

Nové možnosti pri biologickom odbúraní kyselín v hroznových vínach kvasinkami *Schizosaccharomyces*

ERICH MINÁRIK a ANTON NAVARA, Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, Bratislava

663.252.35

Biologické odbúranie kyselín je popri alkoholickom kvasení najdôležitejším biologickým pochodom v hroznovom mušte. Akosť hotového vína v severných vinohradníckych oblastiach je v nepriaznivých ročníkoch s neprimerane vysokou aciditou hrozna značne závislá od odbúrania kyseliny L-jablčnej jablčno-mliečnymi baktériami. Popri spontánnom jablčno-mliečnom kvasení prebiehajúcim viac alebo menej intenzívne pri dokvasení a po skončení alkoholického kvasenia, nechýbali snahy o zavedenie čistých kultúr jablčno-mliečnych baktérií [Flesch a Jerchel [3]], ktoré však doteraz málokde v praxi skutočne využívajú.

V posledných rokoch sa robili početné pokusy o praktické využitie vlastností kvasiniek rodu *Schizosaccharomyces* skvasovať kyselinu L-jablčnú na etanol a kyslíčnik uhličitý. Na rozdiel od jablčno-mliečnych baktérií sú tieto kvasinky schopné paralelne s jablčno-alkoholickým kvasením kyseliny L-jablčnej alkoholicky skvasovať cukry, čo vyvolalo veľký záujem výskumu [Dittrich [2], Peynaud et al. [7]].

Podľa hypotézy Mayera a Temperliho [5] a Temperliho et al. [8] odbúranie kyseliny L-jablčnej prebieha cez kyselinu oxáloctovú, pyrohroznovú a acetaldehyd účinkom jablčnej dehydrogenázy a jablčného enzýmu, ktoré sa nachádzajú v bezbunkovom extrakte *Schizosaccharomyces pombe*. Kvasením prvých dvoch medziproduktov neporušenými bunkami týchto kvasiniek však vnikajú ako medziprodukty aj acetoin a kyselina octová, ktoré pri kvasení kyseliny L-jablčnej nevznikajú. Konečnými produktmi disimilácie kyseliny L-jablčnej, oxalocitovej a pyrohroznovej sú však vždy etanol a CO_2 , čo by nasvedčovalo, že k transformácii kyseliny L-jablčnej dochádza priamo 1,4-dekarboxyláciou.

Sumárna rovnica jablčno-alkoholického kvasenia kyseliny L-jablčnej prebieha takto:



Odbúranie kyseliny L-jablčnej je pri nižšom pH úplnejšie ako pri vyššom. Nad 4,5 až 4,8 kyselina L-jablčná už nekvasí.

Pokusy robené vo Francii [Peynaud a Sudraud [6]] poukázali na ťažkosti spojené s praktickou aplikáciou *Schizosaccharomyces* pri odkyslovaní vín, čo potvrdili v NSR aj Benda a Schmitt [1]. Podstata týchto ťažkostí väzí v tom, že sa *Schizosaccharomyces* oproti kultúrnym kvasinkám *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* pomalšie rozmnožujú a aj alkoholické kvasenie je značne pomalšie. Preto je potrebné vytvoriť pre *Schizosaccharomyces* priaznivé podmienky, a to buď predbežným silným zaisírením a odkalením muštu alebo úplnou inaktíviáciou pôvodnej mikroflóry pasterizáciou muštu.

Naše pokusy sme zamerali na zistenie vhodnosti rôznych druhov *Schizosaccharomyces* na intenzitu odbúrania kyseliny L-jablčnej v kvasiacom mušte a možnosti používania tohto spôsobu pre zníženie hladiny kyselín vo vínach. Bolo veľmi výhodné, že sme k pokusom pristúpili r. 1965, keďže tento ročník sa vyznačoval extrémne vysokou aciditou hrozieň a muštov.

Pokusy 1965

Egalizovaný hroznový mušt (Rizling vlašský) s upravenou cukornatosťou 226 g/l red. cukrov a pôvodným obsahom 18,4 g/l titrovateľných kyselín sme rozdelili na 2 časti: jednu časť sme pasterizovali 20 minút pri 70 °C a zaisírlili 50 mg/l SO_2 , druhú časť sme zaisírlili 200 mg/l SO_2 a odkalili. Ako kontrola slúžil mušt, ktorý sa len zaisíril 50 mg/l SO_2 . Používal sa 4,5% zákvas 4dňovej kultúry kvasiniek *Schizosaccharomyces* alebo *Saccharomyces*. Kvasenie prebiehalo v 5 a 10litrových sklenných balónoch pri teplote 11 až 12 °C. Fľaše sa uzatvárali kvasnými uzávermi. Pribeh alkoholického

kého kvasenia sme sledovali refraktometricky, odbúrание kyselín stanovením titrovateľných kyselín a papierovou chromatografiou. Vína sa ošetrovali a školili obvyklým spôsobom.

Pokusy 1966

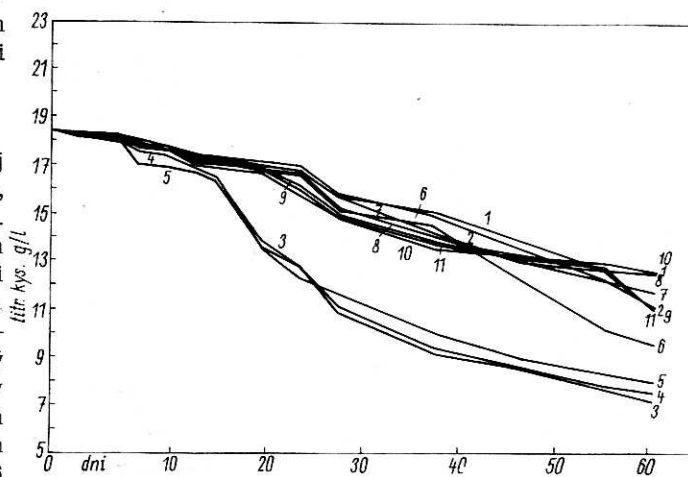
V rovnakom rozsahu sa uskutočnili pokusy aj v tomto roku. Použil sa opäť mušt Rizling vlašský, ktorého cukornatosť sa upravila na 195 g/l red. cukrov. Pôvodná acidita bola 9,3 g/l titrovateľných kyselín. Časť muštu sme opäť pasterizovali pri 70 °C po dobu 20 minút a zasírlili 50 mg/l SO₂ časť sme zasírlili stúpajúcimi dávkami SO₂ (100 — 150 — 200 mg/l). Ako kontrola slúžil mušt zasírený 50 mg/l SO₂. Podmienky kvasenia, použité kultúry a metódy sledovania kvasenia a odbúrания kyselín boli v podstate rovnaké ako v predchádzajúcom roku. Prehľad pokusných variácií r. 1965 až 1966 je zahrnutý v tabuľke 1.

Tabuľka 1

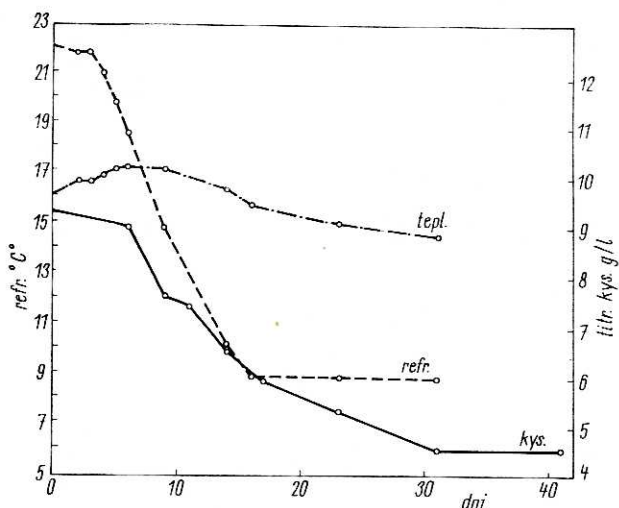
Variácia	1965	1966
1	Mušt zasírený 50 mg/l SO ₂ a kvasený spon-tánne	Detto ako r. 1965
2	Mušt zasírený 50 mg/l SO ₂ a kvasený <i>S. oviformis</i>	Detto ako r. 1965
3	Mušt pasterizovaný a zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. acidodevoratus</i>	Detto ako r. 1965
4	Mušt pasterizovaný a zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. pombe</i>	Detto ako r. 1965
5	Mušt pasterizovaný a zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. mosquensis</i>	Detto ako r. 1965
6	Mušt pasterizovaný a zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. mellacei</i>	Detto ako r. 1965
7	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ a odkalený, kvasený <i>Schizosacch. acidodevoratus</i>	Mušt pasterizovaný a zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>S. oviformis</i>
8	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ a odkalený, kvasený <i>Schizosacch. pombe</i>	Mušt zasírený 100 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. acidodevoratus</i>
9	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ , a odkalený, kvasený <i>Schizosacch. mosquensis</i>	Mušt zasírený 150 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. acidodevoratus</i>
10	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ , a odkalený, kvasený <i>Schizosacch. mellacei</i>	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ , kvasený <i>Schizosacch. acidodevoratus</i>
11	Mušt zasírený 200 mg/l SO ₂ a odkalený, kvasený <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	Mušt zasírený 50 mg/l SO ₂ , kvasený <i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>

Docielené výsledky

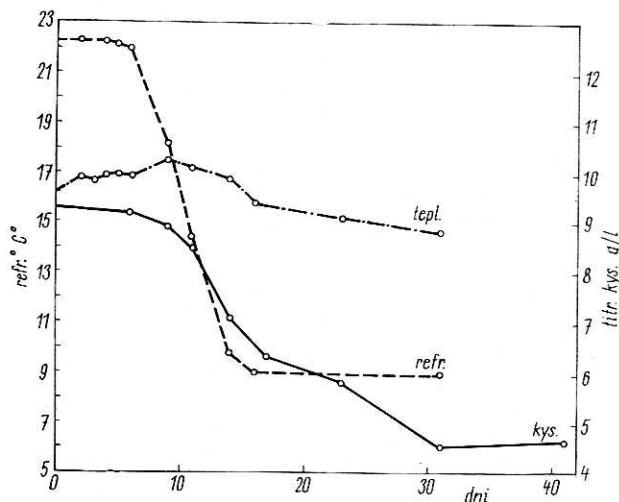
Priebeh odbúrания kyselín v pokusných muštoch 1 až 11 r. 1965 vidieť na obr. 1. Je zjavné, že najintenzívnejšie a najúplnejšie zníženie hladiny titro-



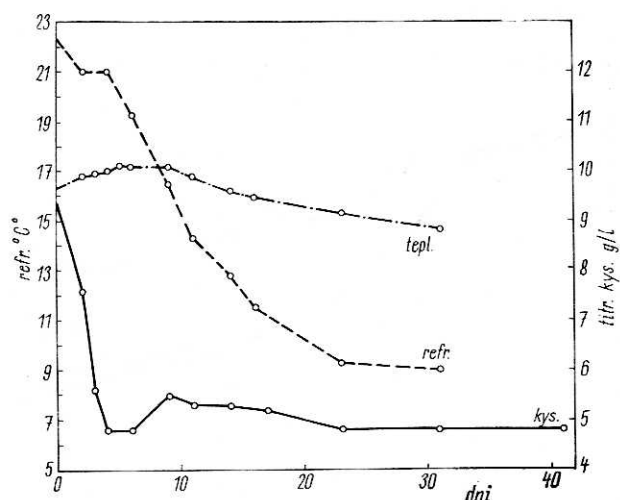
Obr. 1. Odbúrание titrovateľných kyselín v kvasiacom mušte (variácie 1–11 r. 1965)



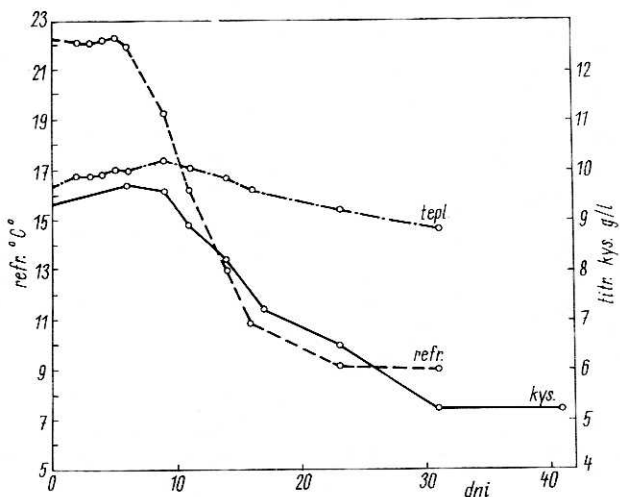
Obr. 2. Priebeh alkoholického kvasenia a odbúrания kyselín v kvasiacom mušte kvasenom *Schizosacch. acidodevoratus* (var. 3—1966)



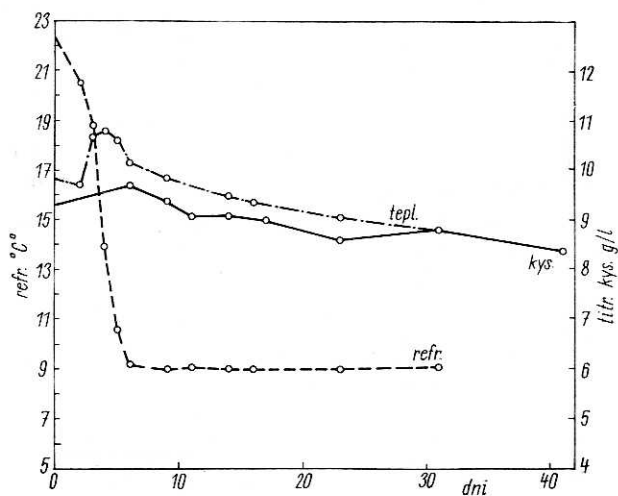
Obr. 3. Priebeh alkoholického kvasenia a odbúrания kyselín v kvasiacom mušte kvasenom *Schizosacch. pombe* (var. 4—1966)



Obr. 4. Priebeh alkoholického kvasenia a odbúrání kyselín v kvasiacom mušte kvasenom *Schizosacch. mosquensis* (var. 5—1966)



Obr. 5. Priebeh alkoholického kvasenia a odbúrání kyselín v kvasiacom mušte kvasenom *Schizosacch. mellacei* (var. 6—1966)



Obr. 6. Priebeh alkoholického kvasenia a odbúrání kyselín v kvasiacom mušte kvasenom *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (var. 11—1966)

vateľných kyselín vykazovali v poradí variácie 3—4—5—6, t. j. mušty predbežne pasterizované a mierne zasírené, zakvasené *Schizosacch. acidodevoratus*, *pombe*, *mosquensis* a *mellacei*. Počas 2 mesiacov klesol obsah titrovateľných kyselín z 18,4 na 7,2 až 9,7 g/l v kvasiacom mušte, čo je v priemere viac ako 50 % pôvodného obsahu kyselín muštu.

Najsilnejšie jablčno-alkoholické kvasenie vykazoval pasterizovaný mušt skvasený *Schizosacch. acidodevoratus*. Obsah kyselín sa tu znížil za túto dobu o 60,9 %. V mušte skvasenom *Schizosacch. pombe* sa hladina titrovateľných kyselín znížila o 58,2 %. Pasterizovaný mušt kvasený *Schizosacch. mosquensis* vykazoval za tú istú dobu o 55,5 %, mušt skvasený *Schizosacch. mellacei* o 47,3 % nižší obsah titrovateľných kyselín. Obsah kyselín sa v mušte skvasenom spontánne znížil na 12,6 g/l (o 31,6 %), v mušte skvasenom *S. oviformis* na 12,3 g/l (o 33,2 %) a *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* na 11,3 g/l (o 38,6 %). U kontrolných vín zrejme prebehlo bakteriálne jablčno-mliečne kvasenie, ktoré však pri tak extrémnej acidite nebolo zrejme dostatočne účinné.

U muštu zasírenom na 200 mg/l SO_2 a odkalenom (var. 7 až 10) sa hladina titrovateľných kyselín po 2 mesiacoch pohybovala na úrovni vín kvasených spontánne alebo čistou kultúrou *S. cerevisiae* a *oviformis*.

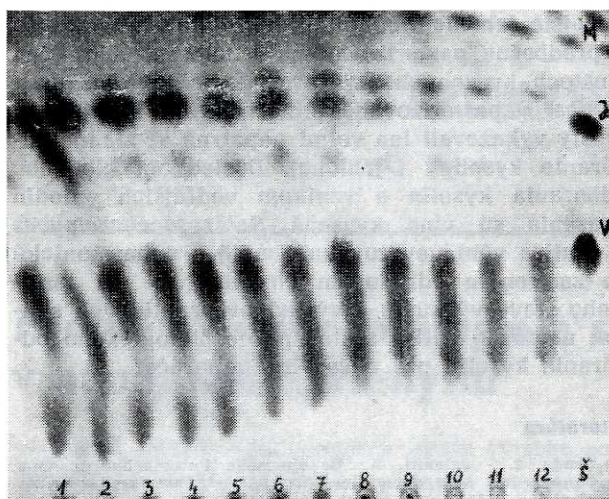
Obdobné relácie sme zaznamenali aj r. 1966, ako vidieť z obr. 2 až 6 (var. 3—6 a 11). Na grafoch je znázornený priebeh odbúrání cukru, teplota kvasiaceho muštu a hladina titrovateľných kyselín predbežne pasterizovaného muštu. Opäť sa potvrdilo, že *Schizosacch. acidodevoratus* a *pombe* odbúrávajú kyselinu L-jablčnú najintenzívnejšie, *Schizosacch. mellacei* najmenej hlboko. Najrýchlejší priebeh odbúrání vykazujú *Schizosacch. mosquensis*. Vo víne kvasenom *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* bol pokles hladiny titrovateľných kyselín minimálny.

V pasterizovanom a mierne zasírenom mušte zakvasenom *S. oviformis* (var. 7), vo všetkých nepasterizovaných muštach zasírených 100 až 200 mg/l SO_2 a zakvasených *Schizosacch. acidodevoratus*, ako aj v kontrolnom mušte kvasenom spontánne alebo *S. oviformis* (var. 1—2), hladiny kyselín podstatne nepoklesli.

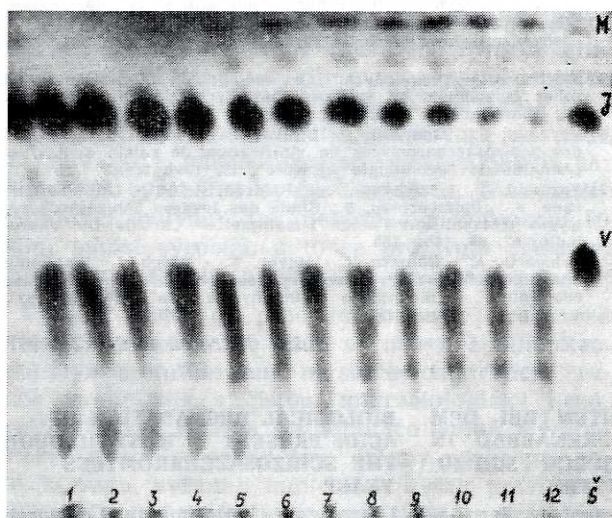
Priebeh odbúrání kyselín v kvasiacom mušte počas prvých 39 dní vidieť z chromatogramov na obr. 7 až 10.

Na obr. 7 možno sledovať priebeh odbúrání kyseliny L-jablčnej v pasterizovanom mušte kvasenom *Schizosacch. acidodevoratus* (var. 3). Skvasovanie je skončené asi 29. deň po začatí. Na obr. 8 vidieť priebeh skvasovania kyseliny L-jablčnej *Schizosacch. mellacei* (var. 6). Rýchlosť odbúrání je o niečo menšia ako v predchádzajúcom pokuse.

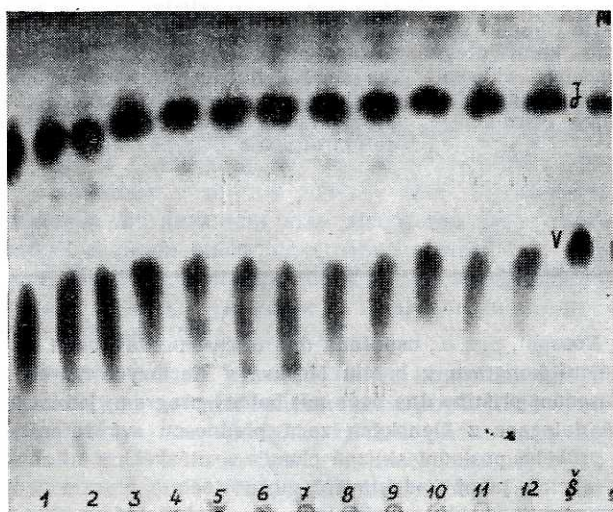
Priebeh odbúrání kyseliny L-jablčnej v nepasterizovanom mušte kvasenom *Schizosacch. acidodevoratus* (var. 8) jasne potvrdzuje, že je minimálne (obr. 9), obdobne ako v mušte kvasenom *S. oviformis*.



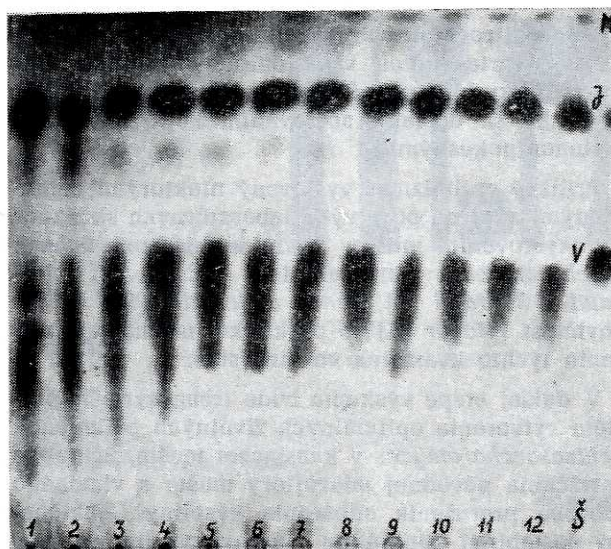
Obr. 7. Odbúranie kyseliny L-jablčnej v kvasiacom muš-
Schizosacch. acidodevoratus (var. 3—1966)



Obr. 8. Odbúranie kyseliny L-jablčnej v kvasiacom muš-
Schizosacch. mellacei (var. 6—1966)



Obr. 9. Odbúranie kyseliny L-jablčnej v kvasiacom pred-
bežne nepasterizovanom muš-
Schizosacch. acidodevoratus (var. 8—1966)



Obr. 10. Odbúranie kyseliny L-jablčnej v kvasiacom muš-
S. oviformis (var. 2—1966)

M — kyselina mliečna; J — kyselina jablčná; V — kyselina
vínna; S — štandardy

mis (var. 2), kde sa obsah kyseliny L-jablčnej po-
čas 39 dní prakticky nezmenil (obr. 10).

Alkoholické kvasenia cukrov v muštach vyvolané kvasinkami *Schizosaccharomyces* súbežne s jablč-
no-alkoholickým kvasením je v porovnaní s kvase-
ním kvasinkami *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* a
oviformis alebo spontánnym kvasením podstatne
(asi o 50 %) pomalšie, čo vidieť z priebehu odbú-
rania cukru na obr. 2 až 5. V silne sírených a od-
kalených muštach sa začiatok kvasenia oddiali
podľa koncentrácie kyseliny siričitej až o 14 dní;
potom však fermentácie prebehne rovnako rýchlo
ako v nesírenom alebo slabo sírenom muš-
te.

Úkaz, že v silne sírených, nepasterizovaných muš-
toch kvasinky *Schizosaccharomyces* nevyvolávajú
znateľnejšie biologické odbúranie kyseliny L-jablč-
nej vyplýva zo skutočnosti, že sa počas dlhej adap-
tačnej periódy kvasiniek pred začiatkom kvasenia
zo spontánnej kvasinkovej flóry vyselektujú SO₂-
rezistentné kmene *Saccharomyces*, ktoré sa rých-
lejšie množia ako *Schizosaccharomyces*. Údaje
mnohých zahraničných autorov o mimoriadnej
odolnosti posledných kvasiniek sa nepotvrdili. Ob-
dobný úkaz dostávame, ak zaočkujeme mušt zmie-
šanou kultúrou *Saccharomyces* — *Schizosaccharo-
myces*. *Saccharomyces* vždy potláča kvasinky rodu
Schizosaccharomyces. Preto zostali aj snahy niekto-
rých výskumníkov o dodatočné zaočkovanie skva-
sených muštov kvasinkami *Schizosaccharomyces*
bezvýsledné.

Vína, získané z pasterizovaných muštov kvase-
ných *Schizosaccharomyces*, sú chuťovo podstatne
menej výrazné so zastretým odrodovým charakte-
rom v porovnaní s vínami kvasenými čistou kultú-
rou *Saccharomyces* alebo spontánne. Niektoré dô-
sledkom príliš hlbokého odbúrania kyseliny L-ja-
blčnej a pravdepodobne aj niektorými doteraz ne-
zistenými vedľajšími splodinami jablčno-alkohol-
ického kvasenia boli mdlé a vykazovali niekedy ne-
čistý tón. Treba ovšem uviesť, že kontrolné vína
roč. 1965 boli chuťovo, vzhľadom na veľmi vysokú

hladinu titrovateľných kyselín, príliš nevyzreté a ostré, napriek tomu však odrodovejšie ako vína kvasené kvasinkami *Schizosaccharomyces*. Lepšie výsledky sa dosiahli sceľovaním kontrolných vín s vínami pokusnými.

Prílišný optimizmus vyslovený niektorými zahraničnými autormi po prvých laboratórnych skúškach s odkysľovaním muštov a vín kvasinkami *Schizosaccharomyces* vystriedala istá zdržanlivosť [Peynaud a Sudraud [6], Benda a Schmitt [1]] až pochybnosť [Mayer [4]] o praktickej možnosti využitia týchto kvasiniek vo vinárstve.

V ďalšej etape výskumu bude treba vyriešiť problém vytvorenia optimálnych životných podmienok *Schizosaccharomyces* v kvasiacom mušte, účinného potlačania pôvodnej mikroflóry muštu a vhodného spôsobu prerušenia odbúrania kyseliny L-jablčnej pri dosiahnutí optimálnej hladiny kyselín vo víne. Až potom bude možné uvažovať o eventuálnom praktickom použití tohoto inak zaujímavého a účinného spôsobu biologickej regulácie hladiny kyselín vo vínach. Pôjde najmä o to, nahradiť pre technológiu stolových a akostných vín nevhodnú pasterizáciu alebo extrémne šírenie inými účinnejšími spôsobmi a zistiť, ktoré látky spôsobujú zhoršenie chuťových vlastností vín kvasených kvasinkami rodu *Schizosaccharomyces*.

Súhrn

Skúšala sa vhodnosť využitia schopnosti rôznych druhov *Schizosaccharomyces* odbúrať kyselinu L-jablčnú v hroznových muštoch a vínach. Najinten-

zívnejšie jablčno-alkoholické kvasenie sa pozorovalo v predbežne pasterizovaných a mierne zasírených muštoch kvasených *Schizosacch. acidodevoratus* a *pombe*. Nepasterizované, silne zasírené a odkalené mušty vykazovali len veľmi nepatrné až žiadne odbúranie kyseliny L-jablčnej. Dôsledkom hlbokého odbúrania kyselín a vznikom vedľajších splodín kvasenia sú vína kvasená *Schizosaccharomyces* v chuti a vône nevyrovnané, mdlé a neharmonické so zastreným odrodovým charakterom. Za terajšieho stavu výskumu a výsledkov praktických skúšok nemožno zatiaľ tento spôsob biologického odbúrania kyselín pre naše vína odporúčať.

Literatúra

- [1] Benda, I. - Schmitt, A.: Oenologische Untersuchungen zum biologischen Säureabbau im Most durch *Schizosaccharomyces pombe*. = „Weinberg und Keller“, **13**, 1966: 239.
- [2] Dittich, H. H.: Versuche zum Äpfelsäureabbau mit einer Hefe der Gattung *Schizosaccharomyces*. = „Wein-Wissenschaft“, **18**, 1963: 392.
- [3] Fleisch, P. - Jerchel, D.: Über die Züchtung von *Bacterium gracile* in natürlichen L-Äpfelsäure enthaltenden Nährmedien. = „Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein“, **10**, 1960: 1.
- [4] Mayer, K.: Biologischer Säureabbau mit Spalthefen. = „Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau“, **101**, 1965: 368.
- [5] Mayer, K. - Temperli, A.: The metabolism of L-malate and other compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. = „Archiv für Mikrobiologie“, **48**, 1963: 321.
- [6] Peynaud, E. - Sudraud, P.: Utilisation de l'effet désacidifiant des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisin acides. = „Annales de Technologie Agricole“, **13**, 1964: 309.
- [7] Peynaud, E. - Domercq, S. - Boidron, A. M. - Lafon-Lafourcade, S. - Guimberteau, G.: Étude des levures *Schizosaccharomyces* métabolisant l'acide L-malique. = „Archiv für Mikrobiologie“, **48**, 1964: 150.
- [8] Temperli, A. - Künsch, U. - Mayer, K. - Busch, I.: Reinigung und Eigenschaften der decarboxylierenden Malatdehydrogenase aus Hefen. = „Biochimica et Biophysica Acta“, **110**, 1965: 630.

Lektoroval Ing. L. Bahník

Došlo do redakcie 10. 2. 1967.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ НЕЙТРАЛИ- ЗАЦИИ КИСЛОТ В ВИНОГРАД- НОМ ВИНЕ С ПОМОЩЬЮ ДРОЖЖЕЙ

SCHIZOSACCHAROMYCES

Приводятся результаты лабораторных экспериментов, направленных на изучение способности разных видов дрожжей рода *Schizosaccharomyces* влиять на интенсивность нейтрализации левовращающей яблочной кислоты в сброживаемом сусле. Ни результаты проведенных исследовательских работ, ни опытные данные, полученные при экспериментах в производственном масштабе, не дают пока возможности рекомендовать рассматриваемый метод нейтрализации кислот как применимый на практике.

NEUE MÖGLICHKEITEN BEI DEM BIOLOGISCHEN SÄURENABBAU IN MOSTENWEINEN DURCH SCHIZO- SACCHAROMYCES-HEFEN

Es werden die Ergebnisse der Laborversuche angeführt, in denen die Fähigkeit verschiedener *Schizosaccharomyces*-Arten zu intensivem L-Äpfelsäureabbau in gärendem Most verfolgt wurde. Aufgrund des gegenwärtigen Standes der Forschungsarbeiten sowie auch der praktischen Versuche kann diese Methode des biologischen Säurenabbaus für die inländischen Weinsorten nicht empfohlen werden.



BIOLOGICAL DEGRADATION OF ACIDS PRESENT IN MUST THROUGH THE SCHIZOSACCHAROMYCES YEAST

Large-scale experimental research works have been carried out to determine, whether some kinds of the *Schizosaccharomyces* yeast can intensify the degradation of malic acid present in the fermenting must. Our present knowledge of the mechanism of degradation and the results of practical application of the method do not allow to recommend it as a reliable biological process securing an efficient degradation of acids.