

Overenie aktivačného účinku *Botrytis cinerea* na novoselektované kmene kvasiniek

Ing. GABRIELA VOJTEKOVÁ, Vinárske závody, o. p., Bratislava, závod Pezinok

V snahe vyselektovať nový hlbokoprekvášajúci a vysoko odolný kmeň kvasiniek vhodný pre aplikáciu vo vinárskej veľkovýrobe bola v rokoch 1979–1981 vykonaná ekologická štúdia hrozna, muštov a vín časti malokarpatskej vinohradníckej oblasti. Jedným z rozhodujúcich hodnotiacich kritérií je priebeh skvasovania cukorných roztokov a možnosť ovplyvnenia, prípadne riadenia tohto procesu. Zloženie konečného produktu, predovšetkým však obsah alkoholu, zvyškové cukry, obsah prchavých kyselín a aromatických látok je objektívnym porovnávacím kritériom. Dôležitú úlohu zohrávajú i zistené fyzikálne údaje, teplota v priebehu kvasenia a výška peny.

Z dvoch možných spôsobov ovplyvnenia priebehu kvasenia sa častejšie skúma jeho urýchlenie — aktivácia. Jednou z dosiaľ najčastejšie sledovaných metód aktivácie kvasného procesu je aplikácia aktivátorov produkovaných hýfovými hubami napr. *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* a *Botrytis cinerea*. Nielsenov aktivátor, ako ho po izolácii z *A. niger* nazvali Nielsen a Hartelius [1932], možno rozdeliť na dve zložky. Prvá je súčasťou tzv. „bios“ faktoru a druhú tvorí vlastný aktivátor *Aspergillus*, ktorý nie je identický s vitamínmi skupiny B. Aktivátor z *A. niger* je termostabilný, vodorozpustný, odolný voči kyslému i alkalickému prostrediu. Účinok Nielsenovho aktivátora spočíva v akumulácii triozofosfátov na začiatku kvasenia, čím sa urýchľuje utilizácia a fermentácia cukrov. Zvyšuje sa tiež rýchlosť využívania acetaldehydu [Minárik 1957]. Pre rast a fermentačnú aktivitu vínnych kvasiniek nie je nevyhnutný, za jeho prítomnosti však značne vzrastá reprodukčná i fermentačná činnosť kvasiniek [Minárik 1982].

Nielsenov aktivátor pôsobí aj na tvorbu vedľajších produktov kvasenia. Jeho účinkom sa znižuje produkcia prchavých kyselín a zvyšuje sa produkcia kyseliny jantárovej [Ribéreau-Gayon 1952]. Lafourcade [1954] dokázala prítomnosť aktivátora obsiahnutého v mycéliu *A. niger* i v mycéliu *B. cinerea*.

V súvislosti s prípadnou aplikáciou tohto aktivátora vo vinárskej praxi, nemali by zrejme byť problémy zo strany hygienických orgánov, vzhľadom na autochtónny charakter a pravidelný výskyt tejto hýfovitej huby na hroznách [Minárik 1982].

METÓDY A MATERIÁL

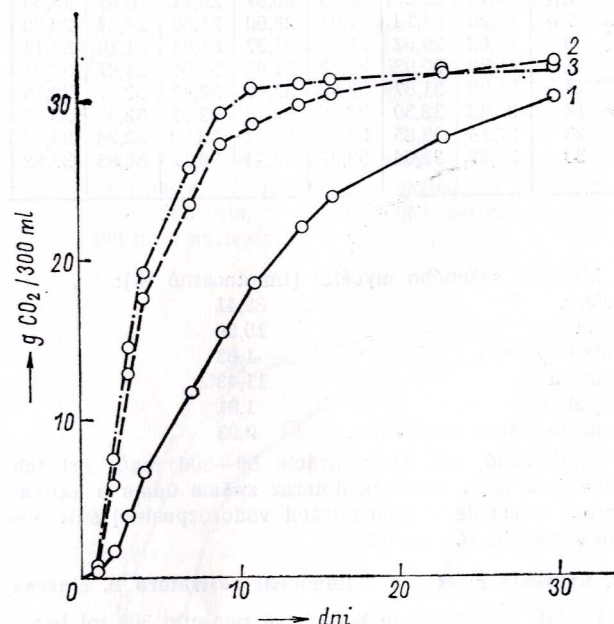
A. Testované kmene kvasiniek

Kvasinky sa izolovali v rokoch 1979 a 1980 z hroznového muštu získaného lisovaním hrozna odrôd Müller Thurgau, Veltlínske zelené a Rulandské biele v prevádzkových podmienkach závodu Pezinok, Vinárske závody, o. p., Bratislava. Asepticky odobraté vzorky muštov boli spracované klasickou Kochovou zriedovacou metódou. Izolované kmene boli identifikované a klasifikované podľa Lodder et al. [1970].

Na základe výsledkov sledovania skvasovacej mohutnosti, tvorby prchavých kyselín a ostatných analytických hodnôt získaného produktu kvasenia boli pre overenie účinku aktivátora a *B. cinerea* vybrané kmene kvasiniek popísané v tabuľke 1.

Tabuľka 1.

Označenie vzorky	Druh kvasiniek	Rok izolácie	Izolované z odrôd hrozna	Produkcia	
				alkoholu [obj. %]	prch. kyselín [g/l]
1	<i>S. cerevisiae</i>	1979	Veltlínske zelené	12,2	0,82
2	<i>S. oviformis</i>		Veltlínske zelené	12,1	0,62
I	<i>S. cerevisiae</i>		Müller Thurgau	13,6	0,53
II	<i>S. oviformis</i>		Rulandské biele	12,4	0,67



Obr. 1. Priebeh kvasenia muštu kvasinkami kmeňa *S. cerevisiae* 1 v prítomnosti aktivátora *B. cinerea* 1 — kontrola, 2 — 50 mg/l aktivátora, 3 — 400 mg/l aktivátora

B. Aktivátor *Botrytis cinerea*

Sušené mycélium *B. cinerea* (kmeň CBS 126.58), udržiavané na sladínovom agare pri teplote miestnosti, bolo pripravené povrchovou kultiváciou na hroznovom mušte za aeróbných podmienok. Množstvo aktivátora potrebné v pokuse poskytlo mikrobiologické laboratórium KVÚV Bratislava. Pripravilo sa postupom, ktorý popsal Minárik [1982].

Tabuľka 2. Priebeh kvasenia muštu kmeňom kvasiniek *S. cerevisiae* 1

Po dňoch	Kon- trolla	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
	úbytok CO ₂ /300 ml v g						
1	0,20	0,32	0,31	0,25	0,18	0,33	0,56
2	1,50	5,77	6,02	6,17	5,75	6,70	7,02
3	3,90	12,72	13,20	14,27	14,50	14,40	14,27
4	6,58	17,40	18,05	19,47	19,40	19,08	19,09
7	11,53	23,39	24,35	26,12	25,59	25,70	26,00
9	15,32	26,59	27,65	29,72	28,93	29,17	29,62
11	18,35	28,45	29,42	30,57	29,60	30,60	31,32
14	21,83	29,57	30,17	30,75	29,95	30,90	31,90
16	23,75	30,32	30,73	30,92	30,00	31,20	32,30
23	27,40	31,55	31,65	31,30	30,27	31,70	33,00
30	30,05	32,12	32,05	31,40	30,33	31,95	33,10

Tabuľka 3. Priebeh kvasenia muštu kmeňom kvasiniek *S. oviformis* 2

Po dňoch	Kon- trolla	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
	úbytok CO ₂ /300 ml v g						
1	0,10	0,17	0,17	0,12	0,07	0,17	0,20
2	1,42	4,07	5,16	4,90	4,51	4,64	4,47
3	4,12	10,94	13,42	14,18	13,50	13,30	12,92
4	8,14	16,87	19,70	20,67	20,12	19,67	19,50
7	11,20	25,14	27,94	28,60	28,59	28,34	29,29
9	15,62	29,02	31,04	31,37	31,64	31,10	32,14
11	18,30	30,92	32,22	31,95	32,35	31,97	32,81
14	21,29	31,87	32,52	32,00	32,47	32,27	33,15
16	25,32	32,30	32,85	32,10	32,67	32,47	33,25
23	27,14	32,85	33,22	32,32	33,00	32,74	33,62
30	28,27	33,04	33,37	32,43	33,17	32,85	33,72

Zloženie sušeného mycélia (hmotnostné %):

sušina	89,41
voda	10,59
celkový dusík	1,83
proteín	11,43
popol	1,91
vodorozpustná substancia	9,03

Aplikované boli koncentrácie 50–500 mg/l. Pri ich určení sa prihliadalo na doteraz známe údaje o aktivátoroch kvasenia a koncentracii vodorozpustnej substancie v mycéliu *B. cinerea*.

C. Kvasenie muštu za prítomnosti aktivátora *B. cinerea*

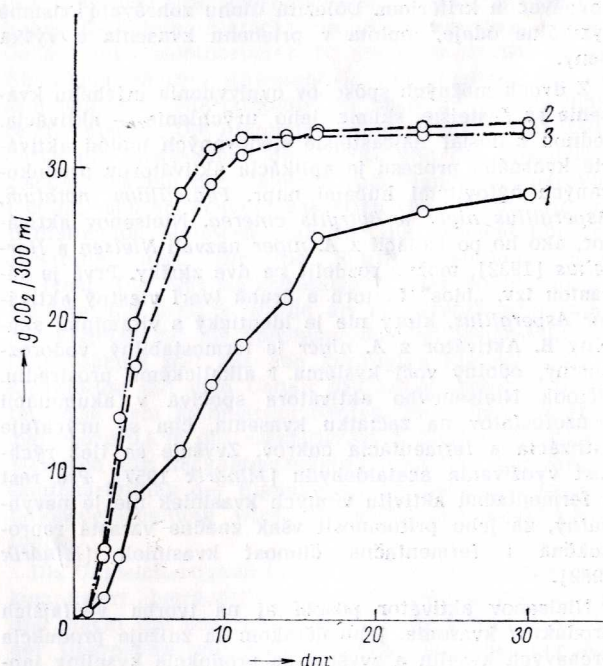
Do 500 ml kvasných baniek sa naplnilo 300 ml hroznového muštu s obsahom 214 g/l redukujúcich cukrov. Po opakovanej sterilizácii pri teplote 100 °C v prúdiacej pare v Kochovom hrnci sa aplikovalo 50, 100, 200, 300, 400 a 500 mg/l sušeného mycélia a 2% zákvas 3dňovej kultúry testovaných kmeňov kvasiniek. Po uzavretí baniek korkovou zátkou s kvasnou trubicou naplnenou glycerínom a po zaliatí parafínom sa banky udržiavali v laboratóriu pri teplote miestnosti (26–28 °C). Úbytok CO₂ sa sledoval pravidelne vážením. Analýza skvaseného muštu sa urobila 30 dní po inokulácii baniek.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetky aplikované koncentrácie aktivátora *B. cinerea* mali výrazný akceleračný vplyv na priebeh kvasenia muštov testovanými kmeňmi kvasiniek. V tabuľkách 2 a

Tabuľka 4. Zloženie muštu skvaseného kmeňom kvasiniek *S. cerevisiae* 1 30 dní po zakvasení

Ukazovateľ	Kontrola	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
Alkohol [obj. %]	12,12	12,91	13,15	12,87	12,91	13,17	13,19
Redukujúce cukry [g/l]	17,60	22,00	7,60	13,60	18,40	9,20	5,60
Prchavé kyseliny [g/l]	0,72	0,42	0,34	0,36	0,31	0,32	0,45
Titrovateľné kyseliny [g/l]	8,70	8,40	8,60	8,70	8,60	8,50	8,70
Úbytok CO ₂ [g/300 ml]	30,05	32,12	32,05	31,40	31,33	30,95	33,10

Obr. 2. Priebeh kvasenia muštu kvasinkami kmeňa *S. oviformis* II v prítomnosti aktivátora *B. cinerea* 1 — kontrola, 2 — 50 mg/l aktivátora, 3 — 400 mg/l aktivátora

3 sa uvádzajú hodnoty úbytkov CO₂ na 300 ml muštu testovanými kmeňmi kvasiniek *S. cerevisiae* 1 a *S. oviformis* 2. Grafické znázornenie tejto závislosti je na obr. 1 a 2.

Adekvátnosť účinku rôznych koncentrácií aktivátora *B. cinerea* na testované kmene kvasiniek *S. cerevisiae* I a *S. oviformis* II vyplýva z grafického znázornenia úbytku CO₂ na 300 ml muštu (obr. 3 a 4).

Významný vplyv na rýchlosť skvasovania redukujúcich cukrov bol zaznamenaný už v druhý a tretí deň kvasenia, tedy úbytok CO₂ v pokusných vzorkách s aplikovaným aktivátorom *B. cinerea* predstavoval 3,85 až 5,10násobok úbytku CO₂ v kontrolných vzorkách. Aktivačný účinok bol aj pri najnižšej koncentrácii 50 mg/l značný. Rozdiely v konečných úbytkoch CO₂ pri aplikácii tejto a vyšších koncentrácií aktivátora *B. cinerea* však neboli výrazné. Vo všetkých pokusných vzorkách s aplikovaným aktivátorom bolo hlavné kvasenie ukon-

Tabuľka 5. Zloženie muštu skvaseného kmeňom kvasiniek *S. oviformis* 2 30 dní po zakvasení

Ukazovateľ	Kon- tro- la	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
Alkohol [obj. %]	12,12	12,93	12,98	12,98	13,08	13,31	13,24
Redukujúce cukry [g/l]	12,00	5,60	4,40	5,60	4,80	4,80	4,40
Prchavé kyse- liny [g/l]	0,62	0,39	0,37	0,36	0,41	0,32	0,38
Titrovateľné kyseliny [g/l]	9,00	8,8	8,70	9,0	8,90	8,80	8,70
Úbytok CO ₂ [g/300 ml]	28,27	33,04	33,37	32,43	33,17	32,85	33,72

Tabuľka 6. Zloženie muštu skvaseného kmeňom kvasiniek *S. cerevisiae* I 30 dní po zakvasení

Ukazovateľ	Kon- tro- la	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
Alkohol [obj. %]	12,91	13,72	13,42	13,17	13,54	13,62	13,54
Redukujúce cukry [%/l]	3,60	5,20	5,20	5,20	5,60	4,40	4,80
Prchavé kyse- liny [g/l]	0,53	0,33	0,32	0,32	0,34	0,30	0,32
Titrovateľné kyseliny [g/l]	8,20	8,10	8,20	8,30	8,10	8,30	8,20
Úbytok CO ₂ [g/300 ml]	29,78	33,40	32,58	32,90	32,97	32,65	33,16

Tabuľka 7. Zloženie muštu skvaseného kmeňom kvasiniek *S. oviformis* II 30 dní po zakvasení

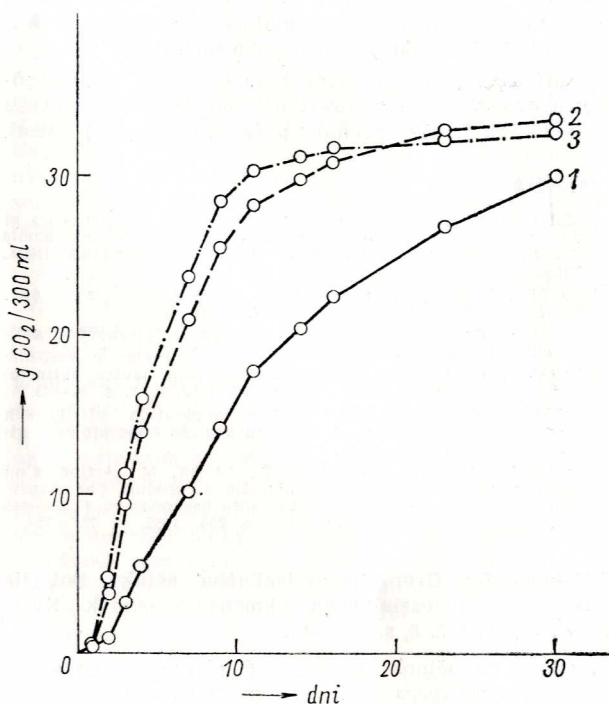
Ukazovateľ	Kon- tro- la	Aktivátor <i>Botrytis cinerea</i> [mg/l]					
		50	100	200	300	400	500
Alkohol [obj. %]	12,81	13,28	13,08	13,08	13,08	13,28	13,21
Redukujúce cukry [g/l]	14,00	6,80	9,60	8,40	8,40	8,20	6,80
Prchavé kyse- liny [g/l]	0,67	0,29	0,31	0,27	0,27	0,29	0,24
Titrovateľné kyseliny [g/l]	8,60	8,40	7,90	7,90	8,60	8,10	8,50
Úbytok CO ₂ [g/300 ml]	32,18	33,19	32,17	32,60	32,05	32,05	32,10

čené v 11.—14. deň. V kontrolných vzorkách v tom čase prebehol kvasný proces len na 75 %.

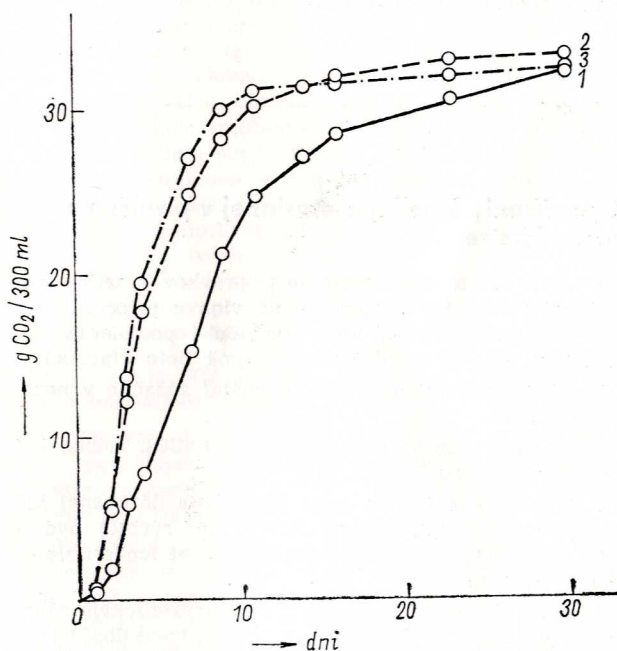
Analytické hodnoty získaného konečného produktu boli stanovené v 30. deň po inokulácii baniek (tabuľky 2, 3, 4 a 5). Obsah alkoholu, ako jeden z limitujúcich ukazovateľov priebehu kvasenia významný i z technologického hľadiska, bol vo všetkých prípadoch veľmi vyrovnaný. Rozdiely 0,20—0,32 obj. % pri aplikácii rôznych koncentrácií aktivátora je zanedbateľný.

V kontrolných vzorkách bol obsah alkoholu vždy o 0,27 až 0,71 obj. % nižší.

Stanovené zvyškové cukry sú dôkazom neúplného prekvasenia substrátu v sledovanom období. Uvedené stanovené hodnoty obsahu prchavých kyselín potvrdili významný tlmivý vplyv aplikácie aktivátora *B. cinerea*



Obr. 3. Priebeh kvasenia muštu kvasinkami kmeňa *S. cerevisiae* I v prítomnosti aktivátora *B. cinerea* 1 — kontrola, 2 — 50 mg/l aktivátora, 3 — 400 mg/l aktivátora



Obr. 4. Priebeh kvasenia muštu kvasinkami kmeňa *S. oviformis* II v prítomnosti aktivátora *B. cinerea* 1 — kontrola, 2 — 50 mg/l aktivátora, 3 — 400 mg/l aktivátora

na ich tvorbu. Vo všetkých vzorkách s aplikovaným aktivátorom bol obsah prchavých kyselín až 2krát nižší ako vo vzorkách kontrolných. Je to kvalitatívne veľmi dôležitý ukazovateľ.

Napriek skutočnosti, že vodorozpustná substancia aktivátora *B. cinerea* predstavuje len 9,03 hmotnostných percent, dokázal sa jeho výrazný aktivačný účinok už v koncentrácii 50 mg/l. Testované kmene kvasiniek *S. cerevisiae* a *S. oviformis* a im podobné druhy tvoria podstatnú časť mikrobioty podieľajúcej sa na skvasovaní redukujúcich cukrov hroznového muštu.

V prípade potreby by teda bolo možné aj týmto spôsobom ovplyvniť a regulovať priebeh kvasného procesu a získať tak finálny produkt požadovanej vyššej akosti.

Literatúra

- [1] LAFOURCADE, S., 1954: Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts des raisins. Thèse. Faculté des Sciences de Bordeaux. INRA, Paris.
- [2] LODDER, J., (Ed.) et al., 1970: The yeasts a taxonomic study. North Holland Publ. Comp., London-Amsterdam
- [3] MINÁRIK, E.: Prvé skúsenosti s používaním plesňových aktivátorov pri kvasení. Kvas. prům., 3, 1957, č. 11, s. 251–253.
- [4] MINÁRIK, E.: Možnosti ovplyvnenia kvasenia muštu aktivátorom *Botrytis cinerea*. Kvas. prům., 28, 1982, č. 2, s. 41–43.
- [5] NIELSEN, N., HARTELIUS, V.: The separation of growth promoting substances. C. R. des Travaux du Laboratoire Carlsberg 19, 1932, č. 8, s. 1–17.
- [6] RIBERAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., 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.

Vojteková, G.: Overenie aktivačného účinku *Botrytis cinerea* na novoselektované kmene kvasiniek. Kvas. prům., 29, 1983, č. 8, s. 179–182.

Sledoval sa účinok aktivátora *B. cinerea* na kvasinky rodu *Saccharomyces*, izolované v malokarpatskej vinohradníckej oblasti v rokoch 1979 a 1980. Už pri aplikácii 50 mg/l aktivátora sa výrazne zintenzívil priebeh kvasenia v 2.–3. deň po inokulácii muštu. Prítomnosť aktivátora podmienila nižšiu tvorbu prchavých kyselín, čo je významný kvalitatívny ukazovateľ pre produkt kvasenia hroznového muštu — víno.

Войтекова, Г.: Испытание активационного действия *Ботритис цинереа* на новые селекционированные штаммы дрожжей. Квас. prům., 29, 1983, № 8, стр. 179–182.

Исследовалось действие активатора *Ботритис цинереа* на дрожжи расы *Сакхаромицес*, изолированные в словацкой винодельной области (малокарпатской) в течение 1979 и 1980 гг. Уже после применения 50 мг/л активатора выразительно повысилась интенсивность хода брожения во втором и третьем дне после инокуляции виноградного сока. Уриутствие активатора обусловило более низкое образование летучих кислот, что является значительным качественным показателем для продукта брожения виноградного сока — вина.

Vojteková, G.: Test of Activating Effect of *Botrytis cinerea* on New Selected Yeast Strains. Kvas. prům., 29, 1983, No. 8, p. 179–182.

The effect of an activator of *Botrytis cinerea* on the *Saccharomyces* yeast strain isolated from Lowkarpat viticultural area in years 1979 and 1980 was tested. The addition of 50 mg of the activator per liter resulted in an increased activity of the must fermentation during the 2nd and 3rd day after the inoculation. The presence of the activator resulted in a lower formation of volatile acids. This is one of the most important parameters describing the quality of a wine produced.

Vojteková, G.: Überprüfung des Aktivierungseffekts von *Botrytis cinerea* auf neuselektierte Hefestämme. Kvas. prům., 29, 1983, Nr. 8, S. 179–182.

Es wurde der Einfluß des Aktivators *B. cinerea* auf *Saccharomyces*-Hefen verfolgt, die in dem Kleinkarpaten-Anbaugebiet in den Jahren 1979 und 1980 isoliert wurden. Bereits bei der Applikation des Aktivators in der Dosis von 50 mg/l wurde eine markante Intensifizierung des Gärungsverlaufs am 6. und 7. Tag nach der Inoculation des Mostes festgestellt. Die Anwesenheit des Aktivators führte zur verminderten Bildung flüchtiger Säuren, die ein bedeutendes qualitatives Merkmal für den Wein als Endprodukt der Gärung des Traubenmostes darstellen.