

Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína

2. časť. Technologické vlastnosti izolovaných vínnych kvasiniek

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

Kľúčové slová: víno, kvasinky, sekundárna fermentácia, osmotolerantné a alkoholrezistentné vlastnosti

Získané kmene vínnych kvasiniek, izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína, charakterizujeme napred z pohľadu technologického. Účelová réžia podmienok autoselekcie mala zabezpečiť získanie kmeňov kvasiniek s výraznými alkoholrezistentnými vlastnosťami [1]. Sledovanie predovšetkým týchto vlastností je preto v našej práci základným kritériom pri hodnotení ich technologických vlastností. Fermentačnú aktivitu izolovaných kvasiniek porovnávame s aktivitou kmeňov vínnych kvasiniek, u ktorých už boli dostatočne preukázané ich alkoholrezistentné i osmotolerantné vlastnosti [2, 3, 4].

2.1 METODICKÁ ČASŤ

2.1.1 Použité média

V prvej časti experimentálnych prác, zameraných na potvrdenie osmotolerantných vlastností kvasiniek, sme ako fermentačnú pôdu využívali zahustený hroznový mušt. Sacharózou zahustený hroznový mušt s koncentráciou redukujúcich cukrov 520–560 g.l⁻¹ pochádzal z Vinárskych závodov, š. p., Pezinok. Zahustený hroznový mušt bol vopred v prevádzke desulfítovaný (celkový SO₂ 88,2 mg.l⁻¹, voľný SO₂ 9,3 mg.l⁻¹), nariadený na 301 g.l⁻¹ redukujúcich cukrov a bola v ňom upravená kyslosť (pH = 3,4). Pred sterilizáciou (20 minút, 0,12 MPa) bol mušt obohatený o anorganické soli [(NH₄)₂HPO₄ 1,5 g.l⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,5 g.l⁻¹]. Po sterilizácii sa fermentačné médium ešte priživilo 0,05 g.l⁻¹ pantotenu vápenatého a 0,02 g.l⁻¹ biotínu.

Pre potreby sledovania alkoholrezistentných vlastností kvasiniek sa ako živné médium pripravila tirážna zmes hroznového vína I. B kvalitatívnej triedy. Tirážna zmes obsahovala 12,10 % obj. alkoholu a 24 g.l⁻¹ redukujúcich cukrov.

2.1.2 Použité mikroorganizmy

Objektom sledovania vybraných technologických vlastností bolo 10 kmeňov vínnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* 1B, 2A, 2C, 3A, 3B, 6A, 6C, 11A, 11B, 11C, izolovaných z dokvášajúcich vín z juhomoravskej vinohradníckej oblasti. Porovná-

vanie ich vlastností malo vyústiť k určeniu kmeňa, ktorý by najviac vyhovoval požiadavkám technologickej praxe. Izolácia a testovanie vlastností prebiehali s cieľom aplikovať získaný kmeň v technológii výroby šumivých vín.

V porovnávacích testoch fermentačnej aktivity sme použili sadu technologicky významných kmeňov vínnych kvasiniek, ktoré sú potenciálne k dispozícii čs. vinárskemu priemyslu. Zbierka kvasiniek KVÚVV v Bratislave (Doc. Ing. E. Minárik, DrSc.) poskytla kmene *S. cerevisiae* Tokaj 76D, Tokaj 74F a Bratislava 1. Mikrobiologické laboratórium Vinárskych závodov, š. p., Pezinok (Ing. G. Vojteková, CSc.) dalo k dispozícii osmotolerantné, hlbokoprevkvašajúce kmene *S. cerevisiae* 13 RVV/d a 3 MTV/XIII. Súbor porovnávacích kmeňov doplnili vlastné vínné kvasinky *S. cerevisiae* FV1 a FV2.

2.1.3 Metódy vyhodnotenia

Testy fermentačnej aktivity prebiehali na oboch médiach v 500 ml liekovkách z tmavého skla. Pôdy boli jednotne inokulované kvapalným zákvasom čistej kultúry kvasiniek tak, aby koncentrácia buniek bola jednotná pri všetkých pokusoch (10⁷.ml⁻¹). Banky boli uzatvorené kvasnou trubicou s glycerolom, zátka bola zaliata parafínom. Priebeh kvase-
nia sa sledoval denným vážením úbytku oxidu uhličitého. Zo získaných úbytkov CO₂ v závislosti od času sme zostrojili kvasné krivky.

Dosiahnuté výsledky sme analyzovali a rozhodli sa ich štatisticky vyhodnotiť. Priebeh kvasného procesu každej vzorky sme aproximovali metódou *Pearl-Verhulsta*, modifikovanou *Blumbergom* [5]. Linearizácia kvasných kriviek fermentácie muštu (tab. 1) bola urobená tak, že premenné x a y sme vyjadrili nasledovne:

$$x = \ln p - \ln (1 - p) + \frac{1}{(1 - p)} \quad (1)$$

$$y = t \quad (2)$$

pričom p je množstvo produktu delené jeho predpokladanou maximálne dosiahnuteľnou hodnotou ($p_{\max} = 15$ % obj. etanolu). Za závisle premennú y sme zobraли čas.

Pre linearizáciu kvasných kriviek sekundárnej fermentácie vína (tab. 2), zohľadňujúc prítomnosť alkoholu na počiatku kvasenia, sme premenné x a y vyjadrili takto:

$$x = \frac{1}{\nu} \cdot \frac{\ln(2,4 - p)}{\ln(2,37 - 2p)} \quad (3)$$

$$y = \frac{t}{\ln(2,37 - 2p)} \quad (4)$$

pričom ν je koeficient rýchlosti tvorby alkoholu. Takýmto spôsobom sme dostali linearizovanú funkciu:

$$y = A + Bx \quad (5)$$

$$\text{pričom } \nu = \frac{1}{A} \text{ a } \rho = \frac{2}{B} \quad (\rho \text{ je špecifická}$$

spotreba substrátu). Získané priamky sme prepočítali metódou lineárnej regresie tak, aby sme získali optimálne hodnoty konštánt linearizovanej funkcie $\{A, B\}$. To je možné za predpokladu minimalizácie súčtu štvorcov odchýliek experimentálnych hodnôt od hodnôt ležiacich na priamke.

Metódy štatistického vyhodnotenia sa realizovali na vlastnom programe osobného počítača Sinclair Spectrum 128 ZX.

2.2 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 prináša výsledky a vyhodnotenie 45-dňového sledovania osmotolerantných vlastností 10 nami izolovaných a 7 porovnávacích kmeňov vínnych kvasiniek. Priebeh kvasenia na vysokocu-

kornom hroznom mušte ($S_0 = 301 \text{ g.l}^{-1}$) je sledovaný gravimetricky. Zo získaných úbytkov hmotností sa zostrojili kvasné krivky. Tie, ako aj samotné hodnoty údajov, boli podkladom pre netradičnú interpretáciu dosiahnutých výsledkov.

Korelačné koeficienty lineárnej regresie (rozmedzie 0,8916—0,9928) sú vysoké, čo je potvrdením správneho metodického prístupu. Uspokojivá aproximácia skutočností modifikovanou metódou Pearl-Verhulsta nám tak dovoľuje vysloviť určité závery. Signifikantný rozptyl medzi jednotlivými kmeňmi je taký, že nám umožňuje každý kmeň charakterizovať určitými veličinami.

Najvýraznejšou hodnotou pre charakterizáciu výkonnosti jednotlivých kmeňov kvasiniek je hodnota koeficientu B . Jeho hodnota je v našom prípade úmerná recipročnej rýchlosti fermentácie. Znamená to teda, že čím nižšia je jej hodnota, tým v daných podmienkach fermentácie je ten, či onen kmeň výkonnejší. Hodnota koeficientu A charakterizuje počiatočné podmienky pokusu. Má taký rozptyl, že veľa vplyvov sa vytratí v rámci chýb merania.

Z pohľadu na preukázateľné hodnoty koeficientu B možno poukázať na kvalitu kmeňa z hľadiska osmotolerantných vlastností. Z tohto pohľadu možno za absolútne najvhodnejší označiť kmeň *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 74 F. Výrazné osmotolerantné vlastnosti z porovnávacích kmeňov preukázali i kvasinky *S. cerevisiae* Bratislava 1 a *S. cerevisiae* 13 MTV/XIII. Z kmeňov nami izolovaných prejavili osmotolerantné vlastnosti kmene *S. cerevisiae* 11A a 1B. Spätný pohľad na produkciu CO_2 u týchto kmeňov je potvrdením ich osmotolerantných vlastností.

Tabuľka 1. Produkcia CO_2 (% hmotn.) v upravenom hroznom mušte ($S_0 = 30,1\%$ hmotn.), inokulovanom čistými kultúrami vínnych kvasiniek ($X_0 = 1 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$)

S.cerevisiae	Produkcia CO ₂ (% hmotn.)						r	A	B
	D e ň								
	5.	10.	20.	30.	40.	45.			
1 B	2,20	4,26	8,52	11,20	12,32	12,56	0,9825	9,4390	7,9635
2 A	3,89	7,65	11,57	12,31	12,42	12,42	0,8916	1,4316	8,8163
2 C	2,13	4,55	8,31	10,85	11,88	12,07	0,9758	9,4891	8,5959
3 A	2,26	4,62	8,18	10,64	11,49	11,66	0,9704	9,2299	9,2475
3 B	3,01	5,98	9,85	11,37	11,89	12,03	0,9468	5,0324	9,3746
6 A	2,59	5,75	9,63	11,91	12,52	12,59	0,9606	6,5320	8,1373
6 C	2,60	5,08	8,72	11,19	11,80	11,86	0,9633	7,5699	9,1301
11 A	3,18	6,32	10,60	12,56	12,84	12,86	0,9457	4,4843	7,9064
11 B	3,10	5,96	9,94	12,02	12,38	12,44	0,9517	5,0116	8,6033
11 C	2,96	5,80	9,60	11,87	12,51	12,62	0,9668	5,5619	8,4536
74 F	2,78	5,52	9,62	12,28	12,79	12,86	0,9656	6,4298	7,7705
76 D	2,96	5,70	9,76	11,70	11,98	11,98	0,9411	5,7158	9,0075
Bratislava 1	3,05	5,95	10,02	12,47	12,94	12,97	0,9623	5,2937	7,7828
FV 1	2,90	5,30	8,14	10,04	11,02	11,42	0,9772	6,5658	10,9798
FV 2	2,84	5,20	8,20	10,12	11,05	11,42	0,9753	6,8518	10,7951
13 RVV	1,25	3,01	6,33	9,44	11,29	12,02	0,9928	14,8094	7,9792
3 MTV	3,82	7,48	11,64	12,12	12,98	12,98	0,9326	1,4329	8,4242

Legenda : r - korelačný koeficient A,B - konštanty linearizovanej funkcie

Tabuľka 2. Produkcia CO_2 [% hmotn.] v tirážnej zmesi ($P_0 = 12,10$ % obj., $S_0 = 2,4$ % hmotn.), inokulovanej čistými kultúrami vinných kvasiniek ($X_0 = 1 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$)

S.cerevisiae	Produkcia CO ₂ (% hmotn.)								r	A	B
	Deň										
	2.	4.	8.	10.	14.	21.	28.	35.			
1 B	0	0,12	0,70	0,82	0,92	1,00	1,05	1,08	0,9560	7,1309	15,4017
2 A	0,02	0,03	0,45	0,68	0,78	0,87	0,88	0,89	0,9067	12,6812	21,2322
2 C	0	0,08	0,56	0,68	0,77	0,83	0,88	0,92	0,9231	11,9924	24,5204
3 A	0,08	0,48	0,70	0,78	0,84	0,90	0,95	0,96	0,9183	8,9817	22,0241
3 B	0,04	0,41	0,73	0,84	0,92	1,04	1,09	1,13	0,9925	5,6144	13,7286
6 A	0	0,05	0,53	0,66	0,76	0,82	0,85	0,89	0,9048	12,8681	25,2477
6 C	0	0,04	0,67	0,81	0,89	1,10	1,16	1,18	0,9902	8,0159	7,6119
11 A	0	0,03	0,60	0,70	0,79	0,84	0,85	0,88	0,8619	12,1503	24,0412
11 B	0	0,07	0,36	0,66	0,80	0,84	0,88	0,88	0,8868	12,8334	22,3085
11 C	0,03	0,45	0,77	0,81	0,85	0,88	0,93	0,97	0,8875	8,9345	21,1954
74 F	0	0,03	0,63	0,73	0,79	0,83	0,86	0,87	0,8276	12,0366	23,8169
76 D	0,01	0,12	0,27	0,67	0,85	0,94	0,96	0,99	0,9414	10,9581	17,2640
Bratislava 1	0,05	0,07	0,51	0,75	0,85	0,89	0,93	0,97	0,9096	10,4786	20,1481
FV 1	0	0,04	0,34	0,64	0,78	0,87	0,89	0,92	0,9186	12,5984	21,3352
FV 2	0	0,03	0,65	0,77	0,85	0,93	0,95	0,97	0,8903	9,6271	19,5599
13 RVV	0	0,02	0,46	0,70	0,85	0,91	0,97	1,00	0,9437	10,4589	18,4074
3 MTV	0	0,05	0,44	0,74	0,84	0,94	0,98	1,02	0,9481	9,9544	17,5109

Legenda : r - korelačný koeficient

A,B - konštanty linearizovanej funkcie

Tabuľka 2 informuje o alkoholerezistentných vlastnostiach nami izolovaných a porovnávacích kmeňov vinných kvasiniek. Priebeh 35-dňového kvasenia je opäť sledovaný gravimetricky a vyhodnocovaný modifikovanou metódou *Pearl-Verhulsta*. Aparát vyhodnotenia je upravený tak, že zohľadňuje prítomnosť alkoholu na počiatku sekundárnej fermentácie hroznového vína.

Korelačné koeficienty lineárnej regresie sú v rozmedzí 0,8276—0,9925. Toto rozmedzie naznačuje, že zvolené metódy vyhodnotenia aproximujú skutočnosť nedostatočne, avšak vďaka rozptylu hodnôt A a B možno jednotlivé kmene charakterizovať.

Rovnako ako v predošlom prípade, hodnota koeficientu A, charakterizujúceho počiatkové podmienky experimentu, má značný rozptyl. Taktiež i koeficient B má značný rozptyl, poukazujúci na diferencované alkoholerezistentné vlastnosti kmeňov. Hodnotiac tieto vlastnosti, za absolútne najvhodnejší možno označiť kmeň *S. cerevisiae* 6C, ktorého hodnota B = 7,6119! Tento kmeň rovnako naprodukoval najväčšie množstvo CO_2 . Alkoholerezistentnými vlastnosťami sa tomuto kmeňu približujú i kmene *S. cerevisiae* 3B (B = 13,7286) a *S. cerevisiae* 1B (B = 15,4017).

Literatúra

- [1] MALÍK, F., VOLLEK, V., HRONČEK, J., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 141.
- [2] MINÁRIK, E.: Ekológia prírodných druhov vinných kvasiniek v Československu. Biol. práce XII/4, Vydavateľstvo SAV Bratislava, 1966.
- [3] VOJTEKOVÁ, G.: Štúdium ekológie a biológie selekovaných vinných kvasiniek a ich aplikácia vo vi-

nárskej praxi [kandidátska dizertačná práca]. CHTF SVŠT Bratislava, 1983.

- [4] MALÍK, F., VOLLEK, V., MECHÁČKOVÁ, D.: Vinohrad, **24**, 1986, s. 41.
- [5] BLUMBERG, A.: J. Theoret. Biol., **21**, 1968, s. 42.

Lektoroval doc. Ing. E. Mindrik, DrSc.

Malík, F. - Hronček, J. - Vollek, V. - Morvayová, E.: Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína. 2. časť. Technologické vlastnosti izolovaných vinných kvasiniek. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 8—9, s. 236—239.

Sledovali a vyhodnocovali sa osmotolerantné a alkoholerezistentné vlastnosti 17 technologicky významných kmeňov vinných kvasiniek. Priebeh fermentácie sa sledoval na základe úbytku oxidu uhličitého. Získané údaje sa vyhodnotili metódami matematickej štatistiky (lineárnou regresiou linearizovaných kvasných kriviek). Na základe týchto metód za absolútne najvhodnejší osmotolerantný kmeň možno označiť *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 74F. Najvýraznejšie alkoholerezistentné vlastnosti potvrdil kmeň *S. cerevisiae* 6C, izolovaný z juhomoravskej vinohradníckej oblasti na princípe autoselekčného efektu.

Малик, Ф. - Грончек, Я. - Воллек, В. - Морвайова, Е.: Биотехнологические свойства дрожжей, изолированных для целей вторичной ферментации вина. 2 часть. Технологические свойства изолированных винных дрожжей. Квас. прум., **35**, 1989, № 8—9, стр. 236—239.

Исследовались и оценивались свойства — осмотолерантности и устойчивости в отношении к спирту — семнадцати технологически значительных штаммов винных дрожжей. Ход ферментации рассматривался на основе убытка двуокиси углерода. Полученные данные обрабатывались методами математической статистики (линейной регрессией линейных кривых брожения). На основе приведенных методов можно обозначить как аб-

солютно наиболее подходящий осмоотолерантный штамм *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 74F. Наиболее выразительную устойчивость в отношении к спирту подтвердил штамм *Saccharomyces cerevisiae* 6C, изолированный из виноградной области южной Моравии на принципе автоселективного эффекта.

Malík, F. - Hronček, J. - Vollek, V. - Morvayová, E.: Biotechnologic Properties of Yeasts Isolated for Secondary Fermentation of Wine. Part II. Technologic Properties of Isolated Yeasts for Wine-Making. Kvas. prům., 35, 1989, No. 8—9, pp. 236—239.

The osmotolerance and the resistance to alcohol in 17 technologically significant strains of wine-making yeasts were evaluated. The course of fermentation was detected on a base of the carbon dioxide uptake. The experimental data were evaluated using statistic methods (the linear regression of linearized fermentation curves). The best osmotolerant property has been found with the strain *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 74F. The best resistance to alcohol has been found with the strain

S. cerevisiae 6C isolated from South Moravia viticultural region using the autoselective effect.

Malík, F. - Hronček, J. - Vollek, V. - Morvayová, E.: Biotechnologische Eigenschaften der Hefe, isolierten für den Bedarf der sekundären Weingärung. 2. Teil: Technologische Eigenschaften der Weinhefen. Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 8—9, S. 236—239.

Die Autoren verfolgten und beurteilten die osmotolerante und alkoholresistente Eigenschaften von 17 bedeutenden Weinhefestämmen. Der Verlauf der Fermentation wurde aufgrund der Kohlendioxidabnahme verfolgt. Die erzielten Ergebnisse wurden durch die Methoden der mathematischen Statistik ausgewertet (liniare Regression der linearisierten Gärkurven). Bei der statistischen Auswertung zeigte sich als absolut geeignetster osmotoleranter Stamm *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 74F. Die markantesten alkoholresistenten Eigenschaften wurden bei dem Stamm *S. cerevisiae* 6C bestätigt, der aus dem südmährischen Weinanbaugebiet nach dem Prinzip des Autoselektionseffektes isoliert wurde.