

WIESŁAW WZOREK, ANNA BUGAJEWSKA, SYLWIA MATEUSIAK,
SYLWIA BONIN

WYKORZYSTANIE DROŻDŻY IMMOBILIZOWANYCH NA SZKLE PIANKOWYM W CIĄGŁEJ FERMENTACJI WINIARSKIEJ

Streszczenie

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania szkła piankowego do immobilizacji komórek drożdży w procesie ciągłej fermentacji winiarskiej.

Drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* rasy S.o./1AD dodawano tylko w momencie uruchamiania fermentorów. Fermentację ciągłą prowadzono 33 dni, przy czym czas przepływu przez 3 kolumny wypełnione kostkami szkła piankowego wynosił 3-4 dni. Stwierdzono prawidłowy przebieg ciągłej fermentacji winiarskiej w ciągu trzydziestu trzech dni badanego okresu. Prognoza statystyczna wykazała prawdopodobieństwo dalszego prawidłowego przebiegu procesu przez następne sześć dni. Białe szkło piankowe okazało się przydatne do unieruchamiania komórek drożdży.

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania wykorzystaniem unieruchomionych (immobilizowanych) komórek drożdży w procesie ciągłej fermentacji moszczu. Immobilizacja polega na unieruchomieniu komórek w taki sposób, aby ograniczyć ich swobodny ruch i umożliwić przepływ koło nich fermentującej cieczy.

Technologie wykorzystujące komórki immobilizowane umożliwiają zwiększenie produktywności zbiorników fermentacyjnych w porównaniu z technologią tradycyjną [1, 4]. Uzyskuje się to dzięki większej rzeczywistej liczbie komórek w jednostce objętości fermentora oraz poprzez stosowanie większych szybkości przepływu. W takich warunkach szybkość dopływu surowca może przekraczać szybkość wzrostu immobilizowanych mikroorganizmów, system fermentacyjny jest bardziej odporny na zmiany warunków procesu, a ryzyko zakażenia jest znacznie mniejsze. Ponadto bioreaktory wykazują dużą stabilność fermentacyjną, która wynika ze znacznej samoreprodukcji systemu [8, 9].

W badaniach dotyczących fermentacji winiarskiej komórki drożdży są najczęściej unieruchamiane metodą pułapkowania lub adsorpcji [3, 13, 14].

Dla konkretnej metody immobilizacji istotny jest wybór odpowiedniego nośnika. Uważa się, że dobry nośnik powinien charakteryzować się następującymi cechami: niski koszt i łatwa dostępność, prostota i łagodność unieruchamiania, mechaniczna i chemiczna stabilność operacyjna, obojętność w stosunku do zatrzymanych mikroorganizmów, jak najniższe ograniczenia dyfuzyjne dla substratu, produktu i innych metabolitów, duża zdolność zatrzymywania komórek oraz łatwość powiększania skali produkcji [5, 6, 7]. Bakoyianis i wsp. [1] prowadząc doświadczenia nad otrzymywaniem wina w niskiej temperaturze, do unieruchamiania komórek drożdży wykorzystali pumeks - porowaty, wulkaniczny materiał zawierający około 70% SiO₂. Wzorek i Rostkowska-Demner [16] oraz Rostkowska-Demner [12] prowadząc badania nad szeryzacją win owocowych wykorzystali do immobilizacji komórek drożdży białe szkło piankowe. Stwierdzili m.in., że szkło to nie powoduje zwiększenia zawartości metali w winie.

Cel i metodyka pracy

Celem pracy było określenie możliwości wykorzystania szkła piankowego do immobilizacji komórek drożdży w procesie ciągłej fermentacji winiarskiej.

Przeprowadzono 3 serie doświadczeń. Nastawy przygotowywano z soku jabłkowego odtworzonego z koncentratu oraz sacharozy, o ilości cukru pozwalającej na otrzymanie w serii pierwszej 14% obj. alkoholu, w drugiej i trzeciej - 16% obj.

Nastawy te wzbogacano w pożywki azotowe w formie wodorooortofosforanu (V) diamonu i siarczanu (VI) amonu w ilości po 0,2 g/dm³.

W celu przeciwdziałania rozwojowi szkodliwej mikroflory w czasie fermentacji sulfitowano je w ilości 50 mg/dm³ SO₂ (seria I) oraz 100 mg/dm³ SO₂ (II i III seria) stosując dodatek disiarczanu (IV) dipotasu.

Fermentacje prowadzono przy użyciu drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* rasy S.o./1 AD z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii Żywności SGGW (opisane (2)), które dodawano tylko w momencie uruchamiania fermentacji, w formie kultury matecznej (10% obj.). Matki drożdżowe w poszczególnych seriach przygotowywano poprzez 4-etapowe namnażanie drożdży na podłożach otrzymanych w sposób analogiczny jak nastawy, przy czym przyzwyczajano je równocześnie do obecności SO₂ w nastawie.

Zestaw do prowadzenia ciągłej fermentacji winiarskiej składał się z trzech szklanych kolumn wypełnionych szkłem piankowym w postaci kostek o wymiarach ok. 1x1x1 cm. Zasilanie zestawu prowadzono przy użyciu pompy tłokowej "Micro-doze pump" typ 335 A. Fermentację prowadzono w ciągu 33 dni, przy czym przepływ nastawy przez fermentory trwał 3–4 dni, czyli 3–4 dni trwała fermentacja wina.

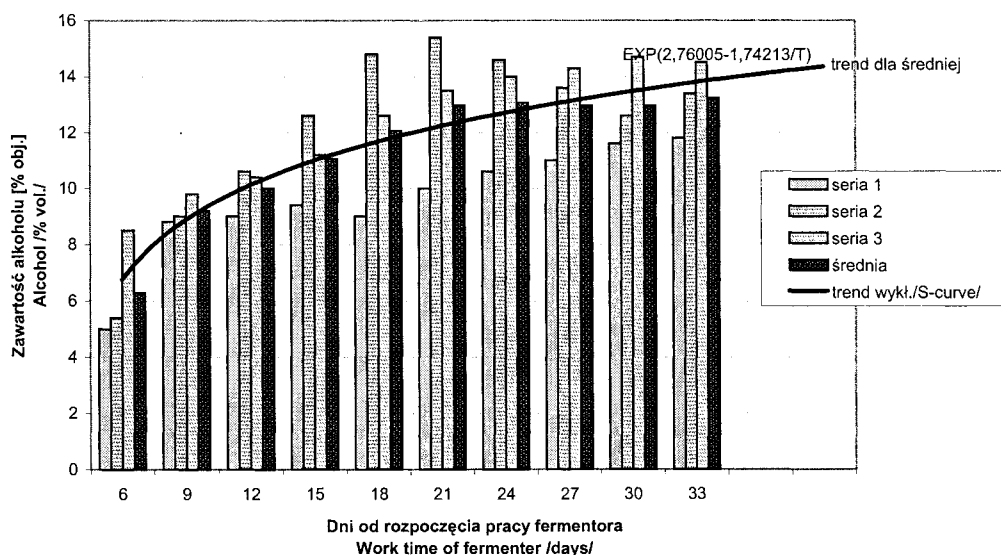
W trakcie procesu fermentacji przeprowadzono analizę chemiczną i organoleptyczną wina oraz określano ogólną liczbę i aktywność życiową komórek drożdży w każdej kolumnie fermentora. W publikacji zamieszczamy tylko niektóre wyniki pracy.

Obliczenia statystyczne przeprowadzono metodą wieloczynnikowej analizy wariancji wykorzystując program komputerowy STATGRAPHICS, a najmniejszą istotną różnicę (NIR) obliczono używając testu Tukeya (dla $\alpha = 0,05$). Ponadto podano wykładniczą linię trendu (krzywa S) oraz równanie tej krzywej.

Omówienie i dyskusja wyników

Doświadczenia (trzy serie) ze względu na ograniczenia czasowe przerywano po 33 dniach od rozpoczęcia fermentacji pomimo, że jej przebieg nie wskazywał na taką konieczność. W związku z tym dla niektórych wyników obliczono wykładnicze (S-curve) równanie trendu i wykreślono jego krzywą (dla średnich) z prognozowaniem dwóch następnych okresów pomiarów.

W pierwszym okresie fermentacji następował wzrost zawartości alkoholu, po czym jego poziom był utrzymywany na w miarę stałym poziomie poprzez regulację szybkości przepływu cieczy (rys. 1). Według PN-A-79121 [10] wino owocowe powinno zawierać minimum 9% obj. alkoholu. W pierwszej serii taką zawartość uzyskano dwunastego dnia od rozpoczęcia pracy fermentorów, a w drugiej i trzeciej serii między szóstym a dziewiątym dniem fermentacji.



Rys. 1. Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na zawartość alkoholu w winie.

Fig. 1. Influence of continuous fermentation time on alcohol content in wine.

Stwierdzono, że ilość otrzymanego alkoholu zależy od tempa przepływu nastawu. Wzrost stężenia alkoholu jest wynikiem mniejszej szybkości przepływu. W ten sposób wydłuża się czas kontaktu nastawu z drożdżami i w związku z tym więcej cukru ulega przemianom w alkohol.

Cechą fermentacji ciągłej jest to, że m.in. poprzez zmianę ilości moszczu dostarczanego do fermentora można wpływać na skład wina i w ten sposób regulować zawartość cukrów pozostających w produkcie [15].

Fermentację ciągłą należy prowadzić jednak w taki sposób, aby w winie opuszczającym linię pozostało 2-3% nie przefermentowanych cukrów, ze względu na utrzymanie aktywności życiowej drożdży [15]. W związku z tym, w niniejszej pracy nie starano się uzyskać maksymalnego stopnia odfermentowania, a jedynie taki, który nie powodował masowego obumierania komórek drożdży.

W trakcie procesu fermentacji ciągłej zaobserwowano wzrost liczby komórek drożdży w tych samych kolumnach, w miarę upływu czasu od uruchomienia fermentorów.

Na podstawie zawartości ekstraktu ogólnego oraz cukrów w winie obliczano ilość ekstraktu bezcukrowego. Stwierdzono, że w miarę upływu czasu fermentacji ciągłej zawartość ekstraktu bezcukrowego w winie wzrasta (tab. 1). W skład ekstraktu bezcukrowego wchodzi kwasy organiczne, sole mineralne, glicerol, związki fenolowe oraz inne składniki nie oznaczane metodami redukcyjnymi. Interesujące jest, jakie składniki powodowały ten wzrost, gdyż proces ten od pewnego momentu nie był skorelowany z zawartością alkoholu.

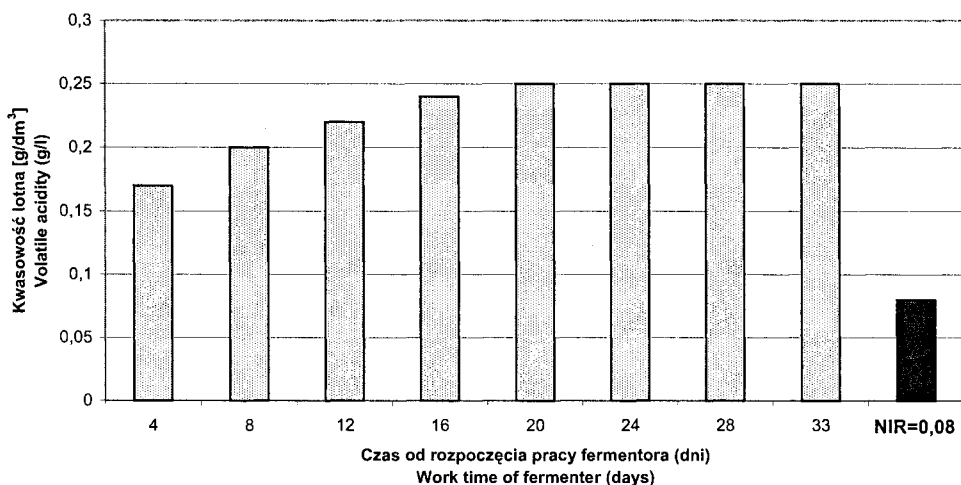
Tabela 1

Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na zawartość wybranych składników wina (średnia z trzech serii).

Influence of continuous fermentation time on content selected components (average from 3 series).

Czas trwania fermentacji (doby) Work time of fermentor (days)	Ekstrakt bezcukrowy Non-sugar solutions (g/dm ³)	Kwasowość ogólna Total acidity (g/dm ³)	Wolny SO ₂ SO ₂ free (mg/dm ³)	Zwiększony SO ₂ SO ₂ bounded (mg/dm ³)	Ocena sensoryczna (punkty) Organoleptic assessment (in points)
4	21,4	3,94	14,4	89,6	-
9	24,7	5,26	11,2	80,0	3,8
15	26,6	6,25	8,0	67,2	4,0
22	29,4	6,27	7,2	69,0	4,0
28	31,9	6,25	9,0	66,4	-
33	33,9	6,25	8,0	68,0	4,1
NIR	-	1,0	2,6	4,0	0,22

W czasie trwania fermentacji ciągłej oznaczano kwasowość lotną wina, która jest ważnym czynnikiem jakościowym oraz wskaźnikiem prawidłowości przebiegu procesu (rys. 2). We wszystkich seriach zaobserwowano wzrost kwasowości lotnej do około szesnastego dnia fermentacji, po czym jej poziom już nie ulegał zmianom. Związane jest to z wzrostem wytwarzania alkoholu przez drożdże w tym czasie, ponieważ kwas octowy jest produktem ubocznym fermentacji alkoholowej. Stwierdzone wartości kwasowości lotnej są zgodne z wymaganiami normy dla białych win owocowych [10] dopuszczającej nie więcej niż $1,2 \text{ g/dm}^3$ kwasów lotnych i świadczą nie tylko o braku rozwoju bakterii fermentacji octowej, ale i o niewielkim zużyciu cukrów na produkcję tego kwasu. Analiza statystyczna nie wykazała wpływu czasu trwania fermentacji ciągłej na kwasowość lotną wina (różnice mieszczą się w granicach błędów).



Rys. 2. Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na kwasowość lotną wina (średnia z trzech serii).

Fig. 2. Influence of continuous fermentation time on volatile acidity (average from 3 series).

Kwasowość ogólna (tab. 1), podobnie jak kwasowość lotna również wzrastała w początkowym okresie fermentacji (do około 8–16 dnia w zależności od serii). Kwasy organiczne stanowią jeden z produktów ubocznych fermentacji alkoholowej i wzrost ich ilości przy niskiej kwasowości ogólnej w nastawach może być związany ze zwiększającą się zawartością alkoholu w winie w tym czasie. W dalszym ciągu trwania procesu obserwowano utrzymywanie się kwasowości ogólnej na stałym poziomie.

Ogbona i wsp. [9] stosując w fermentacji ciągłej drożdże immobilizowane na bio-
nośnikach z alginianu wapnia nie obserwowali różnic w głównych składnikach wina w trakcie trwania procesu, a także zmian w kwasowości ogólnej i lotnej. Natomiast Rosi-

ni (11) prowadząc fermentację z recyrkulacją komórek nie obserwował różnic w kwasowości ogólnej w porównaniu z klasyczną fermentacją, natomiast stwierdził wzrost kwasowości lotnej do ok. 0,52 g/dm³.

W czasie pracy fermentorów obserwowano spadek ilości SO₂ w początkowym okresie fermentacji, tj. do około szesnastego dnia pracy fermentorów. Po upływie tego czasu zawartość SO₂ utrzymywała się na zbliżonym poziomie. Obliczenia statystyczne wykazały, że od szesnastego dnia fermentacji różnice pomiędzy średnimi mieszczą się w zakresie błędu statystycznego, czyli w tym okresie czas trwania fermentacji nie miał istotnego wpływu na zawartość SO₂ w winie (tab. 1).

Podczas trwania fermentacji przeprowadzano ocenę organoleptyczną wina. Oceny ogólne mieściły się w granicach 3,7–4,2 punktu. Najniższe oceny ogólne otrzymywały wina z 9 dnia pracy fermentorów. Wyczuwalny był w nich posmak i zapach siarkowodoru. W winach z następnych dni pracy baterii nie wyczuwano już posmaku i zapachu siarkowodoru, co pozytywnie wpłynęło na oceny (tab. 1).

Podsumowanie

Białe szkło piankowe może być używane do unieruchamiania komórek drożdży w ciągłej fermentacji winiarskiej. Szkło to dzięki trwałej i porowatej strukturze zatrzymuje na swojej powierzchni duże ilości komórek drożdży.

Po upływie ok. 16 dni pracy fermentorów kwasowość wina oraz zawartość SO₂ utrzymywały się na stałym poziomie.

Stwierdzono zależność między zawartością alkoholu w winie a przepływem substratu, przy czym poprzez zmianę ilości nastawu dostarczanego do fermentora można wpływać na skład wina i w ten sposób regulować zawartość cukrów pozostających w produkcie.

LITERATURA

- [1] Bakoyianis V., Kanellaki M., Kaliafas A., Koutinas A.A.: Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1992, 1293.
- [2] Bugajewska A., Wzorek W.: Wpływ długotrwałej adaptacji środowiskowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rasy Bratysława na fermentację winiarską i wybrane cechy komórek. *Przem. Ferm. i Owocowo-Warzywny*, **41**, 1997, 11.
- [3] Divies Ch., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 1994, 135.
- [4] Dubois C., Sablayrolles J. M., Salmon J. M., Barre P.: Study of flocculent yeast fermentors for the reactivation of stuck fermentation in winemaking. *Sciences des Aliments*, **12**, 1992, 467.
- [5] Klein J., Stock J., Vorlop K.D.: Pore size and properties of sphericalca-alginate biocatalysts. *European J. App. Microb. and Biotech.*, **18**, 1983, 86.

- [6] Malik F., Krasny S., Minarik E.: Einsatz immobilisierter Zellen in der Weinbereitung. I. Verwertung immobilisierter Hefen bei der primären Mostgärung. *Weinwissenschaft*, **47**, 1992, 28.
- [7] Nagashima M., Azuma M., Noguchi S., Inuzuka K., Samejima H.: Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. and Bioeng.*, **26**, 1984, 992.
- [8] Ogonna J.C., Amano Y., Nakamura K.: Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 1989, 69.
- [9] Ogonna J.C., Amano Y., Nakamura K., Yokotsuka K., Shimazu Y., Watanabe M., Hara S.: A multi-stage bioreactor with replaceable bioplastes for continuous wine fermentation. *American J. Enol. Viticul.*, **40**, 1989, 292.
- [10] PN-A-79121: Wino owocowe, ustanowiono 1990
- [11] Rosini G.: Wine-making by cell-recycle-batch fermentation process. *App. Microb. Biotech.*, **24**, 1986, 140.
- [12] Rostkowska-Demner E.: Wpływ wybranych metod oksydacji biologicznej na skład i jakość win owocowych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 1996.
- [13] Sroka W., Rzędowski W.: Rodzaje fermentorów stosowanych w procesach fermentacji z unieruchomionymi komórkami drobnoustrojów. *Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny*, **35**, 1991, 13.
- [14] Sroka W., Rzędowski W.: Unieruchamianie drobnoustrojów - metody, rodzaje nośników oraz ich wpływ na właściwości komórek. *Przem. Ferment. i Owocowo-Warzywny*, **35**, 1991, 8.
- [15] Wzorek W., Pogorzelski E.: Technologia winiarstwa gronowego i owocowego. SIGMA-NOT, Warszawa 1995-1998.
- [16] Wzorek W., Rostkowska-Demner E.: Próby zastosowania szkła piankowego jako nośnika drożdży w oksydacji biologicznej win owocowych. *Mat. XXIV Sesji KTiChŻ PAN, Wrocław 1993*, s. 250.

USING YEAST CELLS IMMOBILIZED ON FOAM GLASS IN CONTINUOUS WINE FERMENTATION

S u m m a r y

Wine continuous fermentation by yeast cells immobilized on foam glass was investigated. *Saccharomyces cerevisiae* strain S.o./1AD was added only at the moment when the fermentors were started. Continuous fermentation was carried out for 33 days. The time of pass through 3 columns with cube of foam glass was 3-4 days. The process of continuous fermentation was correct during 33 days. Statistical analysis showed that the next 6 days of process would be also correct. This research has shown that foam glass can be used to immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells in continuous wine - making. ☒