

IZOLÁCIA A IDENTIFIKÁCIA TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÝCH VÍNNYCH KVASINIEK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* RADU FV SAT

FEDOR MALÍK, JURAJ SATKO¹⁾, VALTER VOLLEK
Chemickotechnologická fakulta STU, 812 37 Bratislava

¹⁾Výskumný ústav potravinársky, 900 01 Modra

Kľúčové slová: vínne kvasinky, osmotolerancia, alkoholrezistencia, izolácia kvasiniek

1. ÚVOD

Znalosť kvasinkovej flóry viniča hrozno-rodého nie je dôležitá iba z ekologického hľadiska, ale je zákonite využiteľná aj v procese výroby vína. Kvantitatívne a kvalitatívne zastúpenie kvasiniek vplyva na priebeh kvasenia a tak výraznou mierou ovplyvňuje „tvár“ budúceho produktu.

Ucelený obraz o ekológii vinných kvasiniek v Československu vypracoval Minárik [1]. Kvasinky izolované z prírodných a druhotných stanovišť zaradil do 6 sporogénnych (*Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Saccharomycodes*) a 3 asporogénnych rodov (*Torulopsis*, *Candida*, *Kloeckera*).

Štúdium následnosti jednotlivých zástupcov mikroflóry počas spontánneho kvasenia muštu ukázalo, že zastúpenie asporogénnych druhov kvasiniek klesá od maxima na začiatku kvasenia na minimum pred ukončením fermentácie [2]. Opačný trend vykazujú sporogénne druhy. Súvisí to so zhoršením fermentačných podmienok vo víne (alkohol, vysoká hladina voľného a celkového SO₂) pre menej odolné druhy. Medzi mikroflórou bielych a modrých odrôd viniča nie je kvalitatívny, ale iba výrazný kvantitatívny rozdiel. Podiel asporogénnych druhov kvasiniek v muštoch modrých odrôd je o 25 % vyšší ako v muštoch bielych odrôd [3].

Vojteková [4] sledovala v rokoch 1979-1981 zastúpenie kvasiniek v mikroflóre hrozna, muštu a mladých vín z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti. Autorka konštatovala, že každá vinohradnícka oblasť má charakteristické zastúpenie kmeňov v kvasinkovej flóre primárnych i sekundárnych stanovišť, pričom karyotypy dominujúcich kvasiniek spontánnej fermentácie sa výrazne nemenia. K podobným výsledkom ekologických štúdií dospeli i ďalší autori [5, 6].

Pri spontánnej fermentácii muštu sa rozmnožujú prakticky všetky prítomné mikro-

organizmy, ktoré sa s hroznom dostanú do muštu. Baktérie, mikroskopické huby a divé kvasinky môžu nielen nepriaznivo ovplyvniť aktivitu vinných kvasiniek, ale produkty ich metabolizmu niekedy ovplyvňujú nepriaznivo aj vôňu a chuť, teda celkový charakter vína. Živeľnosť priebehu spontánnej fermentácie treba z týchto dôvodov nahradiť cieľavedomým, kontrolovateľným kvasením čistou, zmiešanou alebo združenou kultúrou vinných kvasiniek. Tak ako je zloženie mikroflóry ovplyvnené klimatickými podmienkami a lokalitou, je vhodné z hľadiska súčasných trendov vinárskej filozofie pri aplikácii týchto zákvasov použiť kmene selektované v oblasti, pre ktorú sú určené [7].

Čisté kultúry vinných kvasiniek, cielene izolované na základe spoznania ich fyziologických, biochemických a technologických vlastností, najviac vyhovujú náročným podmienkam fermentácie muštu. Schopnosť kvasiniek tolerovať vyššie koncentrácie alkoholu je mimoriadne významná vlastnosť, ktorá zabezpečuje prekvasenia muštov v primárnej fermentácii ako aj vín vo fermentácii sekundárnej.

Etanolová tolerancia kvasiniek je kontrolovaná geneticky, pomocou veľkého počtu génov, ktoré v prítomnosti etanolu limitujú proliferáciu buniek [8]. Mechanizmus účinku alkoholu na bunku kvasinky je veľmi zložitý a doteraz, napriek niekoľkoročným štúdiám, ostáva kontroverznou oblasťou. Množstvo faktorov, ako napríklad teplota, pH, osmotický tlak média, koncentrácia extracelulárneho a intracelulárneho etanolu, zloženie cytoplazmatickej membrány a tvorba vedľajších produktov, vplyvajú na etanolovú toleranciu kvasiniek [9,10].

Schopnosť kvasiniek produkovať vyššie hladiny alkoholu (13 – 15 % obj.) býva združená s osmotoleranciou. Osmotický potenciál cukorného roztoku pôsobí utlmujúco na

rozmnožovanie i metabolizmus kvasinkovej bunky. Kvasinkám sa totiž čiastočne odníma voda. Nasávací sila je o to vyššia, 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 spomaľovanie až zastavenie životných funkcií bunky. Osmotolerancia je komplexne ovplyvnená viacerými faktormi: koncentrácia etanolu, kinetika nárastu osmotického tlaku, teplota, prítomnosť stimulujúcich faktorov [11,12].

Práca nadväzuje na naše predchádzajúce výskumné aktivity, zamerané na izoláciu a selekciu kmeňov vinných kvasiniek s vhodnými technologickými vlastnosťami. Tentoraz sa pozornosť venovala charakterizácii izolátov z muštov a vín Malokarpatskej vinohradníckej oblasti s výraznou etanolovou a osmotickou toleranciou.

2. MATERIÁL A METÓDY

2.1 Použité média

V priebehu izolácie a charakterizácie kvasiniek sme používali tieto kultivačné pôdy: agar so sladidlovým extraktom (IMUNA a. s., Slovensko), sladidlové médium, kvasničnoglukózové médium (YD médium), Fowellovo médium, kukuričný agar (OXOID Ltd., Veľká Británia), Nierenbergovej agar (KH₂PO₄ 1 g/l, KNO₃ 1 g/l, MgSO₄ 0,5 g/l, KCl 0,5 g/l, glukóza 0,2 g/l, sacharóza 0,2 g/l, agar 20 g/l), chlamydospórový agar, médium na dôkaz skvasovania sacharidov, C-pôda, resp. N-pôda na asimiláciu zdrojov uhlíka, resp. dusíka kvasinkami [13,14].

Pre potreby izolácie vinných kvasiniek sa použili dokvášajúce odrodové vína ročníka 1994 z Malokarpatského vinárskeho podniku a.s., Pezinok.

2.2 Metódy izolácie, identifikácie a klasifikácie kvasiniek

Z mladých vín sa v MVP a.s., Pezinok izolovalo Kochovou zriedovacou metódou niekoľko kmeňov čistých kultúr kvasiniek [13]. Na základe morfológických znakov a spôsobu rastu v sterilnom hroznovom mušte bolo vybratých 15 kmeňov patriacich do rodu *Saccharomyces*. Po pomnožení v sterilnom mušte sa kultúra preočkovala na šikmý sladínový agar a po 72 h kultivácii pri teplote 27–30 °C sa udržiavala v tme pri 4 °C.

Schopnosť kvasiniek rásť pri vyšších koncentráciách glukózy sa sledovala na pevnej sladínovej pôde obsahujúcej 30, 40, resp. 50 % hmot. glukózy. Podobným spôsobom sa zisťovala aj tolerancia voči etanolu (celková koncentrácia etanolu v pôde 15, 18, resp. 20 % obj.). Kultivácia prebiehala v ter-

utilizácia sacharidov a oxidatívna utilizácia uhľíkatých a dusíkatých zlúčenín, ktorá sa zisťovala za štandardných podmienok, popísaných v monografii Lodderovej [14].

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo vzoriek vín získané čisté kultúry vínnych kvasiniek sa podrobili selekčnému účinku etanolu a vyšších koncentrácií glukózy. Získalo sa tak 15 osmotolerantných a alkoholrezi- stentných kmeňov vínnych kvasiniek, izolovaných zo 7 od- rodových vín štyroch lokalít (tab. 1).

Po 6 dňoch kultivácie na médiu obsahujúcom 30 a 40 %

hmot. glukózy rástli všetky testované kmene vínnych kvasiniek. Pri 50 % hmot. glukózy sa už pre- javil vplyv osmotického tlaku a úplne sa zastavil rast 10 kme- ňov. Naopak, kmene s označením FV SAT1, FV SAT2, FV SAT3, FV SAT4 a FV SAT5 rástli i keď s menšou intenzitou v porovnaní s výsledkami testu pri 30 a 40 % hmot. glukózy. Zvyšovaním kon- centrácie etanolu v médiu (15, 18 a 20 % obj.) sa sprisňovali pod- mienky pre selekciu alkoholrezi- stentných kmeňov kvasiniek. Nakoniec, 20 % obj. etanolu tole-

rovali iba tri kmene (pracovné označenie FV SAT2, FV SAT3, FV SAT5).

Týchto 5 čistých kultúr s mi- moriadnou osmotoleranciou, z pomedzi ktorých boli 3 kul- túry zároveň aj etanoltole- rantné, sa stali predmetom ďal- ších experimentov. Prvoradý cieľ spočíval v druhovom zade- lení týchto izolátov na základe zistených charakteristík.

Všetky charakterizované kmene majú rovnaký spôsob vegetatívneho rozmnožovania, holoblastické multilaterálne pučanie, ktoré je typické pre vi- aceré rody vínnych kvasiniek. Pri kmeňoch FV SAT1, FV SAT2, FV SAT4 sa nepodarilo ani po 6 dňoch kultivácie na ku- kuričnom agare indukovať tvorbu pseudomycélia, zatiaľčo ostatné kmene preukázali po- zitívny výsledok. Chlamy- dospóry netvorí ani jeden testovaný kmeň kvasiniek. Sporulačnú aktivitu vykazovali všetky kmene. Vytvárali najmä dvoj- alebo štvorsporové asky s lineárnym, resp. romboédric- kým usporiadaním spór. Všetky makrokolónie mali krémovú farbu, mäkkú, smotanovú konzistenciu a patrili do morfolo-

Tab. 2 Fermentatívna utilizácia sacharidov testovanými kmeňmi kvasiniek

Sledované sacharidy	Kmeň testovaných kvasiniek				
	FV SAT1	FV SAT2	FV SAT3	FV SAT4	FV SAT5
glukóza	+	+	+	+	+
galaktóza	–	–	–	–	+
sacharóza	+	+	+	+	+
maltóza	+	+	+	+	+
laktóza	–	–	–	–	–
rafinóza	+	+	+	+	+
trehalóza	–	–	–	–	+ p
celobióza	–	–	–	–	–
melibióza	–	–	–	–	–
melezitóza	–	–	–	–	–
inulín	–	–	–	–	–
škrob	–	–	–	–	–

Legenda : p = pomalá fermentácia
+ = pozitívna reakcia
– = negatívna reakcia

gického typu S (Smooth). V ďalších charak- teristikách (pruhovalie, okraj, tvar, profil, veľkosť) sa jednotlivé kolónie kvasiniek lí- šili nepatrne. Po 48 h kultivácii v kvapalnom sladínovom médiu kvasinky vytvorili mi- erny zákal a po 14 dňoch sa na dne skúmavky vytvoril práškovitý až zrnitý sediment. Ani jeden zo sledovaných kmeňov netvoril na povrchu média prstenec alebo kožku.

Dôležitou vlastnosťou vínnych kvasiniek je schopnosť rásť pri nižších teplotách. Po 35 dňovej kultivácii pri 5 °C kmeň FV SAT1 vytvoril na tuhej sladínovej pôde oveľa men- šiu kolóniu (priemer 3 mm) ako ostatné tes- tované kmene, ktorých priemer kolónii sa pohyboval v rozmedzí 6–7 mm. Rovnako pri teplote 37 °C najlepšie rástli kmene FV

Tab. 1 Kmene kvasiniek izolované z mladých vín roč- níka 1994 z MVP a. s., Pezinok

Odrodové vína	Lokalita	Pracovné označenie izolovaných kmeňov
Rizling vlašský	Pezinok	FV SAT1, P3
Veltlínske zelené	Trnava	T1, T2, FV SAT4
Svätovavrinecké	Modra	M6
Svätovavrinecké	Trnava	T4
Frankovka modrá	Trnava	FV SAT2
Cabernet Sauvignon	Modra	FV SAT3, M2, M3
Cabernet Sauvignon	Hlohovec	H1, H2, FV SAT5, H5

mostate 6 dní pri 27 °C. Využitím selekč- ného účinku vyššieho osmotického tlaku alebo etanolu sa získali osmotolerantné a etanolrezi- stentné izoláty kvasiniek, ktoré boli predmetom taxonomickej identifikácie a ich ďalšej charakterizácie.

Druhové zadelenie čistých kultúr prebie- halo na základe určenia morfológických a biochemických vlastností kmeňov vínnych kvasiniek bežnými pracovnými metódami [13,14].

Tvar buniek a spôsob vegetatívneho roz- množovania sa sledoval mikroskopicky po 1 dňovej kultivácii pri 27 °C v kvapalnom kvasnično-glukózovom médiu. Tvorba pseudomycélia sa stimulovala na kukurič- nom agare. Za účelom potvrdenia výsledku sa na indukciu sporulácie kvasiniek zvolilo niekoľko spórotvorných pôd: kvapalnú Fo- wellovo médium, Nierenbergove agar, ku- kuričný agar. Tvorba chlamydospór sa zis- ťovala na chlamydospórovom agare. Vo všetkých predchádzajúcich prípadoch kul- tivácia prebiehala 6 dní pri 27 °C a výsledok sa vyhodnotil mikroskopicky. Na tuhej sla- dínovej pôde sa po 28 dňoch rastu pri 27 °C charakterizovala morfológia makro- kolónii. Toto živné médium sa použilo aj k sledovaniu rýchlosti tvorby kolónii tes- tovaných kmeňov pri extrémnych teplotách (5 a 37 °C). Rast v kvapalnej sladine pri 27 °C prebiehal 14 dní a vyhodnotil sa vi- zuálne. Hlavným diagnostickým znakom testovaných kvasiniek bola fermentatívna

Tab. 3 Oxidatívna utilizácia uhľíkatých a dusíkatých lá- tok testovanými kmeňmi kvasiniek

Sledované uhľíkaté a dusíkaté zdroje	Kmeň testovaných kvasiniek				
	FV SAT1	FV SAT2	FV SAT3	FV SAT4	FV SAT5
glukóza	+	+	+	+	+
galaktóza	–	–	–	–	+
sacharóza	+	+	+	+	+
maltóza	+	+	+	+	+
laktóza	–	–	–	–	–
rafinóza	+	+	+	+	+
trehalóza	+ p	+ p	+ p	+ p	+
celobióza	–	–	–	–	–
melibióza	–	–	–	–	–
melezitóza	–	–	–	–	–
sorbóza	–	–	–	–	–
ribóza	–	–	–	–	–
ramnóza	–	–	–	–	–
ribitol	–	–	–	–	–
galaktitol	–	–	–	–	–
manitol	–	–	–	–	–
glucitol	–	–	–	–	–
salicin	–	–	–	–	–
L-arabínóza	–	–	–	–	–
D-arabínóza	–	–	–	–	–
xylóza	–	–	–	–	–
peptón	+	+	+	+	+
KNO ₃	–	–	–	–	–
močovina	–	–	–	–	–

Legenda : + = pozitívna reakcia
– = negatívna reakcia
p = pomalá oxidácia substrátu

SAT3 a FV SAT5 (priemer kolónie 7 až 8 mm), zatiaľčo pri kmeňoch FV SAT1, FV SAT2 a FV SAT4 sa pozorovali kolónie s priemerom 3 až 5 mm. Na základe získaných výsledkov možno považovať testované kvasinky za mezofilné až fakultatívne psychrofilné.

Charakterizácia a diagnostické znaky testovaných kmeňov kvasiniek, ktoré sme získali pri vyhodnotení morfológie buniek a kolónií, tvorby pseudomycélia a chlamydospór, spôsobu pučania a tvorby spór, rastu v kvapalnom médiu, využitiu uhľikových a dusíkatých zdrojov, nám dovoľuje zaradiť kvasinky, izolované z vína do rodu *Saccharomyces* (tab. 2 a 3). Na základe získaných diagnostických znakov sme kmene kvasiniek druhovo diferencovali. Kmene s pracovným označením FV SAT1, FV SAT2, FV SAT3, resp. FV SAT4 patria k druhu *Saccharomyces cerevisiae* fyziologická rasa *bayanus*. Kmeň s označením FV SAT5 preukázal typické črty druhu *Saccharomyces cerevisiae* fyziologická rasa *cerevisiae*.

4. ZÁVER

Z dokvšajúcich odrodových vín ročníka 1994, ktoré pochádzali z Malokarpatskej vinohradníckej oblasti, sa izolovali kmene technologicky významných kvasiniek. Na základe výsledkov testu rezistencie voči vyššiemu osmotickému tlaku a etanolu sa z pomiedzi izolátov získalo 5 kmeňov s mimoriadnymi osmo- a etanoltolerantnými vlastnosťami. Kultúry kvasiniek, izolované z vín, sa zaradili k taxonomickému druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Možno ich charakterizovať ako mezofilné až fakultatívne psychrofilné kvasinky, netvoriace kožu na povrchu kvapalného média, s fermentatívnou i oxidatívnou využitím uhľikových a dusíkatých látok charakteristických pre tento druh.

5. LITERATÚRA

- [1] MINÁRIK, E.: Vinohrad, **17**, 1979, s. 90.
- [2] TINI, V., CARIDI, A., ROMANO, P.: Industrie delle Bevande, **19**, 1990, s. 24.
- [3] AMERINE, M. A., KUNKEE, R. E.: Ann. Rev. Microbiol., **22**, 1968, s. 323.

- [4] VOJTEKOVÁ, G.: Vinohrad, **21**, 1983, s. 15.
- [5] DITTRICH, H.H. Mikrobiologie des Weines. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart 1976.
- [6] FREZIER, V., DUBOURDIEU, D.: Am. J. Enol. Viticult., **43**, 1992, s. 375.
- [7] MALÍK, F.: Lebensmittelindustrie, **35**, 1988, s. 180.
- [8] MIKLOS, I., SIPICZKI, M.: Zentr. Mikrobiol., **145**, 1990, s. 344.
- [9] CASEY, G. P., INGLEDEW, W. M.: CRC Crit. Rev. Microbiol., **13**, 1986, s. 219.
- [10] UDEN, N. van: Ann. Rep. Ferment. Processes, **8**, 1985, s. 11.
- [11] GERVAIS, P., MARECHAL, P. A.: J. Food Eng., **22**, 1994, s. 399.
- [12] BLOMBERG, A., LARSSON, C., GUSTAFSSON, L.: J. Bacteriol., **170**, 1988, s. 4562.
- [13] BETINA, V.: Mikrobiologické laboratorné metódy. ALFA, Bratislava 1987.
- [14] LODDER, J.: The yeasts. A taxonomic study. 2. ed. North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London 1970.

Lektorovala ing. Ida Hollerová
Do redakcie došlo 20. 1. 1997