

Vinařství

Možnosti ovplyvnenia kvasenia muštu aktivátorom z *Botrytis cinerea*

663.252.4

Doc. Ing. ERICH MINÁRIK, DrSc., Komplexný výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, Bratislava

Už pred 50 rokmi objavil Nielsen a Hartelius [1932] v kultivačnom prostredí *Aspergillus niger* látky, ktoré sú schopné urýchliť rast následných generácií tejto hýfovitej huby. Neskôr zistili, že uvedené substancie sú aktívne aj voči kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* a iným druhom [Nielsen a Hartelius 1937, Nielsen a Sing-Fang 1937]. V podstate rozlíšili dve skupiny aktivačných látok. Prvá skupina zahŕňa substancie, ktoré sú súčasťou tzv. faktoru bios, druhá tvorí vlastný aktivátor *Aspergillus*, ktorý nie je identický s vitamínami skupiny B. Aktivátor z *Aspergillus niger* sa popísal ako termostabilný, rozpustný vo vode a odolný voči kyslému i alkalickému prostrediu. V etanole ani v éteri nie je rozpustný.

Aktivátor z *A. niger* nie je nikdy pre rast a fermentačnú aktivitu vínnych kvasiniek nevyhnutný. Za jeho prítomnosti však značne vzrastá reprodukčná i fermentačná činnosť kvasiniek. Tým sa uvedený aktivátor líši od tzv. „aktivátora Z“ von Eulera, ktorý urýchľuje iba kvasenie bez toho, že by ovplyvnil aj rast kvasiniek.

Účinok Nielsonovho aktivátora sa vysvetľoval tvorbou a akumuláciou triozofosfátov na začiatku kvasenia, čím sa urýchľuje utilizácia a fermentácia cukrov. Ribéreau-Gayon, Peynaud a Lafon [1952] dokázali, že aktivátor uľahčuje glyceropyruvátové kvasenie, čím sa značne modifikuje produkcia vedľajších splođín kvasenia. Produkcia kyseliny octovej sa zníži, tvorba glycerolu a kyseliny jantarovej, naopak, zvýši. Aktivátor zvyšuje aj rýchlosť využívania acetaldehydu. Tým sa znižuje obsah voľného acetaldehydu v kvasnom médiu [Lafon 1954]. Zdá sa, že Nielsenov aktivátor je zatiaľ jedným z málo známych aktivátorov kvasenia, ktoré zvyšujú produkciu glycerolu.

Možnosť praktickej aplikácie sušeného práškoveho mycélia *A. niger* obsahujúceho Nielsenov aktivátor pri výrobe vína uvažovali už dávnejšie vo francúzskych patentoch [1943a, 1943b, 1943c]. Ribéreau-Gayon a Peynaud [1952] uviedli prvé skúsenosti z laboratória i prevádzky s aplikáciou aktivátorov rôznych hýfovitých húb.

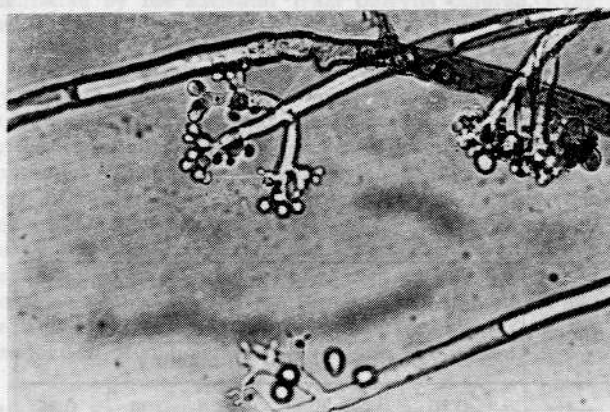
Výskyt Nielsenovho aktivátora v mycéliu *Botrytis cinerea* Persoon signalizovala v svojej dizertácii už Lafourcade [1954], ktorá popísala aj prípravu a úpravu sušeného mycélia huby. Minárik [1957a, 1957b] uviedol prvé skúsenosti s aplikáciou sušeného mycélia rôznych hýfovitých húb pri výrobe prírodných hroznových a ovocných vín a pri výrobe dezertných a šumivých vín. Naznačil tiež možnosti širšieho využívania sušeného mycélia *B. cinerea* pri intenzifikácii kvasného procesu a urýchlení vyzrievania hroznových vín.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

A. Príprava sušeného mycélia *B. cinerea*

Používal sa kmeň CBS 126.58,*¹⁾ ktorý sa zbierkove udr-

žuje na sladinkovom agare pri teplote miestnosti (obr. 1). Kultivácia huby sa uskutočňuje povrchovým rastom na hroznovom mušte za aeróbných podmienok kultivácie. Mušt obsahoval 210 g/l redukujúcich cukrov, pH 3,2 a 7,3 g/l celkových (titrovateľných) kyselín. Kultivačné prostredie sa pripravilo zriedením koncentrovaného hroz-



Obr. 1. *Botrytis cinerea* Persoon
14dňová kultúra na sladinkovom agare. Zväčš. asi 500krát [originál Minárik, foto Czech].

nového muštu [vákuovo teplom zahusteného hroznového muštu] destilovanou vodou.

300 ml muštu sa odmeralo do 500 ml kuželových (Erlenmayerových) baniek, ktoré sa v 24h intervale sterilizovali dvakrát 30 min v prúdiacej pare pri 100 °C. Po vychladnutí sa mušt zaočkoval vodnou suspenziou spór 7–10 dňovej kultúry *B. cinerea*. Po 15 dňoch povrchovej kultivácie pri 25 °C sa rozrástnuté mycélium rozstrihalo, premylo niekoľkokrát vodovodnou vodou za účelom eliminácie antibiotickej substancie typu „botryticínu“. Mycélium sa potom sušilo pri 35–38 °C. Od dezodorizácie suchého mycélia absolútnym alkoholom sa na základe predchádzajúcich skúseností mohlo upustiť [Minárik 1960].

Suché mycélium sa rozomlelo na jemný prášok. Preparát *B. cinerea* predstavuje sivohnedý amorfny prášok, takmer bez vône, ktorý je vo vode málo rozpustný. Zloženie sušeného mycélia (hmotnostné %):

sušina	89,41
voda	10,59
celkový dusík	1,83
proteín	11,43
popoľ	1,91
vodorozp. substancia	9,03

B. Kvasenie muštu s aktivátorom *B. cinerea*

Fermentácia prebiehala v 500 ml kvasných bankách

*¹⁾ Autor ďakuje dr. von Arxovi z Centraalbureau voor Schimmelcultures v Baarne (Holandsko) za poskytnutie autentických kmeňov *B. cinerea*.

uzavretých kvasnou trubicou naplnenou glycerolom. 300 ml muštu s cukornatosťou 210 g/l redukujúcich cukrov sa sterilizovalo dvakrát v 24h intervale, vždy 30 min. Pri sledovaní reprodukčnej aktivity sa použil mušt s cukornatosťou 245,5 a 388,8 g/l redukujúcich cukrov. Po vychladnutí sa do muštu dávalo 200, 300, 400 a 500 mg/l sušeného prípravku *B. cinerea*. Kontrolná vzorka kvasila bez aktivátora. Kvasné testy sa robili v dvoch opakovaníach. Mušty sa inokulovali 2% zákvasom 3 dňovej kultúry *Saccharomyces oviformis*, kmeň Bratislava 1 zo zbierky kvasiniek KVÚVV v Bratislave. Kvasné banky sa napokon hermeticky uzavreli zaliatím korkových uzáverov s kvasnými trubicami parafínom. Banky sa inkubovali pri teplote 24–25 °C. Denne sa sledoval úbytok CO₂ vážením baniek. Analýza skvaseného muštu sa robila 30 dní po zaočkovaní a založení pokusu. Počet kvasničných buniek sa v paralelných sériach stanovil Bürkerovou počítacou komôrkou.

C. Zhodnotenie výsledkov a diskusia

V tabuľke 1 vidieť priebeh kvasenia muštu podľa denného úbytku CO₂. Je zjavné, že už najnižšie dávky prípravku (200 mg/l) veľmi výrazne a podstatne urýchľujú začiatok i celkový priebeh búrlivého kvasenia muštu. Napríklad v 2. deň kvasenia bola priemerná produkcia CO₂ v muštoch s aktivátormi 4,7 krát, 3. deň 3,8 krát väčšia ako v kontrolnom mušte bez aktivátora. Absolútne najrýchlejšie kvasil mušt so 400 mg/l aktivátora. Tento mušt vykazoval aj najväčšiu produkciu CO₂.

Tabuľka 1. Priebeh kvasenia

Po dňoch	Kontrola	Aktivátor <i>B. cinerea</i> mg/l			
		200	300	400	500
	úbytok CO ₂ /300 ml muštu v g				
1	0,10	0,30	0,25	0,30	0,25
2	2,05	8,75	9,70	10,25	10,05
3	4,60	16,10	17,40	18,35	18,15
5	9,50	24,55	26,65	28,05	28,10
7	13,30	27,50	29,40	30,80	30,35
9	15,80	29,20	30,80	31,75	30,85
11	18,80	30,20	31,60	32,15	31,05
14	22,00	30,80	32,10	32,35	31,15
16	23,50	31,00	32,25	32,40	31,25
25	26,20	31,20	32,50	32,65	31,45
30	27,30	31,20	32,50	32,65	31,45

Ako vysvitá z tabuľky 2, najviac alkoholu vzniklo vo vzorke s 300 mg/l prípravku (14,04 obj. %) a s 200 mg/l (13,95 obj. %). Produkcia alkoholu bola vo vykvasenom substráte s aktivátorom o 1,75 až 2,10 obj. vyššia ako v substráte bez aktivátora, kde sa dosiahlo iba 11,94 obj. % alkoholu. Pozoruhodné boli rozdiely aj v obsahu neskvaseného cukru. Kým v kontrolnom víne zostalo po

Tabuľka 2. Zloženie skvaseného muštu 30 dní po zakvasení

Ukazovateľ	Kontrola	Aktivátor <i>B. cinerea</i> mg/l			
		200	300	400	500
Alkohol obj. %	11,94	13,95	14,04	13,78	13,69
Redukujúce cukry g/l	29,6	4,6	4,6	4,5	4,7
Prchavé kyseliny g/l	0,96	0,48	0,47	0,42	0,28
Titrovat. kyseliny g/l	7,2	7,4	7,3	7,1	7,3
pH	3,2	3,2	3,2	3,2	3,15

30 dňoch kvasenia ešte 29,6 g/l (14,0 %) neskvaseného cukru, vo vínach s aktivátorom sa zaznamenalo iba 4,5 až 4,7 g/l, t. j. 2,1 až 2,2 %.

Tabuľka 3. Počet buniek kvasiniek v kvasiacom mušte (v ml./ml)

Deň kvasenia	Kontrola		<i>B. cinerea</i> 500 ml/l	
	A	B	A	B
0	1,5	1,5	1,5	1,5
3	41,5	87,5	64,5	150,5
6	59,0	104,0	147,0	170,5
13	64,0	109,0	151,5	174,0

Osobitne markantné rozdiely sa javili aj v obsahu prchavých kyselín (vyjadrených ako kyselina octová). V kontrolnom víne sa zistilo 0,96 g/l, vo vínach s aktivátorom iba 0,28 až 0,48 g/l, t. j. len 29,1 až 50 % obsahu prchavých kyselín kontroly. Hladina titrovateľných kyselín (vyjadrených ako kyselina vínna) a hodnoty pH kontrolného vína i vín kvasených s aktivátorom boli prakticky rovnaké.

Počet buniek kvasiniek v priebehu 13 dní fermentácie muštu s cukornatosťou 245,5 g/l (pokos A), resp. 388,8 g/l (pokos B) vidieť v tabuľke 3.

V súlade s našimi skoršími údajmi (Minárik 1957b) sa opäť potvrdilo, že rozmnožovacia schopnosť kvasiniek je v muštoch s nižšou cukornatosťou viac ako dvojnásobná za prítomnosti aktivátora v 3. až 6. deň kvasenia. Aj pri vysokej cukornatosť muštu bola reprodukčná schopnosť kvasiniek s aktivátorom výrazne vyššia.

Dôležitým poznatkom, ktorý vyplýva z týchto pokusov, je skutočnosť, že aktivátor z *B. cinerea* neovplyvňuje prakticky chuť ani buket vína, čo sa ostatne dokázalo už dávno predtým (Minárik 1960).

Hroznový mušt predstavuje kvasné prostredie s variabilným zložením v jednotlivých ročníkoch i podľa rôznych kultivarov. Je známe, že napríklad prídavok amoniakálneho dusíka môže mať priaznivý účinok na priebeh kvasenia v jednom ročníku, kým v ďalšom nemusí fermentáciu vôbec ovplyvňovať, najmä ak boli podmienky technologickej zrelosti hrozna priaznivé, teda keď bol mušt dusíkatými látkami dobre zásobený. To platí ostatne aj pre vitamín B₁.

Aktivátory pôvodu hýfovitých húb môžu do značnej miery kompenzovať nedostatok asimilovateľného dusíka i vitamínov. V každom prípade, aj za ich dostatku, vždy zabezpečujú podstatné urýchlenie začiatku i celého priebehu kvasenia, kompletnejšie a racionálnejšie využívanie cukrov substrátu bez ohľadu na ročník, vyzretosť hrozna a kvasné podmienky. Aktivita preparátu *B. cinerea* sa prejavuje pri minimálnej koncentrácii, ak uvažíme, že sotva 10 % aplikovanej substancie je rozpustná, a teda účinná.

Praktické dôsledky pokusov nie sú zanedbateľné. Treba mať na zreteli, že aktívne substancie produkované *B. cinerea* sa vedľa inhibičných látok typu botryticínu vyskytujú v botrytických hroznách, kde majú zrejme istú úlohu pri výrobe vína, najmä v oblastiach s výskytom ušľachtilej hniloby vyvolávanej *B. cinerea* (Tokaj, Sauternes).

Aplikácia upraveného sušeného preparátu *B. cinerea* by teda mohlo kladne ovplyvňovať nielen kvasný proces, ale aj chemické zloženie hotových vinárskych produktov, najmä dôsledkom podstatne nižšieho obsahu prchavých kyselín. Dodajme, že aplikácia prípravku *B. cinerea* by

mohla dôsledkom aktivity oxidačných enzýmov tejto huby priaznivo ovplyvňovať aj urýchlenie procesu zrenia niektorých kategórií prírodne sladkých vín bazírujúcich na oxidatívnej technológii, napríklad tokajských výberov a samorodných vín. Je tiež pravdepodobné, že by aplikácia aktivátora z *B. cinerea* nemala narážať na hygienické pochybnosti vzhľadom na autochtónny charakter a pravidelný výskyt tejto huby na hroznách. Bolo by aj mysliteľné širšie použitie aktivátora v iných úsekoch kvasnej technológie.

Literatúra

- [1] LAFION, M.: Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thèse. Faculté des Sciences de Bordeaux. INRA, Paris 1954, 118 s.
- [2] LAFOURCADE, S.: Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Thèse. Faculté des Sciences de Bordeaux. INRA, Paris 1954.
- [3] MINÁRIK, E.: Prvé skúsenosti s používaním plesňových aktivátorov pri kvasení. Kvas. prům. 3, 1957a, č. 11, s. 251–253. 130 s.
- [4] MINÁRIK, E.: Vplyv plesňových aktivátorov na kvasenie muštu. Biológia 12, 1957b, č. 6, 454–459.
- [5] MINÁRIK, E.: Vplyv aktivátorov na kvasenie muštu (Záv. správa). VÚV, Bratislava 1960, 138 s.
- [6] NIELSEN, N., HARTELIUS, V.: The separation of growth promoting substances. C. R. des Travaux du Laboratoire Carlsberg 19, 1932, č. 8, s. 1–17.
- [7] NIELSEN, N., HARTELIUS, V.: Über die Trennung der auf die Stoffproduktion der Hefe und Schimmelpilzen einwirkenden Wachstumsstoffe. C. R. des Travaux du Laboratoire Carlsberg, sér. physiol. 22, 1937, č. 1, s. 1–32.
- [8] NIELSEN, N., SING-FANG, F.: Vergleichende Untersuchungen über Wachstumsstoffwirkung auf verschiedene Arten von Hefe und Schimmelpilzen. C. R. des Travaux du Laboratoire Carlsberg, sér. physiol. 22, 1937, č. 8, s. 141–154.
- [9] RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, É.: Sur l'emploi en vinification de quelques activateurs vitaminiques de la fermentation. Procès-verbal de la Séance de l'Académie d'Agriculture de France 39, 1952, s. 444–448.
- [10] RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, É., LAFON, M.: Action d'un activateur de la fermentation alcoolique produit par *Aspergillus niger* sur le bilan des produits secondaires. C. R. des Séances de l'Académie des Sciences 234, 1952, s. 757–759.
- [11] — Brevet d'Invention No. 878.989: Procédé pour la fabrication de préparation d'enzymes sans goût. Paris 1943a.
- [12] — Brevet d'Invention No. 878.990: Procédé pour la préparation de boissons. Paris 1943b.
- [13] — Brevet d'Invention No. 878.991: Procédé pour la préparation des jus de fruits, de raisins ou analogues. Paris 1943c.

Za technickú spoluprácu autor ďakuje s. Zuzane Šilhárovej, Márii Petrušovej a Alene Švancarovej.

Minárik, E.: Možnosti ovplyvnenia kvasenia muštu aktivátorom z *Botrytis cinerea*. Kvas. prům., 28, 1982, č. 2, s. 41–43.

V laboratorných podmienkach sa študoval vplyv aktivátora pôvodu hýfovitej huby *Botrytis cinerea* na rýchlosť kvasenia a reprodukčnú schopnosť kvasiniek *Saccharomyces oviformis* a na zloženie skvaseného substrátu. Už v minimálnych dávkach sušeného preparátu z mycélia *B. cinerea* možno doceliť pozoruhodné urýchlenie začiatku i celého priebehu kvasenia, účinnejšie využitie

cukru, vyšší obsah alkoholu a priaznivejšie zloženie vykvaseného muštu. Možné technologické dôsledky pri výrobe prírodne sladkých vín sa diskutujú.

Минарик, Э.: Возможности действия активатора из *Botrytis cinerea* на сбраживание виноградного сока. Квас. прум., 28, 1982, № 2, стр. 41–43.

В лабораторных условиях исследовалось влияние активатора по происхождению из гриба *Botrytis cinerea* на скорость брожения и способность воспроизводства дрожжей *Saccharomyces oviformis* на состав сброженного субстрата. Уже при минимальных дозах сушеного препарата из мицелия *B. cinerea* можно добиться значительного ускорения начала и хода брожения, более эффективного использования сахара, высшего содержания спирта и более выгодного состава сброженного сока. Обсуждаются возможные технологические следствия при производстве природных сладких вин.

Minárik, E.: Possibilities of influencing grape must fermentation by the activator from *Botrytis cinerea*. Kvas. prům., 28, 1982, No. 2, pp. 41–43.

The influence of the activator originating from the hyphal fungus *Botrytis cinerea* on the fermentation rate and reproduction ability of *Saccharomyces oviformis* and on the composition of the fermented substrate had been examined in laboratory conditions. Already by minimal dose of the dried mycelium preparation of *B. cinerea* a remarkable acceleration of the fermentation start as well as of the whole fermentation course, more effective sugar utilization, higher alcohol content and a more favourable composition of the fermented grape must could be achieved. Possible technological conclusions in the production of natural sweet wines are discussed.

Minárik, E.: Möglichkeiten der Beeinflussung der Mostgärung durch den Aktivator aus *Botrytis cinerea*. Kvas. prům., 28, 1982, No. 2, S. 41–43.

In Laborbedingungen wurde der Einfluß des Aktivators aus dem hyphenartigen Pilz *Botrytis cinerea* auf die Gärgeschwindigkeit und das Vermehrungsvermögen der Hefe *Saccharomyces oviformis* und auf die Zusammensetzung des vergorenen Substrats untersucht. Bereits minimale Dosen des getrockneten Präparates des Myzeliums von *B. cinerea* können eine bemerkenswerte Beschleunigung des Gärbeginns sowie des ganzen Gärverlaufes, eine effektvollere Ausnutzung des Zuckers, einen höheren Alkoholgehalt und eine günstigere Zusammensetzung des vergorenen Mostes herbeiführen. Mögliche technologische Folgerungen bei der Herstellung von natursüßen Weinen werden diskutiert.