

ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII – KONTAMINANT ZAHUSTENÉHO HROZNOVÉHO MUŠTU

Doc. Ing. FEDOR MALÍK, CSc., RNDr. VALTER VOLLEK,
Chemickotechnologická fakulta STU, Bratislava
Ing. JURAJ SATKO, Výskumný ústav potravinársky, Modra

Kľúčové slová : zahustený hroznový mušt, kontaminácia, osmotolerantné kvasinky, *Zygosaccharomyces rouxii*

1. ÚVOD

Osmotický potenciál cukrového roztoku, akým je aj hroznový mušt, pôsobí na kvasinkové bunky, ktoré sú prítomné v mušte [1, 2]. Kvasinkám sa totiž čiastočne odníma voda a nasávací sila je o to väčšia, čím je koncentrácia cukru vyššia. Keďže kvasenie, rozmnožovanie a všetky ostatné metabolické procesy predstavujú enzýmové reakcie, ktoré sa uskutočňujú iba vo vodných roztokoch, proces odoberania vody z buniek musí nevyhnutne spôsobiť zabrzdenie týchto reakcií a teda spomaliť až zastaviť životné funkcie buniek.

Všeobecne možno povedať, že rozmnožovanie a fermentácia kvasiniek pri obsahu cukru nad 30 % hm. sa rapídne znižuje [1, 2]. Je to pochopiteľné, pretože pri týchto koncentráciách sa popri nepriaznivo vysokom osmotickom tlaku prejavuje aj inhibičný vplyv tvoriaceho sa alkoholu a iných metabolitov. Gervais a kol. [3, 4] sledovali vplyv kinetiky nárastu osmotického tlaku na viabilitu kmeňa *S. cerevisiae*. Po prudkom hyperosmotickom strese (zvýšenie tlaku o 125 MPa) zahynuli všetky bunky. Naopak, ak osmotický tlak narastal pomaly, bunky sa adaptovali na zmenu prostredia a prežilo až 85 % populácie.

Osmotolerancia buniek kvasiniek závisí od ich aktuálneho fyziologického stavu [5]. Rast a fermentačná aktivita *S. cerevisiae* v hroznovom mušte s vyššou koncentráciou cukrov sa môže stimulovať aeráciou [6]. Bunka si vytvorí zásobu sterolov a kyseliny olejovej, ktoré predstavujú faktory prežitia kvasiniek v nepriaznivých podmienkach [7].

Osmotolerancia sa vyskytuje predovšetkým pri kvasinkách rodu *Saccharomyces* a *Zygosaccharomyces* [8]. Väčšina osmotolerantných druhov, napr. *S. bailii*, *S. elegans*, *S. italicus*, *Z. rouxii*, je prítomná v koncentrovaných šťavách a zahustených muštoch popri *Candida stellata*. Rastú v horných vrstvách cukorných roztokov. Koncentrát odoberá vlhkosť zo vzduchu, tým sa tieto miesta zriedujú a bunky kvasiniek môžu ľahšie prijímať substrát.

Zvláštnosťou týchto druhov je fruktofilia, t.j. prednostné skvasovanie fruktózy pred glukózou v zmesi oboch hexóz [8]. Osmotolerantné kvasinky patria nielen medzi škodcov zahustených ovocných a hroznových štiav, ale vo zvýšenej miere sa vyskytujú aj v hotových fľašových vínach a na zariadeniach fľašovacích liniek. Väčšinou sú chemorezistentné a vykazujú toleranciu proti niektorým konzervačným prostriedkom používaným v potravinárskom a nápojárskom priemysle.

Cieľom práce bolo izolovať a taxonomicky identifikovať osmotolerantný kmeň kvasiniek, kontaminujúci zahustený hroznový mušt. Ďalšia charakterizácia izolátu spočívala v určení základných morfológických a vybraných biochemických vlastností (acidifikačná sila, respiračná aktivita). Komplexnú charakteristiku tohto kmeňa dotvárajú výsledky testov v podmienkach primárnej a sekundárnej fermentácie muštu a vína.

2. METODICKÁ ČASŤ

2.1. Použitie mikroorganizmy

Zo zahusteného hroznového muštu z Malokarpatského vinárskeho podniku a.s., Pezinok, sa izoloval Kochovou zriedovacou metódou kontaminujúci kmeň kvasiniek, ktorý bol predmetom ďalších štúdií [9].

Pre objektívne hodnotenie výsledkov testov biochemických a technologických vlastností izolátu sa použili tieto porovnávacie kmene:

– *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 76D – osmotolerantný kmeň vínnych kvasiniek zo Zbierky kvasiniek KVÚVV v Bratislave (Minárik).

– *Saccharomyces cerevisiae* KE 227 – alkoholotolerantný a chemirezistentný kmeň (Kertészeti Egyetem, Budapest).

– *Saccharomyces cerevisiae* FV3, FV5 – osmotolerantné a hlbokoprekvasujúce kmene izolované z dokvasajúcich vín a sedimentov kvasničnej biomasy z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti (Malík, Vollek, ChTF STU Bratislava).

– *Saccharomyces cerevisiae* 13 RVV/d – osmotolerantný, hlbokoprekvasujúci kmeň (Vojteková, MVP a.s., Pezinok).

– *Saccharomyces cerevisiae* 6C – alkoholerezistentný a hlbokoprekvasujúci kmeň, izolovaný z vín Juhomoravskej vinohradníckej oblasti (Malík, Vollek, ChTF STU, Bratislava).

2.2. Použitie média

Zahustený hroznový mušt pochádzal z Malokarpatského vinárskeho podniku a.s., Pezinok (redukujúce cukry 55 g.l⁻¹, celkové kyseliny 7,5 g.l⁻¹, celkový SO₂ 51,2 mg.l⁻¹, voľný SO₂ 2,6 mg.l⁻¹).

Pre potreby sekundárnych fermentácií sa ako živné médium použilo odrodové víno Rizling rýnsky zo Školského majetku SVOŠ v Modre (redukujúce cukry 8,5 g.l⁻¹, celkový SO₂ 64,0 mg.l⁻¹, voľný SO₂ 23,7 mg.l⁻¹, celkové kyseliny 7,5 g.l⁻¹, alkohol 11,6 % obj.).

Zloženie ďalších médií, roztokov a reagencií používaných pri charakterizácii kmeňa je bližšie popísané v prácach [10, 11, 12].

2.3. Metódy sledovania morfológických, biochemických a technologických vlastností

Tolerancia kvasiniek proti etanolu sa zisťovala na sladínovom agare (SIA) s etanolom o celkovej koncentrácii 15, 18, resp. 20 % obj.

Identifikácia izolovaného kmeňa predstavovala rad štandardných morfológických a fyziologických testov [10, 13] realizovaných za špecifických kultivačných podmienok:

– tvorba pseudomycélia (kukuričný agar, 27 °C, 6 dní)

– sporulácia (Fowellovo médium, Nierenbergovej agar, kukuričný agar, 27 °C, 6 dní)

– tvorba chlamydospór (chlamydospórový agar, 27 °C, 14 dní)

– spôsob vegetatívneho rozmnožovania (kvasnično-glukózové médium, 27 °C, 24 hodín)

– hodnotenie rastu kvasiniek v sladínovom médiu (27 °C, 14 dní) a na sladínovom agare (27 °C, 28 dní; 5 °C, 35 dní alebo 37 °C, 7 dní)

– fermentatívna utilizácia sacharidov (C-kvapalné médium, 27 °C, 14 dní)

– oxidatívna utilizácia uhlíkatých (C-agarové médium, 27 °C, 14 dní) a dusíkatých zlúčenín (N-agarové médium, 27 °C, 14 dní)

Metabolizmus buniek testovaného kmeňa charakterizujeme výsledkami sledovania acidifikačnej sily, t.j. pokles pH po 20 minútach kultivácie kultúry kvasiniek v glukózo-vo-fruktózovom roztoku (celková koncentrácia 10 % hm., pomer sacharidov 1:1), a respiračnej aktivity v prostredí s rôznou koncentráciou glukózy (0, 30, 40, 50 % hm.) [11].

Záverčná fáza charakterizácie izolovaného kontaminantu zahusteného hroznového muštu spočívala v zisťovaní technologických vlastností testovaného i porovnávacích kmeňov kvasiniek v procese fermentácie muštu a vína [12]. K sledovaniu primárnej fermentácie sa použil zahustený hroznový mušt, ktorý bol vopred upravený [redukujúce cukry 210 g.l⁻¹, pH 3,5, (NH₄)₂HPO₄ 1,5 g.l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1,5 g.l⁻¹ a po sterilizácii (20 min, 0,12 MPa) sa pridal pantotenan vápenatý 0,05 g.l⁻¹ a biotín 0,02 g.l⁻¹]. Pre sekundárnu fermentáciu vína sa vo vine sacharózou upravil obsah redukujúcich cukrov na 24,0 g.l⁻¹.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Izolovaný kmeň kvasiniek preukázal veľmi slabé etanolotolerantné vlastnosti a nebol schopný rásť ani v prostredí obsahujúcom 15 % obj. etanolu.

Výsledky morfológickej a fyziologickej charakterizácie sú zhrnuté v tab. 1 Bunky

Tab. 1 Morfologické a fyziologické vlastnosti izolovaného kmeňa kvasiniek *Zygosaccharomyces rouxii*

Sledovaný taxonomický znak	Výsledok pozorovania
pseudomycélium (kukuričný agar)	rudimentárne
sporulácia (Fowellovo médium, Niernbergovej agar, kukuričný agar)	negatívna
chlamydospóry (chlamydospórový agar)	netvorí
vegetatívne rozmnožovanie (kvasnično-glukózové médium)	holoblastické pučanie 1, 2, ojedinele 3 puky
rast v kvapalnom médiu (sladinové médium)	práškovitý sediment absencia kože, prstenca
makrokolónia (sladinový agar)	krémová farba, mäkká, smotanová konzistencia, typ S, okrúhly tvar, ucelený okraj
rast pri 5 °C (sladinový agar)	pozitívny
rast pri 37 °C (sladinový agar)	negatívny
fermentácia sacharidov (C- médium)	glukóza, maltóza
oxidatívna utilizácia C- a N-zlúčenín (C- a N-agar)	glukóza, galaktóza, maltóza, trehalóza, ribitol, manitol, glucitol, peptón

majú oválny tvar a vegetatívne sa rozmnožujú holoblastickým pučaním. Na materskej bunke sa súčasne vytvárajú jeden, dva alebo ojedinele až tri dcérske bunky. Po 6 dňoch kultivácie na kukuričnom agare sa podarilo indukovať tvorbu rudimentárneho pseudomycélia. Avšak na chlamydospórovom agare bunky vôbec nevytvárajú chlamydospóry. Podobne, aj pri sledovaní sporulačnej aktivity na kukuričnom a Nierenbergovej agare alebo vo Fowellovom roztoku sme zaznamenali negatívne výsledky. Testovaný kmeň tvorí na sladinovej pôde makrokolónie krémovej farby, mäkkej, smotanovej konzistencie, morfológieho typu S (smooth – hladký), okrúhleho tvaru s uceleným okrajom. Rast v kvapalnom sladinovom médiu možno charakterizovať tvorbou práškoviťého až zrnitého sedimentu s absenciou prstenca alebo kože na povrchu média. Bunky tohto kmeňa sú schopné sa rozmnožovať pri 5 °C, naopak pri teplote 37 °C sa nepozoroval žiadny rast. Z tohto dôvodu testované kvasinky možno považovať za fakultatívne psychrofilné.

Izolát zo zahusteného hroznového muštu fermentatívne utilizoval z pomedzi 12 testovaných sacharidov iba glukózu a veľmi pomaly aj maltózu. Pri oxidatívnej utilizácii sady 21 uhlikatých a 3 dusíkatých zlúčenín sa pozoroval pozitívny výsledok iba pri testovaní glukózy, galaktózy, maltózy, trehalózy, ribitolu, manitolu, glucitolu a peptónu.

Na základe výsledkov fermentatívnej a oxidatívnej utilizácie, mikroskopických a kultivačných charakteristík sa zaradil kmeň kontaminujúci zahustený hroznový mušt k druhu *Zygosaccharomyces rouxii*. Dosiahnuté výsledky sú v zhode s informáciami publikovanými v monografii Kreger van Rij [13] (mimoriadne osmotolerantný druh s veľmi slabou sporulačnou aktivitou,

fermentujúci úzku paletu sacharidov, nerastúci pri teplote 37 °C).

Acidifikačné vlastnosti izolovaného kontaminantu a porovnávacích kmeňov *S. cerevisiae* 6C a 13 RVV sa vyhodnocovali na základe porovnávania rozdielov kyslosti: ΔpH_5 , ΔpH_{15} a ΔpH_{20} (tab. 2). Bunky *Z. rouxii* naštartovali svoj metabolizmus približne rovnako rýchlo ($\Delta pH_5 = 0,45$) ako porovnávacie osmo- a etanoltolerantné kmene ($\Delta pH_5 = 0,41$ a $0,44$). Avšak v priebehu ďalších 15 minút metabolická aktivita izolátu rapidne poklesla ($\Delta pH_5 = 0,13$) a acidifikačná sila, vyjadrujúca zmenu pH suspenzie po 20 min inkubácie, dosiahla hodnotu iba 0,58. Tieto výsledky poukazujú na nevýrazné acidifikačné schopnosti buniek *Z. rouxii* v porovnaní s bunkami *S. cerevisiae* 6C ($\Delta pH_{20} = 1,11$) alebo *S. cerevisiae* 13 RVV ($\Delta pH_{20} = 1,31$). Predpokladá sa, že veľkosť poklesu pH je priamoúmerná meta-

bolickej aktivite kmeňa kvasiniek. Nie je však pravidlom, že kmeň najlepších acidifikačných vlastností dosahuje i najlepšie technologické vlastnosti.

Meranie respiračnej aktivity kvasiniek prebiehalo s cieľom zistiť množstvo vnútrobunkových zásob a schopnosť adaptácie buniek na prostredie s vyššou koncentráciou glukózy, čo sa odrazí aj v rýchlosti rozmnožovania a priebehu samotnej fermentácie (tab. 2). Počas merania endogénnej respirácie najmenej kyslíka spotrebovala populácia kmeňa *Z. rouxii* ($Q_{O_2} = 3,17 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Hodnota Q_{O_2} charakterizuje množstvo endogénnych zásob a tým aj pripravenosť bunky prežiť v prostredí chudobnom na živiny. Najlepšiu rezervu substrátu na metabolizmus si vytvorili bunky kmeňa *S. cerevisiae* 13 RVV ($Q_{O_2} = 22,15 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$).

V druhej fáze sa sledovala závislosť spotreby kyslíka bunkami od koncentrácie glukózy v suspenzii kvasiniek (tab. 2). V koncentračnom rozsahu 30 až 50 % hm. glukózy hodnota Q_{O_2} všetkých kmeňov lineárne klesala (korelačný koeficient $R = 0,97 - 0,99$) s rastúcim množstvom sacharidu v prostredí. Zároveň sa zmenšil rozptyl hodnôt spotrebovaného kyslíka a pri koncentrácii glukózy 50 % hm. kolísala v hraniciach 1,97 až $3,56 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Pokles spotreby kyslíka pri kmeňoch 6C a 13 RVV je približne rovnaký (smernica sa pohybuje v rozmedzí -0,32 až -0,29), zatiaľ čo pri kmeni *Z. rouxii* sa s rastúcou koncentráciou glukózy rapidne znížila hodnota Q_{O_2} (smernica -0,73). Kontaminant zahusteného hroznového muštu spotreboval pri 30 a 40 % hm. glukózy oveľa viac a pri 50 % hm. glukózy približne rovnaké množstvo kyslíka ako porovnávacie kmene 6C a 13 RVV, čím preukázal mimoriadne dobré osmotolerantné vlastnosti.

Tabuľka 3 prináša výsledky a vyhodnotenie sledovania primárnej a sekundárnej fermentácie muštu a vína. Produkt získaný primárnou fermentáciou kvasinkami *Z. rouxii* obsahoval pomerne veľké množstvo zvyškového cukru ($32,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) a nižší obsah alko-

Tab. 2 Acidifikačné vlastnosti a respiračná aktivita kmeňov kvasiniek

Sledované parametre	Testované kmene		
	<i>Z. rouxii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6C	13 RVV
Q_{O_2} [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	3,17	12,10	22,15
$Q_{O_2}^{30\%}$ [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	17,55	7,80	10,05
$Q_{O_2}^{40\%}$ [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	8,11	3,65	6,06
$Q_{O_2}^{50\%}$ [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹]	2,82	1,97	3,56
úsek	38,95	16,13	19,54
smernica	-0,73	-0,29	-0,32
ΔpH_5	0,45	0,41	0,44
ΔpH_{15}	0,13	0,70	0,87
ΔpH_{20}	0,58	1,11	1,31

Legenda:

- Q_{O_2} – spotreba kyslíka pri endogénnej respirácii
- $Q_{O_2}^{30\%}$ – spotreba kyslíka pri 30 % hm. glukózy
- $Q_{O_2}^{40\%}$ – spotreba kyslíka pri 40 % hm. glukózy
- $Q_{O_2}^{50\%}$ – spotreba kyslíka pri 50 % hm. glukózy
- ΔpH_5 – zmena pH po 5 minútach inkubácie
- ΔpH_{15} – zmena pH v intervale od 5 do 20 minút
- ΔpH_{20} – zmena pH po 20 minútach inkubácie, t.j. acidifikačná sila

Tab. 3 Charakteristiky produktov primárnej (hroznový mušt, $S_0 = 210 \text{ g.l}^{-1}$, $X_0 = 5.10^6 \text{ buniek.ml}^{-1}$, 34 dní) a sekundárnej fermentácie (vino, $S_0 = 24,0 \text{ g.l}^{-1}$, $X_0 = 1,5.10^7 \text{ buniek.ml}^{-1}$, $P_0 = 11,6 \text{ %obj.}$, 30 dní)

Kmeň	Red. cukry [g.l ⁻¹]	Alkohol [% obj.]	Výťažkové koeficienty	
			$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$ [10 ⁻³]
primárna fermentácia				
Z. rouxii	32,9	10,0	0,45	0,36
KE 227	2,5	12,6	0,49	1,36
76 D	2,5	12,5	0,48	1,87
sekundárna fermentácia				
Z. rouxii	1,0	12,9	0,46	1,37
FV 3	0,9	12,8	0,42	10,90
FV 5	0,8	12,9	0,46	10,41

holu (10,0 % obj.) v porovnaní s kmeňmi *S.cerevisiae* KE 227 a 76 D (zvýškový cukor 2,5 g.l⁻¹, alkohol 12,5 – 12,6 % obj.). Rovnako i výťažkové koeficienty premeny substrátu na etanol $Y_{P/S}$ a biomasu $Y_{X/S}$ sa výrazne líšili: pri testovanom kmeni ($Y_{P/S} = 0,45$, $Y_{X/S} = 0,36.10^{-3}$) a porovnávacích kmeňoch ($Y_{P/S}$ 0,48 a 0,49, $Y_{X/S}$ 1,36.10⁻³ a 1,87.10⁻³). Pri sekundárnej fermentácii všetky 3 kmene produkovali „šumivé“ vína približne rovnakej kvality (redukujúce cukry 0,8 – 1,0 g.l⁻¹, alkohol 12,8 – 12,9 % obj.). Výťažkový koeficient $Y_{P/S}$ sa pohyboval v rozmedzí 0,42 až 0,46. Porovnávacie kmene *S.cerevisiae* FV 3 a FV 5 efektívnejšie využívali substrát k tvorbe biomasy ($Y_{X/S} = 1,04.10^{-2}$ – $1,09.10^{-2}$) ako kultúra *Z.rouxii* ($Y_{X/S} = 1,37.10^{-3}$).

3. ZÁVER

Zo zahusteného hroznového muštu sa izoloval kontaminujúci kmeň kvasiniek, ktorý bol na základe štandardných taxonomických kritérií zaradený k druhu *Zygosaccharomyces rouxii*. Významnou vlastnosťou tohto kmeňa (i celého druhu) je absencia rastu pri teplote 37 °C. Bunky tejto kultúry veľmi dobre reagovali na hyperosmotický stres vyvolaný zvýšenou koncentráciou glukózy v prostredí a dýchali intenzívnejšie ako referenčné osmotolerantné kmene *S.cerevisiae* 13 RVV a 6 C.

V kontraste s týmto javom výsledky testov acidifikácie a endogénnej respirácie poukazujú na nevýrazné metabolické aktivity kontaminanta. Aplikáciou izolovanej populácie kvasiniek v procese kvasenia muštu i vína sa pozorovalo neefektívne využívanie poskytovaného substrátu pri tvorbe biomasy a výsledný produkt primárnej fermentácie nedosahoval požadovanú kvalitu.

Izolovaný kmeň *Z.rouxii* nemá praktický význam pre vinárstvo ako „ušľachtilá“ kultúra, ale poznaním jeho vlastností možno v budúcnosti zabrániť kontaminácii akýchkoľvek koncentrovaných ovocných štiav.

LITERATÚRA

- [1] MINÁRIK, E., NAVARA, A.: Chémia a mikrobiológia vína. Bratislava, Príroda 1986.

- [2] DITTRICH, H.H.: Mikrobiologie des Weines. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer 1976.
- [3] GERVAIS, P., MARECHAL, P.A., MOLIN, P.: Biotechnol. Bioeng., **40**, 1992, s. 1435.
- [4] GERVAIS, P., MARECHAL, P.A.: J. Food Eng., **22**, 1994, s. 399.
- [5] BLOMBERG, A., LARSSON, C., GUSTAFSSON, L.: J. Bacteriol. **170**, 1988, s. 4562.
- [6] MAURICIO, J.C., GUIJO, S., ORTEGA, J.M.: Am. J. Enol. Vitic., **42**, 1991, s. 301.
- [7] LAFON-LAFOURCADE, S., LARUE, F., RIBERAU-GAYON, P.: VI. International Specialized Symposium on Yeast. Montpellier, Francúzsko, 1978.
- [8] MINÁRIK, E., BACHOVÁ, E.: Kvas. prům., **26**, 1980, s. 206.
- [9] BETINA, V.: Mikrobiologické laboratorné metódy. Bratislava, ALFA, 1987.
- [10] MALÍK, F., SATKO, J., VOLLEK, V.: Mitt. Klosterneuburg **46**, 1996 (v tlači).
- [11] MALÍK, F., SATKO, J., VOLLEK, V.: Mitt. Klosterneuburg **46**, 1996 (v tlači).
- [12] SATKO, J., MALÍK, F., VOLLEK, V.: Vinohrad **34**, 1996 (v tlači).
- [13] KREGER-van RIJ, N.J.W.: The yeast. A taxonomic study. 3.ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1984.

Lektorovala Ing. Ida Hollerová
Do redakcie došlo 20. 9. 1996