

VPLIV SPREMINJANJA TEMPERATURE FERMENTACIJE NA PRODUKCIJO GLICEROLA V VINIH

Marin Berovič, Marko Herga

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Katedra za Kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo
Univerza v Ljubljani, Askerčeva 5, 1001 Ljubljana
Fax: + 386 1 4760 300, E-mail: marin.berovic@fkkt.uni-lj.si*

Povzetek

V alkoholni fermentaciji grozdnega mošta kultivarja laški rizling v etanol smo raziskovali vpliv temperature na metabolizem vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Ob tem smo raziskovali vpliv spreminjanja temperature iz 18 na 22 in 25°C v različnih časovnih intervalih od 4 do 8 ur. Rezultati so pokazali, da spremenljiva temperatura vpliva na metabolizem kvasovk v smeri pospešene produkcije glicerola, ki nastaja v tem procesu kot osmoregulator s katerim celice kvasovk vzdržujejo redoks ravnotežje. V vseh primerih se je pokazalo, da spremenljiva temperature v procesu alkoholne fermentacije vpliva na povišano produkcijo glicerola. Prav tako smo opazili povišano koncentracijo etanola in drugih alkoholov. Študirali smo tudi vpliv temperaturnega šoka pri 45 °C na vcepek vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Primerjava rezultatov s kontrolnim vzorcem je pokazala, da se je ob uporabi temperaturnega šoka na vcepek, poraba reducirajočih sladkorjev povečala za 65 % ob tem pa je narasla količina glicerola v povprečju za 80 %. Hlapne kisline so bile v vseh primerih v mejah normale. Uporabljena tehnologija predstavlja nov originalno tehnološko metodo povišanje količine glicerola v vinih primerno za uporabo v velikih sistemih.

Gljučne besede : temperaturni šok, vcepek, Saccharomyces cerevisiae, biosinteza glicerola

Uvod

Glicerol je sekundarni metabolit metabolizma vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji vinskega mošta. Koncentracije glicerola v vinih so običajno okoli 6 g l⁻¹. Visoka specifična gostota in viskoznost prispevata k polnosti, mehкости in kompleksnosti vina (Nieuwoudt *et al.* 2002, Karasu and Ozbas 2003). Anaerobna biosinteza etanola je nevtralen redoks process. The anaerobic conversion of glucose into ethanol by *S.cerevisiae* is redox neutral; that is, NAD⁺, ki se porablja po Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) poti se obnavlja v produkciji etanola. Intermediate EMP metabone poti nadomestijo perkursorji sinteze celičnih sestavin. Če pride do motenj, ki jih lahko injicirajo hitre spremembe pH, osmolalnosti, temperature in drugih faktorjev pride do motenj kjer se nastali prebitok NADH ne more reducirati v NAD⁺. To povzroča zaustavitev celičnega metabolizma oziroma odpiranje nove metabolne poti po kateri nastajajo novi reduktivni produkti kot je glycerol (Oura 1977, Jackson 2000). Povišana produkcija glicerola omogoča mikroorganizmu vzdrževati redoks ravnotežje v celicah in pretvorbo NADH v prebitku.

Na biosintezo glicerola v celicah vpliva mnogo faktorjev prisotnih v samem moštu in vinu, kot so : temperatura, izbira seva, koncentracija reducirajočih sladkorjev, dušika in prostega žvepla, pH, dolžina aerobne faze, sorta kultivarja in zrelost grozdja (Ribereau-Gayon *et al.* 2000, Carrasco *et al.* 2001). Temperatura procesa fermentacije je ob tem eden izmed najbolj učinkovitih parametrov, ki vplivajo na process biosinteze glicerola v vinih. Ne samo, da temperatura posredno ali neposredno vpliva na metabolizem vinskih kvasovk temveč je tisti faktor s katerim v procesnem inženirstvu v vinarstvu lahko najbolj učinkovito vodimo ali kontroliramo process grozdnegfermentacije a mošta v vino (Omori *et al.* 1996, Jesus Torija *et al.* 2003). Namen našega predstavljenega raziskovalnega dela, v sklopu raziskav vpliva temperature na biosintezo etanola v fermentaciji grozdnega mošta v vino, je prikazati vpliv temperaturnega šoka na vcepek – suspenzijo kvasovk glicerola *S.cerevisiae*.

Materijali in metode

Mikroorganizem

Uporabili smo vinske kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (Femicru, AR2Val de Loire, France) 2g suhih kvasovk smo reaktivirali 20 min pri 34 °C v 20 ml mošta laškega rizlinga in vode (1:1 v/v). Suspenzijo koncentracije 10^7 cells ml⁻¹ smo ohladili na 18 °C in v 5 minutah pogreli na 45 °C kjer smo to temperaturo vzdrževali 20 minut, potem pa ohladili ponovno na 18 °C.

Substrat

Uporabili smo mošt laškega rizlinga iz Ljutomerško-Ormoških Goric. Uporabljeni mošt ni bil predhodno žveplan ne filtriran. Pred začetkom fermentacije je bila koncentracija reducirajočih sladkorjev 109 g glucose l⁻¹ and 103 g fructose l⁻¹, pH 3.15 in vsebnost organskih kislin 7.8 g l⁻¹. Kot bioaktivator smo uporabili Fermaid E (Danstar Ferment AG) v razmerju 30 g na 100 l mošta.

Fermentorji

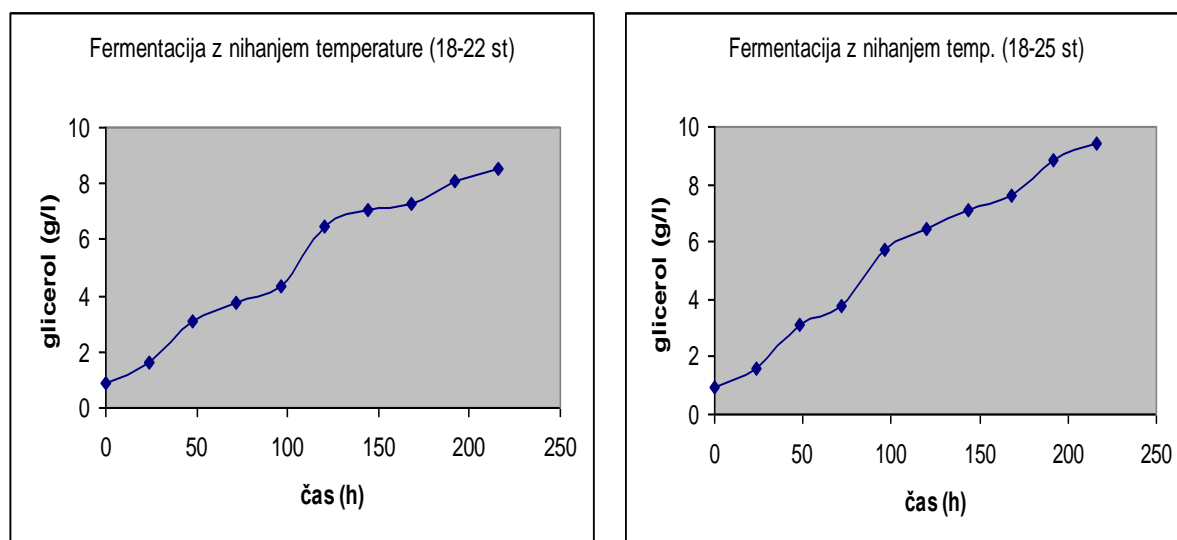
Vsi eksperimenti so potekali v 10 l mešalnih bioreactorjih (Bioengineering AG, Switzerland) standardne konfiguracije. Fermentriji so bili opremljeni z refluks hladilniki, Ingold pH, pO₂ in redoks elektrodami, kontrolo temperature in mešanja. Mešanje je bilo 100 rpm. Za *on-line* kontrolo procesa fermentacije smo uporabili SHIVA software (BIA d.o.o., Slovenia). Prazni prostor nad moštom smo z namenom, da bi preprečili oksidaciji prezračevali z dušikom. Vsak eksperiment smo izvedli v treh paralelkah, za statistično verodostojnost podatkov smo uporabili Test Student, statistična zanesljivost prikazanih rezultatov je 98% (Tabela 1).

Analitske metode

Za zasledovanje produktov smo uporabili visokotlačno tekočinsko kromatografijo. Glukozo, fruktozo, glicerol, etanol in organske kisline smo določili z validiranimi postopki Bio-Rad (1997). Za določitev organskih kislin smo uporabili 300 mm × 7.8 mm Aminex HPX-87H kationsko kolono (Bio-Rad Laboratories, USA) pri temperaturi 65°C. Mobilna faza je bila 2 mMol H₂SO₄ in bidestilirana voda s pretokom 0.6 ml min⁻¹. Volumen injicirane faze je bil 20 µl; elucijo smo merili pri 210 nm. Detektor je bil RI detektor. Vzorce smo filtrirali skozi membranski filter 0.45 µm. Etanol, glicerol, glukozo in fruktozo smo merili z uporabo RI detektorja, organske kisline pa z UV-VIS detektorjem.

Rezultati in diskusija

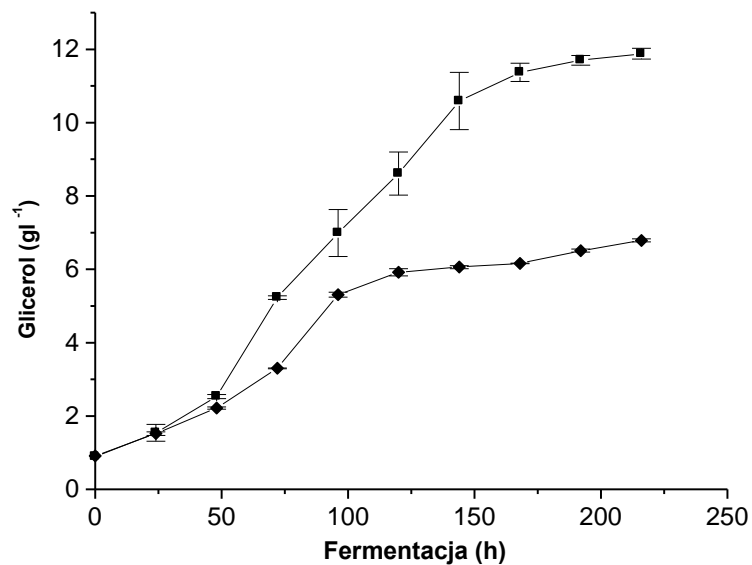
Rezultati spreminjanja temperature med samim procesom fermentacije, ki smo jih izvajali v 12 urnih ciklih, s katerimi smo simulirali spreminjanje temperature med fermentacijo v sodih ali v temperaturno nekontroliranih okoljih so pokazali presenetljive rezultate. Oscilacija temperature, oziroma njeno ciklično spreminjanje stimulira v veliki meri nastajanje glicerola od 8-10 g/l med fermentacijo. Prav tako pri tem procesu ostajajo hlapne organske kisline v mejah normale.



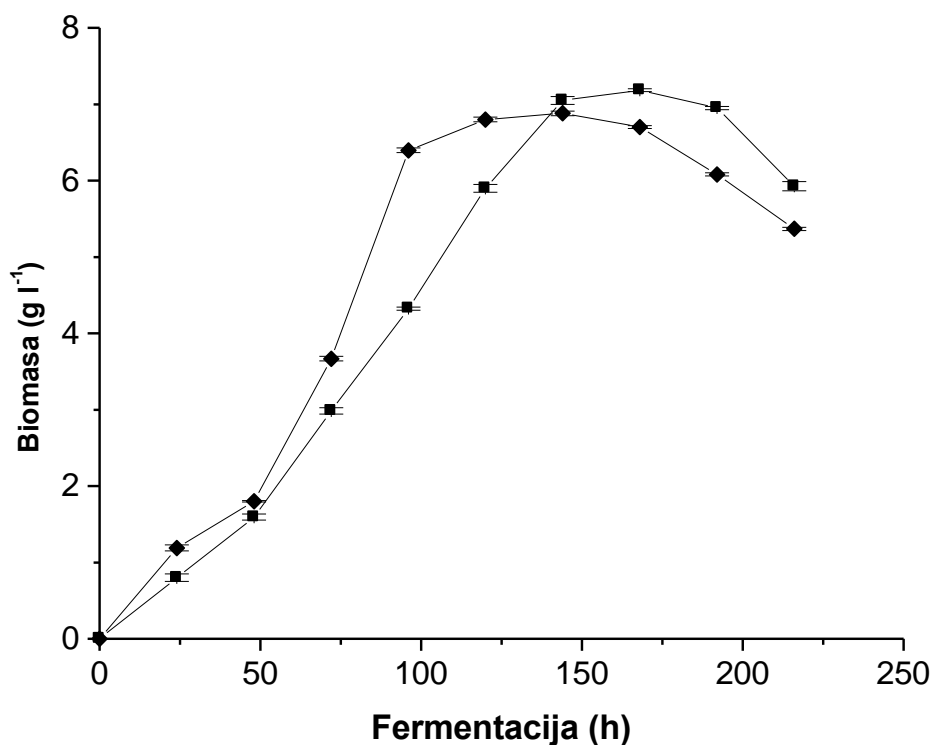
Slika 1 a,b. Nastajanje glicerola pri spremenljivi temperaturi fermentacije

Fermentacija je potekala 192 ur pri 18 °C. Primerjava rezultatov fermentacij, kjer smo kot vcepek uporabili termično obdelano suspenzijo vinskih kvasovk, je pokazala 65 % povečanje hitrosti porabe reducirajočih sladkorjev ob višji produkciji metabolitov med katerimi je v prvi vrsti izstopala povečana koncentracija glicerola do 12.25 g l⁻¹ kar predstavlja v primerjavi s kontrolnim vzorcem v povprečju 80 % povečanje ob končnih 2.4 g l⁻¹ preostalih reducirajočih sladkorjih in koncentraciji etanola 90 g l⁻¹ (Slika 1)

Količina biomase je bila ob tem pri 144 urah v kontrolnem vzorcu 6.7 g l⁻¹ v primerjavi z 7.2 g l⁻¹ v fermentaciji s temperaturno obdelanim vcepkom (Slika 2).



Slika 2. Produkcija glicerola v fermentaciji z ■ 20 minutnim temperaturim šokom vcepka pri 45 °C in ♦ kontrolni vzorec pri fermentacije pri 18 °C.



Slika 3. Biomasa v fermentaciji z ■ 20 minutnim temperaturim šokom vcepka pri 45 °C in ♦ kontrolni vzorec pri fermentacije pri 18 °C.

Prav tako smo izmerili povišanje etanola iz 85 g l⁻¹ v kontroli na 90 g l⁻¹. Koncentraciji jantarne 0.62 to 0.78 g l⁻¹ in jabolčne kisline 3.30 to 3.40 g l⁻¹ sta se pri tem rahlo povišali, kar bi bilo lahko tudi v sklopu eksperimentalne napake, koncentracija vinske kisline pa se je znižala na 0.28 g l⁻¹ (Tabela 1). Koncentracija očetne kisline je bila 0.32 g l⁻¹ v primerjavi s 0.28 g l⁻¹ v kontrolnem vzorcu.

Prikazani postopek fermentacije je potekal pri konstantni temperaturi 18 °C, pri tem smo uporabili termično obdelano suspenzijo vcepka. Termično obdelani vcepek je pri tem postopku ohranil tiste preživele kvasovke, ki so bile sposobne v nadaljevanju kljub spremembi temperaturnega okolja ohraniti sposobnost producirati visokih količin glicerola. Temperaturni šok je v vcepku povzročil nastanek novih oblik proteinov, ki so vplivali na nadaljni metabolizem kvasnih celic v smeri produkcije povišane količine glicerola (Nevoigt & Stahl 1997, Roustan & Sablayrolles 2005). Ob tem je nastala odpornost kvasnih celic na različne spremembe (Attfield 1987, Odumeru *et al.* 1992). Hitra sprememba fermentacijske temperature rezultira v hitri in izraziti spremembi v kvasnem metabolizmu.

Tabela 1. Metaboliti nastali med fermentacijo ob uporabi termično obdelanega vcepka v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Fermentacijski parodukti	Kontrolni vzorec (18 °C) (g l ⁻¹)	termično obdeleni vcepki (20 min / 45 °C) (g l ⁻¹)
Biomasa	6.7 ± 0.02	7.2 ± 0.02
Reducirajoči sladkorji	6.5 ± 0.23	2.4 ± 0.09
Ocetna kislina	0.28 ± 0.06	0.32 ± 0.02
Jantarna kislina	0.63 ± 0.11	0.75 ± 0.12
Jabolčna kislina	3.3 ± 0.16	3.4 ± 0.17
Vinska kislina	2.5 ± 0.18	2.2 ± 0.09
Etanol	84.70 ± 2.18	91.77 ± 0.93
Glicerol	6.81 ± 0,06	12.14 ± 0,26

Kvasne celice ob tem izpadejo iz običajnega ravnotežja sintetizirajo povečano količino glicerola, da bi se povrnilo v novo redoks ravnotežje, ki je pomembno za njihovo nadaljnje delovanje. Ob tem izločajo kot redoks in osmoregulator glicerol (Suetterlin *et al.* 2001). Hitra sprememba v temperaturi okolja inducira aktivacijo encima triose fosfat izomerase, ki kaže povečanje finitete do dihidroksiacetona fosfata kot pa do glicerol aldehyd 3-fosfata, ki ga pretvarja v nadaljnjem metabolizmu v dvostopenjski reakciji v glicerol (Scanes *et al.* 1998).

Prikazani tehnološki postopek predstavlja inovacijo v alkoholni fermentaciji grozdnega mošta v vino in predstavlja enostavno metodo za fermentativno pridobivanje višjih količin glicerola v vinih tudi v velikem merilu.

Reference

- Attfield PV (1987) Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett* 225 : 259-263
- Bio-Rad (1997) Guide to Aminex HPLC columns for food and beverage analysis. Bio-Rad Publications, Richmond
- Carrasco P, Querol A, Del Olmo M (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol* 175 : 450– 457
- Jackson RS (2000) Wine Science: principles, practice, perception., 2nd ed. Academic Press, San Diego
- Jesus Torija M, Rozes N, Poblet M, Manuel Guillamon J, Mas A (2003) Effects of fermentation temperature on the population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Jour Food Microbiol* 80 : 47– 53
- Karasu Yalcin S, Ozbas Y (2003) Production of glycerol by biochemical routes and its importance in wine fermentations. *Gida* 28 : 339 – 347
- Nevoigt E, Stahl U (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21 : 231 – 241
- Nieuwoudt HH, Prior BA, Pretorius IS, Bauer FF (2002) Glycerol in South African table wines:an assessment of its relationship to wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 23: 22– 30
- Odumeru JA, D'amore T, Russell I, Stewart GG (1992) Changes in protein composition of *Saccharomyces* brewing strains in response to heat shock and ethanol stress. *J Ind Microbiol* 9: 229-234
- Omori T, Ogawa K, Umemoto Y, Yuki K, Kajihara Y, Shimoda M, Wada H (1996) Enhancement of glycerol production by brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* with heat shock treatment. *J Ferment Bioeng* 82: 187-190
- Oura E (1977) Reaction products of yeast fermentations. *Proc Biochem* 12: 19 – 21
- Rankine BC, Bridson DA (1971) Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *Am J Enol Vitic* 22 : 2–12
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A (2000) Handbook of enology, volume 1, The microbiology of wine and vinifications. Wiley, West Sussex
- Roustan JL, Sablayrolles JM (2005) Role of trehalose and glycogen in alcoholic fermentation in wine-making conditions. *J Wine Research* 15: 189 – 202
- Scanes KT, Hohmann S, Prior BA (1998) Glycerol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine. A review. *S Afr J Enol Vitic* 19 : 17 - 24
- Suetterlin K, Hoffmann-Boller P, Pfenninger H, Pulver D, Gafner J (2001) Glycerol formation in dependence on use of pure yeast cultures and fermentation temperature. *Obst und Weinbau* 137 : 526 – 528