

SELECTION OF INDIGENOUS YEAST STRAINS ISOLATED FROM CV. GEWURZTRAMINER FROM ILOK WINEGROWING REGION
SELEKCIJA AUTOHTONIH SOJEVA KVASACA IZOLIRANIH SA CV. TRAMINAC MIRISAVI IZ ILOČKOG VINOGRJA

Dora DUJMOVIĆ¹, Katarina BABIĆ¹, Ana JEROMEL², Sulejman REDŽEPOVIĆ¹, Bernard KOZINA², Lucilla IACUMIN³, Sandi ORLIĆ^{1*}

¹Department of microbiology, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb, Croatia

²Department of viticulture and enology, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb, Croatia

³Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Udine, Via Marangoni 33, 33100 Udine, Italy

Corresponding author: Sandi ORLIĆ; +38512394034; +38512393881; e-mail: sorlic@agr.hr

Manuscript received: February 21, 2008; Reviewed: June 24, 2008; Accepted for publication: July 01, 2008.

ABSTRACT

A total of 36 indigenous strains belonging to the *Saccharomyces sensu stricto* complex isolated from the variety of Gewurztraminer from Ilok winegrowing region were tested with the purpose of making top-quality wines. Microfermentation was applied in order to examine the synthesis of ethyl alcohol and volatile acidity. Killer factor, synthesis of pectinase, β -glucosidase and H_2S was determined in isolated yeast strains. In the selection results, strains RO 1344, RO 1351, RO 1364 were the best evaluated and they should be examined in midifermentation.

Keywords: strain selection, wine, *Saccharomyces*, Gewurztraminer

SAŽETAK

Ukupno 36 autohtonih sojeva koji pripadaju skupini *Saccharomyces sensu stricto* izolirano je sa kultivara Traminac mirisavi iz Iločkog vinogroja sa svrhom primjene u proizvodnji vrhunskih vina. Nakon provedene mikrofermentacije određena je koncentracija alkohola i hlapivih kiselina u dobivenim vinima te mogućnost sinteze enzima pektinaze i β -glukozidaze, sinteze sumporovodika, te killer karakter kod izdvojenih sojeva kvasaca. Rezultatima selekcije bilo je moguće izdvojiti sojeve RO 1344, RO 1351 i RO 1364 koje bi trebalo ispitati u uvjetima podruma.

Ključne riječi: selekcija sojeva, vino, *Saccharomyces*, Traminac mirisavi

DETAILED ABSTRACT

Yeasts take part in numerous biochemical reactions during wine production. They are responsible for the biotransformation of the must sugar into alcohol, carbon dioxide and other odour wine components. Species of the genus *Saccharomyces* are responsible for the high-quality completion of the alcoholic fermentation. The main purpose of this research was the selection of the autochthonous yeast of the group *Saccharomyces sensu stricto* isolated from the variety of Gewurztraminer (Ilok winegrowing region) in laboratory conditions, with the purpose of making top-quality wines. Microfermentation was applied in order to examine the synthesis of ethyl alcohol and volatile acidity. Killer factor, synthesis of pectinase, β -glucosidase and H_2S was determined in isolated yeast strains. The results of this research have shown that concentration of alcohol varies from 5,7 vol% to 10,4 vol%. Volatile acidity varies from 0,18 g/L to 0,98 g/L. The possibility of synthesis of pectinase was tested on medium with (G+) and without (G-) glucose. Twelve strains were positive, and 24 negative on the G+ medium. 4 strains were positive, and 32 strains negative on the G- medium. The results of the possibility of the synthesis of β -glucosidase have shown that only 3 strains of yeasts gave positive results (RO 1332, RO 1339, RO 1372), while others were negative. All yeast strains synthesised H_2S but in different quantities, and the results of testing killer character have shown that all yeast strains have a negative killer character. In the selection results, strains RO 1344, RO 1351, RO 1364 were the best evaluated and they should be examined in midfermentation.

UVOD

Povijest vinarstva, a samim time i alkoholna fermentacija, paralelna je s poviješću civilizacije. Alkoholna fermentacija predstavlja složeni biokemijski proces u kojem sudjeluju različite vrste kvasaca, bakterija i gljiva. Kvasci su glavni nosioci tog procesa, a u prvom redu to je rod *Saccharomyces*, koji je jedini odgovoran za kvalitetan dovršetak alkoholne fermentacije [8]. Njegove glavne odlike su: 1) sposobnost brze i efikasne fermentacije moštova s viskom koncentracijom šećera; 2) otpornost na visoke koncentracije etanola i SO_2 ; 3) preživljavanje tijekom fermentacije na visokim temperaturama [3].

Spontana alkoholna fermentacija je često, zbog nekontroliranih uvijeta, dovela do nezadovoljavajućih organoleptičkih rezultata (manjak ili višak kiselina, pojava neharmoničnosti spojeva, početak neželjene malolaktične ili octene fermentacije itd.) [8, 5]. Sredinom 60-tih godina 20. stoljeća na tržištu su se pojavili prvi preparati suhih aktivnih kvasaca koje je tržište uvelike prihvatilo.

Stalnom uporabom navedenih selekcioniranih kvasaca sa tržišta dolazi do gubitka autohtone populacije kvasaca. Uz to, kvasac koji ne potječe iz određenog proizvodnog područja iz kojeg potječe vino, ne može fermentacijom stvoriti vrhunsko vino, iako je mošt izvanredne kvalitete [11, 2, 12].

Traminac mirisavi iz Iloka je jedno od naših najpoznatijih bijelih vina i u cilju poboljšanja njegove kakvoće u ovom radu izvršena je selekcija u laboratorijskim uvjetima različitih sojeva vrste *Saccharomyces sensu stricto*.

MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Korišteni sojevi

Sojevi kvasaca korišteni u ovom pokusu izolirani su sa sorte Traminac mirisavi crveni na području Iloka tijekom berbe 2002 godine. Kvasci su izolirani iz različitih faza spontane fermentacije uzoraka grožđa koji su dopremljeni u Zavod za mikrobiologiju. Spontane fermentacije izvršene su u sterilnim posudama i uzorkovanje mošta u fermentaciji za izolaciju kultura izvršeno je 3, 10 i 15 dan. Kulture su čuvane su na podlozi malt agara (Biolife italiana, Milano, Italija) na temperaturi $+4^{\circ}C$ i na $-70^{\circ}C$. Kvasci su dio zbirke mikroorganizama koja pripada Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi korišteni u ovom istraživanju nalaze se u tablici br. 1.

Identifikacija kvasaca

Identifikacija kvasaca izvršena je metodom predloženoj od Cavazza et al. (1992) [1]. Metoda se zasniva na rasta kolonija mikroorganizama na WL nutrient agaru (Oxoid, Velika Britanija). Na toj podlozi kolonije *Saccharomyces sensu stricto* imaju karakterističnu svijetlo zelenu boju. Radi potvrđivanja te identifikacije, kolonije kvasaca su premještene na Lysine medium (Oxoid, Velika Britanija) na kojoj se kvasac *Saccharomyces sensu stricto* ne razvija jer nema mogućnost asimilacije tog izvora dušika.

Pokusi mikrofermentacija u laboratoriju

Sojevima *Saccharomyces sensu stricto* testirane su enološke karakteristike u pasteriziranom moštu (šećer $75^{\circ}Oe$; ukupne kiseline 4,45g/L) po metodom predloženoj od Orlić et al. [5]. Pasterizacija je izvršena u trajanju od 30 minuta na $100^{\circ}C$. Inokulacija je izvršena s 10^6 CFU u bočice od 150 mL pasteriziranog mošta. Tijekom fermentacije bočice se održavaju na konstantnoj temperaturi od $18^{\circ}C$ i svakodnevno se vrši njihova izvaga. Gubitak mase definira se kao oslobođeni CO_2 u 150ml/danu. Kada masa bočice postane konstantna to se označava kao kraj fermentacije. Brzina fermentacije se označava kao grami oslobođenog CO_2 tijekom 3 ($\Delta 3$) ili 6 ($\Delta 6$) dana.

Određivnje egzocelularne sinteze enzima

Sinteza egzocelularnih enzima izvršena je po metodi predloženoj od Orlić et al. [6]. Ukratko: pektinazna aktivnost određena je na poligalakutronsom agaru s rutecijskim crvenilom kao indikatorom. Kvasci koji su sintetizirali pektinaze su odbojavali agar. β -glukozidazna aktivnost je određivana na selektivnom mediju s arbutinom amonij-željezo citratom. Kvasci kod kojih je utvrđena ova enzimatska aktivnost također su odbojavali medij. Sinteza sumporovodika je određivna na Biggy agaru (Difco, SAD).

Određivanje killer karaktera fiziološkom metodom

Određivanje killer karaktera izvršeno je po metodi predloženoj od Orlić et al. [7]. Ukratko: sojevi 1080 (killer negativan) i 1079 (killer pozitivan) dobiveni su od G.A. Farris (Sassari, Italija) i bili su upotrebljeni kao kontrolni sojevi. Zone inhibicije bile su određene na YEPG agaru (1% kvasni ekstrakt, 1% pepton, 2 % glukoze i 1,5% agara) pH 4.5. Očitavanje rezultata je izvršeno nakon 48 sati na 25°C.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju ispitano je 36 sojeva kvasaca *Saccharomyces sensu stricto* izoliranih s kultura Traminac mirisavi crveni iz Iloka. Ispitane su sljedeće karakteristike: praćenje brzine fermentacije, stvaranje alkohola, stvaranje hlapive kiseline, sinteza egzocelularnih enzima (β -glukozidaze i pektinaze), sinteza sumporovodika, te određivanje killer karaktera.

Mikrofermentacije u laboratorijskim uvjetima

Rezultati mikrofermentacija provedenih u laboratorijskim uvjetima (brzina fermentacije, stvaranje alkohola te stvaranje hlapive kiseline) prikazani su u tablici 1.

Brzina fermentacije

Kao što je vidljivo u tablici 1. pet izolata (RO 1363, 1364, 1369, 1370 i 1372) su u prva tri dana mikrofermentacija imali vrijednost brzine fermentacije iznad 5,00 g/danu, a naredna 3 dana vrijednosti su im bile oko 3,00 g/danu. Svi izolati su u prva 3 dana mikrofermentacija imali vrijednost brzine fermentacije iznad 3,00 g/danu što su visoke vrijednosti [11, 5]. Rezultati pokazuju da navedeni sojevi imaju sposobnost da se brzo razmnožavaju i preuzmu tijekom alkoholne fermentacije. Najveća vrijednost je zabilježena kod soja RO 1363.

Stvaranje alkohola

Koncentracija etanola varirala je od 5,70 vol% do 10,40 vol%. Najveću koncentraciju etanola stvorio je soj RO 1351, a najmanju soj RO 1332. Kod vina fermentiranih sa sojevima koji su imali najviše vrijednosti brzine fermentacije zabilježene su i najviše koncentracije

etanola [5].

Stvaranje hlapive kiseline

Hlapiva kiselost varirala je od 0,18g/L do 0,98 g/L. Najmanju količinu proizveo je soj RO 1332, a najveću RO 1371. Hlapiva kiselost, izražena kao octena kiselina, je izrazito nepovoljno svojstvo i različiti sojevi *S.cerevisiae* obično sintetiziraju 0,3-0,8 g/L [5]. Prema Pravilniku o vinu, vina koja imaju oznaku kontroliranog podrijetla ne smiju sadržavati preko 1 g/l hlapive kiseline te je pozitivno da niti jedan izolat nije sintetizirao tako visoke koncentracije.

Sinteza pektinaze

Pektinaze se vrlo često upotrebljavaju u industriji s ciljem razgradnje pektina. U vinarstvu se često upotrebljavaju tijekom taloženja mošta te je poželjno tijekom selekcije kvasaca utvrditi kvaševu pektinolitičku aktivnost. Rezultati su očitani nakon inkubacije od 5 dana na 30°C. Na podlogama G+ i G- pozitivni su sojevi RO 1332, RO 1363 i RO 1372. Sojevi koji su na G+ podlozi pozitivni, a na G- podlozi negativni su RO 1333, RO 1334, RO 1339, RO 1346, RO 1351, RO 1360, RO 1361, RO 1364 i RO 1373. Soj RO 1371 jedini je negativan na G+ i pozitivan na G- podlozi. Svi ostali sojevi su negativni na obje podloge (64%). Slične smo rezultate dobili i u našim prijašnjim istraživanjima [5, 6].

Sinteza β -glukozidaze

Rezultati su očitani nakon 4 dana inkubacije kvasaca precijepljenih na podlogu za dokazivanje β -glukozidaze, na 30°C. Pozitivnu reakciju su pokazali sojevi RO 1332, RO 1339 i RO 1372 (8%). Kod svih ostalih sojeva nije utvrđena ova enzimatska aktivnost. β -glukozidazna aktivnost je vrlo rijetko svojstvo kod sojeva *S.cerevisiae* [6]. Navedeno je svojstvo vrlo poželjno jer β -glukozidaze sudjeluju u oslobađanju terpena koji imaju presudnu ulogu u formiranju arome vina Traminac.

Sinteza sumporovodika

Kvasci precijepljeni na podlogu za dokazivanje sinteze sumporovodika bili su na inkubaciji 24 sata na 30°C. Utvrđeno je da svi sojevi imaju sposobnost sinteze sumporovodika, te su prema nijansi smeđe boje podijeljeni u 3 skupine: slabo pozitivne (1), srednje pozitivne (2) i jače pozitivne (3). Rezultati su prikazani u tablici 1. Slabo pozitivnih bilo je 8% izolata, srednje pozitivnih 42%, a najviše 50% je bilo je jače pozitivnih. Sinteza sumporovodika tijekom alkoholne fermentacije je normalni proces, i samo oko 1,1% populacije *S.cerevisiae* nema tu sposobnost [6]. Navedeni spoj je vrlo štetan za kakvoću vina. Veću pažnju tijekom selekcije kvasaca trebalo bi posvetiti sojevima koji sintetiziraju manje koncentracije sumporovodika.

Table 1: Results of microfermentation and H₂S synthesis
 Tablica 1: Rezultati mikrofermentacija i sinteze H₂S – a

Soj/Strain	Δ3 (g/dan) (g/day)	Δ6 (g/dan) (g/day)	vol% etanola vol% ethanol	Hlapiva kiselost g/L Volatile acidity g/L	H ₂ S reakcija H ₂ S reaction
RO 1332	4,57	2,97	5.70	0.18	3
RO 1333	3,65	2,91	9.85	0.60	2
RO 1334	3,51	2,88	9.35	0.50	3
RO 1335	4,31	2,91	9.20	0.72	2
RO 1338	4,19	2,93	7.50	0.45	1
RO 1339	3,29	2,71	9.70	0,71	3
RO 1340	4,16	2,97	10.00	0.66	2
RO 1342	4,62	2,95	9.85	0.48	1
RO 1343	3,63	2,83	9.50	0.42	2
RO 1344	4,49	2,92	10.20	0.36	2
RO 1345	3,68	2,87	9.85	0.65	2
RO 1346	4,26	2,98	7.87	0.93	3
RO 1347	3,95	2,92	9.15	0.46	2
RO 1348	4,36	2,96	8.45	0.32	2
RO 1349	3,83	2,93	9.85	0.58	2
RO 1351	4,60	3,00	10.40	0.16	3
RO 1352	4,20	2,98	7.86	0.68	3
RO 1353	4,90	2,99	6.42	0.46	3
RO 1354	4,78	3,00	9.70	0.56	3
RO 1355	4,23	2,92	9.35	0.44	3
RO 1360	3,42	2,83	7.80	0.65	3
RO 1361	4,38	2,95	10.00	0.84	3
RO 1362	4,47	2,97	8.65	0.86	2
RO 1363	5,31	3,13	9.31	0.58	3
RO 1364	5,22	3,10	10.22	0.26	3
RO 1365	4,71	3,01	8.71	0.12	2
RO 1366	4,83	3,07	9.83	0.38	2
RO 1367	4,77	3,00	7.77	0.78	3
RO 1368	4,76	3,11	8.76	0.44	3
RO 1369	5,17	3,06	10.17	0.34	1
RO 1370	5,09	3,09	10.09	0.44	2
RO 1371	3,90	2,97	6.90	0.98	3
RO 1372	5,23	3,10	8.23	0.56	3
RO 1373	4,73	3,07	9.73	0.56	2
RO 1374	4,71	2,97	9.71	0.68	2
RO 1375	3,88	2,96	8.88	0.88	3

izražena kao g/L octene kiseline (as acetic acid g/L)

Killer kakrater

Killer kakrateristika predstavlja svojstvo *S.cerevisiae* da izlučuje killer protein koji ubija osjetljive sojeve kvasaca [7]. Rezultati su očitani nakon 2 dana inkubacije kvasaca precijepljenih na podlogu za dokazivanje killer karaktera. Utvrđeno je da niti jedan kvasac nije bio killer pozitivan, budući da niti oko niti jednog soja nije utvrđena zona inhibicije. Iz toga proizlazi da niti jedan soj od ispitivanih nema svojstvo sinteze killer toksina.

RASPRAVA

Uporaba selekcioniranih sojeva kvasaca dovela je do značajnijeg pomaka u tehnologiji vina [4]. Cilj je industrije vina uvijek bio usmjeren prema selekciji novih sojeva kvasaca s ciljem poboljšanja tehnoloških procesa tijekom proizvodnje (npr. fermentacije na nižim temperaturama, brzina fermentacije...) te kakvoće vina (sinteza egzocelularnih enzima, stvaranje octene

kiseline...) [9].

Ovo istraživanje predstavlja prvo preliminarno istraživanje selekcije sojeva *Saccharomyces sensu stricto* izoliranih s područja Iloka, čuvenog Traminca mirisavog. Svi ispitivani sojevi imali su vrlo visoke vrijednosti brzine fermentacije i nakon 3 odnosno 6 dana što je značajno za kvalitetan i brz početak fermentacije [5, 11]. Uočene značajne razlike u koncentraciji etanola i kiselosti utvrđene su i u našim prijašnjem istraživanju [5] te se objašnjavaju metabolizmom različitih sojeva [2, 11, 12] koji dovodi do različitih produkata fermentacije. Na osnovi kemijskih parametara (koncentracija etanola i hlapive kiselosti) možemo izdvojiti sojeve RO 1344, RO 1351 i RO 1364. Budući da je Traminac mirisavi izrazito aromatska sorta, vrlo je značajno bilo utvrditi da li neki sojevi koji imaju pozitivne enološke karakteristike sintetiziraju i enzime, naročito β -glukozidaze. Sva tri izabrana soja sintetiziraju pektinazu, ali ne i β -glukozidazu. Osim toga, navedeni sojevi sintetiziraju veće koncentracije sumporovodika, što u svakom slučaju nije pozitivno svojstvo. Odabrane sojeve kvasaca nužno je detaljnije ispitivati u midi i makrovinkacijama, kako bi se utvrdio njihov utjecaj na vino u vinariji.

POPIS LITERATURE

- [1] Cavazza, A., Grando, M.S., Zini, C., Rilevazione della flora microbica di mosti e vini, *Vignevini* (1992) 9: 17-20.
- [2] Comi G., Maifreni M., Manzano M., Lagazio C., Coccolin L., Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of oenological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of wine producing area of Collio (Italy), *Int. J. Food Microbiol.* (2000) 58: 117-121.
- [3] Kunkee, R.E., Bisson, L.F.: Wine-making yeast, *The Yeast* vol. 5, Academic Press, London, 1993.
- [4] Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sangorrin, M., Querol, A., Caballero, A. C., Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 34(8): 539-46.
- [5] Orlić S., Očić N., Jeromel A., Huić K., Redžepović S., Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale, *Agri. Cons. Scien.* (2005) 70(3): 87-91.
- [6] Orlić, S., Huić, K., Urlić, B., Redžepović, S., Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *Saccharomyces* wine yeasts isolated from Croatian vineyards, *Periodicum biologorum.* (2007) 109 (2): 201-204.
- [7] Orlić, S., Pogačić, M., Jeromel, A., Karoglan, M., Kozina, B., Iacumin, L., Redžepović, S., Determination of killer character of wine yeast isolated from Istra, *J. Cen. Eur. Agri.* (2008) in press
- [8] Pretorius, I.S., Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast* (2000) 16: 675-729.
- [9] Rainieri S., Pretorius I.S., Selection and improvement of wine yeasts, *Annals of Microbiol.* (2000) 50: 15-31.
- [10] Romano P., Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentation, *Food Technol. Biotechnol.* (1997) 35: 255-260.
- [11] Romano P., Monteleone E., Paraggio M., Marchese R., Caporale G., Carlucci A., A methodological approach to the selection of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains, *Food Technol. Biotechnol.* (1998) 36: 67-74.
- [12] Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A., Function of yeast species and strains in wine flavour, *Int. J. Food Microbiol.* (2003) 86: 169-180.

