заквасок, который близок к оптимальной температуре развития для данных видов бактерий. Другие виды молочнокислых бактерий при внесении в густые закваски не выдерживают конкуренции со спонтанной микрофлорой муки. Жидкие ржанные закваски по видовому составу кислотообразующей микрофлоры мало отличаются от густых. Однако, при брожении жидких заквасок существенную роль наряду с *L. brevis* и *L. plantarum* играют виды *L. fermenti* и *L. Casei*. По-видимому, температура жидких заквасок 32-35°C оказывает благоприятное воздействие на виды *L. casei* и *L. fermenti*, для которых оптимум температуры лежит выше 30° С. Кроме того, на видовой состав микрофлоры жидких заквасок влияет применение чистых культур. В жидких заквасках, выведенных на чистых культурах, наряду с используемыми видами молочнокислых бактерий, спонтанно развиваются другие виды, при этом большую роль играют бактерии, внесенные в разводочный цикл.

При приготовлении ржанных заквасок в процессе культивирования молочнокислых бактерий и *дрожжей последние оказывают положительное влияние* на следующие процессы:

- обогащают среду рядом экстрацеллюлярных продуктов своего метаболизма и делают ее более благоприятной для развития молочнокислых бактерий. В присутствии дрожжей последние могут развиваться в жидких средах, где они самостоятельно не размножаются (это наблюдается в питательных смесях, лишенных ряда витаминов, аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований);

- обеспечивают условия для жизнедеятельности кислотообразующих бактерий, потребляя кислород, способствующий повышению кислотности закваски, вызываемой бактериями *L. brevis* и *L. fermenti*;

- ассимилируют органические кислоты – продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

В свою очередь, *молочнокислые бактерии оказывают положительное влияние* на следующие процессы:

- обеспечивают условия жизнедеятельности *Saccharomyces*, повышая кислотность среды, угнетая конкурентные виды;

- расщепляют мальтозу на две молекулы глюкозы, которая полностью усваивается дрожжами, ускоряя газообразование в заквасках;

- некоторые виды бактерий гидролизуют сложные азотистые соединения, обеспечивая азотным питанием дрожжевые клетки.

Однако в определенных условиях дрожжи и молочнокислые бактерии могут *угнетать* друг друга:

- повышенное содержание закваски в составе питательной смеси и культивирование микроорганизмов при температуре 30°C обеспечивает интенсивное размножение дрожжевых клеток, создавая дефицит сбраживаемых сахаров для молочнокислых бактерий;

- повышение температуры закваски до 32°C неблагоприятно сказывается на жизнедеятельности дрожжей, что приводит к ухудшению подъемной силы закваски, при этом интенсифицируется кислотонакопление;

- уксусная кислота, синтезируемая молочнокислыми бактериями в количестве 1 г на 100 г закваски, тормозит жизнедеятельность всех видов дрожжей;

- молочнокислые бактерии могут паразитировать на дрожжевых клетках с разрушением последних, особенно при повышенных температурах.

Таким образом, основными типами брожения в ржаных полуфабрикатах являются спиртовое и молочнокислое гомо- и гетероферментативное. Кроме того, происходят в определенной мере другие типы брожения (пропионовокислое, бутиленгликолевое, ацетоноэтиловое, ацетонобутиловое и маслянокислое).

Молочная кислота придает хлебу кисловатый вкус, а летучие кислоты – специфический аромат. Кроме летучих кислот влияние на аромат хлеба оказывают ди- и трикарбоновые кислоты,

а также карбонильные соединения, в том числе спирты, эфиры, альдегиды, кетоны, серосодержащие соединения и многие другие. В образовании многих из них участвуют как молочнокислые бактерии, так и дрожжи.

В производственном цикле при многоступенчатом сбраживании закваски и теста из ржаной обойной муки в течение 24 часов молочная и уксусная кислоты образуются в эквимольных количествах в соответствии с анаэробным превращением пировиноградной кислоты. Установлено, что чем выше доля уксусной кислоты в общем содержании кислот, тем резче выражен кислый вкус готового изделия. Доля уксусной кислоты в общей кислотности ржаного теста составляет от 20 до 40%. Молочная кислота благоприятно влияет на пептизацию белков и амилолиз крахмала, и, соответственно, на структурно-механические свойства ржаного теста.

При повышении температуры брожения от 27 до 37°C соотношение кислот изменяется в сторону увеличения молочной кислоты. Уменьшение количества воды в закваске по отношению к муке приводит к увеличению скорости общего кислотонакопления и увеличение доли уксусной кислоты. Внесенные в закваску дрожжи принимают участие в процессе накопления кислотности, что связано с образованием угольной кислоты из диоксида углерода, снижая долю уксусной кислоты. Добавление к закваске фтористого натрия изменяет соотношение молочной и уксусной кислот в сторону уксусной. Кроме того, важным фактором регулирования соотношения молочной и уксусной кислоты в заквасках является подбор соотношения различных видов молочной микрофлоры.

При повышении кислотности среды в результате жизнедеятельности молочно-кислых бактерий повышается растворимость азотистых, веществ в воде, что приводит к снижению содержания глиадиновой и в меньшей степени глютеиновой фракции белковых веществ ржаного теста, увеличению содержания растворимых белков в закваске, увеличению количества низкомолекулярных фракций белков. Значительная часть белков ржаной муки в тесте неограниченно набухает, пептизируется, переходит в состо-

яние вязкого коллоидного раствора, составляющего основу жидкой фазы ржаного теста. Жидкая фаза ржаного теста определяет структурно-механические свойства ржаного теста: высокую вязкость, пластичность, малую способность к растяжению, низкую упругость. Недостаточная и слишком большая пептизация белковых веществ в ржаном тесте нежелательна, т. к. может привести к чрезмерному разжижению теста и снижению его способности удерживать форму при расстойке и выпечке подовых видов хлеба.

3.3 Способы приготовления пшеничных заквасок

Приготовление пшеничного теста на жидких пшеничных заквасках рекомендуется с различной целью:

- для разрыхления теста;
- при переработке муки с пониженными хлебопекарными свойствами;
- для устранения опасности возникновения картофельной болезни;
- для интенсификации созревания теста в ускоренных технологиях. Применяется более 10 различных схем приготовления жидких пшеничных заквасок. Закваски, используемые для разрыхления теста, готовят с использованием чистых культур дрожжей, а иногда культур мезофильных бактерий (Джамбульская схема и Л-4). Закваски, используемые как средство повышения кислотности полуфабрикатов и ускорения созревания теста, готовят с использованием только чистых культур молочнокислых бактерий (Казгипропищепром, ВНИИХП, КМКЗ).

Они представляют собой комбинации и ассоциации разных видов и штаммов микроорганизмов и могут применяться в жидком, сухом и пастообразном состоянии. Чаще всего в пшеничных заквасках используют молочнокислые бактерии видов *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermenti*, *L. leichmanii*, *L. delbrückii*, *L. plantarum* и дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*. Ранее микроорганизмы, предназначенные для производства пшеничных заквасок, выделяли из спонтанных заквасок или производственных сред.

Современные достижения в области биотехнологии, селекции, молекулярной биологии позволили решить задачу программного создания заквасок на основе отбора микроорганизмов с заранее заданными свойствами, полученных в результате гибридизации, мутагенеза, индукции и адаптации. Отбор микроорганизмов производится с учетом назначения той или иной пшеничной закваски, как, например, получение микробиологически чистой продукции (антибиотическое действие на спорообразующую и грибную микрофлору), придание изделиям защитных свойств благодаря обогащению -каротином и витаминами группы В и D, увеличение пищевой ценности в результате повышения содержания незаменимых аминокислот и легкоусвояемых сахаров и т. д. Кроме того, наличие в составе некоторых пшеничных заквасок дрожжевых клеток с высокой мальтазной активностью дает возможность использовать такие закваски в ускоренных схемах тестоприготовления, сократить на 30-50%, а иногда и полностью исключить использование прессованных или сушеных хлебопекарных дрожжей в рецептурах отдельных сортов хлеба и булочных изделий, что дает определенный экономический эффект предприятию, а в регионах, не обеспеченных хлебопекарными дрожжами, служит единственным способом получения хлебопекарной продукции. Источником чистых культур являются музейные штаммы, применяемые в хлебопекарной, дрожжевой, молочной промышленности, культуры, выделенные из производственных сред, заквасок спонтанного происхождения, а также природных источников.

В основе создания определенных видов заквасок лежат следующие аспекты:

- селекция высокоактивных видов и штаммов микроорганизмов с определенными физико-биохимическими свойствами, способных развиваться на мучных средах в условиях незначительной аэрации;
- дифференцированный подход к применению заквасок в зависимости от проблем и задач хлебопекарного производства с учетом принципа их направленного культивирования;
- оптимизация параметров приготовления заквасок.

Требования, предъявляемые к закваскам:

- способность развиваться на мучных средах;
- стабильность при непрерывном культивировании;
- определенный уровень ферментативной активности;
- синтез некоторых витаминов;
- наличие антибиотической активности.

Для хлебопекарной промышленности разработаны следующие виды заквасок для приготовления пшеничного теста: мезофильная, концентрированная молочнокислая, комплексная, ацидофильная, дрожжевая, пропионовокислая, «витаминная».

Мезофильная молочнокислая закваска. Мезофильную закваску применяют при переработке муки с пониженными хлебопекарными свойствами из зерна, поврежденного клопом-черепашкой, проросшего, высушенного при высокой температуре, морозобоинного и другого, а также с целью предотвращения картофельной болезни. Сущность способа сводится к накоплению высокой кислотности в закваске мезофильными молочнокислыми бактериями вида *Lactobacillus fermenti*-27 при температуре 37° С. Культура мезофильных молочнокислых бактерий *L. fermenti*-27 выделена из пшеничной закваски спонтанного брожения. Оптимальная температура жизнедеятельности бактерий составляет 37°С. В водно-мучной среде влажностью 75% из муки второго сорта они накапливают титруемую кислотность 15-16 град в течение 12 ч при температуре 37-40°С. Штамм отличается антагонистическими свойствами к бактериям *Bacillus subtilis*, споры которых являются возбудителями картофельной болезни. Специфической особенностью штамма является свойство бактерий проявлять высокую кислотообразующую активность на среде, состоящей из пшеничной муки I или II сорта и воды, без дополнительного осахаривания муки. Бактерии *L. fermenti*-27 активно проявляют жизнедеятельность при высоких значениях кислотности среды (22-25 град, pH 3,6-3,4).

Технологическая схема приготовления закваски состоит из двух стадий: разводочный и производственный циклы. Приготовление мезофильной молочнокислой закваски по разводочному циклу состоит в переходе со стерильной среды на нестерильный

субстрат и сопровождается несколькими пересевами путем увеличения объема в каждой фазе в 10 раз (1 часть исходной фазы и 9 частей питательной смеси). Для этого накопленную чистую культуру молочнокислых бактерий засевают в питательную смесь (1:9) и культивируют при температуре 35-38° С. Через 24-36 часов титруемая кислотность мезофильной молочнокислой закваски должна составлять 18-22 град для муки I сорта и 22-25 град для муки II сорта или обойной.

Производственный цикл состоит из следующих стадий:

- приготовление питательной смеси;
- приготовление закваски;
- возобновление закваски.

Рекомендуемый состав питательной смеси:

- пшеничная муки высшего или первого сорта: вода при соотношении 1:1,5;
- пшеничная муки второго сорта или обойная: вода при соотношении 1: 2.

Влажность закваски из пшеничной муки I сорта составляет 65-68%, II сорта – 72-75%. При соблюдении установленного технологического режима и рецептуры мезофильная молочнокислая закваска сохраняет стабильные технологические свойства в течение года. Закваска содержит в своем составе большую биомассу молочнокислых бактерий, ферменты, аминокислоты и витамины. Основная биомасса закваски – мезофильные молочнокислые бактерии, обеспечивающие ее высокую кислотность (рН 3,6-3,8). Мезофильная закваска применяется при выработке пшеничного хлеба из муки любого сорта, приготовленного по различным технологическим схемам. Ее используют в количестве 3-6% к массе муки при опарном способе, 8-10% – при безопарном способе производства. Кроме того, возможно одновременное использование 10-20% молочной сыворотки и 4-6% мезофильной закваски при приготовлении опары.

Концентрированная молочнокислая закваска. Использование концентрированной молочнокислой закваски (КМКЗ) рекомендуется для предприятий с прерывистым режимом работы, так как в нерабочее время КМКЗ не требует принудительного охлажде-

ния или других приемов консервирования. Приготовление КМКЗ осуществляется по Ленинградской схеме с применением жидких культур молочнокислых бактерий *L. plantarum*-30, *L. casei*-26, *L. brevis*-1, *L. fermenti*-34. Для получения заквасок используют как жидкие культуры, так и сухой лактобактерин. Использование сухих культур ускоряет и упрощает разводочный цикл, обеспечивает стабильное качество полуфабрикатов и хлеба и возможность внедрения данной технологии в любых районах страны. Оптимальная температура для жизнедеятельности молочнокислых бактерий в КМКЗ составляет 37-41° С. КМКЗ имеет влажность 60-70%, кислотность 18-24 град. Разводочный цикл включает 3 фазы. Первые две фазы проводят в условиях лаборатории при температуре 38-41°С, стимулирующей развитие молочнокислых бактерий и сдерживающей развитие дрожжевых клеток и других микроорганизмов, попадающих с мукой в закваску. В производственном цикле КМКЗ освежают при соотношении выброженной закваски и питательной смеси 1: 9. При замесе теста на КМКЗ в качестве биологического разрыхлителя вносят прессованные или жидкие дрожжи. С закваской расходуется 5-15% муки от общей массы ее в тесте с последующим брожением теста в течение 60-120 мин до требуемой кислотности в зависимости от вырабатываемого сорта хлеба.

Исследования, проведенные в ГосНИИХП, позволили значительно расширить виды пшеничных заквасок, разработать технологии пшеничных заквасок с бактерицидными свойствами, повышенным содержанием органических кислот, летучих соединений – предшественников вкусовых и ароматических веществ, синтезом витаминов А, Д, группы В, улучшенными технологическими показателями.

Основой создания новых видов пшеничных заквасок является селекция высокоактивных видов и штаммов микроорганизмов, способных развиваться на мучных средах в условиях незначительной аэрации. При этом, помимо традиционных методов селекции (выделение чистых культур микроорганизмов из спонтанных заквасок и производственных сред), используются современные методы селекции: индуцированный мутагенез, гибридизация, адаптация, комбинированные методы.

Важным этапом создания заквасок направленного действия является составление из селекционированных микроорганизмов композиций в определенных соотношениях. После формирования микробиологического состава заквасок необходимым условием их стабильности является оптимизация параметров приготовления закваски: состава и способа приготовления основного питательного субстрата, оптимума температуры, рН среды, кислотности, продолжительности выращивания, ритма отбора и возобновления закваски и др.

Источником чистых культур микроорганизмов являются музейные штаммы, применяемые в хлебопекарной, дрожжевой, молочной промышленности, культуры, выделенные из природных источников, производственных сред и заквасок спонтанного брожения. Среди музейных культур отбираются такие виды и штаммы микроорганизмов, которые по своим свойствам отвечают определенным требованиям, предъявляемым к закваскам. К ним относятся способность размножаться на мучных средах, определенный уровень ферментативной активности, стабильность свойств при непрерывном культивировании, синтез определенных витаминов, наличие антибиотической активности, температурный оптимум роста и другие показатели.

В результате приведенных исследований были созданы следующие закваски: пропионовокислая, комплексная, ацидофильная, витаминная, эргостериновая, дрожжевая.

Пропионовокислая закваска Основу пропионовокислой закваски составляет штамм *Propionibacterium freundenreichii* ssp. *shermanii* ВК. М-103. Данная закваска разработана для получения наиболее эффективного биотехнологического средства предотвращения картофельной болезни хлеба и его плесневения. Использование пропионовокислой закваски эффективно для повышения микробиологической чистоты сырья и продукции, в том числе в технологиях с применением пшеничных и ржаных отрубей. Пропионовая и муравьиная кислоты, синтезируемые этим штаммом, оказывают максимальное ингибирующее действие на развитие споровых бактерий, подавляя флавиновые ферменты дыхательного цикла.

Кроме того, эта культура в процессе метаболизма накапливает значительные количества витамина В12, уровень которого можно регулировать путем введения в среду солей кобальта. Этот витамин участвует в процессе кроветворения, поэтому применение данной закваски имеет двойное значение: для предотвращения развития в хлебе микробиологической инфекции и обогащение его витамином В12, который необходим для людей, проживающих в регионах с повышенным уровнем радиации, вблизи металлургических и химических производств, а также для детей с признаками анемии.

В пропионовокислой закваске обнаружен высокий уровень аминокислот, 11 летучих компонентов, в том числе, соединения, содержащие amino-, метилгруппы, фуран, циклические углеводы, ацетальдегид, уксусная, пропионовая, муравьиная кислоты. Пропионовокислая закваска характеризуется следующими биохимическими и технологическими показателями: бактерицидная активность 100%, фунгицидная активность 100%, количество клеток $200-250 \times 10^7/\text{г}$ кислотность 12-14 град.

Комплексная закваска. При приготовлении закваски используют музейные штаммы трех видов молочнокислых бактерий *L. casei*-C1, *L. brevis*-B78, *L. fennenti*-34, пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freundenreichii* ssp. *shermanii* ВК. М-103 и дрожжи *S. cerevisiae* в соотношении 0,5:0,25:0,25:0,02:1. В качестве питательного субстрата для приготовления закваски используется мучная осахаренная заварка, которая готовится из пшеничной муки первого сорта при соотношении муки и воды 1:3. При непрерывном ведении комплексной закваски в течение 3 недель получены стабильные показатели комплексной закваски.

Комплексная закваска является разнообразной по химическому составу, в ней обнаружено 20 летучих компонентов. Среди них преобладающими являлись 3-метил-бутанол (22,99%), эфир муравьиной кислоты (18,52%), 1-метилокси-2-пропанол (17,24%), уксусная кислота (7,02%), производные пропанола, этанола и бензэтанола (3,19%, 2%, 3,83% соответственно). Комплексная закваска обладает антибиотической активностью к спороносным бактериям и плесеням. Проведенный сравнительный анализ ми-

кробиологического состава, ферментативной активности, бактерицидных и технологических свойств комплексной закваски позволил рекомендовать ее в качестве улучшителя качества изделий из муки со слабой клейковиной, при ускоренном способе тестоприготовления, а также в технологиях изделий с пшеничными отрубями. Закваска может быть использована с частичной или полной заменой прессованных дрожжей. Биохимические и технологические характеристики комплексной закваски следующие:

- мальтазная активность 65-70 мин;
- антибиотическая активность: – по отношению к спорообразующим бактериям полное подавление в течение 48 ч; – по отношению к плесеням – подавление в течение 72 ч;
- подъемная сила 15-20 мин;
- кислотность 8-12 град;
- количество клеток: – дрожжей 23-25 10⁷/г; – молочнокислых бактерий (суммарное) 120-130 10⁷/г; – пропионовокислых бактерий (суммарное) 1,5-2,0 10⁷/г.

Ацидофильная закваска. При приготовлении закваски используют музейные культуры *L. asidophilus*-146 и штамм дрожжей «Рязанские-17», адаптированного к высоким температурам (40–45° С). В ацидофильной закваске обнаружен высокий уровень аминокислот: содержание лизина составляет 1585 мг/100г, лейцина -1275 мг/100 г, валина 510 мг/100 г. В ацидофильной закваске идентифицированы следующие летучие вещества: 3-метил-бутанол, уксусная кислота, 1-метил-пропанол, пропионовая кислота и др. Применение ацидофильной закваски эффективно для улучшения качества изделий с крепкой клейковиной, при ускоренных технологиях приготовления теста, а также при выработке батонов и сдобных изделий с высоким содержанием сахара и жира. Закваска может быть использована для частичной или полной замены прессованных дрожжей. Ацидофильная закваска характеризуется устойчивостью к повышению температуры, имеет следующие биохимические и технологические показатели: подъемная сила 10-14 мин; кислотность 9-12 град; содержание клеток дрожжей 35-40х10⁷/г; содержание молочнокислых бактерий 200-250х10⁷/г.

Витаминная закваска. При приготовлении закваски используют дрожжи вида *S. cerevisiae* штамм Фр-3, молочнокислые бактерии *L. acidophilus*-146, пропионовые бактерии *Propionibacterium freundenreichii* ssp. *shermanii* вида ВКМ-103 в соотношении: 1:1:0,5:0,2, а также активный штамм каротинсинтезирующих дрожжей вида *Bullera armeniosa* Сб-206, который не обладает бродильной активностью и имеет низкую скорость роста, но активно накапливает каротин.

Витаминная закваска с высоким содержанием β -каротина и витамина В12 обладает бактерицидными и радиопротекторными свойствами. В качестве основного субстрата для получения закваски необходимо использовать мучную осахаренную заварку влажностью 82-85%. Процесс выращивания продолжается в течение 5-6 ч при температуре 22-25° С.

Применяется витаминная закваска для улучшения качества изделий из муки со слабой клейковиной, при ускоренном способе тестоприготовления с использованием прессованных дрожжей, для повышения пищевой ценности готовых изделий, что является актуальным в экологически неблагоприятных регионах.

Эргостериновая закваска. При приготовлении закваски используют мезофильные молочнокислые бактерий *L. plantarum*-А63, *L. casei*-С1, *L. plantarum*-30, а также дрожжевые клетки – гибрид 576. Этот штамм обладает высокими биохимическими и технологическими свойствами и способен к повышенному синтезу эргостерина (витамина D).

Максимум кислотонакопления в тесте с эргостериновой закваской (8,2-8,4 град) наблюдается через 1,5-2ч. Отличительными свойствами эргостериновой закваски является наличие бродильной активности, обуславливающей возможность частичной замены прессованных дрожжей эргостериновой закваской. Процесс брожения наиболее интенсивно происходит при замене 50% от рецептурного количества прессованных дрожжей на 15% эргостериновой закваски (к массе муки в тесте). Использование эргостериновой закваски при приготовлении хлеба и хлебобулочных изделий способствует увеличению удельного объема на 9-20%, пористости – на 2-4%, сжимаемости – на 10-15% по сравнению

с контролем. Кроме того, повышается пищевая ценность изделий за счет обогащения изделий витамином D. Закваска рекомендуется для применения в регионах экологического неблагополучия.

Мезофильная дрожжевая и дрожжевая закваски. Для создания дрожжевых заквасок в регионах с низкими значениями среднегодовых температур (взамен жидких дрожжей) используются штаммы молочнокислых бактерий *L. casei*-C1, *L. plantarum*-A63, способных развиваться при температуре 25-28°C, и дрожжи *S. cerevisiae* штамм «Фр-3».

При использовании перечисленных культур достигаются наилучшие технологические показатели мезофильной дрожжевой закваски. При использовании мезофильной дрожжевой закваски процесс газообразования в тесте интенсифицируется, сокращается продолжительность брожения. Отмечается увеличение удельного объема хлеба на 15-20%, пористости – на 2-3%, общей упругой деформации – на 35-40% по сравнению с пробами хлеба, приготовленными на традиционных жидких дрожжах. Вариантом дрожжевой закваски является закваска, созданная на основе высокоактивного штамма дрожжей «Краснодарская-II», который был выделен из закваски спонтанного происхождения, применяемой на одном из хлебозаводов г. Краснодара. Отличительной особенностью дрожжевой закваски является возможность использования для выращивания дрожжей водно-мучной среды. В производственных условиях дрожжевая закваска может быть использована взамен жидких дрожжей для приготовления хлеба из муки пшеничной первого и второго сорта на тех предприятиях, где отсутствуют условия для приготовления осажаренной мучной заварки. Обновление дрожжевой закваски осуществляется по мере снижения свойств, но не реже 1 раза в месяц. Дрожжевая закваска обладает следующими биохимическими и технологическими свойствами: мальтазная активность 60-62 мин; подъемная сила 20-25 мин; кислотность 8-10 град; количество клеток дрожжей 20-30х 10⁷/г. Применение новых пшеничных заквасок в хлебопекарном производстве позволяет экономить прессованные дрожжи, интенсифицировать процесс газообразования, улучшать качественные показатели готовых изделий.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что представляет собой закваска?
2. Преимущества использования чистых культур микроорганизмов при приготовлении заквасок?
3. Преимущества использования лактобактерина. стартеров при приготовлении заквасок?
4. Что представляет собой разводочный цикл приготовления закваски?
5. Способы консервации закваски?
6. Какие микроорганизмы присутствуют в ржанных полуфабрикатах?
7. Чем отличаются гомоферментативные и гетероферментативные молочнокислые бактерии?
8. На какие процессы, происходящие в ржанных полуфабрикатах, оказывают положительное влияние дрожжи?
9. Какие компоненты должна содержать питательная среда для обеспечения нормальной жизнедеятельности молочнокислых бактерий и дрожжей?
10. С какой целью применяются жидкие пшеничные закваски при выработке изделий из пшеничной сортовой муки?
11. Какие виды жидких пшеничных заквасок применяют при выработке изделий из пшеничной сортовой муки?
12. Что представляют собой закваски с целенаправленным культивированием микроорганизмов?

ТЕМА 4: ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ МУЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

При производстве мучных изделий используются как промышленные ферментные препараты растительного и микробного происхождения, так и ферментные системы сырья и микроорганизмов в процессе их жизнедеятельности в полуфабрикатах.

В технологии хлеба ферментные препараты используют для корректировки хлебопекарных свойств муки, регулирования метаболизма дрожжевых клеток и молочнокислых бактерий, достижения желаемых реологических свойств теста, получения изделий с улучшенными свойствами и замедления процесса их черствения, для получения ферментированных гидролизатов.

Выпускают ферментные препараты различной степени концентрирования и очистки. Многие виды отечественных ферментных препаратов имеют названия и индексы, в которых отражена информация о продуценте фермента (виде микроорганизма), основной активности и способе выделения препарата. Название таких препаратов состоит из двух частей: первая соответствует виду основной активности, вторая – видовому названию продуцента. Например, Амилаسوبтилин – препарат-амилазы из культуры *B. subtilis*, Глюкаваморин – препарат глюкоамилазы из *A. awamori*, Целловиридин – препарат целлюлазы из *T. viride*.

Различают препараты, выделенные из глубинной культуры, в их названии имеется обозначение «Г» (глубинный), и из твердой фазы – «П» (поверхностный). Затем следует цифровой индекс, который характеризует степень концентрирования фермента в препарате по отношению к культуральной жидкости или твердофазной культуре. Так препараты с индексом Г10х должны иметь активность в ед/г в 10 раз выше, чем средняя активность культуральной жидкости в ед/мл. Наряду с препаратами, имеющими

буквенно-цифровую индексацию, распространены препараты с названиями, в которых отражены основной вид активности, величина активности, название фирмы-производителя и т. д.

Ферментные препараты могут быть твердыми и жидкими, иммобилизованными, а также пролонгированного действия. Твердые ферментные препараты, как правило, стандартизованы солью, крахмалом, мукой и другими веществами в зависимости от области применения. В хлебопекарной промышленности они находят наибольшее применение. Кроме того, твердые ферментные препараты производятся в сыпучем и таблетированном виде. Жидкие формы стабилизируются консервантами.

4.1 Амилолитические ферментные препараты

Для гидролиза крахмала используются амилолитические ферментные препараты, обладающие α -амилазной и глюкоамилазной активностью. В зависимости от условий культивирования микроорганизмов и способов получения препаратов активность ферментов колеблется в широких пределах, при этом важно наличие сопутствующей активности. Ферментные препараты, обладающие α -амилазной активностью, могут быть бактериального и грибного происхождения, что определяет их характеристики и условия действия в полуфабрикатах.

Принцип действия α -амилазы заключается в гидролизе α -1,4-глюкозидных связей в полисахаридах, содержащих три и более остатков D-глюкозы, соединенных α -1,4-связями, причем эти связи разрываются беспорядочно (что определяет α -амилазу как эндофермент), в результате чего образуются низкомолекулярные декстрины, в также небольшое количество мальтозы. Расщеплению подвергается как амилоза, так и амилопектин крахмала.

Применение α -амилазы повышает содержание сбраживаемых сахаров в тесте, что приводит к интенсификации процесса созревания полуфабрикатов, увеличению количества декстринов, в также способствует сохранению свежести хлеба. При добавлении ферментных препаратов в оптимальных дозировках увеличивает-

ся объем хлебобулочных изделий, улучшается структура их пористости, мякиш становится более эластичным, улучшаются вкус и аромат хлеба, корка приобретает более интенсивную окраску и глянец, улучшенные структурно-механические свойства хлеба сохраняются более длительное время.

В России выпускают следующие амилолитические ферментные препараты: с активной α -амилазой – Амилоризин (10х, Г20х), Амилосубтилин Г10х; глюкоамилазой – Глюкоамилаза очищенная. В составе Амилоризина П10х содержится комплекс ферментов: α -амилаза, экзопептидаза, ксиланаза, β -глюканаза, β -глюкозидаза.

Продуцентом Амилоризина П10х является плесневой гриб *Aspergillus oryzae*. Амилосубтилин Г10х представляет собой очищенный ферментный препарат, продуцируемый бактериями *Bacillus subtilis*. Препарат содержит α -амилазу, β -глюканазу и эндопептидазу. Бактериальная α -амилаза по сравнению с грибной обладает высокой термостабильностью. Амилоризин П10х и Амилосубтилин Г10х оказывают наиболее эффективное действие при добавлении к муке с упругой, недостаточно эластичной клейковиной, с пониженной и нормальной сахарообразующей способностью (180-250 мг мальтозы на 10 г муки). Так как амилолитические препараты имеют сопутствующую протеолитическую активность, это затрудняет их использование при переработке муки с пониженным содержанием клейковины, а также слабой по силе.

Фирмами «Quest Int. Nederland B.V.» (Нидерланды), «Novozymes» (Дания) и «Danisco Ingredients» (Дания) выпускается целый ряд ферментных препаратов, обладающих амилолитической активностью. Отличительной особенностью ферментных препаратов, предлагаемых зарубежными фирмами, является их агломерированный вид, получаемый в результате специальной технологии, что позволяет снизить распыление этих продуктов, а также отсутствие или низкая активность сопутствующих ферментов.

Препараты Fungamyl BG (Фунгамил), приготовленный на основе очищенной грибной амилазы (оптимум pH 4,5-5,0, тем-

пературы 53-55° С), Biobake P cone (Биобейк), Grindamyl A 1000 (Гриндамил) характеризуются низким уровнем глюкоамилазной и протеиназной активности, что позволяет применять их при переработке муки с различными хлебопекарными свойствами. Оптимальная дозировка ферментного препарата зависит от его активности: для Амилоризина П10х она составляет 0,001-0,002%, Фунгамил 2500 BG – 0,0004-0,001%, Гриндамил А 1000-0,001-0,005% к массе муки.

Ферментные препараты Фунгамил Сутр МА (АХ), Биобейк 721 и Гриндамил S 100 разработаны для коррекции низкой амилазной активности муки, а также для улучшения структуры мякиша, повышения объема хлебобулочных изделий и продления срока сохранения свежести. В дополнение к α -амилазной, препараты содержат оптимальное количество пентозаназной активности.

Ферментные препараты Novamyl (Новамил), Биобейк 2000, Гриндамил MAX-LIFE U4 и Гриндамил MAX-LIFE E5 предназначены для удлинения срока сохранения свежести хлеба. Рекомендуемая дозировка Новамила составляет 0,006-0,06% к массе муки (6-50 г на 100 кг муки). Препарат можно использовать в производстве широкого ассортимента хлебобулочной продукции, включая изделия из цельнозернового зерна. Новамил воздействует в процессе выпечки на крахмал мякиша хлеба, вызывая образование низкомолекулярных декстринов. Эти декстрины препятствуют взаимодействию крахмала и клейковины, а также ретроградации крахмала. Глюкоамилаза – экзофермент, катализирующий отщепление глюкозы от нередуцирующего конца амилозы и амилопектина. Глюкоамилаза расщепляет с наибольшей скоростью α -1,4-гликозидные связи, способна гидролизовать –1,6- и –1,3-гликозидные связи. Механизм гидролиза – последовательный гидролиз нескольких гликозидных связей в одной молекуле субстрата. Эффективность действия глюкоамилазы тем выше, чем выше молекулярная масса субстрата. Максимальная активность глюкоамилазы проявляется при pH 4,3-5,7 и температуре 40-70° С.

Фирмой «Novozymes» выпускается ферментный препарат глюкоамилаза AMG, продуцируемый *Aspergillus niger* и гидроли-

зующий 1,4-, а также 1,6- α -глюкозидные связи амилозы и амилопектина с образованием глюкозы и небольшого количества декстринов. Добавление AMG в количестве 0,003-0,03 % к массе муки способствует интенсификации газообразования в тесте, улучшению цвета корки изделий и структурно-механических свойств мякиша. Эффективность действия ферментного препарата AMG возрастает при совместном его использовании с α -амилазой и ксиланазой. Оптимальными условиями действия препарата являются pH 3-5 и температура от 40 до 70° С. Ферментный препарат глюкоамилазы применяется при приготовлении хлеба ускоренным способом, в том числе с использованием концентрированной молочнокислой закваски, а также при производстве высокоосахаренных ферментативных полуфабрикатов и жидких дрожжей.

При приготовлении теста на концентрированной молочнокислой закваске (КМКЗ) положительные результаты дает использование ферментных препаратов, проявляющих глюкоамилазную активность. Физико-химические свойства КМКЗ (влажность, pH) соответствуют оптимуму действия грибной глюкоамилазы, оптимальными условиями действия которой составляют pH –

4,0 и температура 45-60° С. Пшеничный хлеб, приготовленный на КМКЗ с глюкоамилазой, обладает более высокими показателями качества, чем на КМКЗ без добавок. При этом отмечается значительное увеличение в хлебе альдегидов, эфиров, ароматических и гетероциклических соединений, то есть ароматизирующих веществ.

Применение амилолитических ферментов при производстве хлеба из ржаной муки снижает количество амилодекстринов и за счет этого уменьшится липкость и заминаемость хлеба. Добавление глюкоамилазы при приготовлении закваски (густой, жидкой, КМКЗ) повышает удельного объема хлеба, его пористость, улучшает структурно-механические свойства мякиша. Комплекс амилолитических ферментов, обладающих α -амилазной и глюкоамилазной активностью в сочетании с пирогосфатом натрия (питание дрожжей) дает хорошие результаты при использовании ржаной муки с различными хлебопекарными свойствами, в боль-

шей степени с пониженной автолитической активностью. Сокращается продолжительность брожения закваски, повышается подъемная сила полуфабрикатов, становится более выраженным вкус и аромат хлеба.

Комплекс ферментных препаратов α -амилазы и глюкоамилазы находит применение при получении высокосахаренных ферментативных полуфабрикатов (ВФП), внесение которых в рецептуру хлеба сокращает продолжительность процесса тестоприготовления и расход сахара. Для приготовления ВФП используют различные крахмалсодержащие продукты: пшеничную, ржаную муку и муку зерна тритикале, а также рисовую муку, крахмальное молоко, крахмал-сырец, черствый хлеб. Осахаривание проводят в течение 6 ч при температуре 60-65°C и pH 4-4,2, что обеспечивается применением лимонной, ортофосфорной кислоты или молочной сыворотки. Количество глюкозы в ВФП из различных видов сырья колеблется в пределах 50-75%, составляя в ВФП из пшеничной муки 1 сорта 66-68%, из крахмального молока – 75%, из рисовой муки – 50% к массе сухих веществ. Степень гидролиза крахмала в ВФП из пшеничной муки 1 сорта составляет 73-75%, из хлеба пшеничного 1 сорта – 84-85%, рисовой муки – 66-68%. Промышленный способ получения ВФП основан на использовании комплекса препаратов Глюкаваморина и Амилоризина. Амилоризин П10х имеет протеолитический комплекс с выраженной экзопептидазной активностью. В результате происходит гидролиз белков муки до аминокислот и пептидов. Легкоусвояемые формы азота стимулируют размножение и синтез ферментов дрожжей. Использование ВФП при замесе теста приводит к увеличению подъемной силы дрожжей, скорости сбраживания сахаров, что позволяет сократить продолжительность тестоприготовления. ВФП эффективны при использовании как в однофазных (безопарных, ускоренных), так и опарных способах приготовления теста.

В рецептуру многих хлебобулочных изделий входит молочная сыворотка, различные виды которой (сыворотка молочная концентрированная, сыворотка молочная сгущенная, сыворотка молочная сухая) содержат от 13 до 95% сухих веществ, в состав

которых входят белок, лактоза, жиры, минеральные вещества и витамины. Содержание лактозы составляет до 90% на сухое вещество сыворотки. Известно, что лактоза не сбраживается хлебопекарными дрожжами. При расщеплении лактозы, катализируемом β -галактозидазой (лактазой), образуется эквивалентное количество глюкозы и галактозы. Глюкоза легко сбраживается хлебопекарными дрожжами, а галактоза является активным компонентом реакции меланоидинообразования. Продукты гидролиза лактозы более сладкие, хорошо усваиваются организмом человека. Гидролиз лактозы повышает эффективность использования молочной сыворотки в хлебопечении. Источником получения β -галактозидазы являются различные микроорганизмы: дрожжи, бактерии и грибы. Бактериальные и дрожжевые препараты проявляют наибольшую активность в нейтральном диапазоне pH (6,9-7,2). Грибные препараты имеют оптимум действия pH 3,6-5,3, отличаются большей стабильностью и широкой специфичностью субстрата.

Установлено, что эффективность применения ферментных препаратов β -галактозидазы зависит от соответствия оптимальных условий действия ферментного препарата параметрам технологического процесса и определяется их активностью. Отмечается интенсификация процесса созревания полуфабрикатов с использованием β -галактозидазы, что выражается в увеличении скорости газообразования, повышении кислотонакопления и в конечном итоге улучшает качество готовых изделий.

4.2 Цитолитические ферментные препараты

Под цитолитическими ферментными препаратами понимают препараты, обладающие гемицеллюлазной, пентозаназной и целлюлазной активностями. В настоящее время находят практическое применение ферментные препараты, обладающие гемицеллюлазной активностью. Они воздействуют на нерастворимые высокомолекулярные ксиланы, глюканы, арабинаны, и другие нерастворимые полисахариды, содержащиеся в муке. Внесение

гемицеллюлазы в тесто увеличивает долю водорастворимых пентозанов, что способствует увеличению доли связанной влаги в полуфабрикатах и приводит к увеличению их водопоглотительной способности, улучшению реологических свойств теста. Известно, что пентозаны обладают высокой водопоглотительной способностью (1 г пентозанов поглощает до 15 г воды). Добавление в тесто из муки высоких выходов, содержащих существенное количество оболочечных частиц зерновки, ферментных препаратов, обладающих гемицеллюлазной активностью, сопровождается увеличением удельного объема хлеба до 30%. Степень ферментативного гидролиза некрахмальных полисахаридов под действием цитолитических ферментов определяется исходным составом сырья, типом используемых ферментных препаратов, параметрами технологического процесса и видом мучных изделий. Полный гидролиз гемицеллюлаз до олигосахаров эффективен при приготовлении бисквитного теста.

Ферментные препараты, обладающие гемицеллюлазной активностью, являются комплексными препаратами, состав которых и активность зависит от продуцента, роль которого выполняют различные бактерии и микроскопические грибы.

Отечественный цитолитический ферментный препарат, продуцентом которого является культура гриба *Trichothecium gozeum*, обладает гемицеллюлазной, целлобиазной, пентозаназной активностями. Цитороземин П10х, который отличается высокой цитолитической и незначительной амилолитической и протеолитической активностью. Добавление его в тесто в количестве от 0,01 до 0,1 % к массе муки способствует дополнительному обогащению теста редуцирующими сахарами, приводит к значительному накоплению в нем водорастворимых пентозанов, изменению упруго-эластичных свойств клейковины, улучшению реологических свойств теста, что приводит к увеличению удельного объема хлеба. Высокую эффективность при переработке ржаной муки имеет препарат Целлофторин, выделенный из культуры гриба рода *Muceliophthora* и обладающий целлюлазной и ксиланазной активностью с оптимумом действия pH 4,0-6,5 и температуры 50-70° С.

Ферментный препарат Пентопан Моно BG представляет собой очищенную эндо-1,4 β -ксиланазу (пентозаназа), которая продуцируется генетически модифицированным штаммом *Aspergillus oryzae*. Применение препарата Пентопан Моно BG способствует стабильности свойств теста, особенно при перерастойке; увеличению подъема теста при выпечке и, следовательно, объема хлеба, улучшению структуры и корочки. Пентопан Моно BG можно использовать при производстве хлебобулочных изделий широкого ассортимента. Пентопан Моно BG обладает синергетическим эффектом при использовании совместно с грибной амилазой и другими ферментными препаратами. Применение Пентопан Моно BG при приготовлении хлебобулочных изделий позволяет улучшить эластичность клейковинного каркаса теста путем воздействия как на растворимые, так и на нерастворимые пентозаны муки. Тесто характеризуется наибольшей стабильностью и наилучшими структурно-механическими свойствами, особенно при разделке. Хлеб, приготовленный с использованием этого препарата, обладает оптимальной структурой мякиша и высоким объемом. Препарат инактивируется в процессе выпечки готовых изделий. Благодаря высокой чистоте дозировка Пентопана Моно BG существенно ниже, чем при использовании традиционной гемицеллюлазы. Рекомендуемая дозировка составляет 2-5 г на 100 кг муки.

4.3 Протеолитические ферментные препараты

Ферментные препараты, обладающие протеолитической активностью, изменяют структуру клейковинных белков, увеличивают количество низкомолекулярных азотистых веществ, используемых дрожжами для питания, в результате чего интенсифицируется процесс брожения полуфабрикатов. Использование протеолитических ферментов целесообразно при переработке муки с чрезмерно сильной или короткорвущейся клейковиной, так как ферменты этой группы оказывают деструктурирующее действие на клейковину муки.

Применение протеолитических ферментов способствует улучшению реологических свойств теста для затяжного печенья, слоеного бездрожжевого теста, крекера, галет, вафель и др. В нашей стране производится ферментный препарат с протеолитической активностью Протосубтилин П10х, продуцентом которого является глубинная культура *Bacillus subtilis*. Сопутствующими ферментами являются ксиланаза, амилаза, эндоглюканаза. Оптимальные условия действия: pH 7-7,5, температура 50° С.

Для переработки муки с сильной клейковиной фирма «Novozymes» выпускает ферментный препарат Neutrase (Нейтраз). Нейтраз содержит нейтральную часть протеаз *Bacillus subtilis*. Оптимальные условия для действия препарата: pH 5,5-7,5 и температура 40-50°С.

4.4 Липолитические ферментные препараты

Практическое значение имеет использование ферментных препаратов, обладающих липолитической активностью, осуществляющих гидролиз триацилглицеридов. Образующие промежуточные продукты гидролиза масел и жиров моно- и диглицериды обладают поверхностно-активными свойствами и оказывают улучшающее действие на полуфабрикаты и готовые изделия.

В качестве препарата, проявляющего липазную активность, фирма «Novozymes» предлагает продукт Lipopan 50 BC {Липопан 50 BC}, продуцентом которого является генетически модифицированный штамм *Aspergillus oryzae*. Применение этого препарата позволяет улучшать реологические свойства полуфабрикатов, облегчать условия разделки теста, структурно-механические свойства мякиша, его цвет, увеличивать объем готовых изделий и их пористость, особенно при производстве хлебобулочных изделий с жировыми продуктами (растительным маслом) При совместном использовании липазы с ферментным препаратом амилолитического действия наблюдается синергетический эффект. Оптимальные дозировки Липопан 50 BC составляет 0,001-0,005% к массе муки.

Установлено, что внесение ферментного препарата липазы улучшает структурно-механические свойства мякиша хлеба, его эластичность, текстуру, упругие свойства, а также продлевает срок свежести готовых изделий. Использование препарата липазы позволяет уменьшать содержание жировых продуктов в рецептуре хлеба без снижения показателей качества готовых изделий.

4.5 Окислительные ферментные препараты

В последние годы в качестве улучшителей окислительного действия находят применение ферментные препараты глюкозооксидазы. Препарат катализирует окисление глюкозы кислородом с образованием γ -глюканолактата, который превращается в глюконовую кислоту и пероксид водорода. Внесение глюкозооксидазы при замесе теста вызывает окисление свободных сульфгидрильных групп в структуре клейковинных белков, посредством чего образуются дисульфидные связи, способствующие укреплению теста, увеличению эластичности теста, увеличению объема изделий.

Для производства ферментного препарата глюкозооксидазы применяют различные виды грибов: *Aspergillus niger*, *Penicillium vitale* и др.

Ферментный препарат Gluzyme (Глюзим) является препаратом глюкозооксидазы с активностью фермента каталазы, продуцируемой *Aspergillus niger*. Он может быть использован в качестве добавки, обеспечивающей окислительное воздействие. Глюзим активен в тесте, стабилен при pH 3,5-7,0 и при температуре 50-60°C, инактивируется в процессе выпечки. Оптимальная дозировка ферментного препарата Глюзим активностью 10000 Е/г (10000 Glucose Oxidase Units) составляет 0,00025-0,007% к массе муки (0,25-7 г на 100 кг муки).

Изучена возможность применения при приготовлении сдобных изделий ферментных препаратов β -фруктофуранозидазы. Обоснованием к ее практическому использованию является увеличение степени сладости в 1,3 раза при инверсии сахарозы. Ис-

пользуя инвертный сахар в качестве заменителя сахарозы возможно достижение аналогичных вкусовых ощущений при снижении содержания сахара-песка в рецептуре. Фермент β -фруктофуранозидаза продуцируется грибами вида *A. awamori*. Оптимальная условия действия pH – 3-5, температура 65° С.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие ферментные препараты используют для регулирования сахаро- и газообразующей способности муки?
2. С какой целью используют протеолитические ферментные препараты при приготовлении теста?
3. В каких случаях целесообразно использовать ферментные препараты с липолитической активностью?
4. Какой ферментный препарат целесообразно использовать при выработке изделий с молочной сывороткой?
5. При выработке каких изделий целесообразно применять цитолитические ферментные препараты?
6. Какие микроорганизмы применяются при получении ферментных препаратов Амилоризин П10х и Амилосубтилин 10х?
7. Какой ферментный препарат рекомендуется при приготовлении теста на КМКЗ?

Список литературы

1. Бирюзова В. И. Ультраструктурная организация дрожжевой клетки. – М.: Наука, 1993. – 224 с.
2. Голубев В. Н., Жиганов И. Н. Пищевая биотехнология. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 122 с.
3. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры функций клетки. – М.: Мир, 1976. – 957 с.
9. Матвеева И. В., Белявская И. Г. Биотехнологические основы приготовления хлеба. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 149 с.
10. Пащенко Л. П. Биотехнологические основы производства хлебобулочных изделий. – М.: —КолосС, 2002. – 367 с.
11. Пермякова Л. В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 42. № 3. – С. 46-55.
12. Фараджеева Е. Д., Болотова Н. А. Производство хлебопекарных дрожжей. – М.: —Профессия, 2002. – 167 с.

Учебное издание

Биотехнологические основы отрасли

Курс лекций

Составитель – Хмелевская Анна Васильевна

Издано в авторской редакции
Технический редактор *Е.Н. Маслов*
Компьютерная верстка *Е.Н. Маслов*
Дизайн обложки *Е.Н. Макарова*

Подписано в печать 25.05.2018.
Формат бумаги 60×84 $\frac{1}{16}$. Бум. офс. Печать цифровая.
Гарнитура шрифта «Times».
Усл. п.л. 8,6. Тираж 100 экз. Заказ №44.

ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет
имени Коста Левановича Хетагурова»
362025, г. Владикавказ, ул. Ватутина, 46

Отпечатано в ИПЦ ИП Цопанова А.Ю.
362000, г. Владикавказ, пер. Павловский, 3