

# Niektoré poznatky z propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek

663.132  
663.252.41

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

Pri štúdiu propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek sme dospeli k niektorým povšimnutiahodným poznatkom. Zaujímavé sa javia predovšetkým výsledky pokusov propagácie z namnoženej kvasničnej biomasy, namnoženej v podmienkach anaerobného batch-procesu. Spracovanie experimentálnych údajov tejto časti pokusov za použitia niektorých bioinžinierskych metodík, s dôrazom na grafické zobrazenie vzťahov poukazuje na skutočnosť, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov rastie len do určitej, v medziach prípadu maximálnej koncentrácie mikroorganizmov [Malík 1972].

## Materiál a metodika

Vo vybraných kontinuálnych fermentáciách, ktoré predkladám, sme použili nasledovné dva kmene kvasiniek:

*Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895

[Bratislava 0, V-10-25-4]

[pokús 1.]

*Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883

[Hliník 1, V-10-35-41]

[pokús 2.].

Uvádzané kmene kvasiniek sa rozmnožujú za aerobných podmienok pri optimálnej teplote 26–28 °C. V oboch fermentačných pokusoch sme používali jedinou živnú pôdu — hroznový mušt. Dávkovaná pôda, pripravená nariadením zahusteného hroznového muštu obsahovala:  $S_1 = 23,44\%$  a  $S_2 = 23,01\%$  cukru. Propagácie kvasničnej biomasy prebiehali za použitia 0,084 g/l média odpeňovacieho oleja Glanapon 1000 [Gross—Busetti 1968]. Experimenty propagácie kvasničnej biomasy, prebiehajúce na samonasávacom modeli fermentéra o objeme 30 litrov [Malík 1974], charakterizujú nasledovné parametre: konštantný objem fermentovaného média  $V_1 = V_2 = 4,5\text{ l}$ , prítoky média  $F_1 = 0,15\text{ lh}^{-1}$ ,  $F_2 = 0,17\text{ lh}^{-1}$  a zriedovacie rýchlosti  $D_1 = 0,033\text{ h}^{-1}$  a  $D_2 = 0,038\text{ h}^{-1}$ .

Pre potreby vyhodnotenia pokusov sme riešili látkové

| t (h) | S [g/100 ml] | P [obj. %] | X [g/100 ml] | $\Delta X$ | $\frac{dX}{dt}$ |
|-------|--------------|------------|--------------|------------|-----------------|
| 0     | 0            | 0          | 1,04         | —          | —               |
| 1     | —            | —          | 1,12         | 0,08       | 0,117           |
| 2     | 0,24         | 0,49       | 1,24         | 0,12       | 0,161           |
| 3     | —            | —          | 1,39         | 0,15       | 0,196           |
| 4     | 0,20         | 0,71       | 1,62         | 0,23       | 0,284           |
| 5     | —            | —          | 1,81         | 0,19       | 0,250           |
| 6     | 0,28         | 0,61       | 1,99         | 0,18       | 0,246           |
| 7     | —            | —          | 2,17         | 0,18       | 0,252           |
| 8     | 0,28         | 0,49       | 2,37         | 0,20       | 0,278           |
| 9     | —            | —          | 2,52         | 0,15       | 0,233           |
| 10    | 0,28         | 0,46       | 2,62         | 0,10       | 0,187           |
| 11    | —            | —          | 2,66         | 0,04       | 0,129           |
| 12    | 0,32         | 0,32       | 2,72         | 0,06       | 0,150           |
| 13    | —            | —          | 2,72         | 0          | 0,090           |
| 14    | 0,32         | 0,28       | 2,74         | 0,02       | 0,111           |
| 15    | —            | —          | 2,74         | 0          | 0,091           |
| 16    | 0,40         | 0,28       | 2,76         | 0,02       | 0,111           |

| t (h) | S [g/100 ml] | P [obj. %] | X [g/100 ml] | $\Delta X$ | $\frac{dX}{dt}$ |
|-------|--------------|------------|--------------|------------|-----------------|
| 0     | 0            | 0          | 2,24         | —          | —               |
| 1     | —            | —          | 2,32         | 0,08       | 0,168           |
| 2     | 0,24         | 0,81       | 2,44         | 0,12       | 0,212           |
| 3     | —            | —          | 2,58         | 0,14       | 0,238           |
| 4     | 0,24         | 0,86       | 2,79         | 0,21       | 0,316           |
| 5     | —            | —          | 3,02         | 0,23       | 0,345           |
| 6     | 0,24         | 0,50       | 3,28         | 0,26       | 0,385           |
| 7     | —            | —          | 3,48         | 0,20       | 0,332           |
| 8     | 0,24         | 0,50       | 3,64         | 0,16       | 0,298           |
| 9     | —            | —          | 3,78         | 0,14       | 0,288           |
| 10    | 0,31         | 0,26       | 3,92         | 0,14       | 0,289           |
| 11    | —            | —          | 4,01         | 0,09       | 0,242           |
| 12    | 0,48         | 0,14       | 4,09         | 0,08       | 0,236           |
| 13    | —            | —          | 4,13         | 0,04       | 0,197           |
| 14    | 0,40         | 0,26       | 4,16         | 0,03       | 0,188           |
| 15    | —            | —          | 4,16         | 0          | 0,158           |
| 16    | 0,44         | 0,20       | 4,20         | 0,04       | 0,200           |



bilancie procesu a z nich určili vzťah pre výpočet rýchlosti rozmnožovania mikroorganizmov:

$$\frac{dX}{dt} = \Delta X + DX_n \quad (1)$$

pričom

$$\Delta X = X_n - X_0$$

### Výsledky a diskusia

Priebeh uvádzaných pokusov je charakterizovaný rastúcou kvasničnou biomasou  $[X]$ , rastúcim a neskôr klesajúcim objemovým percentom alkoholu  $[P]$  a približne konštantnou hladinou substrátu  $[S]$ . Vznik a prítomnosť alkoholu, signalizujúci nedostatočné aerobné prostredie, nás upozorňuje na jeho vplyv pri propagácii kvasničnej biomasy. Kolísanie objemového percenta alkoholu je spôsobené samonasávacím funkčným charakterom propagátora a pravdepodobne i jeho asimiláciou kvasinkami. Pokusy tejto časti boli vedené so zreteľom na uľahčenie úvahy, aby koncentrácia substrátu bola približne rovnaká.

Predpokladáme, že v oboch pokusoch prebiehajú vedľa seba dva procesy:

- proces rozmnožovania mikroorganizmov, spojený s procesom tvorby alkoholu,
- proces zriedzovania, čiže vyplavovania.

Ak uvažujeme látkovú bilanciu mikroorganizmov vo fermentačnom systéme, v ktorom neprebíha rozmnožovanie a ani tvorba alkoholu, ale len vyplavovanie, potom pre rýchlosť vyplavovania platí:

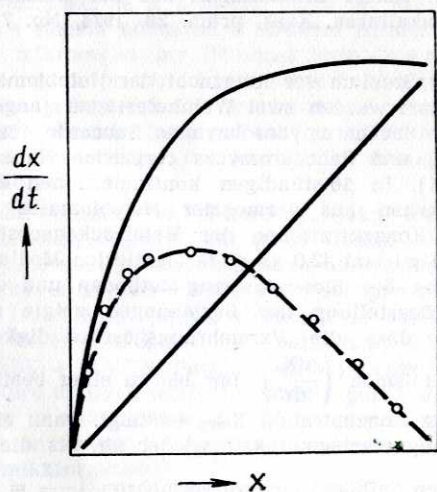
$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F}{V} X \quad (2)$$

Rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov  $\frac{dX}{dt}$  je úmerná koncentrácii mikroorganizmov a je ovplyvňovaná i inhibíciou tvoriaceho sa alkoholu. Zohľadniac vzťahy Egamberdieva a Jerusalemského (1968) môžeme preto písať:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \mu_0 \cdot \frac{X}{P + k_p} \quad (3)$$

Z pohľadu na objemové percento alkoholu je zrejmé, že s ohľadom na nedostatočné aerobné podmienky, je tvorba alkoholu nezanedbateľným produktom životnej činnosti kvasiniek. Za predpokladu, že rýchlosť tvorby alkoholu je úmerná koncentrácii buniek, môžeme písať:

$$\frac{dP}{dt} = k X \quad (4)$$



Obr. 1. Grafické znázornenie všeobecnej závislosti (6)

$$\frac{dX}{dt} = \text{rýchlosť rozmnožovania,}$$

$X$  = koncentrácia mikroorganizmov

Zohľadnením vzťahov (2) a (3) pre celkovú zmenu mikroorganizmov platí:

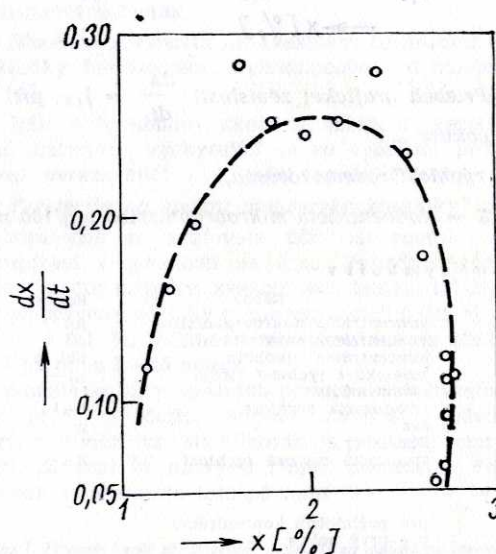
$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_0 X}{P + k_p} - \frac{F}{V} X = X \left( \frac{\mu_0}{P + k_p} - \frac{F}{V} \right) = X \cdot \left( \frac{\mu_0}{kX + k_p} - \frac{F}{V} \right) \quad (5)$$

Úpravou vzťahu (5) dostávame:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_0 X}{k'X + k_p} - \frac{F}{V} X \quad (6)$$

Oba členy všeobecnej závislosti (6) sme zakreslili do grafu (obr. 1.). Prvý člen závislosti je obdobný rovnici Michaelis-Mentenovej (Aiba et al. 1965) a jej grafickým obrazom je hyperbolická krivka. Tvar druhého člena je rovnicou priamky so smernicou  $F/V$ . Grafický rozdiel (Jurga 1958) je obrazom priebehu funkcie

$\frac{dX}{dt} = f(x)$ , ktorá je na obr. 1 vyznačená čiarkovane.



Obr. 2. Priebeh grafickej závislosti  $\frac{dX}{dt} = f(x)$  pri pokuse 1.

$\frac{dX}{dt}$  = rýchlosť rozmnožovania,

$X$  = koncentrácia mikroorganizmov v g/100 ml

Priebeh tejto závislosti poukazuje na skutočnosť, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov rastie len do určitej, v medziach prípadu maximálnej koncentrácie ( $X_{max}$ ). Potom rýchlosť rozmnožovania klesá a mikroorganizmy sa prestanú rozmnožovať ( $\frac{dX}{dt} = 0$ ). Vychádzajúc zo vzťahu (6) vypočítali sme i hodnotu  $X_{max}$ :

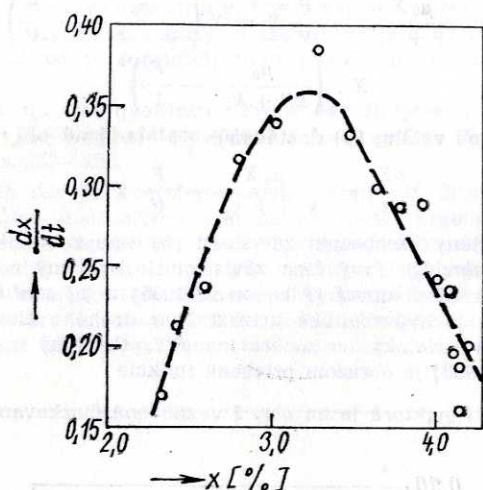
$$X_{max} = \left( \frac{\mu_0}{D} - k_p \right) \frac{1}{k'} \quad (7)$$

Z tohto pohľadu bude teraz zaujímavé vrátiť sa ku grafickým závislostiam  $\frac{dX}{dt} = f(x)$  pri pokusoch 1. a 2.:

Z priebehu grafických závislostí na obr. 2 a obr. 3 je zrejme podobnosť s priebehom všeobecnej závislosti, vyplývajúcej zo vzťahu (6) na obr. 1. Výsledky našich experimentov sú teda dokladom tvrdenia, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov  $\frac{dX}{dt}$  rastie len po určitú koncentráciu mikroorganizmov, ktorú sme označili ako maximálnu ( $X_{max}$ ). Potom rýchlosť rozmnožovania



klesá [približne od ôsmej hodnoty fermentácie] a mikroorganizmy sa prestanú rozmnožovať.



Obr. 3. Priebeh grafickej závislosti  $\frac{dX}{dt} = f(X)$  pri pokuse 2.

$\frac{dX}{dt}$  = rýchlosť rozmnožovania,

$X$  = koncentrácia mikroorganizmov v g/100 ml

#### Zoznam symbolov

| Symbol  | Názov                        | Rozmer            |
|---------|------------------------------|-------------------|
| $X$     | koncentrácia mikroorganizmov | g/l               |
| $S$     | koncentrácia substrátu       | g/l               |
| $P$     | koncentrácia alkoholu        | obj. %            |
| $F$     | prietoková rýchlosť média    | l h <sup>-1</sup> |
| $V$     | objem média                  | l                 |
| $D$     | zriedňovacia rýchlosť        | h <sup>-1</sup>   |
| $t$     | čas                          | h                 |
| $k, k'$ | konštanty                    | h                 |
| $\mu$   | špecifická rastová rýchlosť  | h <sup>-1</sup>   |

#### Indexy

|       |                             |
|-------|-----------------------------|
| 0     | pre počiatočnú koncentráciu |
| 1     | pre prvý pokus              |
| 2     | pre druhý pokus             |
| $n$   | pre konečnú koncentráciu    |
| $max$ | pre maximálnu koncentráciu  |
| $p$   | pre alkohol                 |

#### Literatúra

- [1] AIBA, S., HUMPHREY, A. E., MILLIS, U. F.: Biochemical Engineering, Academic Press New York, 1965, s. 100
- [2] EGAMBERDIEV, N. B., JERUSALIMSKIJ N. D.: Studies of the continuous must fermentation processes with the yeast *Saccharomyces vini* (race Pr — 1) to produce dry wines, Continuous Cultivation of Microorganisms, Proceedings of the 4th Symposium held in Prague June 17–21 1968, Academia Praha 1969, s. 517–527
- [3] GROSS-BUSETTI Co.: Glanapon 1000 and Glanapon P-204, Gross-Busetti Co. 1170, Wien 1968 (prospekt)
- [4] JURGA, F.: Monografia a iné grafické metódy, SVTL Bratislava, 1958, s. 44
- [5] MALÍK, F.: Štúdium propagácie kvasničnej biomasy pre účely vinárskej technológie (kandidátska dizertačná práca), ČHf SVŠT Bratislava 1972, s. 171
- [6] MALÍK, F.: Štúdium propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek, Kvasný prům. 20, 1974, s. 32–34

**Malík, F.: Niektoré poznatky z propagácie čistých kultúr vínnych kvasiniek.** Kvas. prům. 20, 1974, č. 7, s. 156–158.

Pre štúdium propagácie kvasničnej biomasy na hroznomom mušte sme exploatovali dva kmene vínnych kvasiniek: *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0) a *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). V 16hodinových kontinuálnych pokusoch propagácie z namnoženej kvasničnej biomasy sme dosiahli finálne koncentrácie kvasničnej sušiny: 27,6 g/l a 42,0 g/l fermentovaného média. Použitie bioinžinierskych metódik a grafické zobrazenie vzťahov poukázalo na skutočnosť, že rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov  $\left(\frac{dX}{dt}\right)$

rastie len do určitej, maximálnej koncentrácie  $X_{max}$ . Rýchlosť rozmnožovania potom klesá a mikroorganizmy sa prestanú rozmnožovať  $\left(\frac{dX}{dt} = 0\right)$ . V práci sa uvádzajú i vzťahy pre výpočet rýchlosti rozmnožovania a vzťah, udávajúci hodnotu maximálnej koncentrácie mikroorganizmov.

**Малик, Ф.: Опыт по разведению чистых культур винных дрожжей.** Квас. прум. 20, 1974, № 7, стр. 156–158.

Для изучения процесса размножения дрожжей в виноградно-мусте были выбраны два штамма винных дрожжей: *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Братислава 0) и *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Глиник 1). После 16 часов непрерывного размножения было получено: 27,6 г/л дрожжей (сухого вещества) и 42,0 г/л сброженной среды. Из расчетов и диаграмм видно, что скорость размножения микроорганизмов  $\left(\frac{dX}{dt}\right)$  возрастает лишь до определенной максимальной концентрации ( $X_{max}$ ), после чего она падает. Микроорганизмы перестают размножаться  $\left(\frac{dX}{dt} = 0\right)$ . В статье приведены формулы для расчета скорости размножения и максимальной концентрации микроорганизмов.

**Malík, F.: Experience on the Propagation of Pure Cultures of Wine Yeast.** Kvas. prům. 20, 1974, No. 7, pp. 156–158.

To study the propagation of biological mass of yeast in must the author selected two strains of wine yeast, viz.: *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0) and *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). The yields after 16 hours of continuous propagation were: 27,6 g/l of dry yeast and 42,0 g/l of fermented medium. Detailed calculations and diagrams confirm that the propagation rate of microorganisms is rising  $\left(\frac{dX}{dt}\right)$  only to a certain maximum concentration ( $X_{max}$ ). Then the propagation rate starts to drop and microorganisms cease to multiply  $\left(\frac{dX}{dt} = 0\right)$ . The author presents formulae permitting to calculate the propagation rate and maximum concentration.

**Malík, F.: Einige Erkenntnisse aus der Reinzucht der Weinhefenkulturen.** Kvas. prům. 20, 1974, No. 7, S. 156–158.

Für das Studium der Reinzucht der Hefebiomasse auf Traubenmost wurden zwei Weinhefestämme angewendet und zwar *Saccharomyces bayanus* Saccardo 1895 (Bratislava 0) und *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 1883 (Hliník 1). In 16-stündigen kontinuierlichen Propagationsversuchen aus vermehrter Hefebiomasse wurden folgende Konzentrationen der Hefetrockensubstanz erzielt: 27,6 g/l und 42,0 g/l d. fermentierten Mediums. Die Anwendung der Bioengineering-Methoden und die graphische Darstellung der Beziehungen zeigte auf die Tatsache, dass die Vermehrungsgeschwindigkeit der Mikroorganismen  $\left(\frac{dX}{dt}\right)$  nur bis zu einer bestimmten, maximalen Konzentration  $X_{max}$  ansteigt. Dann sinkt die Vermehrungsgeschwindigkeit wieder ab, bis die Mikroorganismen aufhören sich zu vermehren.  $\left(\frac{dX}{dt} = 0\right)$ . In der Arbeit werden auch die Beziehungen für die Berechnung der Vermehrungsgeschwindigkeit und des Wertes der Maximalkonzentration der Mikroorganismen angeführt.