

Zloženie kvasničnej flóry hroznových muštov

ERICH MINÁRIK, Výskumný ústav pre vinohradníctvo a vinárstvo, Bratislava

663.12/14

I keď sa používanie čistých kultúr vínnych kvasiniek vo vinárstve čoraz viac rozširuje, najmä vo veľkovejrobe, v mnohých závodoch a v malovýrobných podmienkach obzvlášť ešte prevláda spontánne kvasenie hroznových muštov. Ak odhliadneme od šírenia muštov vyraďujúceho časť menej odolných apikulátových kvasiniek, a od odkalovania, znižujúceho všeobecne počet kvasničných buniek, vplýva človek len málo na zloženie kvasničnej flóry muštov pri samovoľnom kvasení. Pôvodná mikroflóra hrozien je výsledkom prispôbovania rôznym ekologickým podmienkam. Táto flóra je veľmi rozmanitá a pri spontánnom kvasení sa vo veľkej miere zúčastňuje kvasného procesu a podieľa tak aj na vytváraní organoleptických vlastností vín. Z týchto dôvodov je veľmi dôležité poznať zastúpenie a výskyt najdôležitejších skupín kvasiniek na hroznách a v muštoch v priebehu kvasenia.

Materiál a metodika

V rámci rozsiahlejšieho štúdia mikroflóry viniča v ČSSR sa v r. 1958 až 1959 skúmala kvasničná flóra hrozien a muštov v malokarpatskej vinohradníckej oblasti v okolí Bratislavy. V dobe zberu hrozna sa odobralo 21 vzoriek hrozna a muštov tečúcich od lisov, z vinohradov a lisovní Bratislavy, Karlovej Vsi, Rače, Vajnora a Sv. Jura, predvážne z JRD a Vinárskych závodov.

Reprezentačné vzorky boli odobrané za aseptických podmienok, pričom sa dbalo na to, aby sa vzorkovali iba nesírené a čistou kultúrou nezakvasované mušty. Hrozná sa napred ručne lisovali a potom sa spracovali obdobne ako mušty. V každom prípade sa odoberalo, resp. vylisovalo asi 500 ml muštu do kvasných baniek.

Časť muštu sa spracovala ihneď, najneskôr do 24 hodín, Kochovou zriedovacou metódou. Z dvoch vhodných zriedení vo fyziologickom roztoku sa pripravili 2 Petriho misky so sladinkovou želatínou.

Osvedčilo sa pridávať do pôdy 0,25 % propionanu sodného k potlačeniu vzrastu plesní [1]. Misky sa inkubovali niekoľko dní pri teplote miestnosti. Vyrástle dobre diferencované kolónie kvasiniek sa po predbežnom makroskopickom vyšetrení oddeľovali zo želatíny platinovým očkom alebo malým prúžkom sterilného filtračného papiera, ktorými sa preniesli do sterilného muštu vo Freudenreichových bankách. Po 3 až 4 dňoch sa rozmnožené kvasinky preočkovali na šikmý sladinkový agar, ktorý sa po rozrástnutí kultúr zalieval sterilným parafínovým olejom. Pred ďalším vyšetrením sa kvasinky vždy občerstvovali z agaru pasážami cez hroznový mušt.

Väčšia zbývajúca časť muštu sa inkubovala pri 25 °C. Po 5 až 6 dňoch a po 30 dňoch sa izolácia kvasiniek opakovala obdobným spôsobom. Tým sa zabezpečila izolácia a podchytenie kvasiniek aktívne vystupujúcich v rôznych fázach kvasenia: pred kvasením, vo fázi búrlivého kvasenia a pri dokvášaní. Priemerne sa z jednej vzorky muštu izolovalo 10 kmeňov. Mnohé kvasničné kmene sa prečistovali ešte raz buď Kochovou zriedovacou metódou alebo pomocou monosporickeho izolátora [2].

Jednotlivé kmene boli podrobené identifikačným skúškam podľa metód, ktoré uvádzajú v systematikách kvasiniek *Lodderová* a *Kreger van Rijová* [3], *Lodderová*, *Slooffová* a *Kreger van Rijová* [4], *Kudriavcev* [5], *Wickerham* [6] a *Kocková-Kratochvílová* [7]. Najdôležitejšie testy asimilačnej a kvasnej schopnosti kvasiniek sa zhodnocovali chromatografickou metódou na papieri [8, 9, 10, 11].

Výsledky a ich zhodnotenie

Vyššie uvedeným spôsobom bolo z 21 vzoriek hrozien a muštov izolovaných 222 kmeňov kvasiniek. Na základe podrobných identifikačných skúšok morfológických, fyziologických a biochemických vlastností boli kvasinky klasifikované do 2

Tabuľka 1
Zastúpenie a výskyt kvasiniek v muštach z okolia Bratislavy

Druh	Počet kmeňov	Na 1 000 izolov. kmeňov pripadá	Nájdenné v počte muštov	Výskyt v % muštov
Spórogenné kvasinky	192	364,8	21	100
<i>Saccharomyces vini</i>	153	689,1	21	100
<i>Saccharomyces oviformis</i>	2	9,0	2	9,5
<i>Saccharomyces bayanus</i>	4	18,0	3	14,2
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	3	13,5	3	14,2
<i>Saccharomyces uvarum</i>	10	45,0	5	23,8
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	3	13,5	3	14,2
<i>Saccharomyces fructuum</i>	1	4,5	1	4,7
<i>Saccharomyces exiguus</i>	1	4,5	1	4,7
<i>Saccharomyces steineri</i>	1	4,5	1	4,7
<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	1	4,5	1	4,7
<i>Saccharomyces veronae</i>	3	13,5	3	14,2
<i>Torulaspora rosei</i>	10	45,0	4	19,0
Aspórogenné kvasinky	30	135,1	15,0	71,4
<i>Torulopsis stellata</i>	2	9,0	2	9,5
<i>Candida pulcherrima</i>	9	40,5	5	23,8
<i>Kloeckera apiculata</i>	19	85,5	12	57,1

spórogenných rodov (*Saccharomyces*, *Torulaspora*) a do 3 aspórogenných rodov (*Torulopsis*, *Candida*, *Kloeckera*). Dovedna sa našlo 15 druhov kvasiniek, z toho 11 druhov rodu *Saccharomyces* a po jednom z ostatných rodov. Percentuálne zastúpenie a výskyt jednotlivých druhov v muštach vidieť z tabuľky 1.

Ako z tejto tabuľky vysvitá, boli *Sacch. vini* so 153 kmeňmi (68,9 % všetkých izolovaných kvasiniek) a *Kl. apiculata* (8,5 % všetkých kvasiniek) najpočetnejšie zastúpené. Prvé sa našli vo všetkých muštach (100 % výskyt), posledné v 57,1 % muštov. Oba druhy tvoria tak dominantný podiel zastúpených kvasiniek v muštach. Z ostatných druhov sú dôležitejšie ešte *Sacch. uvarum* a *T. rosei* tvoriace 4,5 % a *C. pulcherrima* 4 % všetkých nájdených kvasiniek. Ostatné druhy sa v muštach vyskytovali iba sporadicky a v nepatrnom zastúpení, z čoho možno súdiť, že pri kvasení majú len malý význam. Výnimkou sú len *Sacch. oviformis*, ktoré sú dôležitými dokvášajúcimi kvasinkami (12, 13).

V jednotlivých vzorkách muštov sa našli priemerne 3 druhy, ojedinele až 7 druhov kvasiniek. Z tohoto vidieť pestrosť palety zastúpených kvasiniek.

Sledujúc zastúpenie a výskyt jednotlivých druhov v rôznych fázach kvasenia muštov (tabuľka 2) vidieť, že kvasenie zahajujú nielen *Kl. apiculata*, ako sa všeobecne uvádza, ale aj *C. pulcherrima*. Na aktivitu týchto kvasinkovitých mikroorganizmov nadväzujú vždy *Sacch. vini*, prípadne aj iné druhy. Ukázalo sa, že v rôznych fázach kvasenia muštu sa pomer medzi zastúpením spórogenných a aspórogenných kvasiniek mení. Pritom sa všeobecne konštatovalo, že na začiatku kvasenia je zastúpenie aspórogenných kvasiniek najvyššie. V priebehu fermentácie počet aspórogenných kvasiniek rýchle klesá k minimu pri dokvasení. Prechodná úloha aspórogenných kvasiniek ako iniciátorov alkoholického kvasenia muštov je z tohoto zrejme. Silná redukcia počtu aspórogenných kvasiniek v priebehu kvasenia súvisí zrejme s prirodzenou selekciou vplyvom alkoholu, ktorý sa v prostredí vytvára, ako aj vplyvom ostatných metabolitov kvasenia.

Kl. apiculata a *C. pulcherrima* sú slabými producentami alkoholu, ako vidieť z tabuľky 3. Je zrejme, že najhlbšie skvasujú mušty sacharomycety,

najmä *Sacch. vini*, ktoré spolu so *Sacch. oviformis* tvoria podstatnú časť mikroflóry mladých vín (12, 13). Maximálna produkcia alkoholu u *Sacch. vini* činila v tejto časti oblasti 15 obj.%. Prekvasovacia schopnosť *C. pulcherrima* je minimálna (1 až 2 %), u *Kl. apiculata* mierne vyššia (2 až 4 % alkoholu). Kvasnú aktivitu uvedených troch druhov vidieť z grafu na obr. 1.

Vzhľadom na podstatne vyšší nález *C. pulcherrima* a *Kl. apiculata* v iných, najmä severnejších častiach malokarpatskej vinohradníckej oblasti (14), možno prvým kvasinkám pripísať dôležitú úlohu „štartéra“ kvasenia v prvých hodinách, druhým v prvých dňoch spontánnej fermentácie hroznových muštov. Pre malú odolnosť voči alkoholu a voči priemernej koncentrácii cukru býva kvasenie muštov, v ktorých prevládajú *C. pulcherrima*, dosť ležérne a pozvoľné, na rozdiel od muštov, v ktorých zpočiatku prevládajú *Kl. apiculata*, ktorých produktivita i virulencia, ako bolo vidieť, je 2 až 3krát vyššia, dôsledkom čoho býva aj rozkvasenie muštov urýchlené a zvyčajne po 48 hodinách pre-

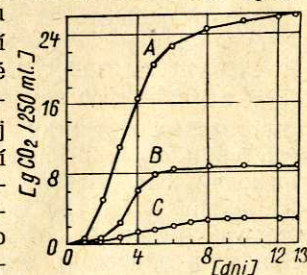
Tabuľka 2

Zastúpenie jednotlivých druhov kvasiniek v priebehu kvasenia muštov

Druh kvasiniek	Pred kvasením %	Búrlivé kvasenie (5.-8. deň) %	Do-kvasenie (30. deň) %
Spórogenné kvasinky	71,0	95,2	96,0
<i>Saccharomyces vini</i>	45,6	77,8	86,9
<i>Saccharomyces oviformis</i>	1,2	1,6	—
<i>Saccharomyces bayanus</i>	1,2	4,7	—
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	1,2	3,2	—
<i>Saccharomyces uvarum</i>	3,6	6,3	3,9
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	2,4	—	1,3
<i>Saccharomyces fructuum</i>	—	—	1,3
<i>Saccharomyces exiguus</i>	1,2	—	—
<i>Saccharomyces steineri</i>	—	1,6	—
<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	—	—	1,3
<i>Saccharomyces veronae</i>	3,6	—	—
<i>Torulaspora rosei</i>	10,8	—	1,3
Aspórogenné kvasinky	29,0	4,7	3,9
<i>Torulopsis stellata</i>	1,2	1,6	—
<i>Candida pulcherrima</i>	7,2	3,2	1,3
<i>Kloeckera apiculata</i>	20,5	—	2,6

chádza v búrlivé kvasenie. Ako sa ukázalo v priebehu ďalších prác (15), je zastúpenie aspórogenných kvasiniek v severnejšej časti oblasti vyššie ako v južnejšej. Ukázalo sa, že *C. pulcherrima* máva stanovišťa častejšie na modrých hroznách ako na bielych. Vysoký výskyt a zastúpenie *C. pulcherrima* sa zaznamenal najmä v okolí Horných Orešian, známych odrodou Portugalské modré, ktorá tu je značnejšie rozšírená. Vzhľadom na nízku prekvasovaciu schopnosť *C. pulcherrima* a *Kl. apiculata*, možno pre vinársku

veľkovýrobu pri kvasení muštov odporučiť čisté kultúry vínnych kvasiniek. Platí to vo zvýšenej miere pri nakvasovaní modrých hrozných (kvasenie na mláte) a v nepriaznivých ročníkoch so silne redukovaným počtom kvasničných buniek na hroznových bobuliach, ktoré bývajú často značne kontaminované najmä plesňami.



Obr. 1. Priebeh kvasenia muštu kvasinkami *Sacch. vini* (A), *Kloeckera apiculata* (B) a *Candida pulcherrima* (C)

Hĺbka prekvasenia muštov rôznymi druhmi kvasiniek

Tabuľka 3

Druh	0—	1—	2—	3—	4—	5—	6—	7—	8—	9—	10—	11—	12—	13—	14—	15—	Celkove kmeňov
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
obj. % alkoholu																	
S. vini										2	20	44	53	32	2		153
S. oviformis												1	1				2
S. bayanus									1	4		3	1				4
S. pastorianus							1	1	1								3
S. uvarum						1	1	2		2							10
S. carlsbergensis												1	1			1	3
S. fructuum																	1
S. exiguus					1												1
S. steineri													1				1
S. heterogenicus													1				1
S. veronae																	3
T. rosei						2	3	4	1								10
T. stellata							1			1							2
C. pulcherrima		9															9
Kl. apiculata		1	10	8													19
S p o l u		10	10	8	1	3	6	10	7	5	20	49	58	32	3		222

Souhrn

Spontánne kvasenie malokarpatských muštov z okolia Bratislavy iniciuje zvyčajne spoločenstvo *Kl. apiculata* a *Candida pulcherrima*. Pre nízku aktivitu aspórogenných kvasiniek sú tieto už po niekoľkých dňoch kvasenia takmer úplne vytlačané produktívnejšími sacharomycetami, hlavne *Saccharomyces vini*, ktoré sú zodpovedné za búrlivé kvasenie a spoločne so *Sacch. oviformis* aj za dokvášanie vín.

Druhovú paletu kvasiniek na hroznách a v muštovoch je veľmi pestrá. Je zložená prevážne zo sacharomycetov. Najsilnejšie sú zastúpené *Saccharomyces vini*, ktoré sa našli vo všetkých skúmaných muštovoch. K dominantným druhom možno počítať aj *Kloeckera apiculata*, *Candida pulcherrima*, *Saccharomyces uvarum* a *Torulaspóra rosei*. Poukazuje sa na minimálnu kvasnú schopnosť *Candida pulcherrima* a nízku kvasnú aktivitu *Kloeckera apiculata*. Pre kvasenie muštov vo veľkovýrobných podmienkach a pre nakvasovanie modrých hrozien

a všeobecne za nepriaznivých kvasných podmienok možno doporučiť používanie čistých kultúr vínnych kvasiniek.

Literatúra

- [1] Lund A.: Ecology of Yeasts. Príspevok v knihe Cook A. H.: The Chemistry and Biology of Yeasts. Acad. Press Inc. Publ. New York 1958.
- [2] Nečásek J., Palečková F., Tesař A.: Preslia 26, 105 (1954).
- [3] Lodder J., Kreger van Rij N. J. W.: The Yeasts, a taxonomic study. North Holland Publ. Comp. Amsterdam 1952.
- [4] Lodder J., Slooff W. Ch., Kreger von Rij N. J. W.: The Classification of Yeasts. Príspevok v knihe Cook A. H.: The Chemistry and Biology of Yeasts. Acad. Press Inc. Publ. New York 1958.
- [5] Kudriavcev V. I.: Sistematika drožžej. Izd. Akad. nauk SSR. Moskva 1954.
- [6] Wickerham L. J.: Taxonomy of Yeasts. U. S. Dep. Agr. Techn. Bull. No. 1029. Washington 1951.
- [7] Kocková-Kratochvílová A.: Kvasinky. SVTL Bratislava 1957.
- [8] Laho L., Minárik E., Navara A.: Biológia 13, 909 (1958).
- [9] Minárik E., Laho L., Navara A.: Biológia 14, 587 (1959).
- [10] Minárik E., Laho L., Navara A.: Kvasný průmysl, 5, 240 (1959).
- [11] Minárik E.: Zur Möglichkeit der Anwendung von Papierchromatographie bei der Identifizierung von Weinhefen, Kiserlet-ügyi közlemények. Mezőgazdasági kiadó Budapest 1960.
- [12] Minárik E.: Biológia 15, 272 (1960).
- [13] Minárik E.: Kvasný průmysl 6, 58 (1960).
- [14] Minárik E.: Štúdium a klasifikácia kvasničnej flóry malokarpatskej vinohradníckej oblasti. Dizertačná práca 1960.
- [15] Minárik E.: Poľnohospodárstvo 7, 1960 (v tlači).

Došlo do redakcie 2. 8. 1960.

**ДРОЖЖЕВАЯ ФЛОРА
ВИНОГРАДНОГО СУСЛА**

**ZUSAMMENSETZUNG
DER HEFEFLORA
IN TRAUBENMOSTEN**

**STRUCTURE OF THE YEAST FLORA
GRAPES AND MUSTS**

Вопросы ферментации сусла винограда из области Малых Карпат подвергаются систематическому изучению. Как на кистях винограда, так и в сусле преобладают дрожжи семейства Saccharomycetes. Из них наиболее часто встречаются Saccharomycetes vini, которые были обнаружены во всех анализированных суслах. К видам присутствующим в значительном количестве можно считать Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima, Saccharomycetes uvarum, Torulaspóra rosei. Самопроизвольное брожение вызывают обыкновенно дрожжи Kloeckera apiculata и Candida pulcherrima, однако позже их вытесняют более жизнедеятельные Saccharomycetes vini, проявляющиеся весьма бурной ферментацией.

В статье подчеркивается весьма незначительная сбраживающая способность дрожжей Candida pulcherrima и Kloeckera apiculata. Для ферментации сусла на крупных винодельческих заводах, для возбуждения процесса ферментации в сусле из красного винограда и вообще для затрудненных условий ферментации следует обязательно применять чистые культуры винных дрожжей.

Die Hefeflora von Trauben und Mosten in dem Weinbaugebiet der Kleinen Karpaten wurde eingehend untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sich diese Flora aus einer bunten Palette von Arten, besonders aber aus Saccharomycetes-Arten zusammensetzt. In allen untersuchten Mosten konnten die Hefen Saccharomycetes vini identifiziert werden, die auch zu den am häufigsten vorkommenden Hefen zählen. Zu den dominanten Hefen der Moste gehören auch Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima, Saccharomycetes uvarum und Torulaspóra rosei.

Die spontane Mostgärung wird durch die Gemeinschaft Kloeckera apiculata — Candida pulcherrima eingeleitet und durch Saccharomycetes vini weitergeführt. Es wird auf die minimale Gärleistung von Kloeckera apiculata und besonders von Candida pulcherrima hingewiesen. Für die Mostgärung im Grossbetrieb, besonders bei der Maischegärung und in ungünstigen Jahrgängen allgemein, ist eine Anwendung von Hefereinkulturen unumgänglich.

The yeast flora from grapes and musts originating in the vine-region of Malé Karpaty, was thoroughly studied. A wide range of species consisting chiefly of Saccharomycetes species was found. In all of the musts examined Saccharomycetes vini was present which belongs to the most widespread yeasts at all. Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima, Saccharomycetes uvarum and Torulaspóra rosei may be also counted to the dominant yeast species of grapes and musts of this region.

The fermentation of must is mostly initiated by the association of Kloeckera apiculata — Candida pulcherrima and carried on by Saccharomycetes vini. The weak resistance towards alcohol and average sugar concentration of Kloeckera apiculata and especially that of Candida pulcherrima is underlined. For these reasons the use of pure yeast cultures for large-scale fermentation in the wineries, especially for the red wine fermentation and generally in unfavourable conditions is advised.