

# Výroba čistých kvasničných kultúr v ovocných liehovaroch a pri kvasení ovocných vín

663 3 : 663.551.5

E. PÍŠ

*Pestovanie a aklimatizácia kvasničných kmeňov priamo zo zdravého ovocia selekčnými metódami. Používané substráty. Mikologická a technická kultivácia čistých kultúr. Schéma pomnožovania. Význam silného zákvasu.*

## *Význam čistých kvasničných kultúr*

Hodnota ovocných plodov, bohatých obsahom cukrov, sa transformuje anoxydatívnym, najmä alkoholickým kvasením kvasničnými fermentami pri ich spracovaní na víno, alebo na destiláty. Cukorný obsah sa premení na etylalkohol. Enzymatické systémy, ktorými je mikrobiologická chemická premena pri kvasení riadená, sú produkované kvasničnými mikroorganizmami a priebeh i intenzita premeny cukru závisí od ich fyziologickej účinnosti a fyzikálnych i chemických podmienok prostredia. Použitím špeciálnych kvasničných kmeňov v dostatočne silnom zákvasu sa zaistí účinné kvasenie a jeho kvalita.

## *Pestovanie a aklimatizácia kvasničných kmeňov priamo zo zdravého ovocia selekčnými metódami*

Výber a vypestovanie mikroorganizmu priamo z plodu je dosť náhodné. Preto treba previesť celú sériu selekcií. Povrch ovocia býva pokrytý mikroflórou, medzi ktorou nachádzame i kvasinkovité mikroorganizmy. Pri selekcii volíme strom s krásnymi, zdravými plodmi. Pod vybratý plod postavíme Freudenreichovu baňku so sterilnou vodou, kde plod po odstrihnutí stonku padne. Sterilná voda postupne extrahuje cukorný obsah plodu a kvasničné buňky včítane ostatnej mikroflóry začínajú svoju činnosť. Po dostatočnom prekvasení a prečistení v kyselom kúpeli inokulujeme kvasničnú usadeninu striedavo do sacharózového a glukózového substrátu vhodného zloženia a reakcie, aby sme postupne prispôbovali kvasničnú buňku pre laboratorné pomnoženie a jej prácu v prevádzke. Potom prevedieme užšiu selekciu, na pr. Lindnerovou metódou. Vybrané individuá inokulujeme zvlášť a porovnávame prekvasovanie i morfológickú jednoduchosť vybraných kvasničných buniek. Vyberáme len najvhodnejšie a ich kombináciou vytvoríme prevádzkový kmeň, ktorý podrobíme skúškam na prekvasenie a pomnoženie. Rýchlosť a hĺbku prekvasovania zisťujeme analyticky a získané výsledky porovnáme s typovou kultúrou. Tým dostaneme celkový obraz o vlastnostiach vypestovaného kvasničného

kmeňa, z ktorého jasne vyplývajú ďalšie možnosti šľachtenia zámerne volenou zmenou prostredia, ako je napr. šírenie, ktoré treba chápať ako zásah do oxydoredukčného systému prostredia. Osvedčený kvasničný kmeň prechováame na pevných a v tekutých substrátoch (prípadne ho tiež lyofilujeme pre zbierkové účely) so striedavou zmenou jeho zloženia, aby kvasinky neboli jednostranne vyživované a tým zoslabované v svojej aktivite až k trvalej degenerácii.

U skvasovaných ovocných štiav izolujeme kvasinky zo šťavy v intenzívnom kvasení, alebo už silne prekvasenej, ktorú stále kontrolujeme a u ktorej môžeme pozorovať zvlášť hlboké prekvasenie s dostatočnou tvorbou príslušného bouquetu a s maximálnou produkciou liehu. Z praxe poznáme mnohé prípady kvasenia, ktoré môžu byť základom k izolácii čistej kvasničnej kultúry so všetkými špecifickými vlastnosťami.

Izoláciu prevedieme sterilným odňatím vzorky, ktorú inokulujeme do vysterylovaných substrátov. Po niekoľkonásobnom preočikovaní prevedieme vlastnú izoláciu na ostro sfiltrovanej sladinke Lindnerovou kvapičkovou metódou. Jednotlivé individuá vedieme zvlášť s dostatočnou kontrolou a ďalším výberom zjednotíme v konečný prevádzkový kmeň, ktorý vyskúšame.

Kvasinky, znášajúce vysoký obsah alkoholu, izolujeme z hlboko prekvasených štiav (až 12 % alkoholu), u ktorých zistíme ďalšie prekvasovanie zbytkového alebo pridaného cukru.

U vypestovaných kmeňov môžeme ďalším zámerným šľachtením vytvoriť reprodukovateľnú vlastnosť pre požadované výkony i za nepriaznivých alebo sťažených podmienok kvasenia. Takým je napr. odolnosť a dobrá aktivita u štiav bohatých trieslovinami, silne zasírených, bohatých na éterické oleje a podobne. V zámerne volenom substráte časť slabších a menej odolných buniek zahynie a časť sa postupne adaptuje, prekonáva nepriaznivý vliv látok vo svojom metabolizme. Zmenou vonkajších podmienok, ako je teplota, pH, redoxpotenciál,



osmotický tlak, zloženie živnej pôdy a pod., môže trvale usmerniť priebeh jednotlivých biochemických reakcií. Prispôsobenie je v určitých podmienkach dedične trvalé, so sklonom k bežnej degenerácii, biochemickému vyčerpaniu, zvlášť v pravidelnej prevádzke a pri prechovávaní v substrátoch.

#### Používané substráty:

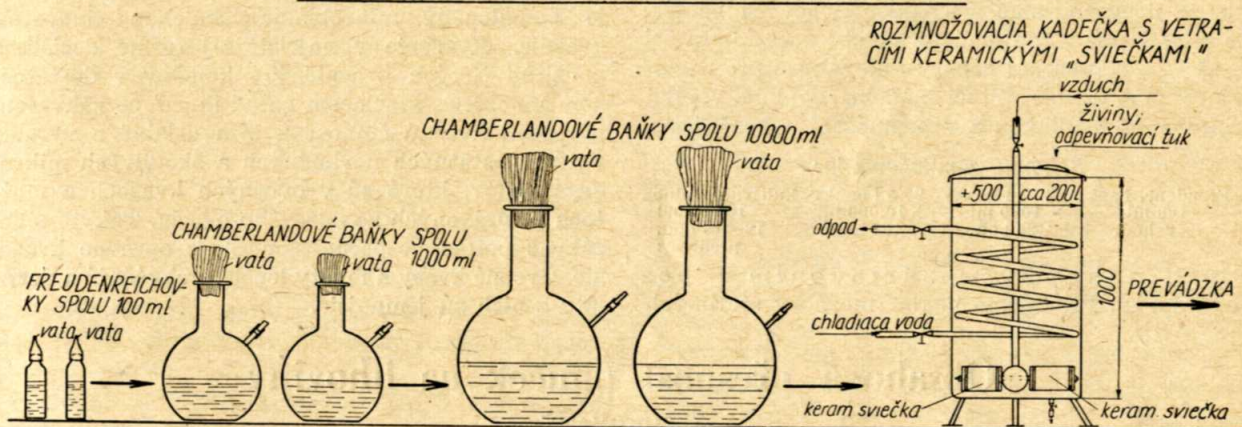
a) Pre laboratorné vedenie kultúr si pripravujeme živné substráty zo surovín ako sú: obilie, melasa, kvasničný autolyzát a rôzne výťažky zo zelenín, plodov a ovocia. Tieto vhodne kombinujeme a doplníme skvasiteľnými formami cukrov tak, aby sa sacharizácia pohybovala v medziach 12—13 °Bg. Ph upravíme kyselinou mliečnou na hodnotu 4,5.

b) Sladinky pre prevádzkové pomnoženie: Predpokladajú prípravu kvasného prostredia na podmienky v kvasnej kádi a preto k ich príprave priberáme i samo ovocie, plod, ktorý sa má spracovať.

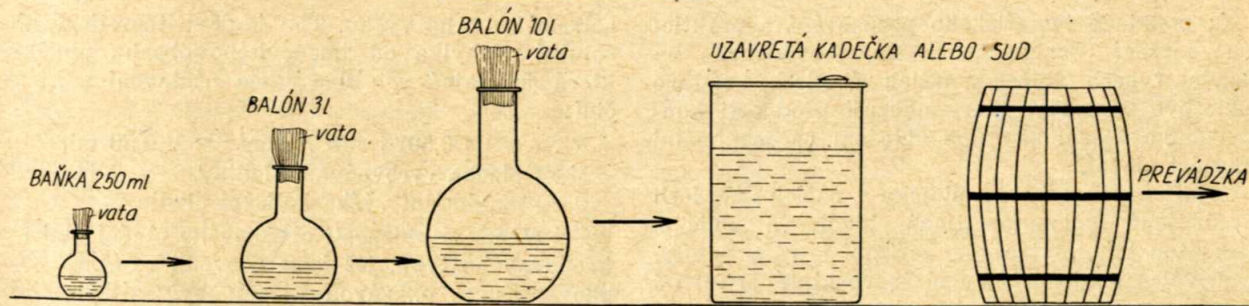
#### Mykologická a technická kultivácia čistých kultúr

a) Pri dokonalom zariadení. Kvasničnú kultúru vedíme v tekutých substrátoch, naplnených vo Freudeneichových baňkách trikrát sterilovaných obdĺ, ktorých obsah striedavo zamerne meníme, aby kultúra dostávala vždy iné prostredie, ktoré obsahuje všetky látky, zaručujúce dobrý fyziologický stav buniek. Kultúru určenú k rozmnoženiu preočkujeme do dvoch Freudeneichových ba-

### POMNOŽENIE KULTÚRY V MYKOLOGICKOM LABORATÓRIU



### NÁHRADNÉ SCHEMA



Pritom je tiež dôležitá ústojnosť substrátu voči zmenám aktuálnej acidity. Okrem cukrov musí byť substrát doplnený vhodnými dusíkatými a fosforečnými živinami. Obvykle stačí asi 20 % kvasničného autolyzátu. Substrát musí obsahovať vzrastové látky typu „bios“ so súborom ostatných kompletínov, obsiahnutých v samotných ovocných šťavách, cornsteepu, butanol-acetónových výpalkoch a koncentrátu mikroelementov.

Filtrát substrátu musí byť iskerný, jasný, bledej farby a pri sterilizácii má vzniknúť čo najmenej zrazeniny. Tmavé substráty (okrem melasovej sladiny) obsahujú skaramelizované cukry alebo neskvasiteľné látky, vzniklé pôsobením aminokyselín na redukujúce cukry. Takýmto sa vyhýbame. Substráty plníme do vopred vysterylizovaných Freudeneichových baniek, ktoré sa najlepšie osvedčili. Sterilizujeme 3krát obdĺ sterilizátorom v pare.

niek a kultivujeme pri 20—25 °C. Po prekvasení celý obsah Freudeneichovej baňky i s kvasničnou usadeninou prelejeme sterilne do dvoch 1litrových Chamberlandových nádob s kultivačnou tekutinou, ktorú necháme do druhého dňa prekvasiť pri 20 až 25 °C. Prekvasený substrát prevedieme do dvoch 5litrových Chamberlandových baniek s kultivačnou tekutinou a necháme do druhého dňa prekvasiť. S touto prekvasenou sladinkou zakvasíme vysterylizovanú sladinku v kultivačnej nádobe s vetraním. Veľajemným vetraním enzymatický aparát kvasnice sú výkonnejšie ako bez vetrania (b). (H. Schanderl: „Die Mikrobiologie des Weines“, 1950, str. 156—160.)

Vetráme zpočiatku mierne a až po uchytaní kvasenia zvýšime množstvo vzduchu z 20 litrov na 50



až 70 litrov vzduchu na 100 litrov kvasnej tekutiny za 1 hodinu. Množenie kvasiniek sledujeme mikroskopicky a prekvas sacharometrom. Klesnutie pôvodnej sacharizácie na polovičnú hodnotu značí približne strávenie poskytnutého cukru. Pretože sladinky s  $8^{\circ}\text{Bg}$  sú už dosť viskózne, treba pri vetraní priklvapnúť občas niekoľko kvapiek odpeňovacieho tuku na srazenie vznikajúcej peny.

Asi 200litrový obsah kvasnej káddecky slúži ako zákvas pre predkvas s 20—30 hl zápary, ktorá sa má spracovať, alebo ovocného muštu. Predkvas v búrlivom kvasení je silným a najvhodnejším zákvasom pre 200—300 hl ovocnej šťavy, alebo brečky. Pomer zakvášaných objemov je zhruba 1:10. Kultúru pomnožujeme v takom tempe, aby bol každý kvasný priestor zakvasený dostatočným predkvasom. V čase núdze možno pomnožovanie obrátiť tak, že nevychádzame z Freudenreichových baniek, ale ponecháme v kultivačnej nádobe s vetraním asi  $1\frac{1}{5}$  až  $1\frac{1}{10}$  vykvasenej zápary ako zákvas pre nasledujúce pomnoženie. Stačí nádobu doplniť vopred pripravenou sladinkou a v pomnožení pokračujeme.

#### Schéma pomnožovania:

2 × Freudenr. baňky 100 ml 49 hod.	2 × 1 l baňky 1000 ml 24 hod.	2 × 5 l baňky 10.000 ml 24 hod.	kultivač. nádoba 100—200 l 12—18 hod.
--	-------------------------------------	---------------------------------------	---

predkvas

b) S náhradným zariadením — bez vetrania. Pracujeme pokiaľ možno v sterilných

sklenených baňkách, balónoch, fľašiach, uzavretých vatovou zátkou, ktorých objem sa zväčšuje zhruba v pomere 1:10. Kvasničný kmeň, pomnožený vo Freudenreichovej baňke, nalejeme pokiaľ možno sterilne do nádoby so 100 ml sladiny. Po 24 hod. prekvasení prelejeme opäť do 1 l sladiny, ďalej do 10 l sladiny a po prekvasení do kultivačnej nádoby (kadečka, sud), naplnenej sterilnou alebo aspoň prevarenou sladinou. Po prekvasení pripravíme predkvas ako hore.

#### Schéma pomnožovania:

ampulka kultúry	Skł. nádoba 100 ml sl. dinky za 24 hod.	Skł. nádoba 1000 ml sladinky za 24 hod.	Skł. nádoba 10 000 ml sladinky za 24 hod.	Kult. nádoba 100—200 l predkvas
--------------------	--	--	--	---------------------------------------

#### Význam silného zákvasu

Priebeh kvasenia akejkoľvek cukornatej suroviny je podmienený mikrobiálne-chemickou činnosťou kvasníc. Kvasenie v najčistejšej forme docielime použitím čistých kvasničných kmeňov v dostatočnom množstve, stačiacom začať ihneď po zakvasení mohutnú kvasnú činnosť a tým oslabiť a vyradiť väčšinu ostatných nevhodných a škodlivých mikroorganizmov, ktoré sú v ovocných kvasoch a muštoch pripravených zo surového ovocia. Takýto silný zákvas potom bezpečne usmerňuje správne kvasenie. Ovocné kvasy a mušty lepšie prekvášajú a destiláty z nich sú jemnejšie.