

Detekcia druhovej diverzity kvasiniek v procese výroby vína

Detection of species diversity of yeasts in the process of wine production

Regecová I., Semjon B., Výrostková J., Jevinová P., Marcinčák S., Pipová, M.
Univerzita veterinárského lekárstva a farmácie v Košiciach
Katedra hygieny technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín

Abstract

The study is focused on the detection of the species diversity of yeasts in samples of mash, must and young wine (Lipovina variety) in relation to the maceration carried out in the production process. In the investigated samples, the number of yeasts and molds (from 3.7 to 8.2 log cfu/ml) was determined by culture examination. When comparing the results between individual types of must, small differences in the numbers of yeasts and molds were observed. Using the PCR method, non-*Saccharomyces* yeasts were subsequently identified in the mash samples to a greater extent. In a more specific overview of the percentage of species representation of yeasts in the must with previous maceration, a greater diversity of non-*Saccharomyces* yeasts was observed, where the genera *Candida*, *Hanseniospora*, *Metschnikowia* and *Pichia* were detected. up to the 4th week of the fermentation process.

Key words: maceration, must, non-*Saccharomyces*, PCR, mash

Materiál a metodika

- Skúmané vzorky boli odobraté (v októbri až novembri 2023) z muštu odrody hrozna **Lipovina** pochádzajúce z Tokajskej vinohradníckej oblasti.
- Strapce hrozna boli spracované na rmut ktorý sa rozdelil na dve časti. Jedna časť rmutu bola očkovaná kvasinkovou kultúrou druhu *Saccharomyces cerevisiae* (SBCH1; Tecnofood, Italia) (**MK**). Druhá časť sa macerovala týždeň a následne prebehla fermentácia spontánne bez pridania kvasinkovej kultúry (**M**).
- Mikrobiologické vyšetrenie sa uskutočnilo najprv zo vzoriek rmutu a následne sa vzorky odobrali z muštu **po 3., 7., 14. dňoch a po 4 týždňoch** fermentácie.
- Kultivačné mikrobiologické vyšetrenie vzoriek sa vykonalo podľa pokynov normy **ISO 6887-1 (2017)** a **ISO 21527-1 (2010)**
- Druhovú identifikáciu sa previedla použitím konvenčnej metódy **PCR** podľa **White et al. (1990)**.
- Amplifikované PCR fragment boli **sekvenované** komerčnou spoločnosťou (SEQme s.r.o., Dobříš, Česká republika). Získané izoláty boli zadané do databázy GenBank — EMBL na porovnanie so sekvenciami dostupnými v nukleotidovej databáze Národného centra pre biotechnologické informácie (NCBI).

Výsledky

- ✓ Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vstupnej suroviny (rmutu) boli stanovené počty kvasiniek a plesní na 4.0 ± 0.1 log cfu/g.
- ✓ Pri stanovení počtu kvasiniek a plesní sa pozoroval mierny pokles v 4. týždni fermentácie a to vo vzorkách M ($4,7 \pm 0.0$ log cfu/ml) aj vo vzorkách MK ($4,6 \pm 0.0$ log cfu/ml).
- ✓ Pri porovnaní výsledkov medzi jednotlivými druhmi muštov sa pozorovali malé rozdiely v počtoch kvasiniek a plesní.
- ✓ Následným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek sa získalo **40 izolátov** kvasiniek, ktoré sa podrobili druhovej identifikácii pomocou PCR metódy s následným sekvenovaním získaných amplicónov a retrospektívne sa prepočítalo percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov kvasiniek podľa fenotypového prejavu a rastu izolátov na povrchu selektívno diagnostického média (tabuľka 1).
- ✓ Vo vzorkách rmutu sa detegovali vo väčšej miere non-*Saccharomyces* kvasinky.
- ✓ Pri prehľade percentuálneho druhového zastúpenia vo vzorkách muštu sa pozorovala diverzita non-*Saccharomyces* kvasiniek práve vo vzorkách **M** a to až **do 4. týždňa fermentácie**, kde boli ešte detegované druhy *Candida tenuis*, *Hanseniospora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima* a *Pichia kluyveri*.
- ✓ Najmenšie percentuálne zastúpenie bolo detegované u kvasiniek druhu *Candida zeylanoides*, ktoré sa detegovali **len do 3. dňa** fermentačného procesu v oboch vzorkách.

Tabuľka 1: Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov kvasiniek v procese fermentácie.

Fermentácia vzorky	rmut	3. deň		7. deň		14. deň		4. týždeň	
		M	MK	M	MK	M	MK	M	MK
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1%	3%	1%	5%	-	4%	-	-	-
<i>Candida tenuis</i>	2%	5%	2%	4%	-	3%	-	1%	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	1%	1%	2%	-	1%	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	2%	1%	-	-	-	-	-	-
<i>Candida utilis</i>	2%	1%	-	2%	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus magnus</i>	-	5%	2%	1%	-	-	-	-	-
<i>Hanseniospora uvarum</i>	3%	13%	9%	15%	8%	16%	7%	2%	1%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5%	15%	10%	14%	9%	13%	7%	2%	-
<i>Pichia kluyveri</i>	2%	11%	7%	12%	2%	4%	3%	2%	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	7%	2%	2%	-	1%	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	4%	5%	2%	4%	-	3%	-	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2%	4%	1%	3%	-	1%	-	-	-
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	-	4%	-	2%	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3%	14%	60%	32%	78%	54%	83%	93%	99%
<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	3%	1%	-	3%	-	-	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	3%	7%	1%	2%	-	-	-	-	-

Záver

Štúdia potvrdila, že macerácia v procese výroby bieleho vína (odroda Lipovina) má pozitívny vplyv na druhovú diverzitu kvasiniek, najmä na skupinu non-*Saccharomyces* kvasiniek. Táto skupina kvasiniek sa v počiatočnej fáze fermentácie vyskytovala vo vyššom percentuálnom zastúpení. Práve non-*Saccharomyces* kvasinky majú pozitívny vplyv na arómu a chuť vína.