

# Štúdium propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek

Ing. FEDOR MALÍK, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT Bratislava

Živelnosť priebehu spontánneho kvasenia, ktorého sa zúčastňuje pestrá zmes mikroorganizmov, možno nahradiť cieľavedomým, kontrolovateľným kvasením čistými kultúrami vínnych kvasiniek. Štúdium propagácie kvasničnej biomasy pomáha odstraňovať problémy potrieb čistých kultúr kvasiniek za účelom plynulého kvasenia a získavania vín s nižšou hladinou prchavých kyselín a zbytkového cukru. Prípravou zákvasu čistých kultúr vínnych kvasiniek sa zároveň rieši i problém inhibície kvasenia, spôsobený aplikáciou organických fungicídov, ktorých reziduá ovplyvňujú priebeh kvasného procesu.

Zakvášanie muštu čistými kultúrami vínnych kvasiniek je vo vinárskej technológii bežné už dlhší čas [Rankine 1965; Egamberdiev 1967; Knappstein, Rankine 1970]. Náznaky na zakvášanie muštov zmesnými kultúrami kvasiniek, t.j. niekoľkými kmeňmi čistých kultúr vínnych kvasiniek, sa veľmi rozchádzajú. Soós (1953) uvádza, že kvasenie zmesnými kultúrami nemôže mať očakávaný účinok, pretože v zmesi kvasinkových kmeňov uplatní sa ten kmeň, ktorý sa intenzívnejšie rozmnožuje. Minárik (1965) dokazuje, že pri používaní zmesi čistých kultúr sa musia jednotlivé zákvasy vínnych kvasiniek pripraviť oddelene a pomiešať sa môžu až pri zakvasení muštu. Do zmesi sú vhodné kombinácie kmeňov *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* a *Torulaspora rosei* [Lodder 1970].

Čisté kultúry vínnych kvasiniek sa u nás na trh dostávajú v suchom stave [Mykoprodukta n. p.] a suspen-dované vo vykvasenom mušte, tzv. „tekuté kvasinky“ [VÚVV Bratislava]. I keď niektorí autori [Ostrouchova 1961] odporúčajú používanie lyofilizovaných kvasiniek, od ich aplikácie sa na základe neuspokojivých výsledkov v praxi ustupuje [Saller, Stefani 1962]. V zahraničí sa preto pristupuje k iným formám uchovávania a distribúcie čistých kultúr kvasiniek. Vo Švajčiarsku vo forme hustej pasty [Minárik 1957], v Kanade vo forme vlhkých lisovaných koláčov [Kunkee, Amerine 1970] a v Maďarsku v suspenzii muštu nasiaknutej v sterilnej buničitej vate.

## Materiál a metodika

V kontinuálnych i periodických fermentáciách s nepravidelným dávkovaním sme používali tieto kmene kvasiniek:

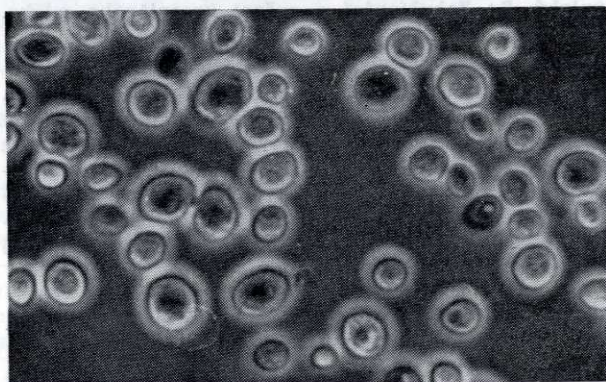
*Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 [Bratislava 0, V - 10 - 25 - 4],

*Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 [Bratislava 1, V - 10 - 28 - 8],

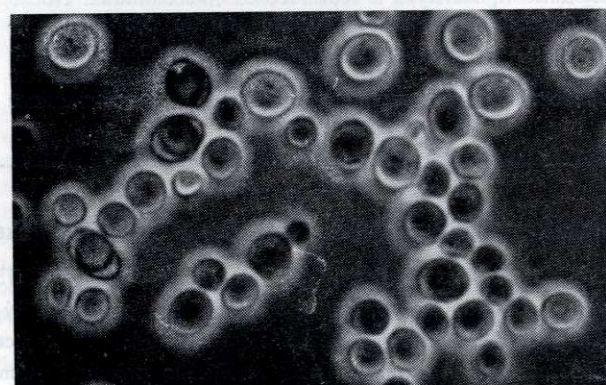
*Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 [Hliník 1, V - 10 - 35 - 41].

Vybrané kmene kvasiniek sa rozmnožujú za aerobných podmienok pri optimálnej teplote 25 až 32 °C [obrázky 1, 2 a 3].

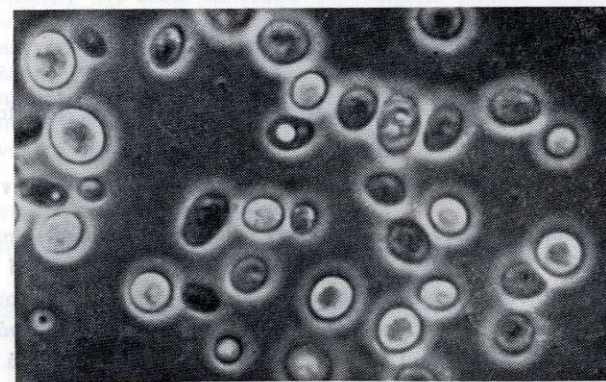
Vo všetkých fermentačných pokusoch sme používali jedinou živnú pôdu — hroznový mušt. Zahustený hroznový mušt sa riedil na požadovaný stupeň cukornatosti a acidita sa upravovala zriedenou kyselinou sírovou na pH  $\approx$  4,5, t.j. na pH optimálne pre životnú činnosť kvasiniek. V priebehu pokusov používali sme odpeňovacie oleje Struktol J 21 a Glanapon 1000.



Obr. 1. *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0, V - 10 - 25 - 4), trojdňová kultúra na sladinkovom agare, zväčšené asi 900krát — fázový kontrast (foto G. Czech)



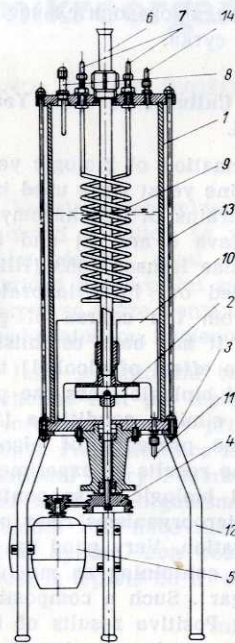
Obr. 2. *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava, V - 10 - 25 - 8), trojdňová kultúra na sladinkovom agare, zväčšené asi 900krát — fázový kontrast (foto G. Czech)



Obr. 3. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1, V - 10 - 35 - 41), trojdňová kultúra na sladinkovom agare, zväčšené asi 900krát — fázový kontrast (foto G. Czech)



Pre potreby propagácie kvasničnej biomasy sme použili samonasávací fermentér o objeme 30 litrov, vyvinutý na Katedre technickej mikrobiológie a biochémie Chemickotechnologickej fakulty SVŠT. Prietokné množstvo vzduchu nasávané fermentérom sú závislé od obsahu zádrže fermentovaného média, typu a otáčok vymeniťelných rotorov. Činnosť laboratórneho fermentéra je aplikovateľná pre väčšinu aerobných fermentácií (obr. 4).



Obr. 4. Laboratórny fermentér

1 — sklený valec (Ø 240 mm), 2 — turbínka (rotor) prevzdušňovacieho zariadenia (Ø 140 mm), 3 — príruha náhonu s ucpávkou, 4 — remenica náhonu na 3 stupne rýchlosti 900, 1280, 1500 ot/min, 5 — elektromotor o výkone 250 W/380 V, 6 — privodová trubka na vzduch a médium (Ø 25/20 mm), 7 — privod a odvod chladickej vody, 8 — odporový teplomer, 9 — chladiaci trubkový had (trubka 10/8 mm), 10 — brzdiace lopatky, 11 — výtok média, 12 — podstavec s prírubami, 13 — upevňovacie skrutky, 14 — odvzdušňovacia trubka.

Pokusy experimentálnej časti boli metodicky začlenené do troch etáp:

- pokusy propagácie kvasničnej biomasy z východzej čistej kultúry,
- pokusy propagácie z namnoženej kvasničnej biomasy,
- pokusy propagácie kvasničnej biomasy na surogovanom substráte.

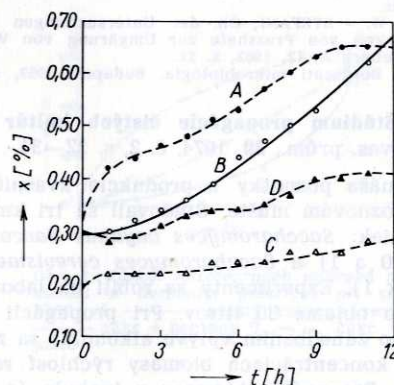
Pri pokusoch propagácie kvasničnej biomasy z východzej čistej kultúry sme vychádzali zo zákvasu vínnych kvasiniek, pripraveného naočkovaním riedeného hroznového muštu čistou kultúrou zo šikmého agaru. Po 48hodinovej kultivácii v termostate pri 28 °C sa inokulum odstredilo a premiestnilo do živného média vo fermentéri. Pri fermentačných pokusoch z namnoženej biomasy sa zvýšené kvantum kvasničnej biomasy získalo pomnožením v alkoholovej fermentácii batch-procesom. V pokusoch z namnoženej kvasničnej biomasy na surogovanom substráte sme prikrmovali k 20–80 % surogácii základného substrátu repným cukrom.

#### Výsledky a diskusia

Maximálna koncentrácia kvasničnej biomasy v mušte, ktorý dokváša, je približne 12,5 g kvasničnej sušiny/liter muštu. V 24hodinových pokusoch propagácie kvasničnej biomasy z východzej čistej kultúry vínnych kvasiniek sme dosiahli konečnú koncentráciu biomasy 4,1–5,3 g kvasničnej biomasy na liter média. Pri zanedbaní vplyvu tvoriaceho sa alkoholu a z pozorovania vzájomných vzťahov medzi rýchlosťou spotreby substrátu a koncentráciou biomasy sa zistilo, že pri vyšších koncentráciách kvasničnej biomasy rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov klesá. Propagácia čistých kultúr kvasiniek z inokula s vplyvom alkoholu konštatuje formou rovnice, zodpovedajúcej tvarom nekompetitívnej inhibície, brzdiaci vplyv alkoholu na rýchlosť rozmnožovania (Malík 1972).

V pokusoch propagácie z namnoženej kvasničnej biomasy, namnoženej v podmienkach aerobnej fermentácie, sa finálna koncentrácia biomasy pohybovala v značne vyššom rozmedzí: 22,1–42,0 g kvasničnej sušiny/l. V žiadnom z pokusov tejto časti sa vplyv počas fermentácie vznikajúceho alkoholu, z dôvodov nedostatečného aerobného prostredia, nemohol zanedbať. Spracovanie experimentálnych údajov tejto časti za použitia niektorých bioinžinierskych metódik s dôrazom na grafické zobrazenie vzťahov poukazuje na skutočnosť, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov rastie len do určitej, v medziach prípadov maximálnej koncentrácie mikroorganizmov (Malík 1972). Rýchlosť rozmnožovania potom klesá a kvasinky sa prestanú rozmnožovať ( $\frac{dx}{dt} = 0$ ).

Pri pokusoch z namnoženej biomasy na surogovanom substráte je z priebehu rastových charakteristík pozorovaná zväčšujúca sa miera brzdenia nárastu biomasy s rastúcim percentom surogácie hroznového muštu (obr. 5). Z výsledkov pokusov je zrejmé, že 20 % miera surogácie základného substrátu repným cukrom po doplnení fosforečnými a dusíkatými živinami (o ktoré bol zahustený hroznový mušt ochudobnený pri technologickom spracovaní) je prípustná i účelná pre potreby technologické.



Obr. 5. Grafické závislosti  $x = f(t)$  pre pokusy na surogovanom substráte

$x$  = koncentrácia kvasničnej biomasy v g/100 ml,  $t$  = čas v hodinách  
A — 20 %ná surogácia bez stopových prvkov  
B — 40 %ná surogácia so stopovými prvkami  
C — 60 %ná surogácia so stopovými prvkami  
D — 80 %ná surogácia bez stopových prvkov

Napropagovaná kvasničná biomasa čistých kultúr vínnych kvasiniek sa exploatovala pre potreby technologického zákvasu v podmienkach poloprevádzky. Kladné výsledky pokusov s kvasením čistými kultúrami vínnych kvasiniek nielen zamietajú názory o zmene kvality a charakteru vín čistou kultúrou kvasiniek, ale naopak sú doporučením k ich širšej aplikácii.

Využívajúc poznatkov experimentálneho vyhodnotenia a vychádzajúc z požiadaviek vinárskej veľkovýroby sa záverom v práci navrhuje zariadenie na produkciu kvasničnej biomasy. Pre propagáciu čistých kultúr vínnych kvasiniek navrhujeme fermentačný dvojčlen. Prvý člen pre aerobnú fermentáciu (propagátor), so zariadením umožňujúcim dobrý prestup kyslíka. Druhý člen, v ktorom kvasinky načas zostávajú v prostredí anaerobnom, je prepojený spätným tokom (feed back) s prvým členom. Zariadenie by slúžilo ako selektor (Hronček 1966). Kapacita navrhovaného zariadenia je počítaná pre závod, ktorý spracúva 10 vagónov hroznového muštu denne. Za predpokladu 5%ného zákvasu uvažujeme s dennou produkciou 60 kg kvasničnej sušiny.

Výsledky propagácie vybraných čistých kultúr vínnych kvasiniek *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0, Bratislava 1) a *Saccharomyces cerevisiae* Hansen



1883 (Hliník 1), ako i kladné výsledky ich technologickej aplikácie, dokázali oprávnenosť použitia čistých kultúr vínnych kvasiniek v technológii hroznových vín.

Lektoroval Doc. Ing. E. Minárik, CSc.

#### Literatúra

- [1] EGAMBERDIEV, N. B.: Izučenie dynamiki sbraživanja vinogradnogo susla drožžami *Saccharomyces vini* (rasa Parkenskaja-1) v usloviach nepreryvnogo kultivirovaniya. Prikladnaja Biochimija i Mikrobiologija, 3, 1967, s. 456.
- [2] HRONČEK, J.: Selektor (Rezortná úloha 03.18/d). SVŠT Chf Bratislava 1966, s. 77.
- [3] KNAPPSTEIN, A. T. - RANKINE, B. C.: Commercial application of pure yeast in winemaking and its influence on Wine quality. Australian Wine, Brewing and Spirit Review, 89(3), 1970, s. 52 (separát).
- [4] KUNKEE, R. E. - AMERINE, M. A.: Yeast in Winemaking. In: The Yeast, Vol. III. Academic Press, London and New York 1970, s. 6—60.
- [5] LODDER, J.: The Yeast (A taxonomic study). North-Holland Publishing Comp., Amsterdam-London 1970, s. 555—718.
- [6] MALÍK, F.: Štúdium propagácie kvasničnej biomasy pre účely vinárskej technológie (kandidátska dizertačná práca). SVŠT Chf Bratislava 1972, s. 171.
- [7] MINÁRIK, E.: Správa zo študijnej cesty do Švajčiarska. VÚV SAV Bratislava 1957, s. 21—43.
- [8] MINÁRIK, E.: Vplyv čistej kultúry a zmesi čistých kultúr kvasiniek na kvasenie hroznového muštu. Kvasný prům., 4, 1965, s. 82.
- [9] OSTROUGHOVA, Z. A.: Sochranenie svojstv vínnych drožžej metodom lyofilnoj sutky. Mikrobiologija, 30, 1961, s. 341.
- [10] RANKINE, B. C.: Pure yeast cultures in winemaking (Text of a lecture to winemakers of Nurioopta on July 22 1965, under the auspices of the Gawler Adult Education Centre) — separát.
- [11] SALLER, W. - STEFANI, Ch. de: Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Presshefe zur Umgärung von Wein. Mitt. Klosterneuburg A, 12, 1962, s. 11.
- [12] SOÓS, J.: Borászati mikrobiológia. Budapest 1953, s. 71—124.

**Malík, F.: Štúdium propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek.** Kvas. prům., 20, 1974, č. 2, s. 32—34.

Práca prináša poznatky z produkcie kvasničnej biomasy na hroznovom mušte. Študovali sa tri kmene vínnych kvasiniek: *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0 a 1) a *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). Experimenty sa robili na laboratórnom fermentéri o objeme 30 litrov. Pri propagácii biomasy z inokula (so zanedbaním vplyvu alkoholu) sa zistilo, že pri vyšších koncentráciách biomasy rýchlosť rozmnožovania klesá. Propagácia biomasy z inokula (s vplyvom tvoriaceho sa alkoholu) konštatuje brzdiaci vplyv alkoholu na rýchlosť rozmnožovania. Propagácia z namnoženej biomasy poukazuje na skutočnosť, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov rastie len do určitej, maximálnej koncentrácie. Pokusy propagácie biomasy na surogovanom substráte poukazujú na účelnosť 20 % miery surogácie hroznového muštu repným cukrom. Kladné výsledky pokusov s kvasením napropagovanými čistými kultúrami vínnych kvasiniek sú doporučením k ich širšej aplikácii. Pre produkciu čistých kultúr vínnych kvasiniek sa navrhuje fermentačný dvojčlen s dennou produkciou 60 kg kvasničnej sušiny.

**Малик, Ф.: Изучение размножения чистых культур винных дрожжей.** Квас. прум. 20, 1974, № 2, стр. 32—34.

В статье приводятся результаты изучения процесса образования дрожжевой биологической массы в питательной среде виноградного сусла. Работа охватывает три штамма винных дрожжей *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Братислава 0 и 1) и один штамм *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Глиник 1). Для всех экспериментов применялся бродильный аппарат емкостью 30 л. При образовании биологической массы из посевной культуры с повышающейся концентрацией массы скорость ее размножения уменьшается (не учитывается влияние спирта). Образующийся в ходе процесса спирт заметно тормозит размножение. Экспери-

мент с предварительно разведенной биологической массой показал, что скорость размножения микроорганизмов возрастает лишь до их определенной концентрации. В качестве питательной среды целесообразно применять виноградное сусло содержанием 20 % заменителя, т. е. свекловичного сахара. На основании положительных результатов экспериментов можно рекомендовать применение предварительно разведенных чистых культур винных дрожжей. Всем требуемым условиям отвечает двухсекционный бродильный аппарат производительностью 60 кг сухой дрожжевой массы в сутки.

**Malík, F.: Propagation of Pure Cultures of Wine Yeast.** Kvas. prům. 20, No. 2, pp. 32—34.

The article deals with the formation of biologic yeast mass in must. Four strains of wine yeast were used in a series of experiments, viz.: 3 strains of *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0 and 1) and one strain of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). All experiments were carried out in a laboratory fermenter of 30 l capacity. From the course of propagation started with inoculum it has been established (without taking into account the effect of alcohol) that with increasing concentration of biologic mass the propagation rate decreases. Under similar conditions (i. e. propagation from inoculum) the presence of alcohol retards the propagation rate. The results of experiments carried out with prepropagated biologic mass confirm that the propagation rate of microorganisms rises only to a certain maximum concentration. Very good results were achieved with a substrate containing as much as 20 % of surrogate (beet-root sugar). Such a composition can be therefore recommended. Positive results of fermentation with prepropagated pure wine yeast cultures speak for wider application of this method. For the propagation of pure wine yeast cultures two-section fermenters producing up to 60 kg of dry yeast mass per day should be used.

**Malík, F.: Studium der Reinzucht der Weinhefekulturen.** Kvas. prům. 20, 1974, No. 2, S. 32—34.

Die Arbeit bringt Erkenntnisse auf dem Gebiet der Produktion der Hefebiomasse auf Traubenmost. Es wurden 3 Weinhefestämme studiert: *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0 und 1) und *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). Die Versuche wurden auf einem 30-Liter-Laborfermentor durchgeführt. Bei der Vermehrung der Biomasse aus dem Inoculum (bei Ausserachtlassung des Einflusses des Alkohols) wurde festgestellt, dass bei höheren Biomassekonzentrationen die Vermehrungsgeschwindigkeit sinkt. Bei der Propagation der Biomasse aus dem Inoculum (mit dem Einfluss des sich bildenden Alkohols) zeigte sich der bremsende Einfluss des Alkohols auf die Vermehrungsgeschwindigkeit. Die Propagation aus der vermehrten Biomasse weist auf die Tatsache hin, dass die Vermehrungsgeschwindigkeit der Mikroorganismen nur bis zu einer bestimmten Maximalkonzentration anwächst. Die Versuche der Biomasseproduktion auf Surrogat-haltigen Substraten beweisen die Zweckmäßigkeit eines 20 %-Ersatzes des Traubenmostes durch Rübenzucker. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Gärversuche mit den produzierten Weinhefe-Reinkulturen kann eine breite Applikation empfohlen werden. Für die Vermehrung der Weinhefe-Reinkulturen wird ein Doppelfermentor mit einer täglichen Produktion von 60 kg Hefetrockensubstanz vorgeschlagen.