

Využití imobilizovaných kvasinek k výrobě šumivých vín

Ing. BLANKA PARDONOVÁ, Ing. MICHAELA POLEDNÍKOVÁ, Ing. HELENA ŠEDOVÁ, Ing. MIROSLAV KAHLER, CSc., Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Praze

663.25 663.252.4 663.252.41

Klíčová slova: víno, mošt, kvasinky, imobilizované kvasinky, kvašení

Předneseno na 7. konferenci o technologii a hodnocení výrobků nápojového průmyslu, Domažlice, 28.—29. května 1986

V minulém roce jsme zahájili ve spolupráci s pracovny Českých vinařských závodů ve Starém Plzenci zkoušky s imobilizovanými kvasinkami v provozním měřítku. Obdobně jako při poloprovozních zkouškách se použil k imobilizaci přírodní polymer, alginát sodný. Hlavní pozornost se věnovala změnám tvorby některých vedlejších metabolitů, absorpcie volných aminokyselin a morfologickému stavu buněk při diskontinuální výrobě šumivých vín.

Přehled výsledků

Biochemická aktivita vázaných kvasinek je závislá na použité metodě imobilizace a na fyziologickém stavu buňčné populace. Z hlediska zachování dobrého fyziologického stavu během imobilizace je nejšetrnejší metodou zabudování buněk do alginátu vápenatého. Odborná literatura poskytuje bohaté informace o způsobu imobilizace [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Změna prostředí, do kterého jsou kvasinky imobilizovány, působí inhibičně na jejich růst a částečně ovlivňuje některé metabolické pochody. Koncentrace vedlejších metabolitů v šumivých vínách je závislá na složení tirážní směsi, na použití též kmusu kvasinek a na obsahu volných aminokyselin. Převážná část aromatických látek se tvoří činností kvasinek při biochemických reakcích aminokyselin a mastných kyselin. K aromatickým látkám patří vyšší alkoholy, estery, karbonylové sloučeniny a laktony. Hlavním meziproduktem při tvorbě alkoholů jsou 2-ketokyseliny, které vznikají trasaminací příslušných aminokyselin nebo ze sacharidů. Estery se tvoří esterifikací organických kyselin uvnitř buňky přes aktivní acyl-CoA v přítomnosti příslušného alkoholu. Většina esterů ve vínách jsou acetáty, hexanoáty, oktanoáty a dekanáty. Při tvorbě sloučenin obsahujících síru vstupují do reakce Met, Cys a Ser. Z vyšších mastných kyselin vznikají při látkové výměně β-oxidací nižší mastné kyseliny, estery, laktony, hydroxykysely, methylketony a z nenasycených kyselin některé nenasycené aldehydy, např. trans-2-undecenal, trans-2, trans-6-nonadienal a nenasycené aldehydy, např. oktanal, hexanal [8, 9]. Na základě provozních zkoušek při diskontinuální výrobě šumivých vín jsme se pokusili posoudit tvorbu aromatických látek volnými a vázanými kvasinkami. Koncentrační rozdíly volných aminokyselin v pokusných a srovnávacích vínách dokumentují nestejný stupeň jejich absorpcie a biosyntézy.

Výrazné změny byly zaznamenány u Gly, Glu, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Ala a Arg. (tab. 1). Jejich asimilace vyjádřená v procentech je vztažena na výchozí koncentraci v tirážní směsi. Při velmi nízkém obsahu Val a Ile lze předpokládat jejich zvýšenou biosyntézu při kvašení, a proto i zvýšenou tvorbu derivátů pentanolu. Naopak utilizaci Glu, Asp, Lys, His a Gly se podporuje tvorba biomasy, která je u volných kvasinek prokazatelně větší. Hlavní mechanismus produkce aromatických složek buňky probíhá přes kyselinu šikimovou, která vzniká při syntéze Tyr, Phe a Try. Celkové množství volných aminokyselin v pokusných vínách bylo průměrně o 9 % vyšší [10].

Tvorba vyšších alkoholů a vicinálních diketonů úzce souvisí s biosyntézou Val, Leu a Ile. Obsah vyšších alkoholů při sekundární fermentaci se vždy zvyšoval. Výraznější asimilace Leu vázanými kvasinkami se projevila nižší tvorbou 3-methylbutanolu, zatímco volné kvasinky produkovaly tohoto alkoholu více. Celkové množství vyšších alkoholů se zvýšilo v hotových srovnávacích vínách průměrně o 20 %, v pokusných vínách pouze o 7 % [11]. Současná zvýšená asimilace Leu ovlivnila také tvor-

Tabulka 1. Absorpce některých volných aminokyselin volnými a vázanými kvasinkami

Aminokyseliny	Kvasinky (% průměrné hodnoty)	
	volné	vázané
Glu	64,8	39,2
Lys	58,3	39,4
His	80,5	57,6
Arg	1,2	18,5
Gly	83,3	48,7
Ala	27,7	6,9
Leu	30,4	61,2
Phe	42,0	21,7
Tyr	34,2	40,7

bu diacetylu. V pokusných vínách nebyl zaznamenán jeho přírůstek. Pokles celkového množství karbonylových sloučenin byl způsoben snížením koncentrace ethanalu. U pokusných vín dosáhlo uvedené snížení 44 %, u srovnávacích vín 11 % (tab. 2).

Esterы jsou jednou z nejpočetnějších skupin těkavých látek. Jejich vliv na senzorické vlastnosti šumivých vín je podstatný, protože mají výrazný aditivní účinek [12]. Na chut vína působí příznivě ethylester kyseliny hexanové, oktanové, dekanové a 2-fenyloctové. Zvýšení obsahu esterů během fermentace se pohybovalo v pokusných a srovnávacích vzorku mezi 25 až 30 %. Aróma šumivých vín lze hodnotit podle poměru vyšších alkoholů k esterům. Optimální rozsah tohoto poměru je 4,6 + 1 až 3,8 + 1. Při vyšších hodnotách tohoto poměru jsou vina méně aromatická (tab. 3).

Nižší mastné kyseliny se tvoří převážně při kvašení moštů a jejich koncentrace má obvykle při výrobě šumivých vín stoupající tendenci [13]. Analyzovaná vína obsahovala málo kyseliny octové. U volných kvasinek se mírně zvýšil obsah kyseliny isomáselné, isovalerové a dekanové, u vázaných kvasinek obsah kyseliny oktanové a fenyloctové. Celkový přírůstek mastných kyselin byl u pokusných vín 10 %, u srovnávacích vín 20 % (tab. 3).

Zjištěné koncentrační změny těkavých látek v pokusných vínách měly pozitivní vliv na jejich kvalitu. Při degustačních zkouškách označili členové komise vína

Tabulka 2. Vyšší alkoholy a karbonylové látky

Označení sloučenin	mg · l⁻¹		
	Tirážní směs	Srovnávací víno	Pokusné víno
Propanol	stopy	0,19	0,17
2-Methylpropanol	4,1	9,3	7,8
Butanol	0,11	0,18	0,19
2- a 3-Methylbutanol	78,4	98,3	88,7
2-Fenylethanol	17,3	12,2	12,4
Celkové množství vyšších alkoholů	99,9	120,2	107,3
Ethanal	19,2	17,1	10,7
2-Methylpropanal	0,12	0,54	0,16
3-Methylbutanal	0,52	0,53	0,50
2-Hexanal	0,13	0,08	0,09
Heptanal	0,08	0,06	0,24
Diacetyl	0,49	0,62	0,41
2-Butanon	0,08	0,06	0,07
2,3-Pentandion	0,12	0,18	0,11
Acetoin	2,6	1,6	1,9
Celkové množství karbonylových látek	23,3	20,8	14,2

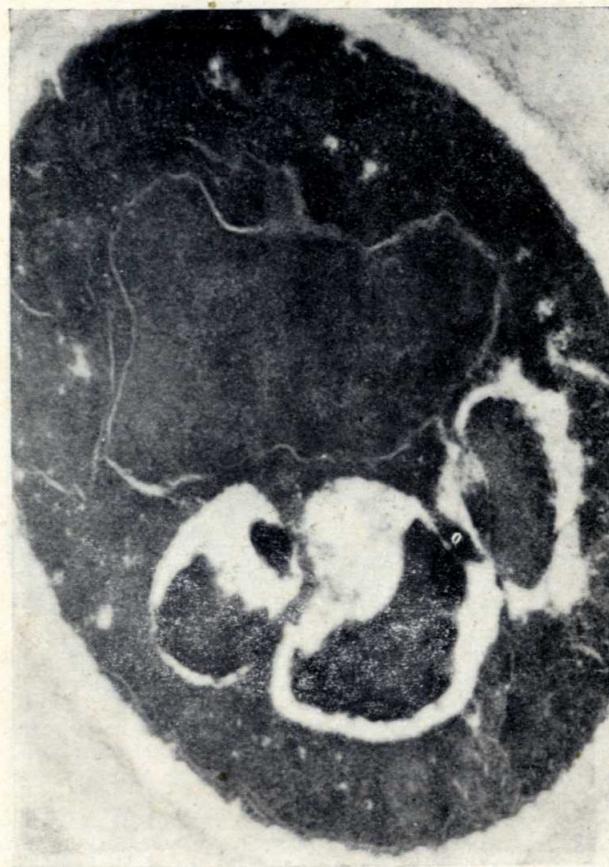
Tabulka 3. Estery a mastné kyseliny

Označení sloučenin	mg . l ⁻¹		
	Tírážní směs	Srovnávací víno	Pokusné víno
Ethylformiát	0,16	0,13	0,04
Ethylacetát	8,5	12,6	10,4
Ethylpropionát	0,09	0,07	0,38
2-Methylpropylacetát	0,28	0,19	0,03
3-Methylbutylacetát	0,62	0,71	0,23
Ethylhexanoát	0,39	0,48	0,37
Ethyliaktát	0,41	0,23	0,85
Hexylacetát	0,11	0,29	0,09
Ethyloktanoát	0,08	0,04	0,37
Ethyldecanoát	0,09	0,02	0,34
2-Fenylethylacetát	0,42	0,14	0,38
Ethyldodecanoát	0,53	0,16	0,49
Ethyltetradecanoát	0,04	0,17	0,63
Celkové množství esterů	11,7	15,2	14,6
Poměr vyšších alkoholů k esterům	8,54+1	7,91+1	7,35+1
Octová kyselina	2,0	2,4	1,5
Propionová kyselina	0,43	0,33	0,12
Isomáselná kyselina	1,0	1,2	0,74
Máselná kyselina	0,19	0,29	0,19
Isovalerová kyselina	1,8	2,8	1,3
Valerová kyselina	0,47	0,18	0,31
Hexanová kyselina	0,72	0,29	0,52
Oktanová kyselina	0,80	1,6	2,9
Dekanová kyselina	0,31	0,42	0,34
Fenylooctová kyselina	0,70	0,63	1,2
Dodekanová kyselina	0,00	0,00	0,09
Celkové množství mastných kyselin	8,4	10,1	9,2

vyrobená vázanými kvasinkami jako vína s harmonickou chutí bez vedlejších příchutí, s jemnou, příjemnou a čistou vůní.

Dosavadní výsledky ukázaly, že aktivita hlavních metabolických procesů zůstala po imobilizaci na stejném úrovni a podle kvasních křivek při různém objemovém množství biokatalyzátoru dosáhla specifická rychlosť úbytku limitujícího substrátu až trojnásobně větších hodnot než za stejných podmínek volné kvasinky. Při dlouhodobém využití biokatalyzátoru klesá postupně aktivita intracelulárních enzymů vlivem změn povrchových struktur vázaných buněk, které vznikají buď trvalým kontaktem s nosičem, nebo nedostatečným příslunem důležitých živných látek. Na základě podkladů získaných rastrovací a transmisní elektronovou mikroskopíí vznikají největší morfologické změny v prvních třech kvasních cyklech po imobilizaci. Na obarvených řezech sledovaných světelným mikroskopem byly kvasinky řidce a celkem pravidelně rozmištěny po celé ploše řezu. Jednotlivé buňky měly buď téměř homogenní protoplast nebo různý stupeň vakuolizace. Vzhled některých buněk připomínal buňky odumřelé. Poměr mezi těmito typy buněk nebyl jednotný. Při hodnocení submikroskopické struktury měly buňky homogenní protoplast, silnou buněčnou stěnu s odloučenými mikrofibrilami na vnějším povrchu. Ribosomy byly málo zřetelné, obvod protoplasmy byl slně zvlněný s hojnými cisternami endoplasmatického retikula. Vakuolizované buňky měly značnou strukturální variabilitu, některé z nich se hodnotily jako autolyzované (obr. 1, 2). Tuto skutečnost lze vysvětlit jako reakci buněk na imobilizaci, kdy nedošlo ještě k plné adaptaci.

Při porovnání řezů tohoto vzorku vázaných kvasinek se vzorkem odebraným po desetiměsíčním provozu světelným mikroskopem byly viditelné mikrokolonie jednotlivých buněk ve společném obalu, poněkud odlišně obarveném. Buňky měly homogenní obsah, některé působily a přibližně 10 % buněk bylo vakuolizovaných. Submikroskopická struktura buněk s homogenním protoplastem byla dosti podobná struktuře buněk ze suspenzní kultury. Podobnost byla zejména v dobré rozlišitelnosti ribosomů, jež indikují intenzitu proteosyntézy. Obvod protoplastu byl pravidelně zvlněný, provázený četnými vesikuly a cisternami endoplasmatického retikula. Chybely však charakteristické velké vakuoly. Buněčná stěna byla tlustá. Tyto buňky hodnocené na submikroskopické úrovni byly již dobře adaptovány na nové prostředí a mohly by se použít i pro další kvašení (obr. 3).



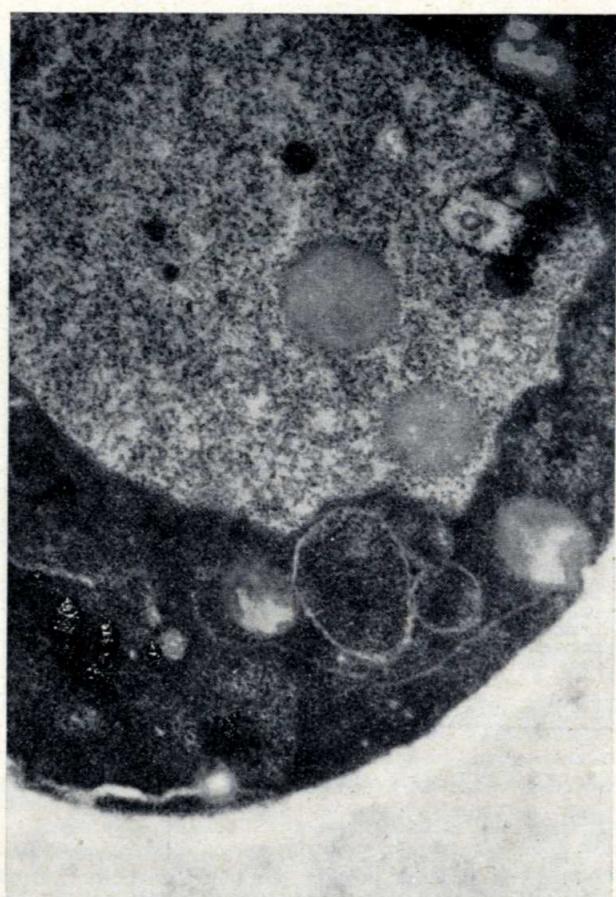
Obr. 1. Vázané kvasinky po 3. kvasném cyklu (zvětšení 3 X 18 800)



Obr. 2. Vázané kvasinky po 3. kvasném cyklu, autolyzovaná buňka (zvětšení 4 X 14 300)



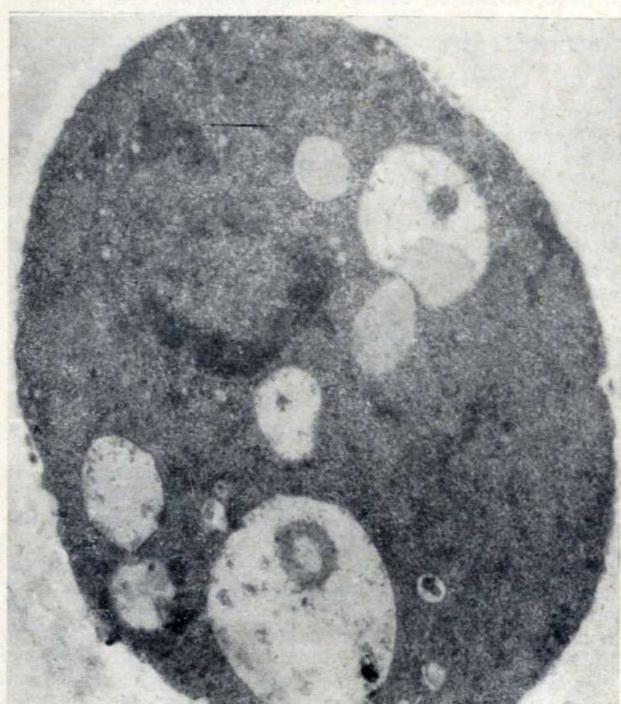
Obr. 3. Vázané kvasinky po desetiměsíčním provozu (zvětšení 4 X 18 800)



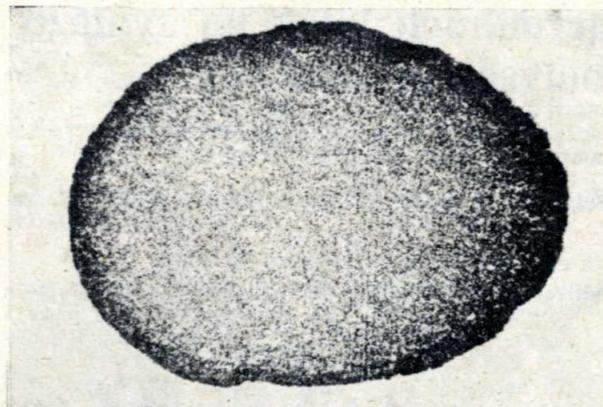
Obr. 4. Vinné kvasinky ze suspenzní kultury (zvětšení 4 X 14 300)

Všechny informace získané transmisní elektronovou mikroskopíí byly porovnány s nálezem kvasinek, jež se odebraly ze suspenzní kultury. Tyto buňky měly relativně tenkou buněčnou stěnu bez struktury. V plazmě byly nápadně vakuoly s jemně granulovaným obsahem, popříp. lipidními krupějemi. Některé drobné vakuoly byly bez strukturového obsahu. Cytoplasma měla dobře diferencované ribosomy. Mitochondrie neměly zřetelné kristy a jejich vnější membrány, stejně jako membrány endoplasmatického retikula, byly elektrontraspakrentní. Plasmalema nebyla zcela zřetelná a obvod protoplastu byl jen nepatrně zvlněný. Všechny buňky měly zhruba stejnou strukturu (obr. 4, 5).

S přihlédnutím k podmínkám sekundární fermentace (vysoký přetlak CO_2 , nízká hladina dusíkatých látek, cukru a nízký obsah rozpuštěného kyslíku) je specifická rychlosť růstu buněk velmi malá. V anaerobním prostředí se rozpuštěný kyslík uplatňuje jako stimulátor biosyntézy sterolů, nenasycených mastných kyselin a růstových faktorů, které mají přímý vztah k růstu buněk. Lze proto předpokládat uvnitř peletek trvalý nedostatek kyslíku a velmi nízké pomnožení kvasinek. Podle mikroskopického sledování řezů peletek se po imobilizaci s přibývajícím počtem opakovacích kvasných cyklů zhušťovaly kvasinky v periferní zóně, zatímco ve vnitřní zóně zůstalo rozptýlení buněk téměř stejné (obr. 6). V gramu vakuově osušených peletek se jejich počet zvýšil po čtyřměsíčním provozu (18 kvasných cyklů) tisíckrát. Uvedený růst neměl viditelný vliv na rozrušení tvaru peletek. V provozních podmínkách stacionárního kvašení se udržela kvasná aktivita biokatalyzátoru 11 měsíců. Po této době se rychlosť kvašení výrazně zhoršila, i když senzorické vlastnosti hotového vína zůstaly nezměněné. V současné době se zahájily provozní zkoušky s imobilizovanými kvasinkami v kontinuálním systému.



Obr. 5. Vinné kvasinky bezprostředně po imobilizaci (zvětšení 3 X 14 300)



Obr. 6. Vázané kvasinky, řez peletkou (zvětšení 185krát)

Pozn.: Mikrofotografie kvasinek zhotovil dr. T. KALINA, CSC, Katedra botaniky nižších rostlin UK

Literatura

- [1] FUKUI S., TANAKA A.: Ann. Rev. Microbiol., **33**, 1982, s. 145
- [2] CHIBATA I., WINGARD L. B.: Appl. Biochem. Bioeng., Vol. 4, Immobilized Microbial Cells, Academic Press, 1983
- [3] GHOSE T. K., BANDYOPADHYAY K. K.: Biotechnol. Bioeng., Vol. XXIV, 1982, s. 797, 805
- [4] KLEIN J. ET AL.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **18**, 1983, s. 88
- [5] TANAKA H., MATSUMARA M., VELIKY I. A.: Biotechnol. Bioeng., Vol. **XXVI**, 1984, s. 53
- [6] KYUNG K. H., GERHARDT P.: Biotechnol. Bioeng., Vol. **XXVI**, 1984, s. 252
- [7] BIRNBAUM S. ET AL.: Biotechnol. Letters., **3**, 1981, č. 8, s. 393
- [8] GARZA - ULLOA H. ET AL.: Brew. Digest, **51**, 1976, č. 4, s. 48
- [9] SCHREIER P. ET AL.: Z. Lebensm. Unters. - Forsch., **154**, 1974, s. 279
- [10] DITTRICH H. H.: Mikrobiologie des Weines, Verlag E. Ulmer, Stuttgart 1977
- [11] HUPP H.: Wein-Eiss, **29**, 1974, s. 1
- [12] PIENDL A., GEIGER E.: Brew. Digest, **55**, 1980, č. 5, s. 26
- [13] DRAWERT F. ET AL.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., **155**, 1974, s. 342

Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Využití imobilizovaných kvasinek k výrobě šumivého vína. Kvas. prům. **32**, 1986, č. 10, s. 232—235.

Při provozních zkouškách se sledovalo zastoupení některých těkavých látek a volných aminokyselin v šumivých vínech, vyrobených diskontinuálním způsobem s vázanými a volnými kvasinkami. Snížená absorce volných aminokyselin vázanými kvasinkami a jejich omezený růst se projevil koncentračními změnami těkavých látek. Pokusná vína obsahovala méně vyšších alkoholů, esterů, mastných kyselin a karbonylových sloučenin, naopak množství volných aminokyselin bylo průměrně o 9 % vyšší. Tyto změny měly kladný vliv na chutové vlastnosti hotových pokusných vín. Při hodnocení morfologického stavu vázaných buněk na submikroskopické úrovni byly zaznamenány největší změny v prvních kvasných cyklech po imobilizaci. Po desetiměsíčním provozu měly vázané buňky submikroskopickou strukturu podobnou buňkám ze suspenzní kultury. Podobnost byla zejména v dobré rozlišitelnosti ribosomů. V provozních podmírkách stacionárního kvašení se udržela kvasná aktivity biokatalyzátoru 11 měsíců.

Пардонова, Б., Поледникова, М., Шедова, Г., Калер, М.: Использование иммобилизованных дрожжей при производстве игристого вина. Квас. прум. 32, 1986, № 10, стр. 232—235.

При производственных испытаниях исследовалось

представление некоторых летучих веществ и свободных аминокислот в игристых винах, произведенных прерывным путем с связанными и свободными дрожжами. Пониженная абсорбция свободных аминокислот связанными и их ограниченный рост проявились в изменениях концентрации летучих веществ. Экспериментальные вина содержали менее высших алкоголов, сложных эфиров, жирных кислот и карбонильных соединений, наоборот количество свободных аминокислот было в среднем на 9 % выше. Эти изменения оказали положительное влияние на вкусовые свойства экспериментальных вин.

При оценке морфологического состояния связанных дрожжей на субмикроскопическом уровне были отмечены наиболее значительные изменения в первых циклах брожения после иммобилизации. После десятимесячной эксплуатации связанные клетки отличались субмикроскопической структурой подобной клеткам из суспензионной культуры. Сходство наблюдалось прежде всего в хорошей разрешаемости рибозомов. В производственных условиях стационарного брожения сохранилась бродильная активность биокатализатора 11 месяцев.

Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Utilization of Immobilized Yeasts for Production of Sparkling Wine. Kvas. prům. **32**, 1986, No. 10, pp. 232—235.

The quantity of some volatile compounds and free amino acids in sparkling wines produced in the batch procedure using free and immobilized yeast cells were tested in production-scale experiments. The lowered absorption of free amino acids by immobilized yeast population as well as their limited growth resulted in concentration changes of volatile compounds. The wines contained less higher alcohols, esters, fatty acids and carbonyl compounds but the quantity of free amino acids was about by 9 % higher. These changes had a positive effect on taste properties of the final experimental wines. The morphology of immobilized cells was changed during several first fermentation cycles after the immobilisation. After 10 months procedure the morphological structure of the cells was similar to that found by cells from the suspension culture. The similarity also was in a good distinction of ribosomes. The fermentation activity of the biocatalyst remained 11 months in the production conditions of the stationary fermentation.

Pardonová, B. - Poledníková, M. - Šedová, H. - Kahler, M.: Applikation immobilisierter Hefen zur Schaumweinherstellung. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 10, S. 232—235.

Es wurde in Betriebsversuchen die Vertretung einiger flüchtigen Substanzen und freien Aminosäuren in Schaumweinen verfolgt, die im diskontinuierlichen Verfahren mit immobilisierten und freien Hefen erzeugt wurden. Die verringerte Absorption der freien Aminosäuren durch immobilisierte Hefen und ihr begrenztes Wachstum kam in den Konzentrationsänderungen der flüchtigen Substanzen zum Vorschein. Die Versuchswine enthielten weniger höhere Alkohole, Ester, Fettsäuren und Karbonylverbindungen; der Gehalt an freien Aminosäuren lag dagegen im Durchschnitt um 9 % höher. Diese Änderungen hatten einen positiven Einfluss auf die Geschmackseigenschaften der fertigen Versuchswine.

Bei der Auswertung des morphologischen Zustandes der gebundenen Zellen auf submikroskopischem Niveau wurden die grössten Änderungen in den ersten Fermentationszyklen nach der Immobilisierung festgestellt. Nach 10 Monaten Betrieb wiesen die gebundenen Zellen eine submikroskopische Struktur auf, die den Zellen aus der Suspensionskultur ähnlich war. Die Ähnlichkeit bestand vor allem in der guten Unterscheidbarkeit der Ribosome. In den Betriebsbedingungen der stationären Gärung blieb die Gäraktivität des Biokatalysators 11 Monate erhalten.