

Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína

663.252.41

Doc. Ing. FEDOR MALÍK, CSc., RNDr. VALTER VOLLEK, Doc. Ing. JÁN HRONČEK, CSc., Ing. ERIKA MORVAYOVÁ,
Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

1. časť: Autoselekčný efekt, izolácia a identifikácia vínnych kvasiniek

Kľúčové slová: *autoselekčný efekt, vínne kvasinky, izolácia kvasiniek, vlastnosti kvasiniek*

K izolácii vínnych kvasiniek z primárnych i sekundárnych stanovišť pristupujú vinárski mikrobiológovia differencecane. Na základe poznania života mikroorganizmov, využívajúc dostupné i menej dostupné pracovné metodiky, odhaľujú nové princípy a zákonitosti život-

ných prejavov populácii kvasiniek. Napíňajú tak nielen zábery ekologického výskumu, ale poskytovaním vysokovýkonných jedincov slúžia i aplikovanému výskumu a výrobnéj praxi.

Ucelený obraz o ekológii vínnych kvasiniek u nás

podal Minárik [1]. Tri desaťročia študoval zastúpenie a frekvenciu jednotlivých druhov kvasiniek, izolujúc pritom desiatky priemyselne významných kmeňov vinných kvasiniek [2]. Štúdiu mikrobiológie hrozna, muštu a vína sa venovali i ďalší naši autori [3, 4, 5].

Ekologické štúdie kvasiniek sa neustále rozširujú, dopĺňajú a skvalitňujú. Tieto výskumy sa vedú v presvedčení, že len dokonalé poznanie rodového a druhového zastúpenia kvasiniek a ich fyziologických vlastností umožňuje aplikáciu účinnejších spôsobov výroby a biologickej stabilizácie hroznových vín.

Izolačné postupy v posledných rokoch využívajú princípy prirodzenej selekcie mikroorganizmov. Originálny princíp riadenej autoselekcie kvasiniek popísal v roku 1967 Hronček [6]. Dôsledná exploatácia princípu autoselekčného efektu, ktorý využíva vertikálnu „pracovnú“ dráhu kvasiniek, je možná v navrhovanom dvojčlennom zariadení (selektor) na kontinuálne rozmnožovanie čistých kultúr vinných kvasiniek [7, 8]. V selektore, ako v každom biologickom systéme sa uplatňuje zákon súťaživosti podľa Volterra: z dvoch kvasiniek, ktoré „súťažia“ v tom istom priestore o ten istý zdroj živín sa presadí tá, ktorej špecifická rastová rýchlosť je vyššia. Pretože špecifická rastová rýchlosť kvasiniek je nižšia než špecifická rastová rýchlosť kontaminantov, možno rozmnožovanie týchto potlačiť len vyššou zriedovacou rýchlosťou. Tento efekt sa uplatňuje v kontinuálne pracujúcom selektore, v ktorom sa vhodnou zriedovacou rýchlosťou vyplavuje nevhodná kvasinka, či kontaminant a zabezpečuje sa rozmnožovanie žiadanej kultúry kvasiniek.

Efekt autoselekcie možno s určitými obmedzeniami zabezpečiť i v podmienkach „batch“ fermentácie hroznového muštu. Vhodnou voľbou podmienok možno vyselektovať v priebehu kvasného procesu i dokvášania také populácie kvasiniek, ktoré sa môžu v ďalších, či opakovaných fázach technologického procesu využiť. Tak možno napríklad zvýšenou koncentráciou oxidu siričitého, cukru, alkoholu v kvasiacom médiu, či kvase- ním pri nízkej teplote získať sulfítové, osmotolerantné, alkoholrezistentné, či chladnomilné kmene vinných kvasiniek.

Vo svojej práci sme sa zamerali na izoláciu a charakterizáciu kvasiniek, použitých v procese sekundárnej fermentácie vína. Vychádzali sme z konkrétnych požiadaviek praxe, s cieľom použiť získané kmene v technológii výroby šumivých vín, či aplikovať ich v prípade nedokvaseného vína. Základnou požadovanou charakteristikou týchto kvasiniek mala byť preto ich alkoholre- zistentnosť.

1.1 METODICKÁ ČASŤ

1.1.1 Použité média

V priebehu práce, zameranej na identifikáciu izolovaných vinných kvasiniek sme používali nasledovné kultivačné pôdy: Sabouraudov agar [izolácia, rast a charakteristika makrokolónií, tvorba biomasy], Fowellov roztok (sporulačná pôda), cibulový agar (rast pseudomycélia), kvapalné sladidlové médium (charakterizácia rastu) a sladidlový agar (úschova izolátov) [9].

Pre potreby izolácie vinných kvasiniek sme mali k dispozícii dvanásť dokvášajúcich vín z juhomoravskej vinohradníckej oblasti. Prevádzkáreň MVZ s.p. v Mikulove poskytla 6 dokvášajúcich hroznových vín odrôd: Neuburgské (vz. 1), Müller Thurgau (vz. 2), Veltlínske zelené (vz. 3, 4), Rulandské biele (vz. 5) a Rizling vlašský (vz. 6). Z oblasti Pavlova to boli tri hroznové vína: Rulandské biele (vz. 7), Rulandské sivé (vz. 8) a Rizling rýnsky (vz. 9). Z prevádzkárne MVZ s.p. Dolní Dunajovice pochádzali vína Silvánske zelené (vz. 10), Neuburgské (vz. 11) a Rizling vlašský (vz. 12).

1.1.2 Metódy izolácie, identifikácie a klasifikácie kvasiniek

Na izoláciu kvasiniek sme použili Kochovu zriedovaciu metódu. Individuálne vyrastené kolónie kvasiniek sa preočkovali na šikmý sladidlový agar. Po 72 h kultu-

vácii pri teplote 28–30 °C sa kultúry uskladnili v chladniacom boxe.

Identifikácia kvasiniek prebiehala na základe určenia morfológických, fyziologických a biochemických vlastností izolátov. Podľa morfológických vlastností sa určil rod kvasiniek. Spoznanie fyziologických a biochemických vlastností kvasiniek umožnilo rozlíšiť jednotlivé druhy kvasiniek. Pre účely identifikácie sme použili bežné pracovné metódy [10, 11].

Tvar buniek kvasiniek sa sledoval mikroskopicky, ich rozmery sa merali okulárovým mikrometrom. Tvorba spór sa pozorovala u izolovaných jedincov po 7–14 dňovej kultivácii vo Fowellovom roztoku. Tvorbu pseudomycélia sme sledovali pri inkubácii na skličkách s cibulovým agarom. Sklička sa inkubovali 7 dní pri 28 °C v Petriho miskách. Druhovú diagnostiku stanovených ro- lov sme urobili podľa Kockovej-Kratochvílovej [11].

1.2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Vzorky dokvášajúcich hroznových vín sa odoberali z vrchnej časti veľkoobjemových stojatých oceľových nádrží. Takýto pracovný postup zabezpečil na základe efektu autoselekcie odber populácií kvasiniek so žela- teľnými vlastnosťami. Cieľom práce bolo izolovať také kmene kvasiniek, ktoré sú odolné voči vysokým kon- centráciám alkoholu.

Izolované kvasinky z jednotlivých vín sme očkovali na Sabouraudov agar s postupne sa zvyšujúcim obsahom etanolu — 12, 15 a 20 % obj. Týmto počínom sa sprís- ňovali podmienky pre selekciu alkoholrezistentných kmeňov kvasiniek. Po dvojdňovej kultivácii rástla na pôde s 12 % obj. etanolu väčšina izolovaných jedincov. Na pôde, ktorá obsahovala 15 % obj. etanolu vyrástlo už podstatne menej kolónií kvasiniek. Najintenzívnej- šie rastúce kolónie sme napokon preočkovali na pevnú Sabouraudovu pôdu s 20 % obj. etanolu. Až potom na základe vizuálneho posúdenia intenzity rastu sme vy- brali 10 kmeňov kvasiniek, ktoré sa stali predmetom ďalšieho experimentálneho záujmu. Boli to kmene s pra- covným označením 1B, 2A, 2C, 3A, 3B, 6A, 6C, 11A, 11B, 11C (viď číslovanie vzoriek vín). Týchto 10 kmeňov kvasiniek sme podrobili v ďalšom identifikácii a náväz- nému testovaniu ich technologických, biochemických a genetických vlastností.

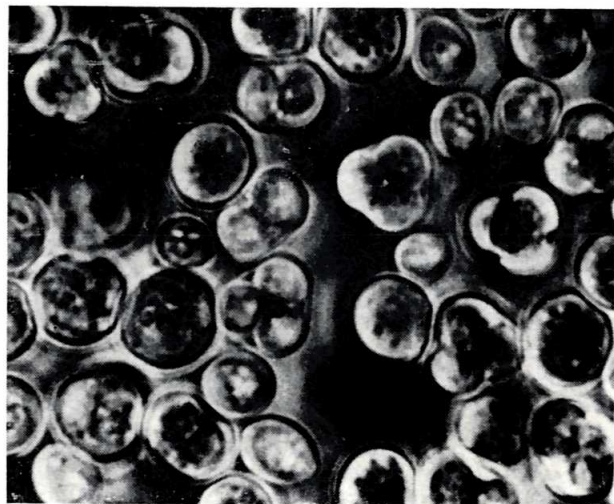
Účelová charakterizácia 10 izolátov si všima tieto zá- kladné charakteristiky kvasiniek: morfológiu buniek a kolónií, tvorbu pseudomycélia a tvorbu spór. Na pozo- rovanie morfológie buniek sme použili 48 h kultúru, získanú kultiváciou v kvapalnej Sabouraudovej pôde s ob- sahom redukujúcich cukrov 100 g.l⁻¹. Izolované kmene kvasiniek mali guľaté bunky, ktorých rozmer sa po- hyboval v rozpätí 5,8–12,5 μm. Morfológia kolónií sa vyhodnocovala po vyrastení na Sabouraudovom agare. Pri makroskopickom vzhľade kolónií sa pozorovali malé odlišnosti. Kmene 2A a 2C mali hladký povrch, ostatné kmene sa vyznačovali jemne granulovaným povrchom kolónií. Všetky kolónie izolátov kvasiniek boli biele, lesklé a konvexné.

Po vyhodnotení mikroskopického pozorovania vyraste- ných kvasiniek na cibulovom agare konštatujeme abse- enciu tvorby pseudomycélia u všetkých izolovaných kmeňov kvasiniek. Mikroskopické vyhodnotenie fyziolo- gického stavu kvasiniek vo Fowellovom roztoku potvr- diťo sporuláciu všetkých izolovaných kmeňov, pričom tvorili dvojspórové a štvorspórové asky (obr. 1).

Charakterizácia a diagnostické znaky izolovaných kmeňov kvasiniek, ktoré sme získali pri vyhodnotení morfológie buniek a kolónií, tvorby pseudomycélia, spo- sobu pučania a tvorby spór, využili sme na určenie ras- tu buniek v kvapalnom médiu, nám dovoľuje zaradiť izolované kvasinky do rodu *Saccharomyces*. Na základe získaných diagnostických znakov sme všetky izolované kmene kvasiniek určili ako druh *S. cerevisiae*.

1.3 ZÁVER

Využitím princípu autoselekčného efektu, uplatnené- ho vo výrobe a návazne i v laboratóriu, bolo z dokvá- šaných hroznových vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti izolovaných 10 kmeňov vinných kvasiniek *Sac-*



Obr. 1. Mikroskopický obraz izolovanej kultúry *Saccharomyces cerevisiae* 6C rastúcej v sporulačnom Fowellovom médiu (zväčšenie 3125X)
foto: Dr. V. Vollek

Saccharomyces cerevisiae. Réžia podmienok selekcie zabezpečila alkoholrezistentné vlastnosti izolátov, ktorých použitie je nasmerované do oblasti sekundárnej fermentácie vína.

Komplexnú charakterizáciu izolovaných kmeňov kvasiniek doplnia návazné časti tohto príspevku, ktoré pojednajú o technologických, biochemických a genetických vlastnostiach izolovaných kmeňov vínnych kvasiniek. Posledná časť príspevku bude informovať o aplikácii izolovaných kvasiniek v prevádzke.

Literatúra

- [1] MINÁRIK, E.: Štúdium ekológie vínnych kvasiniek a kvasinkovitých organizmov prírodných a druhotných stanovišť (doktorská dizertačná práca). SAV Bratislava, 1978.
- [2] MINÁRIK, E.: Kvas. prům. 23, 1977, s. 207.
- [3] VOJTEKOVÁ, G.: Štúdium ekológie a biológie selektovaných kmeňov vínnych kvasiniek a ich aplikácia vo vinárskej praxi (kandidátska dizertačná práca). ČHTF SVŠT, Bratislava 1983.
- [4] STOLLÁROVÁ, V.: Príspevok k štúdiu mikroflóry hrozna nitrianskej vinohradníckej oblasti. Zborník PF Nitra 18, 1970, s. 61.
- [5] ŠVEJCAR, V.: Wein-Wiss. 23, 1968, s. 251.
- [6] HRONČEK, J.: Mitteilungen der Versuchsstation für das Gärungsgewerbe, Wien 1967, s. 1.
- [7] MALÍK, F.: Štúdium propagácie kvasničnej biomasy pre účely vinárskej technológie (kandidátska dizertačná práca). ČHTF SVŠT Bratislava 1973.
- [8] MALÍK, F., HRONČEK, J.: Kvas. prům. 20, 1974, s. 225.
- [9] MORVAYOVÁ, E.: Izolácia a charakterizácia priemyselne významných kmeňov vínnych kvasiniek (diplomová práca). ČHTF SVŠT Bratislava 1988.
- [10] VRANÁ, D. et al.: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Academia Praha, 1986.
- [11] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Katalóg kultúr kvasiniek. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava 1977.

Lektoroval doc. Ing. Erich Minárik, DrSc.

Malík, F. - Vollek, V. - Hronček, J. - Morvayová, E.: Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína. I. časť. Autoselekčný efekt, izolácia a identifikácia vínnych kvasiniek. Kvas. prům., 35, 1989, č. 5, s. 141—147.

Z dokvášajúcich vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti bolo na princípe autoselekčného efektu izolovaných niekoľko významných kmeňov vínnych kvasiniek. Podmienky návaznej laboratórnej selekcie zabezpečili získanie 10 kmeňov kvasiniek, ktoré sa vyznačovali výraznými a alkoholrezistentnými vlastnosťami. Izolované kmene, charakterizované ako druh *Saccharomyces cerevisiae*, sú určené pre potreby sekundárnej fermentácie vína.

Малик, Ф. - Воллек, В. - Грончек, Я. - Морвайова, Е.: Биотехнологические свойства дрожжей, изолированных для потребностей вторичной ферментации вина. I. часть. Автоселективный эффект, изоляция и идентификация винных дрожжей. Квас. prům., 35, 1989, № 5, стр. 141—147.

Из дображивающих вин виноградної области южной Моравии на принципе автоселективного эффекта было изолировано несколько значительных штаммов винных дрожжей. Условия последующей лабораторной селекции обеспечили получение 10 штаммов дрожжей, которые отличались выразительными спиртоустойчивыми свойствами. Изолированные штаммы, характеризованные как вид *Saccharomyces cerevisiae*, назначены для потребностей вторичной ферментации вина.

Malík, F. - Vollek, V. - Hronček, J. - Morvayová, E.: Biotechnological Properties of Yeasts Isolated for Secondary Fermentation of Wine. Part I. Autoselective Effect, Isolation and Identification of Yeasts for Wine-Making. Kvas. prům. 35 1989, No. 5, pp 141—147.

Using the autoselective effect some significant yeast strains for wine-making has been isolated from a secondary fermentation of wines from South Moravia viticultural region. Ten yeast strains were obtained from the following laboratory selection. The strains had a high resistance to alcohol and they were suitable for the application in a secondary fermentation of wine. All the strains belong to *Saccharomyces cerevisiae*.

Malík, F. - Vollek, V. - Hronček, J. - Morvayová, E.: Biotechnologische Eigenschaften der Hefe, isolierten für den Bedarf der sekundären Weingärung. Teil I. Autoselektionseffekt, Isolation, Identifizierung der Weinhefe. Kvas. prům., 35, 1989, č. 5, s. 141—147.

Aus den nachgärenden Weinen des südmährischen Weingebietes wurden auf dem Prinzip des Autoselektionseffektes einige bedeutsame Stämme der Weinhefe isoliert. Die Bedingungen der anknüpfenden Laborselektion haben die Erzielung von 10 Hefestämme, die sich mit markanten alkoholresistenten Eigenschaften auszeichneten, versichert. Die isolierten Stämme, die als Sorte *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert wurden, sind für den Bedarf der sekundären Weingärung bestimmt.