

Aktivácia alkoholového kvasenia biologickou a nebiologickou cestou

663.2 663.252.4 663.252.41

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

Kľúčová slova: hroznový mušt, fermentace, kvasinky, *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces oviformis*, aktivátor, stimulačné, celulóza, aktivita, ethanol, sacharidy, prchavé kyseliny

V predchádzajúcich prácach sme uviedli pozitívne výsledky docelené so stimuláciou alkoholového kvasenia hroznového muštu za nepriaznivých fermentačných podmienok [1, 2]. Najčastejšou príčinou nedokonalého kvasenia, resp. nedokvasenia cukru muštu býva prítomnosť inhibítorov kvasenia — zvyškov fungicídov, vyššia koncentrácia oxidu siričitého alebo neschopnosť kvasiniek „dotiahnuť“ vykvasenie posledných zvyškov sacharidov do konca, najmä pri vyššej počiatočnej koncentrácii cukru muštu, t.j. pri vyššom osmotickom tlaku prostredia.

Skutočnosť, že kvasinky vo fáze úbytku rastu už nie sú v stave dokvasiť zvyškový cukor spočíva o.i. aj v tom, že im chýba tzv. faktor prežívania [4] v podobe sterolov, intramolekulového kyslíka, resp. že im v prežití bránia niektoré vlastné metabolity, napríklad alkohol, masné kyseliny s krátkym bočným reťazcom a ich estery.

Je známe, že cieľenou adsorpciou možno produkované masné kyseliny [kyselina kaprylová, kaprinová a ich estery] z kvasiaceho muštu včas eliminovať vhodným biosorbentom, napr. preparátom bunkových stien kvasiniek (BSK) [5, 6]. Inou možnosťou je stimulácia fermentačnej a rastovej aktivity kvasiniek tzv. Nielsenovým aktivátorom obsiahnutého v mycéliu niektorých hýfovitých húb, napr. *Botrytis cinerea* [7, 8].

Dokázali sme, že preparáty z BSK rušia z veľkej časti inhibičný účinok pre kvasinky toxických masných kyselín s krátkym bočným reťazcom a umožňujú tak takmer kompletne dokvasenie muštu aj za krajne nepriaznivých fermentačných podmienok [3].

V predloženej práci by sme chceli ukázať, že aj celulóza má podobné detoxikačné adsorpčné vlastnosti ako BSK — teda že ňou možno z veľkej časti eliminovať nepriaznivé fermentačné podmienky simulované vysokým obsahom cukru muštu alebo prítomnosťou inhibítorov kvasenia (masné kyseliny) podobne ako aktivátorom z *B. cinerea* alebo BSK.

MATERIÁL A METÓDY

Použité kvasné médium

Pripravil sa hroznový mušt zriedením teplom koncentrovaného muštu. Zloženie muštu oboch variantov vidieť z tabuľky 1.

Tabuľka 1. Chemické zloženie muštov série I a II

Ukazovateľ	I	II
Cukor [g.l ⁻¹]	252,0	308,0
Alkohol [% obj.]	1,82	1,68
Titrovateľné kyseliny [g.l ⁻¹]	6,0	6,4
Prchavé kyseliny [g.l ⁻¹]	0,18	0,18
SO ₂ celkový [mg.l ⁻¹]	30,7	29,5
SO ₂ voľný [mg.l ⁻¹]	9,0	9,0
pH	3,45	3,53
rH	18,7	19,2

Testovací mikroorganizmus

Použil sa kmeň 76/D [*Saccharomyces oviformis*] — 3 % záklas 3-dňovej kultúry s koncentráciou buniek 6, 92. 10⁷ . ml⁻¹ v zákvase.

Aktivátory

Mikrokryštalická celulóza farmaceutická (PND 37-055-82) s veľkosťou častíc pod 0,06 a 0,5 mm (jemnozrnná — A, hrubozrnná — B), v ďalšom označovaná ako MKC FA-A a MKC FA-B. Celulózu dodala Bukóza, n. p., Vranov nad Topľou*). Preparát celulózy jemnozrnej (A) a hrubozrnej (B) sa dőzoval v množstve 300 a 500 mg.l⁻¹ muštu.

Preparát pripravený z hýfovitej huby *Botrytis cinerea* Pers. dávkaný 200 mg.l⁻¹ muštu [7].

Preparát z bunkových stien kvasiniek (BSK) Yeast wall (YW) firmy Fould-Springer, S. A., Maison-Alfort, Francúzsko, sa dőzoval v množstve 250 mg.l⁻¹ muštu.**)

Inhibítory

Použila sa chemicky čistá **kyselina kaprylová** v koncentrácii 5 mg.l⁻¹ muštu.

*) Za dodanie mikrokryštalickej celulózy farmaceutickej autori ďakujú Ing. Zoltánovi Leškovi z n. p. Bukóza, Vranov n/T.

**) Autori ďakujú Prof. P. Ribéreau-Gayonovi z Univerzity Bordeaux-II a Dr. S. Lafon-Lafourcadeovej za zaslanie preparátu YW.

Tabuľka 2. Pokusné varianty série I a II

Číslo variantu	Označenie variantu (dodané do muštu)
1	Kontrola bez aktivátora a inhibítora
2	Mušt s 250 mg. l ⁻¹ YW
3	Mušt s 200 mg. l ⁻¹ B. cinerea
4	Mušt s 300 mg. l ⁻¹ MKC FA-A
5	Mušt s 500 mg. l ⁻¹ MKC FA-A
6	Mušt s 300 mg. l ⁻¹ MKC FA-B
7	Mušt s 500 mg. l ⁻¹ MKC FA-B
8	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 250 mg. l ⁻¹ YW
9	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 200 mg. l ⁻¹ B. cinerea
10	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 300 mg. l ⁻¹ MKC FA-A
11	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 500 mg. l ⁻¹ MKC FA-A
12	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 300 mg. l ⁻¹ MKC FA-B
13	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej a 500 mg. l ⁻¹ MKC FA-B
14	Mušt s 5 mg. l ⁻¹ kyseliny kaprylovej (kontrola)

Pracovný postup

Do 300 ml muštu v 500 ml kvasných fľašiach sa pridal aktivátor resp. inhibítor podľa plánu (tabuľka 2).

Mušt sa inokuloval 9 ml 3 % zákvasu. Kvasné fľaše sa uzavreli kvasnou trubicou s glycerolom a korkové zátky utiesnili parafínom. Fľaše boli inkubované pri 25 °C.

Celý pokus prebiehal v dvoch sériách s muštom 252 a 308 g. l⁻¹ redukujúcich cukrov (tabuľka 1). Denným vážením úbytku hmotnosti (úbytok CO₂) sa sledoval priebeh alkoholového kvasenia. Po skončení fermentácie (denný úbytok hmotnosti (CO₂) ≤ 0,05 g) sa urobila chemická analýza vykvaseného substrátu.

VÝSLEDKY A ZHODNOTENIE

Pri nižšej koncentrácii cukru muštu sa stimulačný účinok aktivátorov *B. cinerea*, BSK ani celulózy neprejavuje tak vyhranene ako pri vyššej koncentrácii. Možno to dokumentovať jednak z rýchlosti prekvaseného cukru, jednak z docielenej konečnej hladiny alkoholu, tvorby CO₂, resp. obsahu zvyškového cukru (tabuľka 3 a 4).

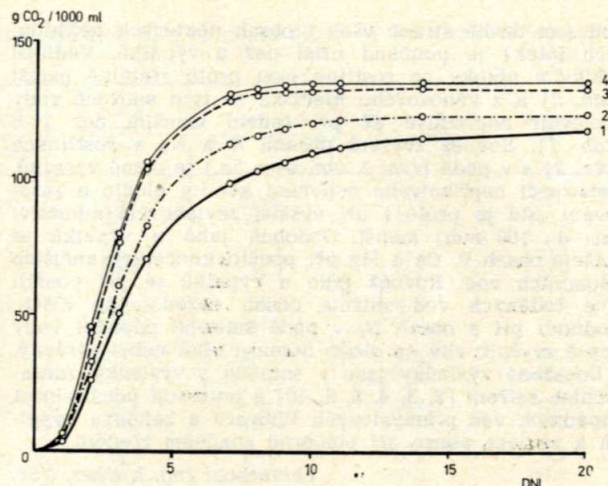
Irekvapujúci je silný aktivačný účinok aký vykazuje celulóza. V porovnaní s aktivátorom *B. cinerea* a BSK, bol účinok celulózy rovnocenný. Ak aktivačný vplyv *B. cinerea* pripisujeme Nielsenovmu aktivátoru, stimulačný účinok BSK i celulózy adsorpcii inhibične pôsobiacich masných kyselín, ktorých hladina sa silne zníži [5, 9, 10]. Nepotvrdili sa údaje Geneix-[5] o zníženej adsorpcijnej schopnosti celulózy.

Ukázalo sa, že nielen *B. cinerea*, ktorá silne znižuje tvorbu prchavých kyselín, ale aj preparáty celulózy, podobne ako BSK, majú vplyv na zníženie produkcie prchavých kyselín vínnymi kvasinkami. Kým aktivitu *B. cinerea* vysvetľujú modifikáciou glykopyruvátového kvasenia, vysvetlenie pre BSK a celulózu zatiaľ chýba.

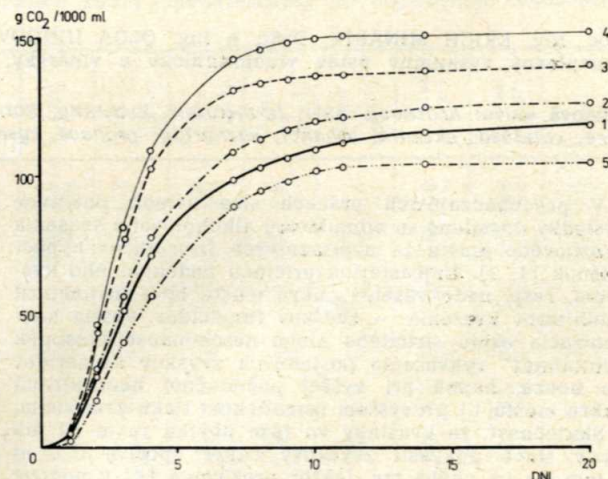
Markantné rozdiely sa docielili v hĺbke prekvasenia muštu s vyšším obsahom cukru za neprítomnosti inhibítora (tabuľka 4). Napríklad kontrolný mušt bez aktivátora a inhibítora (var. 1) prekvasil na 16,31 % obj. alkoholu, mušty kvasené s celulózo (var. 4–7) na 17,97–18,34 % obj., t.j. o 1,66 až 2,03 % obj. alkoholu viac ako kontrolný mušt. Mušt kvasený s aktivátorom *B. cinerea* (var. 3) dosiahol 18,43 % obj. mušt s YM (var. 2) 17,05 % obj. alkoholu, čo je o 2,12, resp. 0,74 % obj. alkoholu viac ako pri kontrole.

Podobné výsledky sa dosiahli pri kvasení muštov za prítomnosti inhibítora (kyseliny kaprylovej). Mušt bez aktivátora (var. 14) prekvasil iba na 14,49 % obj. alkoholu, mušty kvasené s celulózo (var. 10–13) dosiahli 18,25–18,43 % obj., t.j. o 3,76 až 3,94 % obj. alkoholu viac ako kontrola. Ten istý mušt kvasený s aktivátorom *B. cinerea* (var. 9) dosiahol 18,62 % obj., mušt kvasený s YW (var. 8) 17,14 % obj. alkoholu t.j. o 4,13, resp. 2,65 % obj. alkoholu viac ako kontrolný mušt.

Z uvedených údajov je zrejmé, že preparáty celulózy, podobne ako *B. cinerea* a bunkové steny kvasiniek (BSK), dosiahli v mušte s vyššou cukornatosťou podstatne hlbšie

Obr. 1. Priebeh kvasenia muštu bez inhibítora (séria II — obsah cukru 308 g. l⁻¹)

1. Mušt bez aktivátora (kontrola) — var. 1
2. Mušt s 250 mg. l⁻¹ BSK (YW) — var. 2
3. Mušt s 200 mg. l⁻¹ B. cinerea — var. 3
4. Mušt s 500 mg. l⁻¹ MKC FA-A — var. 5

Obr. 2. Priebeh kvasenia muštu s inhibítorm (séria III — obsah cukru 308 g. l⁻¹)

1. Mušt bez aktivátora a inhibítora/kontrola/ — var. 1
2. Mušt s 250 mg. l⁻¹ BSK (YW) + 5 mg. l⁻¹ kys. kaprylovej — var. 8
3. Mušt s 200 mg. l⁻¹ B. cinerea + 5 mg. l⁻¹ kys. kaprylovej — var. 9
4. Mušt s 500 mg. l⁻¹ MKC FA-A + 5 mg. l⁻¹ kys. kaprylovej — var. 11
5. Mušt bez aktivátora + 5 mg. l⁻¹ kys. kaprylovej — var. 14

Tabuľka 3. Zloženie mladého vína tesne po dokvasení a tvorba CO₂ počas kvasenia — Séria I

Variety	Alkohol [% obj.]	Cukor [g. l ⁻¹]	Tit. kys. [g. l ⁻¹]	Prch. kys. [g. l ⁻¹]	SO ₂ celk. [mg. l ⁻¹]	pH	rH	Σ CO ₂ [g. l ⁻¹]
1	17,05	5,9	7,9	0,84	39,7	3,49	18,7	127,1
2	16,68	5,6	7,9	0,79	41,0	3,52	18,9	125,0
3	16,58	5,6	8,4	0,80	41,0	3,46	18,7	127,0
4	16,49	5,4	8,0	0,59	39,7	3,46	19,2	128,2
5	16,77	5,6	8,1	0,54	39,7	3,48	20,3	123,3
6	17,23	5,7	8,8	0,61	34,6	3,41	18,3	128,3
7	17,14	5,6	8,3	0,56	35,9	3,48	18,7	125,5
8	16,86	5,9	8,6	0,82	35,9	3,55	20,5	125,6
9	17,14	5,5	8,0	0,67	37,1	3,50	18,5	127,0
10	17,05	6,0	8,1	0,65	38,4	3,51	19,4	127,3
11	16,95	5,4	8,0	0,67	35,9	3,43	18,5	124,3
12	16,95	5,7	8,3	0,74	34,6	3,46	18,7	125,2
13	17,05	5,9	8,0	0,76	44,8	3,46	18,7	125,7
14	16,58	16,4	9,4	0,96	35,9	3,32	20,1	119,0

Tabuľka 4. Zloženie mladého vína tesne po dokvasení a tvorba CO₂ počas kvasenia — Séria II

Variety	Alkohol [% obj.]	Cukor [g. l ⁻¹]	Titr. kys. [g. l ⁻¹]	Prch. kys. [g. l ⁻¹]	SO ₂ celk. [mg. l ⁻¹]	pH	rH	Σ CO ₂ [g. l ⁻¹]
1	16,31	54,0	9,2	1,34	58,9	3,51	20,3	119,0
2	17,05	45,0	10,3	1,24	48,7	3,50	19,1	124,5
3	18,43	24,0	9,1	0,98	50,0	3,51	18,9	135,0
4	17,97	24,4	8,7	0,96	50,0	3,53	20,5	135,2
5	18,43	23,0	8,5	0,96	41,0	3,43	18,2	137,3
6	17,79	32,0	9,5	0,98	39,7	3,40	18,0	133,2
7	18,34	24,0	9,5	0,94	41,0	3,41	18,3	134,7
8	17,14	44,0	9,5	1,33	38,4	3,44	17,6	127,3
9	18,62	21,0	9,5	1,07	38,4	3,45	18,4	140,0
10	18,43	24,0	9,1	1,03	41,0	3,48	17,3	139,5
11	18,43	29,0	9,0	0,99	48,7	3,48	18,9	154,5
12	18,16	35,0	8,8	1,05	46,1	3,47	18,5	130,3
13	18,25	29,0	9,2	1,04	43,6	3,50	18,7	133,2
14	14,49	75,0	10,5	1,48	38,4	3,22	17,1	104,7

prekvasenie ako kontrolný mušt, a to za neprítomnosti i za prítomnosti inhibítora. Pri nižšej koncentrácii cukru muštu (séria I, tabuľka 3) sú tieto rozdiely menej výrazné.

Značné diferencie sme zistili v hladine prchavých kyselín. Napríklad kontrola bez aktivátora a inhibítora (var. 1, tabuľka 3) vykazovala po dokvasení 0,84 g. l⁻¹, mušt kvasený s aktivátorom *B. cinerea* (var. 3) len 0,60 g. l⁻¹, mušty kvasené s celulózu (var. 4–7) 0,54 až 0,61 g. l⁻¹ prchavých kyselín, čo je pre posledné o 0,23–0,30 g. l⁻¹ menej prchavých kyselín ako v kontrole. V mušte s inhibítorm a bez aktivátora (var. 14) sa zistilo 0,96 g. l⁻¹, v mušte s *B. cinerea* (var. 9) len 0,67 g. l⁻¹, vo vzorke s YW (var. 8) 0,82 g. l⁻¹ a v muštach s celulózu (var. 10–13) 0,65–0,76 g. l⁻¹ prchavých kyselín. Pre varianty s celulózu to znamená o 0,20 až 0,31 g. l⁻¹ menej vytvorených prchavých kyselín ako v kontrole bez aktivátora.

Podobné výsledky sme zaznamenali v sérii II s vyššou koncentraciou cukru v mušte (tabuľka 4). Mušt bez inhibítora a aktivátora (var. 1) vykazoval 1,34 g. l⁻¹, variant s *B. cinerea* 0,98 g. l⁻¹, variant s YW 1,24 g. l⁻¹ a varianty s celulózu 0,94–0,98 g. l⁻¹ prchavých kyselín, čo je o 0,36 až 0,40 g. l⁻¹ menej prchavých kyselín pri vzorkách s celulózu, o 0,36 g. l⁻¹ menej pri vzorke s *B. cinerea* a o 0,10 g. l⁻¹ menej prchavých kyselín pri mušte s YW. V mušte s inhibítorm bez aktivátora (var. 14) sme zistili 1,48 g. l⁻¹ prchavých kyselín, v muštach s celulózu (var. 10–13) 0,99–1,05 g. l⁻¹, t. j. o 0,43 až 0,49 g. l⁻¹ prchavých kyselín menej ako v kontrole. Mušt s *B. cinerea* (var. 9) mal 1,07 g. l⁻¹, variant s YW 1,33 g. l⁻¹, t. j. o 0,41, resp. 0,15 g. l⁻¹ menej prchavých kyselín ako v kontrole.

Treba uviesť, že základné mušty všetkých variantov mali pred kvasením 0,18 g. l⁻¹ prchavých kyselín a 1,62 % obj. alkoholu (zahustený mušt bol veľmi mierne nakvasený), pozri tabuľku 1. To však nemení vôbec na skutočnosť, že produkcia alkoholu bola vo všetkých variantoch s aktivátorom vždy významne vyššia a tvorba prchavých kyselín kvasinkami podstatne nižšia ako v príslušnej kontrole.

Pri ostatných ukazovateľoch (titrovateľné kyseliny, pH, rH, celkový SO₂) sme nezaznamenali významné rozdiely. Treba však poukázať na skutočnosť, že rýchlosť prekvasenia muštu s vyššou cukornatosťou bola vo variantoch s aktivátormi vždy vyššia v porovnaní s kontrolami bez aktivátora, a to nielen vo variantoch bez inhibítora, ale aj s inhibítorm.

Z týchto výsledkov teda vidieť, že celulóza, podobne ako bunkové steny kvasiniek (BSK), predstavujú účinný adsorpčný prostriedok, ktorým možno eliminovať inhibične pôsobiace činitele alkoholového kvasenia, ako je vyššia počtatočná koncentrácia cukru (vyšší osmotický tlak), prítomnosť inhibítorov kvasenia, napr. toxické masťné kyseliny apod.

Je zrejme, že už minimálne dávky sorbentov umožňujú hlbšie prekvasenie, t. j. docieľenie vyššej hladiny alkoholu a lepšie využitie sacharidov muštu. Súčasne sa dosahujú nižšie koncentrácie prchavých kyselín vo vínach,

ktoré sú dôležitým ukazovateľom akosti hotového produktu. Urýchľujú celkový priebeh alkoholového kvasenia aj za nepriaznivých fermentačných podmienok a zabráňujú nedokvaseniu vín pripravených z muštov s vyššou koncentraciou cukru.

V ďalšom výskume sa chceme zamerať na vplyv týchto aktivátorov na inhibičnú aktivitu reziduí fungicídov a na účinnosť pri prekvasovaní nedokvasených hroznových vín.

Literatúra

- [1] MINÁRIK, E.: Zur Aktivierung der alkoholischen Gärung schwer vergärbbarer Moste durch Hefezellwände. Mitt. Klosterneuburg 36, 1986, č. 5, s. 194–197.
- [2] MINÁRIK, E., KUNOVÁ, Z., JUNGOVÁ, O., ŠILHÁROVÁ, Z.: Možnosti stimulácie alkoholového kvasenia hroznového muštu preparátom z bunkových stien kvasiniek. Kvas. prům. 32, 1986, č. 7/3, s. 169–173.
- [3] MINÁRIK, E., ŠILHÁROVÁ, Z.: Možnosti zintenzívnenia alkoholového kvasenia muštu preparátom zo stien kvasinkových buniek. Vinohrad 24, 1986, č. 5, s. 110–112.
- [4] LAFON-LAFOURCADE, S., LARUE, F., RIBÉREAU-GAYON, P.: Evidence for the existence of „survival factors“ as an explanation for some particularities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. Appl. Env. Microbiol. 38, 1979, č. 6, s. 1069–1073.
- [5] GENEIX, C.: Recherches sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Thèse. Université de Bordeaux II, Bordeaux 1984, 168 s.
- [6] LAFON-LAFOURCADE, S., GENEIX, C., RIBÉREAU-GAYON, P.: Les modalités de mise en oeuvre des écorces de levure en vinification. Connaiss. Vigne Vin 18, 1984, č. 2, s. 111–125.
- [7] MINÁRIK, E.: Možnosti ovplyvnenia kvasenia muštu aktivátorom z *Botrytis cinerea*. Kvas. prům. 28, 1982, č. 2, s. 41–43.
- [8] MINÁRIK, E.: Zur Aktivierung der alkoholischen Gärung zuckerreicher Moste. Wein-Wiss. 38, 1983, č. 3, s. 202–209.
- [9] LABATUT, E., LAFON-LAFOURCADE, S., LARUE, F.: Recherches sur quelques propriétés des écorces de levure. Rapport des Activités de Recherches 1983–1984. Institut d'Oenologie-Université de Bordeaux II, Talence 1985, s. 28–31.
- [10] GENEIX, C., LAFON-LAFOURCADE, S., RIBÉREAU-GAYON, P.: Prévention et traitement des arrêts de fermentation. Rapport des Activités de Recherches 1982–1983. Institut d'Oenologie-Université de Bordeaux II, Talence 1984, s. 24–27.

Minárik, E., Jungová, O.: Aktivácia alkoholového kvasenia biologickou a nebiologickou cestou. Kvas. prům. 32, 1986, č. 12, s. 321–324.

Mikrokryštalická celulóza vykazuje, podobne ako bunkové steny kvasiniek a aktivátor z *Botrytis cinerea*, stimulačný účinok na fermentačnú aktivitu kvasiniek *Saccharomyces oviformis* v hroznovom mušte za nepriaznivých kvasných podmienok. Stimulačný účinok sa prejavuje v hlbšom prekvasení, docieľení vyššej hladiny alkoholu a nižšej tvorby prchavých kyselín vo víne. Pri vyššej koncentrácii cukru muštu sa tento účinok prejavuje výraznejšie ako v mušte s nižšou cukornatosťou.

Минарик, Э., Юнгова, О.: Активация спиртного брожения биологическим и небиологическим путем. Квас. прум. 32, 1986, № 12, стр. 321–324.

Микрокристаллическая целлюлоза оказывает подобно как клеточные стенки дрожжей и активатор из *Botrytis cinerea*, стимулирующее действие на ферментативную активность дрожжей *Saccharomyces oviformis* в виноградном соке и при неблагоприятных условиях брожения. Стимулирующее действие проявляется в более глубоком сбраживании, достижении более высокого содержания спирта при низшем образовании летучих кислот в вине. При более высокой концентрации сахара сока это действие проявляется выразительнее чем в соке с более низким содержанием сахара.

Minárik, E., Jungová, O.: Activation of Alcoholic Fermentation by Biologic a Non-biologic Means. Kvas. prům. 32, 1986, No. 12, pp. 321–324.

Microcrystalline cellulose shows, similarly as yeast wall preparations and the activator *Botrytis cinerea*, a stimulating effect on the fermentation activity of the yeast *Saccharomyces oviformis* in grape must even under unfavorable fermentation conditions. The stimulating effect is evident by a more profound fermentation, higher alcohol content and lower volatile acid formation in the wine. This effect is markedly higher in musts with high sugar concentration.

Minárik, E., Jungová, O.: Biologische und nichtbiologische Aktivierung der alkoholischen Gärung. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 12, S. 321—324.

Mikrokristalline Zellulose besitzt, ähnlich wie Heferinde und der Aktivator aus *Botrytis cinerea*, eine stimulierende Wirkung auf die Gärungsaktivität der Hefe

Saccharomyces oviformis auch bei ungünstigen Gärungsbedingungen im Most. Die stimulierende Wirkung ist offensichtlich in der gründlicheren Vergärung des Zuckers, in der Erzielung höherer Alkoholgehalte und in der geringeren Bildung flüchtiger Säure durch die Hefe im Wein. Die stimulierende Wirkung wird in Mosten mit höherer Zuckerkonzentration noch verstärkt.