

SYLWIA BONIN, WIESŁAW WZOREK

## DŁUGOTRWAŁA, CIĄGLA FERMENTACJA WINIARSKA Z DROŹDZAMI IMMOBILIZOWANYMI NA SZKLE PIANKOWYM

### Streszczenie

Celem pracy było przeprowadzenie długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym.

Fermentację prowadzono przez okres ponad 4,5 miesiąca, w temp. 22°C. Przepływ medium przez 4 szklane kolumny wypełnione kostkami szkła piankowego wynosił 5–6 dni. Stwierdzono prawidłowy przebieg fermentacji przez okres ponad 3 miesięcy. Po tym czasie nastąpił nieznaczny spadek otrzymanego alkoholu, a w 5. miesiącu zmiany cech sensorycznych wina. W czasie fermentacji obserwowano obniżanie się liczby komórek drożdży w kolejnych kolumnach i w miarę upływu czasu pracy fermentora, a także wzrost liczby komórek nieaktywnych życiowo. Obserwacje mikroskopowe wykazały zmiany w kształcie komórek. Stwierdzono, że możliwe jest prowadzenie ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym przez okres 3-4 miesięcy.

### Wstęp

W ostatnich latach, w procesie ciągłej fermentacji obserwuje się wzrost zainteresowania wykorzystaniem unieruchomionych komórek drożdży [17]. Badania te prowadzone są głównie w kierunku produkcji etanolu [13]. Nieliczne prace z zakresu fermentacji winiarskiej donoszą głównie o wykorzystaniu drożdży immobilizowanych metodą pułapkowania w różnych rodzajach żeli [2, 3, 5, 8, 11]. „Kuleczki” żelu są jednak ściśliwe i wykazują tendencję do osadzania się na dnie zbiorników fermentacyjnych, co utrudnia przepływ medium. Stwarza to konieczność stosowania fermentorów z mieszaniem fluidyzacyjnym lub z zastosowaniem przegród [16]. Ponadto w kwaśnym środowisku wina, żele tracą swe właściwości mechaniczne, a przy dłuższym użyciu mogą ulec destrukcji. Niektórzy wskazują też na niekorzystny wpływ na właściwości sensoryczne otrzymanego produktu [5].

Stąd też wydaje się właściwe podjęcie prób nad ciągłą fermentacją winiarską z drożdżami unieruchomionymi na powierzchni twardego, nieściśliwego nośnika. Doświadczenia nad ciągłą fermentacją winiarską w niskiej temperaturze z drożdżami immobilizowanymi na powierzchni pumeksu (porowatego, wulkanicznego minerału zawierającego około 70%  $\text{SO}_2$ ) przeprowadzili Bakoyianis i wsp. [1]. W naszym Zakładzie w badaniach nad szeryzacją win owocowych do immobilizacji komórek drożdży wykorzystano białe szkło piankowe [14, 15]. Nośnik ten zastosowano również do unieruchamiania drożdży w ciągłej fermentacji winiarskiej trwającej 33 dni [18].

Celem pracy była próba określenia wpływu długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym, na cechy otrzymywanego wina.

### **Materiały i metody badań**

Zestaw do prowadzenia ciągłej fermentacji składał się z 4 szklanych kolumn wypełnionych kostkami szkła piankowego, pompy zasilającej, zbiornika zasilającego i odbieralnika.

Nastaw winiarski przygotowywano z soku odtworzonego z koncentratu jabłkowego, przy czym zawartość cukrów ogółem wynosiła po uzupełnieniu sacharozą ok.  $320 \text{ g/dm}^3$ . Nastaw wzbogacano w pożywkę azotową, a także sulfitowano do ilości  $80 \text{ mg/dm}^3 \text{ SO}_2$  w celu przeciwdziałania rozwojowi szkodliwej mikroflory w czasie fermentacji.

Do fermentacji używano drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, rasy S.o./1AD, adaptowane do wysokiego stężenia cukrów i alkoholu, pochodzące z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Drożdże dodawano jednorazowo przed rozpoczęciem fermentacji, a kolumny napełniano stopniowo w odstępach dwudniowych. Przerwy te umożliwiały osadzenie się drożdży na powierzchni nośnika.

Przed rozpoczęciem fermentacji przeprowadzano pasażowanie drożdży mające na celu przyzwyczajenie ich do obecności  $\text{SO}_2$  w nastawie i do wzrastającej zawartości cukrów.

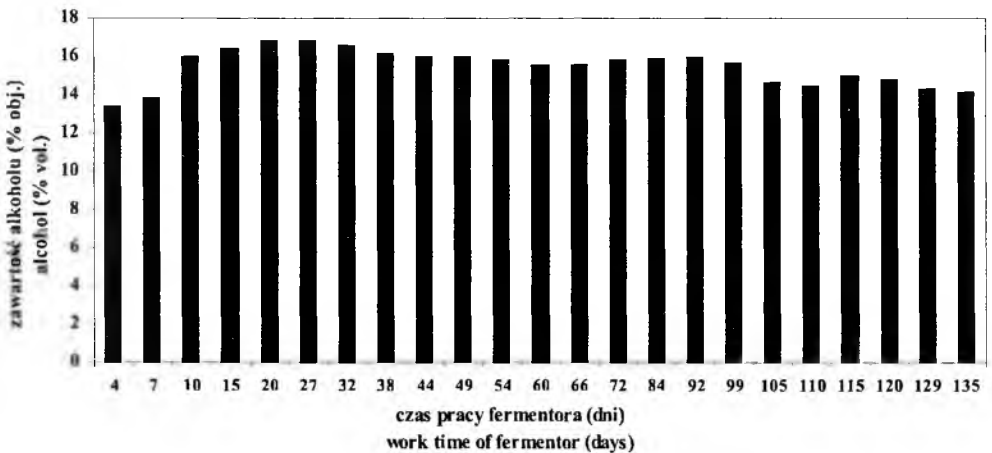
Fermentację prowadzono w temp. ok.  $22^\circ\text{C}$  przez okres ponad 4,5 miesiąca od momentu rozpoczęcia zasilania, przy czym przepływ przez baterię fermentorów wynosił ok. 5–6 dni.

W trakcie procesu fermentacji prowadzono analizę chemiczną zgodnie z powszechnie stosowaną metodyką. Przeprowadzano również ocenę sensoryczną wina w skali pięciopunktowej o 9 poziomach jakości wyliczając ocenę ogólną jako średnią ważoną przy współczynnikach ważkości: barwa-1, zapach-2, smak-6. Określano także liczbę komórek drożdży w medium w poszczególnych kolumnach fermentora metodą liczenia bezpośredniego w komorze Thoma oraz metodą płytkową. Po zakończeniu

procesu oznaczano w kolejnych kolumnach liczbę komórek drożdży na powierzchni nośnika z uwzględnieniem komórek nieaktywnych życiowo.

## Wyniki i dyskusja

Ilość otrzymywanego alkoholu wzrastała w początkowym okresie pracy fermentorów. Najwyższą ilość alkoholu otrzymano ok. 20–30 dnia fermentacji i wynosiła ona 17,4% obj. Następnie poprzez zwiększenie przepływu starano się uzyskiwać ok. 16% alkoholu, tzn. przepływ przez kolumny wynosił wtedy ok. 5–6 dni. W 4 miesiącu fermentacji nastąpił nieznaczny spadek ilości otrzymywanego alkoholu i wynosił on ok. 15%, a w 5 miesiącu ok. 14% (rys. 1). Fermentację ciągłą należy prowadzić w ten sposób, aby w winie opuszczającym linię pozostało 2–3% nie przefermentowanych cukrów podtrzymujących aktywność życiową drożdży [19]. Stąd nie starano się zmniejszać przepływu dla pełnego odfermentowania cukrów.



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

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

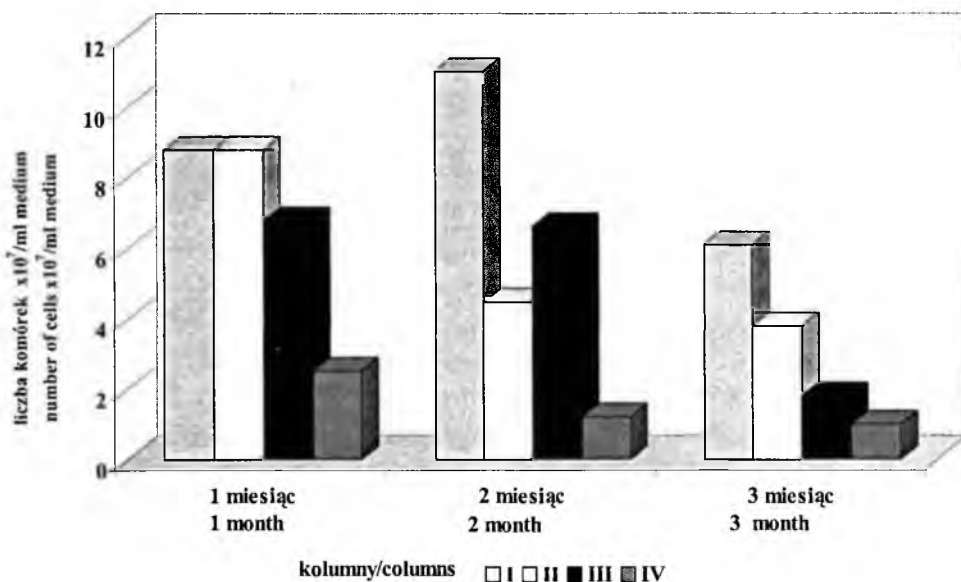
Jakość młodych win była dobra (bez dodatkowej obróbki) i na wyrównanym poziomie przez okres ponad 3 miesiące trwania fermentacji. Pod koniec 4 miesiąca nieprzerwanej fermentacji jakość win uległa niewielkiemu obniżeniu. Pojawił się specyficzny posmak i zapach, co prawdopodobnie wiązało się z procesem autolizy drożdży, a ocena ogólna uległa obniżeniu do 3,7 punktu (tab. 1). Powyższe dane wskazują na znaczną stabilność w procesie fermentacji w ciągu ponad trzech miesięcy jego trwania. Bakoyianis i wsp. [1] prowadzili ciągłą fermentację winiarską przez okres 75 dni obniżając stopniowo temperaturę z 27 do 5°C. Natomiast Ogbonna i wsp. [12] prowadzili

proces fermentacji ciągłej przez 42 dni używając drożdży immobilizowanych w postaci membrany w alginianie wapnia na szklanych biowłódkach. Dallmann i wsp. [2] przeprowadzili trwającą 15 dni ciągłą fermentację soku jabłkowego z użyciem drożdży pułapkowanych w alginianie wapnia. O trwającej 5 miesięcy fermentacji z drożdżami immobilizowanymi również w alginianie wapnia donoszą Nagashima i wsp. [10]. Jednak badania te prowadzone były w kierunku otrzymywania alkoholu z trzciny cukrowej.

Tabela 1

Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na ocenę sensoryczną win (skala 5-punktowa).  
Influence of continuous fermentation time on organoleptic assessment of wines (5 point score).

Wyróżnik / Quality factor	Czas pracy fermentora (dni) / Work time of fermentor (days)			
	30	50	100	135
Barwa / Colour	3,9	3,4	4,4	4,4
Zapach / Aroma	4,1	4,4	4,0	3,3
Smak / Taste	4,2	4,0	4,0	3,7
Ocena ogólna / Total assessment	4,1	4,0	4,1	3,7

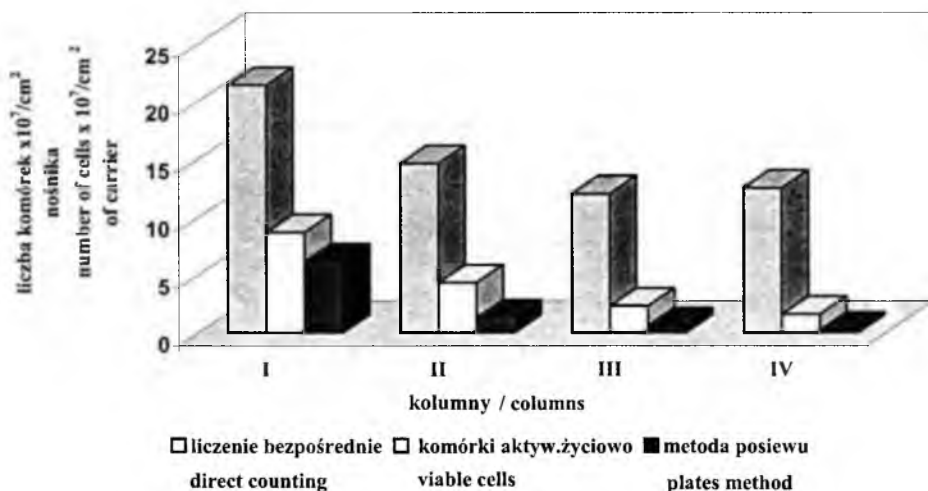


Rys. 2. Liczba komórek drożdży w kolumnach w zależności od czasu pracy fermentora.

Fig. 2. Number of yeast cells in columns depending on work time of fermentor.

W miarę upływu czasu fermentacji obserwowano obniżanie się liczby komórek drożdży w 1 ml fermentowanego medium oraz w kolejnych kolumnach. Na rys. 2. przedstawiono dane otrzymane metodą liczenia bezpośredniego. Szczególnie niewielką liczbę komórek zaobserwowano w IV kolumnie. Liczba ta wynosiła  $2,5 \cdot 10^7$  komórek w pierwszym miesiącu fermentacji, a w trzecim miesiącu obniżyła się o połowę do  $1,1 \cdot 10^7$ , co jest spowodowane prawdopodobnie znaczną koncentracją alkoholu. Obniżanie się liczby komórek w kolejnych kadziach fermentacyjnych stwierdzili Lipiec i Krawczyk [7], prowadząc próby nad ciągłą fermentacją winiarską w skali technicznej.

Bezpośrednio po zakończeniu procesu fermentacji określano liczbę komórek drożdży na  $1 \text{ cm}^2$  powierzchni nośnika (rys. 3). Stwierdzono spadek liczby drożdży w kolejnych kolumnach fermentora. Jednocześnie liczba komórek otrzymana metodą posiewu była niższa niż uzyskana drogą liczenia bezpośredniego, z uwzględnieniem komórek nie barwiących się błękitem metylenowym. Przyczyną może być tworzenie przez drożdże aglomeratów, łańcuszków 3–4 komórkowych. Obniżanie się liczby komórek na powierzchni nośnika jest zgodne ze stwierdzonym wcześniej spadkiem ilości drożdży w medium w kolejnych kolumnach fermentora.

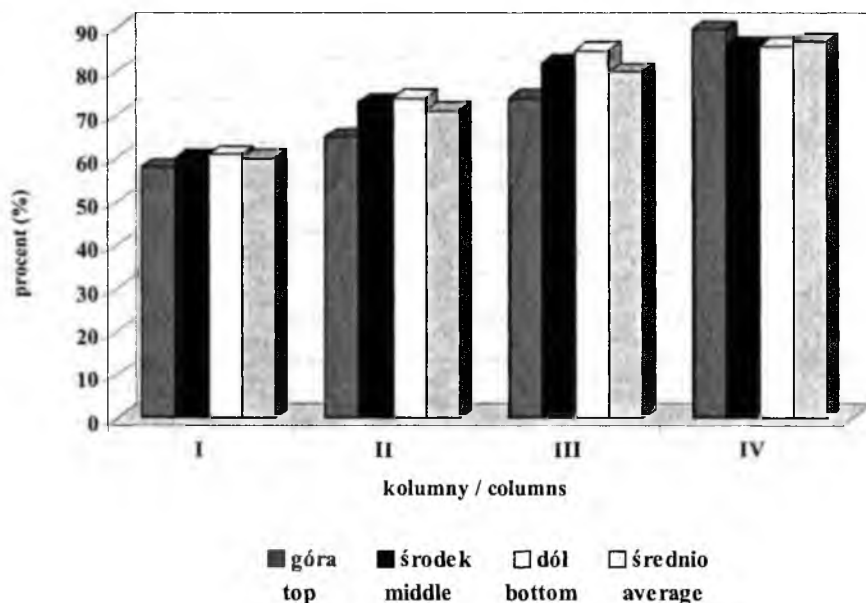


Rys. 3. Liczba komórek drożdży w kolumnach po zakończeniu fermentacji.

Fig. 3. Number of yeast cells in columns after fermentation.

Po zakończeniu fermentacji określano także procent komórek nieaktywnych życiowo na powierzchni nośnika w poszczególnych kolumnach (rys. 4). Stwierdzono wzrost liczby komórek nieaktywnych życiowo w kolejnych kolumnach. Zaobserwowano także nieznaczne zwiększenie się udziału tych komórek w dolnych partiach

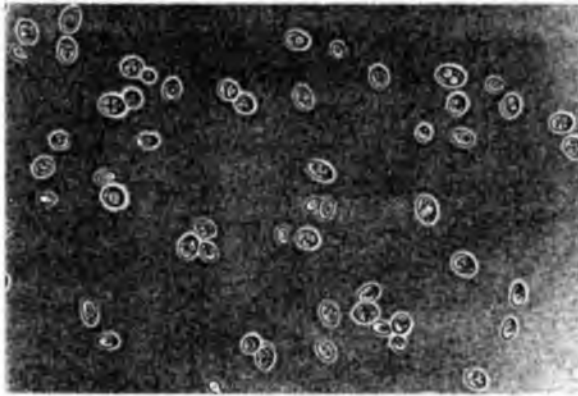
trzech kolumn, licząc od początku zestawu. Wzrost liczby komórek barwiących się błękitem metylenowym w kolejnych kadziach stwierdzili Lipiec i Krawczyk [7]. Jednak ta ciągła fermentacja trwała 92 dni i prowadzona była metodą tradycyjną.



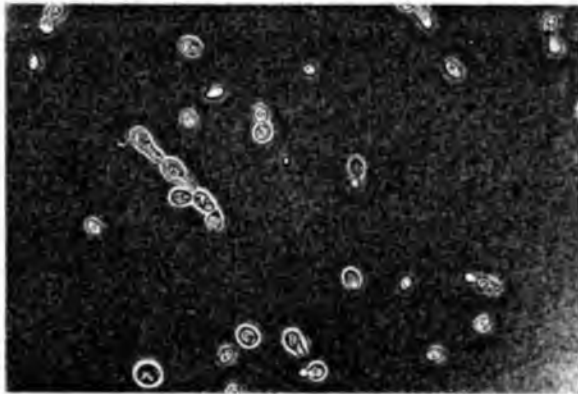
Rys. 4. Udział komórek nieaktywnych życiowo na różnych poziomach kolumn po 4,5 miesiącach pracy fermentora.

Fig. 4. Content of non-viable yeast cells on different levels of columns after 4,5 month work of fermentor.

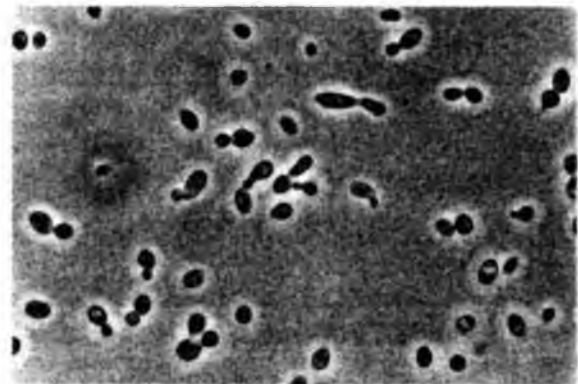
W miarę upływu czasu pracy fermentora obserwowano zmiany w kształcie komórek drożdży. Zwiększał się udział komórek wydłużonych i buławkowatych, co udokumentowano na zdjęciach z mikroskopu świetlnego (fot. 1-3). Zmiany w kształcie komórek od eliptycznych do podłużnych podczas fermentacji ciągłej zaobserwowali Hill i Robinson [4]. Stwierdzili oni, że im bardziej przepływające podłoże jest rozcieńczone, tym komórki są bardziej wydłużone. Również Lipiec [6] zaobserwowała wydłużanie się komórek drożdży w kolejnych kadziach fermentacyjnych. Stwierdzone przez nas kształty buławkowate mogą wiązać się z faktem, że przy znacznej i długotrwałej koncentracji alkoholu w środowisku może następować wyciek zawartości komórek w wyniku uszkodzenia błony komórkowej [9]. Planowane są dalsze badania w tym kierunku.



Fot. 1. Komórki „matki drożdżowej” (pow. x600).



Fot. 2. Drożdże po ponad 4,5 miesiącach fermentacji wyizolowane z nośnika (pow. x600).



Fot. 3. Komórki drożdży wyizolowane z nośnika po 4,5 miesiącach fermentacji (pow. x600).

## Podsumowanie

Możliwe jest prowadzenie ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkłe piankowym, przez okres ok. 3–4 miesięcy, w temp. ok. 22°C, bez negatywnego wpływu na jakość otrzymywanego produktu.

Białe szkło piankowe wydaje się być odpowiednim nośnikiem drożdży w ciągłej fermentacji winiarskiej.

## 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] Dallmann K., Buzas Zs., Szajani B.: Continuous fermentation of apple juice by immobilized yeast cells. *Biotech. Lett.*, **9**, 1987, 577.
- [3] Divies Ch., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 1994, 135.
- [4] Hill G.A., Robinson C.W.: Morphological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* during continuous fermentation. *Biotech. Lett.*, **10**, 1988, 815.
- [5] Krasny S., Malik F., Kozankova J., Nahalka J., Minarik E.: Immobilisierte Hefen im Gärungsprozeß von Apfelmost. *Mitt. Klosterneuburg*, **43**, 1993, 139.
- [6] Lipiec M.: Dobór ras drożdży winiarskich do fermentacji ciągłej. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **19**, 1969, 445.
- [7] Lipiec M., Krawczyk W.: Dobór ras drożdży winiarskich do fermentacji ciągłej. Próby techniczne. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **21**, 1971, 53.
- [8] Malik F., Pach L., Halama D., Bales V.: Zur Charakterisierung einiger Eigenschaften immobilisierter Weinhefen, 1. Mitteilung: Mechanische Eigenschaften immobilisierter Zellen. *Mitt. Klosterneuburg*, **40**, 1990, 205 .
- [9] Nagashima M.: Progress in ethanol production with yeasts, in: *Yest – biotechnology and biocatalysis*, New York and Basel, 57, 1990.
- [10] Nagashima M., Azuma M., Noguchi S., Inuzuka K., Samejima H.: Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. and Bioeng.*, **26**, 1984, 992.
- [11] Ogbonna J.C., Amano Y., Nakamura K.: Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 1989, 92.
- [12] Ogbonna 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.
- [13] Olejnik A., Czaczek K.: Zastosowanie komórek immobilizowanych w przemyśle spożywczym, Cz. 1. Fermentacja etanolowa, *Przem. Spoż*, **52**, 1998, 39.
- [14] Rostkowska-Demner E.: Wpływ wybranych metod oksydacji biologicznej na skład i jakość win owocowych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa, 1996.
- [15] Rostkowska-Demner E., Wzorek W.: Próby zastosowania szkła piankowego jako nośnika drożdży w oksydacji biologicznej win owocowych. *Żywność*, **3 (20)**, 1999, 121.
- [16] Sroka W., Rzędowski W.: Rodzaje fermentorów stosowanych w procesach fermentacji z unieruchomionymi komórkami drobnoustrojów. *Przem. Ferment. i Owoc.-Warz.*, **35**, 1991, 13.



- [17] Sroka W., Rzędowski W.: Unieruchamianie drobnoustrojów - metody, rodzaje nośników oraz ich wpływ na właściwości komórek. *Przem. Ferment. i Owoc.-Warz.*, **35**, 1991, 8.
- [18] Wzorek W., Bugajewska A., Mateusiak S., Bonin S.: Wykorzystanie drożdży immobilizowanych na szkłe piankowym w ciągłej fermentacji winiarskiej. *Żywność*, **1 (21)**, 2000, 102.
- [19] Wzorek W., Pogorzelski E.: *Technologia winiarstwa gronowego i owocowego*. SIGMA-NOT, Warszawa, 1995-1998.

## LONG-LASTING, CONTINUOUS FERMENTATION BY YEAST CELLS IMMOBILIZED ON FOAM GLASS

### S u m m a r y

Long-lasting, continuous wine fermentation by yeast cells immobilized on foam glass was investigated. The fermentation was carried out for more than 4,5 months at 22°C. The medium was passed through 4 glass columns with the cubes of foam glass at a rate of 5–6 days. The steady state was maintained for more than 3 months and insignificant decrease of alcohol content was observed after this period. The negative changes in the sensoric quality of wine occurred in the 5th month of investigation. The decrease in the number of yeast cells per ml of medium in the columns and at the work time of fermentor was stated. The increase in number of non-viable yeast cells in the columns was observed too. Microscopic observation shows morphological changes of yeast cells after fermentation. This research has shown that process of continuous wine fermentation with yeast immobilized on foam glass can be conducted for 3–4 months. ☒