

Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína

663.12 663.252.41

3. časť. Biochemické vlastnosti izolovaných vínnych kvasiniek

Doc. Ing. FEDOR MALÍK, CSc., Ing. SOŇA MICHALČÁKOVÁ, Ing. DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ, CSc., Ing. ERIKA MORVAYOVÁ, Ing. ANDREA KUKAŇOVÁ, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: *víno, fermentácia, kvasinky, alkoholrezistencia*

Izolované kmene vínnych kvasiniek, určené pre potreby sekundárneho kvasenia vína, charakterizujeme v ďalšom slede experimentálnych prác z pohľadu hodnotenia ich biochemických vlastností. Prinášame výsledky hodnotenia acidifikačných a respiračných vlastností sáboru 17 technologicky významných kmeňov vínnych kvasiniek. Prispievame tak ku komplexnej charakterizácii kvasiniek, izolovaných z juhomoravskej vinohradníckej oblasti [1, 2].

Proces dýchania a kvasenia sú súbežné biochemické deje, charakterizujúce fyziologický stav a metabolickú

aktivitu kvasiniek [3]. I vínne kvasinky, u ktorých prevláda anaeróbny metabolizmus, možno charakterizovať vyhodnocovaním pomeru dýchania a kvasenia. Respiračný koeficient, daný pomerom uvoľneného CO_2 a spotrebovaného O_2 , tak môže prispieť k obrazu celkovej charakterizácie izolovaných kmeňov vínnych kvasiniek.

Acidifikácia je dôležitým indikátorom metabolickej aktivity kvasiniek [4]. Procesy, podieľajúce sa na acidifikácii a tvorbe extracelulárnej tlmivej schopnosti zahŕňajú uvoľňovanie organických kyselín, metabolickú produkciu CO_2 , vylučovanie iónov vodíka a draslíka. Pro-

ces okysľovania média si tak možno predstaviť ako refaz reakcií spojených s transportom glycidického substrátu, enzýmovou konverziou substrátu na kyslý metabolit a s vylúčením nadbytočných protónov z bunky [5]. Sledovanie poklesu extracelulárneho pH v suspenzii buniek a substráte je tak ukazovateľom rýchlosti naštartovania metabolizmu a schopnosti pružne degradovať sacharidový substrát na primárne metabolity.

3.1 METODICKÁ ČASŤ

3.1.1 Použité mikroorganizmy

Sledovali sa biochemické vlastnosti 10 kmeňov vinných kvasiniek *S. cerevisiae*, izolovaných z dokvášajúcich vín juhomoravskej vinohradníckej oblasti a 7 kmeňov vinných kvasiniek, ktoré sú súčasťou zbierok kvasiniek u nás. Ich charakteristiky prinášajú predchádzajúce časti tohto príspevku [1, 2].

3.1.2 Metódy sledovania biochemických vlastností

Respiračné vlastnosti kvasiniek sme sledovali Warburgovou manometrickou metódou. Kvasinky (0,2 ml suspenzie; 10^7 buniek ml^{-1}) sme inkubovali pri 28 °C za aeróbných podmienok v tlmivom roztoku NaH_2PO_4 (3 ml; 0,1 mol l^{-1}) o pH 5,0 s glukózou a fruktózou v pomere 1:1 (10 g l^{-1}), resp. bez zdroja uhlíka (endogénna respirácia). RQ sme stanovovali priamou Warburgovou metódou, v dvoch nádobkách s manometrami. V prvej bola meraná spotreba kyslíka, tj. vznikajúci CO_2 bol eliminovaný v absorpčnom komínčeku roztokom KOH (0,2 ml; 4 mol l^{-1}). V druhej nádobke bola nameraná zmena tlaku spôsobená súčasne spotrebou kyslíka a tvorbou oxidu uhličitého. Z rozdielu tlakov v oboch nádobkách po korekcii na termobarometer (v nádobke 3 ml destilovanej vody) sme vypočítali množstvo uvoľneného CO_2 [6].

Hodnotenie acidifikačných vlastností sa uskutočnilo na digitálnom pH-metri fy. Radelkis OP 208/1 s kombinovanou elektródou fy Radiometer v sklenenej temperovanej nádobke pri teplote 28 °C. Deväť ml inokula čistej kultúry vybratého kmeňa vinných kvasiniek o koncentrácii buniek 10^7 ml^{-1} sa doplnilo 1 ml desaťpercentného roztoku zmesi glukózy a fruktózy. pH roztoku sa upravilo na hodnotu 6,5. Zmenu pH sme sledovali 15 minút v jednonútových intervaloch pri súčasnej aerácii suspenzie pomocou magnetického miešadla.

3.2 Výsledky a diskusia

Tabuľka 1 informuje o respiračných vlastnostiach testovaných kmeňov vinných kvasiniek. Prináša hodnoty

Tabuľka 1. Respiračné vlastnosti izolovaných vinných kvasiniek

Kmeň <i>S. cerevisiae</i>	RQ						
	čas (min)						
	60	70	80	90	100	110	120
1 B	1,68	2,44	1,94	1,88	1,79	1,79	2,09
2 A	1,70	1,55	1,57	2,05	1,76	2,01	1,99
2 C	4,15	5,60	3,19	2,67	2,64	2,57	3,76
3 A	1,65	1,39	2,13	1,51	2,05	2,09	2,51
3 B	2,99	1,86	2,27	2,32	0,67	1,06	1,25
6 A	1,92	1,74	1,49	1,63	1,69	1,84	1,49
6 C	1,92	1,82	1,63	1,61	2,02	1,86	2,46
11 A	1,87	2,43	2,11	2,09	1,95	1,89	2,06
11 B	1,01	0,72	1,40	0,91	0,79	0,68	2,23
11 C	1,03	0,98	1,13	0,93	1,02	1,00	1,23
74 F	1,70	1,91	1,76	1,78	1,75	1,73	1,87
76 D	2,24	2,03	1,52	1,93	1,43	1,31	1,54
Bratislava 1	1,49	1,51	1,68	1,52	1,38	1,56	1,46
FV 1	1,27	1,22	1,80	1,31	1,42	1,28	1,24
FV 2	1,34	1,13	1,29	1,39	1,22	1,25	0,99
13 RVV	0,85	0,95	0,93	0,94	0,94	0,98	1,11
3 MTV	1,07	0,99	1,12	1,12	1,07	1,06	1,17

$RQ = V_{\text{CO}_2}/V_{\text{O}_2}$
 V_{CO_2} ($\mu\text{l CO}_2/10^7$ buniek)
 V_{O_2} ($\mu\text{l O}_2/10^7$ buniek)

respiračných koeficientov RQ (uvoľnený oxid uhličitý / spotrebovaný kyslík) počas dvojhodinového sledovania dýchacej a fermentačnej aktivity 10 izolátov a 7 porovnávacích kmeňov vinných kvasiniek.

Z hľadiska zámeru našej experimentálnej práce sme hľadali také kmene kvasiniek, ktoré by boli najvhodnejšie pre účely výroby šumivého vína. Domnievame sa, že takýto kmeň by mal mať vyššiu hodnotu RQ (mal by menej dýchať a viac produkovať CO_2). Z takto vysloveného kritéria by potom mohlo vyplývať, že najvhodnejším kmeňom pre potreby sekundárnej technológie by mohol byť kmeň *S. cerevisiae* 2C, ktorý v priebehu 120 minútového sledovania dosiahol hodnoty RQ v rozmedzí 2,57 až 5,60. V technológii šumivých vín bežne používaný kmeň *S. cerevisiae* Bratislava 1 dosahoval v priebehu sledovania respirácie hodnotu RQ v rozmedzí 1,38 až 1,68. Kmeň *S. cerevisiae* 6C, v predchádzajúcej časti charakterizovaný ako kmeň s najvýraznejšími alkoholerezistentnými vlastnosťami, dosiahol počas pozorovania rozpätie $RQ = 1,61 - 2,46$.

Poukázať na vhodnosť určitého kmeňa pre danú technológiu na základe vyhodnotenia navrhnutého kritéria sa zdá byť predsa len odvážne. Vyhodnotenia sú navyše sťažené i v tom smere, že máme k dispozícii len výsledky niekoľkých meraní. Vyhodnotenie respirácie kvasiniek prispieva však vhodným spôsobom do obrazu celkovej charakterizácie biochemických a fyziologických vlastností izolovaných kmeňov vinných kvasiniek.

Tabuľka 2 prináša údaje o zmenách kyslosti v cukorných roztokoch fermentovaných jednotlivými kmeňmi kvasiniek pri 28 °C. Acidifikačné vlastnosti izolovaných a porovnávacích kmeňov vinných kvasiniek sa vyhodnocovali na základe porovnávania rozdielov kyslosti: ΔpH_5 , ΔpH_S a ΔpH_{20} , pričom:

$$\begin{aligned}\Delta \text{pH}_5 &= \text{pH}_0 - \text{pH}_5 \\ \Delta \text{pH}_S &= \text{pH}_5 - \text{pH}_{20} \\ \Delta \text{pH}_{20} &= \Delta \text{pH}_5 + \Delta \text{pH}_S\end{aligned}$$

Tabuľka 2. Zmeny pH pri sledovaní acidifikačných vlastností izolovaných vinných kvasiniek

Kmeň <i>S. cerevisiae</i>	ΔpH_5	ΔpH_S	ΔpH_{20}
1 B	0,16	0,81	0,97
2 A	0,05	1,33	1,38
2 C	0,11	1,09	1,20
3 A	0,13	1,04	1,17
3 B	0,04	0,86	0,90
6 A	0,05	0,86	0,91
6 C	0,08	0,94	1,02
11 A	0,04	1,11	1,15
11 B	0,01	1,10	1,11
11 C	0,04	1,03	1,07
74 F	0,17	0,73	0,90
76 D	0,20	0,80	1,00
Bratislava 1	0,14	1,00	1,14
FV 1	0,15	1,40	1,55
FV 2	0,15	1,31	1,46
13 RVV	0,26	1,37	1,63
3 MTV	0,06	1,43	1,49

ΔpH_5 = zmena pH po 5 minútach inkubácie
 ΔpH_S = zmena pH v intervale od 5 do 20 minút
 ΔpH_{20} = zmena pH po 20 minútach inkubácie

Zmeny pH jednotlivých kmeňov vinných kvasiniek po 5 minútach pozorovania sú malé (rozmedzie $\Delta \text{pH}_5 = 0,01 - 0,26$) a z hľadiska posúdenia acidifikačných vlastností nevýznamné. Pre vyhodnotenie týchto vlastností je významnejšie určenie hodnoty zmeny po ďalších 15 minútach pozorovania (ΔpH_S). Tieto hodnoty majú rozpätie zmien pH 0,73—1,43. Najvýraznejšiu hodnotu ΔpH_S zaznamenal kmeň *S. cerevisiae* 3 MTV, najvyšší pokles kyslosti charakterizuje kmeň *S. cerevisiae* Tokaj 74 F. Najväčší celkový pokles extracelulárneho pH v priebehu 20-minútového sledovania dosiahol kmeň *S. cerevisiae* 13 RVV ($\Delta \text{pH}_{20} = 1,63$), najmenší kmeň *S. cerevisiae* Tokaj 74 F ($\Delta \text{pH}_{20} = 0,90$). Kmeň *S. cerevisiae* 6 C, ktorý dosahoval z hľadiska zámeru využitia najoptimálnejšie technologické vlastnosti, dosahoval priemerné acidifikačné vlastnosti ($\Delta \text{pH}_S = 0,94$, $\Delta \text{pH}_{20} = 1,02$).

Predpokladáme, že veľkosť poklesu pH je priamo úmerná metabolickému aktivitám testovaného kmeňa vinných kvasiniek. Nie je však pravidlom (a to sa potvrdzuje), že kmeň najlepších acidifikačných vlastností dosahuje i najlepšie technologické vlastnosti [7]. Na základe výsledkov sledovania acidifikačných vlastností nemôžeme tak vyvodit' jednoznačné závery o charakteristike sledovaných kmeňov kvasiniek. Acidifikačná metóda posudzuje jedinou vlastnosť kmeňa — rýchlosť naštartovania bunkového metabolismu. Jej výhodou je časová nenáročnosť a jednoduchosť. V spojení s výsledkami ďalších fyziologicko-biochemických a technologických vlastností môžu však acidifikačné vlastnosti doplnit' komplexnú charakteristiku pozorovaných kmeňov vinných kvasiniek.

3.3 ZÁVER

Výsledky sledovania respiračných a acidifikačných vlastností nám nedovoľujú vysloviť jednoznačné závery o charakteristike sledovaných kmeňov kvasiniek. Prispievajú však ku komplexnej charakterizácii biotechnologických vlastností kvasiniek izolovaných z juhomoravskej vinohradníckej oblasti pre potreby sekundárnej fermentácie vína.

Literatúra

- [1] MALÍK, F., VOLLEK, V., HRONČEK, J., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 141.
- [2] MALÍK, F., HRONČEK, J., VOLLEK, V., MORVAYOVÁ, E.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 236.
- [3] EDELENYI, M.: Borászati mikrobiológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest 1978.
- [4] MICHALČÁKOVÁ, S.: Transport a utilizácia monosacharidov kvasinkami [diplomová práca]. Chemickotechnologická fakulta SVŠT Bratislava 1984.
- [5] OPEKAROVÁ, M., SIGLER, K.: Folia microbiol. 27, 1982, s. 395.
- [6] VRANÁ, D. et al.: Kvasinky ve výzkumu a praxi. Academia Praha 1986.
- [7] MALÍK, F., MICHALČÁKOVÁ, S., MINÁRIK, E.: Die Wein-Wissenschaft 42, 1987, s. 65.

Lektoroval doc. Ing. Erich Minárik, DrSc.

Malík, F. - Michalčáková, S. - Šmogrovičová, D. - Morvayová, E. - Kukaňová, A.: Biotechnologické vlastnosti kvasiniek izolovaných pre potreby sekundárnej fermentácie vína. 3. časť. Biochemické vlastnosti izolovaných vinných kvasiniek. Kvas. prům., 35, 1989, č. 11, s. 325—327.

Sledovali a vyhodnocovali sa vybrané biochemické vlastnosti 17 technologicky významných kmeňov vinných kvasiniek. Pri hodnotení respiračných vlastností konštatujeme, že najvyššie hodnoty RQ dosahoval náš izolát *S. cerevisiae* 2 C. Uspokojivé respiračné vlastnosti charakterizuje i nami izolovaný alkoholrezistentný kmeň *S. cerevisiae* 6 C. Sledovanie acidifikačných vlastností poukazuje na metabolickú aktivitu inokulovaných kmeňov. Najvýraznejšie zmeny pH v zmesi glukózy a fruktózy dosiahol po 20 minútach sledovania porovnávaci kmeň *S. cerevisiae* 13 RVV ($\Delta pH_{20} = 1,63$). Sledovanie respiračných a acidifikačných vlastností je príspevkom k poznaniu biotechnologických vlastností kvasiniek izolovaných na princípe autoselektie z juhomoravskej vinohradníckej oblasti.

Малик, Ф. - Михалчакова, С. - Шмогровицова, Д. - Морвайова, Е. - Куканева, А.: Биотехнологические свойства дрожжей, изолированных для потребностей вторичной

ферментации вина. 3. часть. Биохимические свойства изолированных винных дрожжей. Квас. прум., 35, 1989, № 11, стр. 325—327.

Исследовались и оценивались избранные биотехнологические свойства 17 технически значительных штаммов винных дрожжей. При оценке респирационных свойств констатируется, что высшие величины RQ достигал наш изолят *S. cerevisiae* 2C. Удовлетворительные респирационные свойства характеризуют и нами изолированный алкогольрезистентный штамм *S. cerevisiae* 6C. Исследование подкислительных свойств указывает на метаболическую активность инокулей отдельных штаммов. Наиболее выразительные изменения pH в смеси глюкозы и фруктозы достиг в течение 20 мин сопоставляемый штамм *S. cerevisiae* 13 RV ($pH_{20} = 1,63$). Исследование дыхательных и подкислительных свойств представляет собой вклад в познание биотехнологических свойств дрожжей, изолированных на принципе автоселекции из виноградной области Южной Моравии.

Malík, F. - Michalčáková, S. - Šmogrovičová, D. - Morvayová, E. - Kukaňová, A.: Biotechnologic Properties of Yeasts Isolated for Secondary Fermentation of Wine. Part III. Biochemical Properties of Isolated Wine-Making Yeasts. Kvas. prům., 35, 1989, No. 11, pp. 325—327.

Significant biochemical properties of 17 production strains of wine-making yeasts were observed and evaluated. From the standpoint of respiratory properties the highest RQ value was achieved with our strain *S. cerevisiae* 2C. Satisfactory results have also been obtained with the alcohol resistant strain *S. cerevisiae* 6C being isolated by authors. The metabolic activity of inoculating material of the individual strains is detected by acidification properties. The highest change of pH in the mixture of glucose and fructose was achieved with the comparative strain *S. cerevisiae* 13 RVV after 20 min ($\Delta pH_{20} = 1.63$). The results of respiration and acidification measurements give better characteristics of biotechnologic properties of yeasts isolated from the South Moravia viticulture region.

Malík, F. - Michalčáková, S. - Šmogrovičová, D. - Morvayová, E. - Kukaňová, A.: Biotechnologische Eigenschaften der für die Zwecke der sekundären Weinfermentation isolierten Hefen. 3. Teil: Biochemische Eigenschaften isolierter Weinhefen. Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 11, S. 325—327.

Es wurden ausgewählte biochemische Eigenschaften von 17 technologisch bedeutenden Weinhefestämmen verfolgt und ausgewertet. Die Auswertung der Respirationseigenschaften zeigte, daß der höchste RQ-Wert bei dem Isolat *S. cerevisiae* 2C erreicht wurde. Befriedigende Respirationseigenschaften wies auch der von den Autoren isolierte alkoholresistente Stamm *S. cerevisiae* 6 C auf. Die Verfolgung der Azidifikationseigenschaften erwies die metabolische Aktivität der Einsätze der einzelnen Stämme. Die markantesten Änderungen des pH in dem Glukose-Fruktose-Gemisch wurden nach 20 Minuten Verfolgung bei dem Vergleichsstamm *S. cerevisiae* 13 RVV ($\Delta pH_{20} = 1,63$) erreicht. Das Studium der Respiration- und Azidifikationseigenschaften stellt einen Beitrag zur Erkenntnis der biotechnologischen Eigenschaften der Hefen dar, die nach dem Autoselektionsprinzip aus der südmährischen Weinbaugebiet isoliert wurden.