

## СВОБОДНЫЙ АМИННЫЙ АЗОТ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПИВОВАРЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

Т.С. Пицко, И.В. Коктыш

*Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова  
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, [tspitsko@gmail.com](mailto:tspitsko@gmail.com)*

**Аннотация:** Концентрация и аминокислотный состав сусла влияют на ферментативные процессы при производстве пива. Спектрофотометрическим методом исследована концентрация свободного аминного азота в пиве. Показатели свободного аминного азота в пиве с нормальной плотностью (10-12%), из соложенного сырья и с добавками несоложенного сырья находились в диапазоне от 82 до 130 мг/л. Сравнительный анализ свободного аминного азота между образцами пива из соложенного сырья и пивом с добавками несоложенного сырья показал наличие статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ). Полученные данные указывают, что от качественного и количественного состава усваиваемых аминокислот зависит тип реакций у дрожжей, которые формируют не только физико-химические свойства, но окончательный ароматический профиль пива.

**Ключевые слова:** пивоварение, контроль качества, свободный аминный азот, спектрофотометрия

Для поддержания стабильности качества и вкуса пива производителями необходимо проводить различные анализы. Одним из таких тестов может стать тест на свободный аминный азот, который позволяет оценить эффективность процессов ферментации, установить содержание белка.

Для определения азотистых компонентов сусла/пива используется показатель соединений азота – свободный аминный азот (free amino nitrogen, FAN), который метаболизируется дрожжами во время брожения. К ним относят отдельные альфа-аминокислоты сусла, аммиак и небольшие пептиды (ди- и трипептиды). Несмотря на то, что в сусле растворен широкий спектр азотсодержащих соединений, пивоваренные дрожжи могут усваивать только более мелкие молекулы, а именно FAN, который в свою очередь является одним из параметров ферментации пива. Образование высших спиртов по пути Эрлиха происходит при поглощении аминокислот. Принятая в настоящее время элементарная ферментативная последовательность пути Эрлиха включает трансaminaзу, декарбоксилазу и алкогольдегидрогеназу. Трансaminaзы катализируют перенос аминов между аминокислотами и соответствующей  $\alpha$ -кето кислотой, используя глутамат/ $\alpha$ -кетоглутарат в качестве донора/акцептора. После переаминирования оставшиеся  $\alpha$ -кето кислоты могут быть декарбоксилированы с образованием соответствующего альдегида. После декарбоксилирования сивушные альдегиды вступают на последнюю стадию пути Эрлиха, на которой они превращаются в соответствующие спирты под действием алкогольдегидрогеназы. Хотя этот путь является наиболее изученным и обсуждаемым, высшие спирты также образуются во время восходящего (анаболического пути) биосинтеза аминокислот. От качественного и количественного состава усваиваемых аминокислот зависит тип реакций у дрожжей, которые сформируют окончательный

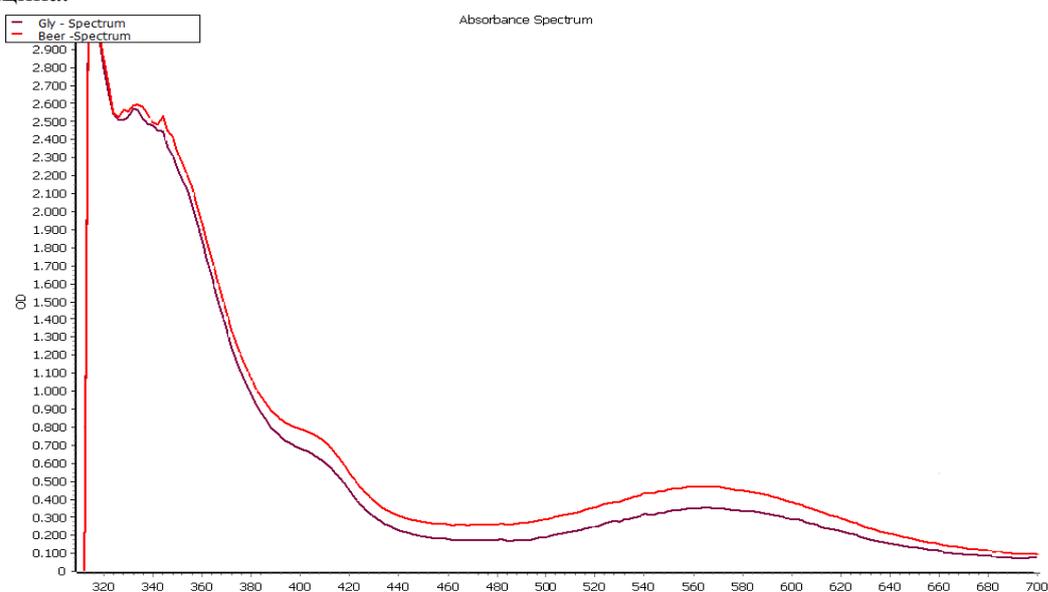
ароматический профиль пива. Наиболее важным является синтез *de novo* аминокислоты с разветвленной цепью через путь изолейцин–лейцин–валин.

**Цель исследования** – установить концентрацию свободного аминного азота в пиве белорусского производства для разработки критериев оценки качества пивоваренной продукции.

**Материалы и методы исследования.** Стандартные анализы контроля качества пивоварения включают тест на свободный аминокислотный азот (FAN), который позволяет оценить содержание белка. Традиционный способ определения содержания белка в пиве основан на анализе Кьельдаля, который является сложным и довольно дорогостоящим. Альтернативой является микроанализ с использованием нингидрина [2].

При проведении исследования использовалось 30 образцов пивоваренной продукции производства Республики Беларусь от различных производителей с нормальной плотностью (10-12%), из соложенного сырья и с добавками несоложенного сырья. Первичные аминокислоты (FAN) определяли в реакции с нингидрином в микропланшете. В качестве стандарта использовалась аминокислота глицин. Проводился спектральный анализ образцов в диапазоне от 300 до 700 нм, а также регистрация результатов анализа при максимуме поглощения (575 нм) с помощью мультиридера CLARIOstar<sup>Plus</sup> (BMGLabtech, Германия). Статистический анализ полученных данных проведен с помощью непараметрических статистических методов с применением пакета прикладных программ STATISTICA 8.0.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В исследованных образцах пива установлено содержание свободного аминного азота в диапазоне от 82 до 130 мг/л. На рисунке представлены типичные спектры поглощения образца пива с нормальным значением FAN (118 мг/л) и стандарта глицина.



**Рисунок – Спектры поглощения для пива (красный) и стандарта глицина (фиолетовый)**

Добавление аминокислот с разветвленными боковыми цепями, таких как валин, лейцин и изолейцин, в бродящее сусло увеличивает образование соответствующих сивушных спиртов (изобутанола, изоамилового и амилового спиртов). Пролин также способствует увеличению образования сивушных спиртов. Поскольку пролин не может быть преобразован в более высший спирт по пути Эрлиха, его роль в индукции образования сивушного спирта отнесена к синтезу глутамата. Добавление в сусло лизина и гистидина улучшает производительность пивных дрожжей при производстве лагерного пива. По сравнению с лизином гистидин больше влияет на ароматический профиль пива, увеличивая образование высших спиртов и сложных эфиров.

Содержание и состав FAN являются основными факторами, влияющими на образование диацетила при брожении пива. Сусло с меньшим количеством FAN производит меньше диацетила во время ферментации. Наличие FAN ниже критических уровней стимулирует синтез *de novo* валина, увеличивая количество  $\alpha$ -ацетолактата. Поглощение валина уменьшается с увеличением содержания FAN [1]. Чем меньше FAN (следовательно, меньше аминокислот), тем быстрее потребляются предпочтительные аминокислоты, что дает больше шансов валину проникнуть в клетку. И наобо-

рот, чем больше аминокислот доступно для проникновения в дрожжевую клетку, тем сложнее валину проникнуть в клетку.

Одной из наиболее распространенных стратегий для снижения затрат является использование несоложенного сырья. Однако такое сырье содержит мало FAN и не обладает ферментативной активностью во время затираания. Следовательно, чем выше соотношение несоложенного сырья, используемых в рецептуре, тем беднее будет сусло. Дрожжи будут компенсировать этот недостаток FAN с помощью анаболического пути образования аминокислот из углеводов, что приведет к повышенному образованию высших спиртов [1]. Увеличение производства высших спиртов также является распространенной проблемой при непрерывном брожении. Увеличение производствасивушных спиртов путем непрерывной ферментации является результатом работы как катаболических, так и анаболических путей. С одной стороны, непрерывное введение аминокислот в ферментер непрерывного действия неизбежно повышает образование высших спиртов по пути Эрлиха. С другой стороны, повышенная доступность предпочтительных аминокислот ухудшает потребление менее предпочтительных, следовательно, происходит запуск анаболического пути.

Для получения качественного как по органолептическим, так и по физико-химическим характеристикам пива, химический состав воды, сорт и вид ячменя, соложение играют важную роль в биохимических процессах ферментации пива. Разные сорта пива требуют разного химического состава воды. Корректировки включают удаление взвешенных твердых частиц, снижение нежелательного содержания минералов и удаление микробного загрязнения. Таким образом, различные минеральные ионы будут по-разному влиять на процесс пивоварения или конечный вкус пива. Например, сульфаты повышают крепость и сухость пива, но также благоприятствуют раскрытию хмелевого букета. Высокое содержание железа и марганца может изменить цвет и вкус пива. Кальций самый важный ион. Он защищает  $\alpha$ -амилазу от ранней инактивации путем снижения pH до оптимального для ферментативной активности. Во время кипячения кальций не только способствует осаждению избытка соединений азота, но и предотвращает чрезмерную экстракцию компонентов хмеля. Кроме того, кальций также играет решающую роль в процессе ферментации, поскольку он является обязательным для флокуляции дрожжей. Росту и брожению дрожжей способствуют ионы цинка, но препятствуют нитриты [1].

В основном в пивоварении используются два вида ячменя: двухрядный и шестьюрядный. Двухрядный ячмень богат крахмалом. И наоборот, в шестьюрядном ячмене меньше крахмала, но больше белка. Поэтому в случае необходимости увеличения содержания экстракта используется двухрядный ячмень, тогда как, если целью является ферментативная активность, лучшим выбором будет шестьюрядный.

В процессе соложения зерна проращивают для получения соответствующего солода. Однако правильная степень прорастания семян является ключом к получению хорошего солода. Во время прорастания эмбрион растет за счет резервного материала, хранящегося в ядре. Как только зерно вступает в контакт с подходящими условиями во время замачивания (оптимальная влажность и температура), весь ферментативный аппарат постепенно активизируется для разрушения запасов крахмала и белков с образованием нового растения. В этом заключается решающая роль соложения, которая заключается в обогащении солода ферментами (амилолитическими, протеолитическими и т.д.), модификации эндосперма ядра и образовании вкусовых и ароматических соединений. Ферменты, разрушающие крахмал (такие как  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза,  $\alpha$ -глюкозидаза и декстриназа), образующиеся во время прорастания, характеризуются лучше, чем протеолитические аналоги [3].

Оптимальная стадия для прерывания прорастания, это когда солод богат ферментами, достиг достаточной модификации эндосперма и использовал как можно меньше резервных материалов (крахмал, белки) во время развития эмбриона. На этом этапе прорастание задерживается обжигом (сушкой). Различные сорта солода получают с этого момента путем обжига или обжарки при различных температурах. Однако, чем больше солод подвергается термической обработке, тем больше повреждение ферментов. Таким образом, в то время как светлый солод богат ферментами, шоколадный солод (тщательно обжаренный) практически не обладает ферментативной активностью. При использовании смесей несоложенного ячменя и солода наблюдается ингибирующее действие на эндопептидазы солода, что приводит к уменьшению количества сусла, без влияния на извлечение углеводов при затираании.

Согласно МЕВАК (Центрально – Европейская комиссия анализа пивоварения) нормативными значениями FAN для пива нормальной плотности являются 100-120 мг/л. Из 30 исследуемых образцов с нормальной плотностью (10-12%) пивоваренной продукции от различных белорусских

производителей только 3 соответствовало референтным показателям. В тоже время, сравнительный анализ FAN между образцами пива из соложенного сырья и пивом с добавками несоложенного сырья показал наличие статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ).

Полученные нами данные свидетельствуют о влиянии на процесс ферментации и на образование побочных продуктов брожения низкомолекулярных соединений азота, в частности аминокислот в сусле. Фактически, для получения пива высокоплотного либо пива с нормальной плотностью, обработка сусла протеазами увеличивает конечный FAN, что в конечном итоге увеличивает производство высших спиртов и сложных эфиров пивоваренными дрожжами.

**Заключение.** Таким образом, определение свободного аминного азота позволяет оценить качество ферментации пива. Низкомолекулярные соединения азота, в частности аминокислоты в сусле, а также их концентрация и состав оказывают влияние на процесс ферментации и на образование побочных продуктов брожения, определяя органолептические свойства пива. Контроль нормативного содержания аминного азота позволит стандартизировать технологию производства пива и повысить экспортный потенциал выпускаемой продукции.

#### **Список использованных источников**

1. Pires, E. Biochemistry of Beer Fermentation / E. Pires, T. Brányik. – New York: Springer, 2015. – 76 p.
2. Abernathy, D. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay / D. Abernathy, G. Spedding, B. Starcher // J. Inst. Brew. – 2009. – Vol.115, №2. - P.122-127.
3. Stanbury, P. F. Principles of Fermentation Technology / P.F. Stanbury, A. Whitaker, S. J. Hall. – 3rd ed. – United Kingdom: Elsevier, 2017. – 803 p.