

Възможности за биологично подкисляване на майша при производството на пивна мъст: Изследване възможността за повишаване на синтеза на млечна киселина от щамове *Lactobacillus delbrueckii* с добавка на царевичен екстракт

Богдан Горанов, Запряна Денкова, Михаил Ангелов, Георги Костов

Possibilities of mash biological acidification during the wort production: Increasing the synthesis of lactic acid from *Lactobacillus delbrueckii* strains with addition of corn extract: The mashing is a key process in the brewing industry. On it affect a number of factors - pH, temperature, stirring, concentration of the malt mash and others. One of the important parameters of this process is pH, which directly affects the enzymatic activity. In this work was studied the possibilities of obtaining lactic acid concentrate for acidification of mash during the mashing process. The influence of the addition of corn extract as a growth factor for two strains *Lactobacillus delbrueckii* 1 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M3 was studied. The effect of the extract was studied in 6 different initial values of the growth factor - 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5%. There were differences in the dynamics of production of lactic acid and diacetyl. As a result, the study was found that 1% is the optimum concentration of corn extract for the lactic acid fermentation.

Key words: brewing, mashing, acidification, lactic acid production, lactic acid bacteria, corn extract

ВЪВЕДЕНИЕ

Процесът, при който високомолекулните вещества от малца и немалцуваните суровини се превръщат в разтворима форма и преминават в пивната мъст се нарича майшуване. Температурата, рН, концентрацията на твърдата фаза, разбъркването твърдостта на водата и др. оказват съществено влияние върху майшуването [1, 2].

рН играе важна роля при майшуването, тъй като всеки ензим, участващ в процеса има определен рН оптимум на действие. Средно оптималните стойности на рН за действие на амилазния комплекс е в границите 5,3-5,6. Като при рН 5,3-5,4 се наблюдава най-голям добив на екстракт, намалява се времето за озахаряване, подобрява се цвета, филтруването на пивната мъст и др. [1, 2].

При взаимодействието на Ca^{2+} и Mg^{2+} с фосфатите и други съединения от малца рН се установява между 5,5-5,9. Тези стойности се отклоняват от оптималните, което в повечето налага корекция на рН. За тази обработка се използват различни методи: обработка на водата, прибавяне на някой соли, добавяне на неорганични киселини и биологично подкисляване [1, 2].

Биологичното подкисляване може да се извърши по два начина: чрез използване на кисели малцови и/или млечна киселина [2].

За получаване на кисели малцови се използват различни методи. Най-често зеления малц се навлажнява със суспензия от млечнокисели бактерии, най-често *Lactobacillus delbrueckii*. Млечнокиселата ферментация се провежда при температура 50°C за 24-36 h. Тази операция се провежда непосредствено преди сушенето и веднага след нея зеления малц се изпраща за сушене. Киселите малцови се влагат до 5% от общото количество на смления малцов шрот [5, 6].

По-широко приложение намерил методът на биологично подкисляване на малцовата каша с използване на млечна киселина (млечнокисел концентрат) получени, при култивирането на различни щамове млечнокисели бактерии: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*; *L. delbrueckii* subsp. *lactis*; *L. fermentum*; *L. amylolyticus*; *L. amylovorus* и др. [4].

Ферментационна среда за горепосочените щамове е сладка пивна мъст, разредена до съответния екстракт. Като нивото на образуваната млечна киселина от *L. delbrueckii* е около 1% . Изследвано е влиянието на млечната киселина върху качеството на малца, като са използвани щамовете: *L. amylovorus* FST 1.1,

Lactobacillus plantarum TMW 1.460 и *Lactobacillus amylolyticus* TMW 1.268 и е установено повишаване на глюканазата в майша, намаляване на вискозитета на кашата и повишаване на рандемана на екстракт [4, 5, 8].

Предимствата на подкисляването на малцовата каша се свеждат до: по-висок добив на екстракт; по-висока скорост на филтруване на кашата; по-добра ферментация; по-хармоничен вкус на готовото пиво, подобрява пенообразуването, колоидната и вкусовата стабилност и др. [1].

За да се използват за биологично подкисляване щамове лактобацили трябва да образуват максимално количество млечна киселина и ниски количества диацетил.

Известно е, че млечнокиселите бактерии се нуждаят от растежни фактори. Царевичният екстракт е богат на органично свързан азот, аминокиселини, витамини и др., необходими за жизнената дейност на млечнокиселите бактерии.

В предходни наши изследвания са селектирани щамове млечнокисели бактерии, подходящи за приложение в пивоварната промишленост. Също така са проучени условията на култивиране за селектираните щамове и за всеки един от тях е определена оптималната температура на култивиране.

Целта на настоящата работа е да се проучат възможностите за приложение на царевичен екстракт като източник на растежни фактори за развитието на млечнокиселите бактерии. Проучено е влиянието на различни концентрации на царевичен екстракт върху биосинтеза на млечна киселина и продуцирането на диацетил при култивиране на щамове на *Lactobacillus delbrueckii*.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Използвани щамове

В работата са използвани щамове *Lactobacillus delbrueckii* 1 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M3, от колекцията на катедра "Микробиология" при УХТ - Пловдив.

Хранителни среди и условия на култивиране.

MRS среда (g/dm^3) – глюкоза - 20; пептон - 10; месен екстракт - 8; дрождев екстракт - 4; CH_3COONa - 5; триамониев цитрат - 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KH_2PO_4 - 2; Tween 80 - 1 cm^3 . Стерилизира се 15 min при 121 °C.

Ферментационна среда – използвана е заводска сладка пивна мъст, предоставена от пивоварна „Каменица“ – Пловдив. Сладката пивна мъст, разреждана в съотношение 1:1 за щамове *Lactobacillus delbrueckii* 1 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M3, като в резултат на разреждането се получава пивна мъст с екстракт 9 °P. Ферментационните среди се стерилизират при 121 °C за 25 min.

Млечнокиселата ферментация се провежда в колби, в които се поставя 150 cm^3 хранителна среда. Колбите се инокулират с 10% предварително развита култура от съответният щам млечнокисели бактерии. Култивирането се провежда при 37°C, в статични условия.

МЕТОДИ ЗА АНАЛИЗ

Определяне на титруемата киселинност

Млечната киселина е определена чрез титруемата киселинност на пробата (°T), с титруване с 0,1 N NaOH, до розово оцветяване при използване на фенолфталеин като индикатор (1 °T = 0,009 g млечна киселина) [9, 10].

Определяне на общи вицинални дикетони

Вичиналните дикетони (VDK) се определят спектрофотометрично. За целта 100 cm^3 от пробата се подлагат на парна дестилация. Скорост на процеса се поддържа в границите 3 cm^3 в минута дестилат, а времето за дестилация е 8-10 минути. При спазване на тези параметри е необходимо да се съберат 25 cm^3 дестилат. След

това 10 cm³ от дестилата се поставя в епруветка, добавя се 0,5 cm³ разтвор на о-фенилендиамин (с концентрация 10 g/dm³ приготвен при разтваряне в 4 mol/dm³ HCl). Пробата престоява 30 min на тъмно. Едновременно с зареждането на пробите се зарежда празна проба – дестилирана вода и разтвор на о-фенилендиамин и стандартна проба. Стандартната проба представлява 9,9 cm³ дестилирана вода в която се добавят 0,5 cm³ разтвор на о-фенилендиамин и 0,1 cm³ стандартен разтвор на диацетил (250 mg/dm³). Така подготвените проби се поставят за 30 min на тъмно. След изтичане на времето към всяка от пробите се добавят 2 cm³ HCl (4 mol/dm³). След това се измерва абсорбцията при дължина на вълната λ=335 nm.

Концентрацията на вицинални дикетони се определя от следната зависимост:

$$VDK = \frac{A_{335} - A_{np}}{A_{CT} - A_{np}} \cdot 0,625, \text{ mg / dm}^3$$

Методът е рефериран в стандартите на Европейската пивоварна конвенция (ЕВС).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

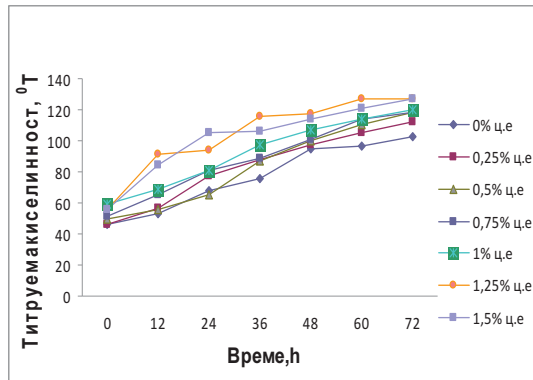
Динамиката на ферментационния процес с подобрите щамове млечнокисели бактерии е проследена при 6 различни начални концентрации на царевичния екстракт – 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 %. Като контрола е ползвана млечнокисела ферментация без добавка на царевичен екстракт. Всички ферментации са проведени при температура 37°C. Данните от ферментационните процеси са представени на фиг. 1 до фиг.4.

От фиг.1 и фиг.3, отразяващи динамиката на натрупване на млечна киселина съответно за щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 и *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 се вижда, че с увеличаване на концентрацията на царевичния екстракт нараства и концентрацията на млечната киселина. При щам *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 максимална титруема киселинност 150 °Т се достига при концентрация на царевичен екстракт 1%, което е с 56,9 °Т повече в сравнение с контролата (93,1 °Т). При по нататъшно увеличаване на концентрацията на царевичния екстракт в пивната мъст титруемата киселинност намалява, като при 1,5% достига 129 °Т.

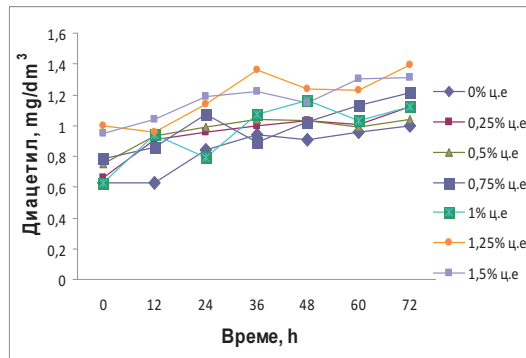
На Фиг.4 е представено зависимостта на натрупването на диацетил при различни концентрации на царевичния екстракт. Концентрацията на диацетил нараства с нарастване на количеството царевичен екстракт в средата и на 72 h и достига 1,20 mg/dm³

Опитните данни сочат че при концентрация при 1% в ферментационната среда при щам *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 се натрупва максимална киселинност при запазено съдържание на диацетил.

При другия щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 кривите имат сходен характер с нарастване на концентрацията на царевичния екстракт в средата титруемата киселинност се увеличава. При концентрация 1% тя достига 119,8 °Т. При повишаване на концентрацията на царевичния екстракт титруемата киселинност нараства незначително при 1,25 и 1,5% приема стойности 127 °Т.

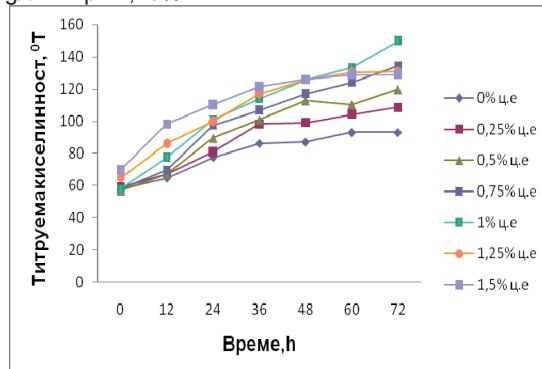


Фиг.1. Динамика на натрупване на млечна киселина при култивирането на щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 при различна концентрация на царевичен екстракт



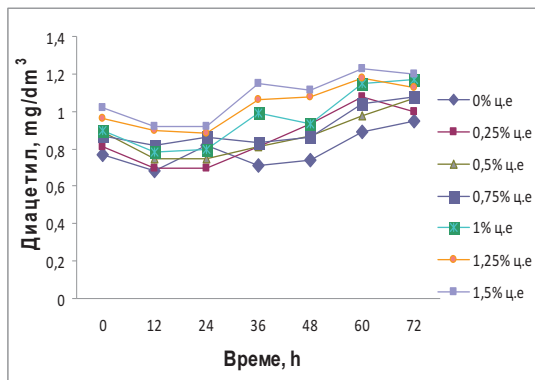
Фиг.2. Динамика на натрупване на диацетил при култивирането на щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 при различна концентрация на царевичен екстракт

От Фиг.2 е видно, че при щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 концентрацията на диацетил нараства с увеличаване на количеството на царевичният екстракт и достига до 1,39 mg/dm³ при 1,25%.



Фиг.3. Динамика на натрупване на млечна киселина при култивирането на щам *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M3 при различна концентрация на царевичен екстракт.

Опитните данни показват, че концентрацията на царевичния екстракт 1% е оптимална и за двата щама млечнокисели бактерии. При тази концентрация се достига титруема киселинност е 119,8 °Т и 150 °Т и диацетил 1,12 -1,20 mg/dm³.



Фиг.4. Динамика на натрупване на диацетил при култивирането на щам *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 при различна концентрация на царевичен екстракт

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на изследванията на влиянието на царевичния екстракт, като растежен фактор при култивирането на селектирани щамове лактобацили върху образуването на млечна киселина и диацетил могат да се обобщят следните изводи:

1. Установена е динамиката на натрупване на млечна киселина и диацетил при култивиране на *Lactobacillus delbrueckii* 1 и *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 при различни концентрации на царевичен екстракт .0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 и 1,5%.

2. Установено е, че за щам *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* M3 оптималната концентрация на царевичния екстракт е 1%, и се достига титруема киселинност 150°Т, което е с 56,9°Т повече в сравнение с контролата 93,1°Т, а концентрация на диацетил е 1,20 mg/dm³.

3. За щам *Lactobacillus delbrueckii* 1 е установена оптимална концентрация на царевичен екстракт 1%, при която титреумата киселинност, 119,8°Т (което е с 17,2°Т в сравнение с контролата 102,6°Т), и диацетил в количество 1,12 mg/dm³.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Кабзев, Й., И. Игнатов (2011). Технология на пивото, Академично издателство, УХТ, Пловдив.
- [2] Кунце, В. (2001) Технология солода и пива(превод от немски), Професия, Санкт Петербург.
- [3] Bamforth, C.W. (2006). Brewing.New tehnologie, Woodhead Publishing Ltd.
- [4] Bohak, I., W. Back, L. Richter, M. Ehrmann, W. Ludwig, K.H. Schleifer, (1998). *Lactobacillus amylolyticus* sp. Nov., isolated from beer malt and beer wort. *Syst Appl Microbiol.* 21(3):360-4.
- [5] Briggs, D.E. (1998). Malts and Malting, Blackie Academic & Professional.
- [6] Briggs, D.E., C.A. Boulton, P.A. Brookes, R.Stevens.(2004). Brewing Science ant practice, Woodhead Publishing Ltd.
- [7] Deirdre, P. L. and E. K. Arendt, (2004). The Use and Effects ofLactic Acid Bacteria in Malting and Brewingwith Their Relationships to Antifungal Activity,Myco toxins and Gushing: A Review. *J. Inst. Brew.* 110(3), 163–180.

[8] Deirdre, P.L., E. K. Arendt, A. M. Soriano and H. M. Ulmer, (2005). The Influence of Lactic Acid Bacteria on the Quality of Malt. *J. Inst. Brew.* 111(1), 42–50,

[9] Macrae, R., R. K Robinson, M. Sadler, (1993). *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Vol. 5, Academic Press, San Diego.

[10] Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall, Upper Saddle River.

За контакти:

Маг. инж. Богдан Горанов, редовен докторант към катедра „Микробиология“, Университет по Хранителни Технологии, Пловдив, бул. „Марица“ №26, goranov_chemistry@abv.bg

Докладът е рецензиран.