PRESLIA 1957
29: 269—277

Anna Kocková-Kratochvílová a Ľudevít Drobnica:

Roztřídění vinných kvasinek

(Katedra technické mikrobiologie a biochemie chemické fakulty Slovenské vysoké školy technické v Bratislavě)

Už v dřívějších pracích jsme se zabývali vztahem mezi morfologickými a fysiologickými vlastnostmi pivovarských kvasinek (Kocková-Kratochvílová, Vavruchová, Nováková 1951) a kvasinek skupiny „cerevisiae" a „carlsbergensis" (Kocková-Kratochvílová a Nečásek 1952). Zjistili jsme, že velký počet kmenů pivovarských kvasinek lze seřadit podle průměrných délek a šířek jejich buněk a podle tvarové vyrovnanosti do skupin, které se navzájem odlišují také vlastnostmi fysiologickými, jako je na př. hloubka prokvašení, aglutinace, množivá energie a pod., a také délkou doby života schopnosti kmenů. U vinných kvasinek jsme také pozorovali, že déle vydrží při životě kmeny zalité sterilním parafinovým olejem, které mají různotvárnější buňky a větší sklon k tvoření pseudomycelia (obr. 1, 2, 3). Proto jsme se pokusili o roztřídění většího počtu čistých kultur vinných kvasinek do morfologických skupin a sledovali jsme také některé vlastnosti fysiologické.

Použitý materiál a methody

1. Původ použitých kmenů

V1 a V2 dodal Dr Řach,
V3—V8 dodal doc. Hampl,
V9 dodal Dr Salač (původně pivovarská kvasinka),
V10 původem z USA,
V11 původem z Kodaně,
V12 původem z Vysoké školy zemědělské v Praze,
V13—V35 z Výzkumného ústavu pro ovoce a zeleninu v Praze,
V36—V40 z Kvasného priemyslu v Trenčíně,
V41—V43, V48, V49, V59—V61, V64—V86 dodal Výskumný ústav pre vinárstvo a vinohradníctvo v Bratislavě,
V44—V47, V50—V58, V62 a V63 původem z Výzkumného ústavu ampelologického v Budapešti.

Kmeny z Výskumného ústavu pre vinárstvo a vinohradníctvo v Bratislavě byly čerstvě isolovány z vinných hroznů, ostatní kmeny zde uvedené byly déle pěstovány ve sbírce. Proto při třídění jsme čerstvě isolované bratislavské kmeny vedli odděleně. Tyto kmeny jsme obdrželi bez bližší identifikace jako „vinné" kvasinky a jejich bližším popisem a zařaděním se zabýváme v další práci.

2. Použité živné půdy

Hroznový mošt (redukující cukry 12,78 g/100 ml, celkový dusík 0,054 g/100 ml, dusík aminokyselin 0,0196 g/100 ml, celkové kyseliny 0,776 g/100 ml jako kyselina jablečná, těkavé kyseliny 0,0099 g/100 ml jako kyselina octová, netěkavé kyseliny 0,7661 g/100 ml jako kyselina jablečná, pH 3,5, extrakt 17,5 %, spec. váha 1,066, povrchové napětí 67,08 dyn/cm, popel 0,62 g/100 ml). Sladina (8 % váh. extraktu, světlá, pH 4,8).

3. Příprava kmenů k měření

Kmeny byly přeočkovány na jednotný moštový agar a inkubovány 3 dny při 25 °C. K vlastnímu měření byla použita jednotná sladina, abychom mohli vzájemně porovnávat i ostatní technické kvasinky, které jsme v současné době posuzovali. Měření jsme prováděli po třech a po deseti dnech. Kultury vinných kvasinek se totiž na sladině vyvíjejí pozvolna. Abychom zjistili, v jakém stadiu růstové křivky se kultura třetího dne nacházela, zařadili jsme ještě měření po deseti dnech.

4. Stanovení rozměrů

Rozměry 100 buněk byly měřeny okulárovým mikrometrem tak, jako v předešlých pracích (1951, 1952, 1955). Ze získaných hodnot byl vypočten aritmetický průměr a střední chyba, délkošířkový korelační koeficient, jako znak charakterisující tvarovou vyrovnanost, poměr šířky k délce a rozdíly v aritmetických průměrech byly podle potřeby hodnoceny t-testem na průkaznost.

5. Stanovení odolnosti vůči alkoholu

Odolnost kmenů vůči alkoholu jsme posuzovali v moště s rozličnou koncentrací etanolu: 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 % a 18 % obj. Po třech a po sedmi dnech jsme stanovili celkový počet buněk a také počet mrtvých buněk podle vybarvení 0,01 % methylenovou modří, pufrovanou na pH 4,6. První koncentraci alkoholu, která způsobila 100% úmrtnost jsme brali jako charakteristickou pro orientační posouzení. Podrobněji jsme výsledky vyjadřovali procenty etanolu, při kterém byly v prostředí nalezeny ještě živé buňky, a procentem etanolu, při kterém bylo přítomno 20 ± 5 % živých buněk.

6. Posouzení množivé energie a množivé schopnosti

Množivá energie (ME) a množivá schopnost (MS) vyjadřující kolikrát se buňky rozmnožily za dobu 3 dnů a za dobu 7 dnů od naočkování. Pěstovány byly v hroznovém moště při teplotě 25 °C.

7. Posouzení životaschopnosti kultur

Kultury staré tři dny byly přeočkovány na sladinový a moštový agar. Po třech dnech inkubace při 25 °C byly převrstveny sterilním parafinovým olejem. Po roce byly odtud přeočkovány na sladinový agar a bylo zjišťováno, zda ještě zachovaly schopnost se rozmnožovat.

Výsledky pokusů

A. Roztřídění kmenů vinných kvasinek do morfologických skupin

Podle délkošířkového poměru a průměrného délkošířkového korelačního koeficientu se dají zkoumané kmeny vinných kvasinek rozdělit do tří skupin:

I. Kulaté kvasinky

Délkošířkový poměr od 1,0—1,1, průměrný délkošířkový korelační koeficient 0,84

Délka v μ	r	Číslo kmene	Charakteristika
5,09	0,75	V10	USA-Louisville
5,17	0,92	V62	Tokaj 7
5,25	0,88	V52	Tokaj 19
5,36	0,82	V58	Johannisberg
5,40	0,71	V49	Oporto
5,51	0,97	V47	Tokaj 4
5,64	0,88	V3	Sherry
5,72	0,82	V11	Bourgogne-Dánsko
5,88	0,96	V26	Sherry
6,08	0,79	V4	Malaga
6,13	0,74	V41	Madeira
6,17	0,68	V51	Eger 2
6,21	0,90	V13	Malaga
6,29	0,64	V35	Malaga

II. Oválné kvasinky

Délkošířkový poměr od 1,1—1,3, průměrný korelační koeficient, r = 0,59 až 0,64.

a) Kratší

Průměrný korelační koeficient, r = 0,59

Délka v μ	r	Číslo kmene	Charakteristika
5,32	0,66	V24	Bourgogne
5,56	0,59	V28	Alžír
5,56	0,49	V12	Mělník
5,65	0,34	V23	Mělník-Bourgogne
5,67	0,49	V31	Mělník-Bourgogne
5,82	0,58	V53	Eger 1
5,98	0,42	V15	Mělník
5,99	0,42	V54	Chablis B
5,99	0,91	V17	Wimmingen
6,08	0,97	V61	Steinberg
6,10	0,57	V27	Wimmingen
6,18	0,38	V16	Mělník-Bourgogne

b) Delší

Průměrný korelační koeficient, r = 0,64

Délka v μ	r	Číslo kmene	Charakteristika
6,24	0,75	V56	Badacsony
6,36	0,70	V57	Tokaj 12
6,40	0,54	V38	Sherry-Berlin
6,47	0,62	V18	Champagne
6,64	0,61	V8	Neurokop
6,74	0,70	V55	Sauterne

III. Dlouze oválné kvasinky

Délkošířkový poměr 1,3 — výše, průměrný délkošířkový korelační koeficient, r = 0,44.

Délka v μ	r	Číslo kmene	Charakteristika
5,41	0,89	V21	Bourgogne
5,83	0,67	V59	Herrliberg
6,28	0,23	V40	Portugalské (?)
6,45	0,43	V5	Champagne
6,50	0,54	V7	Bordeaux
6,69	0,24	V20	Champagne
6,99	0,28	V19	kmen 4
7,16	0,19	V42	Valé d'Auge
7,31	0,43	V43	Valé d'Auge
8,06	0,61	V22	Champagne
8,27	0,23	V32	Malaga Cg
8,37	0,53	V9	Melitoferment
8,64	0,37	V30	Champagne
10,50	0,26	V33	Champagne

Z uvedeného přehledu se už jeví vztah tvarových vlastností k vlastnostem funkčním. Tak na př. v první skupině, kde jsou kultury typicky kulaté, jsou hlavně kmeny isolované z těžkých vín s vyšším obsahem alkoholu. Krátce oválné kmeny ze skupiny druhé jsou isolované většinou ze stolních vín a dlouze oválné kmeny třetí skupiny z vín šumivých jako dokvášející. Druhá skupina *b* tvoří přechod mezi první a třetí.

Kmeny čerstvě isolované M i n á r i k e m (1955) z bobulí vinných hroznů jsme posoudili odděleně. Jevily větší tvarovou různorodost. Objevily se v prvních dvou skupinách, skupina třetí zde nebyla zastoupena.

I. skupina

Délka v μ	r	Číslo kmene	Původ
4,92	0,87	V48	Veltlín zelený (Bratislava 1)
5,20	0,98	V60	Bratislava 0 (5 RP)
5,38	0,68	V71	Sv. Jur 1
5,65	0,71	V72	Sv. Jur 2
5,90	0,84	V75	Myslenice 1

II. skupina *a*

Délka v μ	r	Číslo kmene	Původ
5,12	0,44	V66	Radošiná 2
5,66	0,85	V65	Radošiná 1
6,13	0,79	V67	Bratislava 2

II. skupina *b*

Délka v μ	r	Číslo kmene	Původ
6,30	0,82	V83	Bohatá
6,38	0,64	V79	Topoľčianky 4
6,57	0,76	V81	Komárno 5
6,58	0,82	V77	Želiezovce 3
6,63	0,79	V70	Malá Tŕňa 3
6,69	0,85	V69	Topoľčianky 1
6,82	0,82	V80	Viničky 2

B. F y s i o l o g i c k é v l a s t n o s t i k m e n ů v i n n ý c h k v a s i n e k

Přehled odolnosti kmenů vůči alkoholu, množivá energie, množivé schopnosti a jejich rozdíly:

I. morfologická skupina

Číslo kmene	% alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	% alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	ME	MS	Rozdíl
V10	12	12	10,5	18,1	7,6
V62	16	16	8,8	12,	3,2
V52	12	12	15,3	22,1	6,8
V58	10	10	9,9	10,9	1
V49	12	12	11,5	16,6	5,1
V47	14	14	9,0	11,3	2,3
V3	18	16	11,7	11,3	0,6
V11	12	12	13,9	16,1	2,2
V26	14	14	15,9	17,3	1,4
V4	12	12	13,2	14,4	1,2
V41	16	16	12,2	16,9	4,7
V51	12	12	7,4	10,4	3
V13	14	14	11,5	12,6	1,1
V35	16	16	10,2	10,5	0,3
Průměr	13,5	13,4			3,3

IIa. morfologická skupina

Číslo kmene	% alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	% alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	ME	MS	Rozdíl
V24	16	14	12	13,6	1,6
V28	16	16	9,9	11,1	1,2
V12	16	12	15,4	21,6	6,2
V23	16	14	9,1	10,0	0,9
V31	16	14	7,6	11	3,4
V53	16	16	13,1	16,5	3,4
V15	14	14	12,5	20,2	7,7
V54	16	14	12,8	17,6	4,8
V17	16	16	14,7	21,4	6,7
V61	16	16	10,4	12,2	1,8
V27	16	14	16,1	20	3,9
V16	14	14	12,3	13,2	0,9
Průměr	15,7	14,5			3,5

IIb. morfologická skupina

Číslo kmene	% alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	% alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	ME	MS	Rozdíl
V56	18	18	13,2	17,5	4,4
V57	14	14	15	26,8	11,8
V38	16	14	12,1	14,3	2,2
V18	16	16	12,1	18,5	6,4
V8	12	12	12,4	18,9	6,5
V55	18	16	15	19,3	4,3
Průměr	15,6	15			5,9

III. morfologická skupina

Číslo kmene	% alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	% alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	ME	MS	Rozdíl
V21	12	12	15,8	19,2	3,4
V59	12	12	38,9	56	17
V40	18	18	13,3	21,6	6,3
V5	16	16	28	33,8	5,8
V7	18	16	14,43	22	7,57
V20	18	18	9,1	16,6	7,5
V19	14	14	5,67	6,07	0,4
V42	16	16	37	48	11
V43	18	18	8,23	9,01	0,78
V22	18	16	12	16,84	4,84
V32	18	18	6,57	9,27	2,7
V9	18	18	16,44	25,77	9,23
V30	12	12	9,15	13,4	4,25
V33	16	16	7,55	14,48	6,93
Průměr	16	15,7			5,8

U těchto starších kmenů se ukázalo, že průměrné procento alkoholu, při kterém jsme nalezli v moště ještě živé buňky, stoupá od první k třetí morfologické skupině. Podobně stoupá procento alkoholu, při němž bylo v kultuře nalezeno ještě 20 ± 5 % živých buněk.

	I. skupina	IIa. skupina	IIb. skupina	III. skupina
Procenta alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	13,5 %	15,7 %	15,6 %	16 %
Procenta alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	13,5 %	14,5 %	15 %	15,7 %

tímto směrem přibývá kmenům vlastnosti dokvášet

tímto směrem přibývá kmenům vlastnosti odolávat vyšší koncentraci cukru a hlouběji prokvášet.

Množení kultur jsme posuzovali rozdílem mezi množivou schopností a množivou energií. Ukázalo se, že tento rozdíl klesá, čím jsou kmeny schopny hlouběji prokvášet a naopak vzrůstá, čím mají větší schopnost dokvášet. Čím je tento rozdíl větší, tím obyčejně zbývá více nezkvašeného extraktu po hlavním kvašení. Tento může sloužit k dokvašování, nebo může být také vhodným zdrojem bakteriální infekce.

Přehled fysiologických vlastností čerstvě isolovaných kmenů:

Číslo kmene	% alkoholu, kde jsou ještě živé buňky	% alkoholu, kde je ještě 20 ± 5 % živých buněk	ME	MS	Rozdíl
I. skupina					
V48	14	14	9,6	11,6	2
V60	14	14	8,4	10	1,6
V71	16	14	23,25	25,57	2,32
V72	18	18	9,46	10,02	0,56
V75	14	14	4,96	5,38	0,42
Průměr	15,2	15			1,4
IIa. skupina					
V66	16	14	14	15,33	1,33
V65	16	14	9,31	10	0,69
V67	16	14	11,1	14,17	3,07
Průměr	16	14			1,69
IIb. skupina					
V83	16	16	10,9	11,4	0,49
V79	12	12	4,59	4,81	0,22
V81	16	16	7,9	8,1	0,2
V77	18	18	14,33	17	2,67
V70	16	16	15,62	19	3,38
V69	16	14	23,42	26,65	3,23
V80	18	16	26,29	28,51	2,22
Průměr	16	15,4			1,8

Z právě uvedeného přehledu plyne, že kmeny čerstvě isolované z přírody jeví méně odlišné vlastnosti navzájem, že mají také větší schopnost hlouběji prokvášet a snášet vyšší koncentrace cukru.

Souhrn výsledků

1. Podle poměru šířky k délce buněk a podle tvarové vyrovnanosti kultur lze rozdělit vinné kvasinky do tří morfologických skupin: I. s buňkami kulatými, II. s buňkami středně oválnými a III. s buňkami protáhlejšími. Kva-

sinky první skupiny byly isolovány převážně z těžkých vín, kvasinky druhé skupiny z vín stolních a kvasinky třetí skupiny z vín šumivých.

2. Morfologické skupiny se také odrážejí ve způsobu, jak odolávají vyššímu procentu alkoholu v prostředí. Ukázalo se, že kmeny kulaté odolávají lépe bohatě cukernatým moštům a hlouběji je prokvášejí, zatím co kvasinky protáhlé jsou schopny lépe dokvašovat.

3. Kvasinky čerstvě isolované z vinohradu nemají vlastnosti ani tvarově, ani fysiologicky specificky vyhraněné, mají větší sklon hlouběji prokvášet. Zapadají do skupiny první a druhé. Zdá se, že skupina třetí vznikla více méně umělým vyselektováním.

4. Třetí skupina s buňkami protáhlejšími a tvarově málo vyrovnanými odolává lépe nepříznivým podmínkám konservace kmenů pod vrstvou parafinového oleje. Ukazuje se tu zřetelně zachovaný úkol pseudomycelia.

Došlo: 20. IV. 1956

Text k tab. XVIII.

1 — kvasinky první morfologické skupiny rok pod parafinovým olejem. Fázový kontrast.
2 — kvasinky druhé morfologické skupiny rok pod parafinovým olejem. Fázový kontrast.
3 — kvasinky třetí morfologické skupiny rok pod parafinovým olejem. Vytvořilo se zřetelně pseudomycelium. Fázový kontrast. (Foto Kutková.)

Literatura

Kocková-Kratochvílová, A., Vavruchová, A., Nováková, D. (1951): Význam správného pěstování technických mikroorganismů. Průmysl potravin 3 : 305—312.
Kocková-Kratochvílová, A., Nečásek, J. (1952): Zur Frage der Bestimmung der Hefearten nach ihrer Zellengrösse. Mikroskopie 7 : 8—17.
Minárik, E. (1955): Selekcia vinných kvasiniek. Práce Výskumného ústavu pre vihohradníctvo a vinárstvo v Bratislave. Vyd. Slov. akad. vied, str. 303—323.

А. Коцкова-Кратохвилова и Л. Дробница:

Классификация винных дрожжей

1. Согласно отношению ширины и длины клеток и согласно выравниванию форм культур можно разделить винные дрожжи на триморфологические группы: I — с клетками круглыми, II — с клетками полуовальными и III — с клетками продолговатыми. Дрожжи первой группы изолировались преимущественно из тяжелых вин, дрожжи второй группы из столовых вин, а дрожжи третьей группы из вин шипучих.

2. Морфологические группы отличаются также способом сопротивления к более высокому проценту алкоголя в среде. Оказалось, что штаммы круглой формы более устойчивы к богато сахаристым суслам и глубже их проквашивают, тогда как дрожжи продолговатые обладают способностью лучше доквашивать.

3. Свежие дрожжи, изолированные из винограда, не имеют свойств, ни к образованию форм, ни к физиологически специфической отчетливости, нообладают большей способностью глубоко проквашивать. Они могут быть причислены как к первой, так и к второй группам. Третья же группа, по всей вероятности, возникла более или менее искусственной селекцией.

4. Третья группа с клетками продолговатыми с формой маловыравненной более устойчивы к неблагоприятным условиям консервации штаммов под слоем парафинового масла. В данном случае ясно видна защитная задача псевдомицелия.

A. Kocková-Kratochvílová und L. Drobnica:

Einteilung der Weinhefen

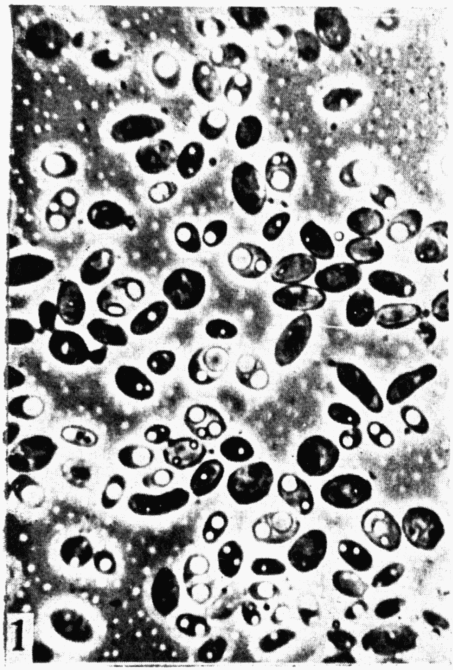
1. Nach dem Verhältnis der Breite zur Länge und nach dem Korrelationskoeffizient der Breite und Länge der Zellen können wir die Weinhefen in drei morphologische Gruppen einteilen:

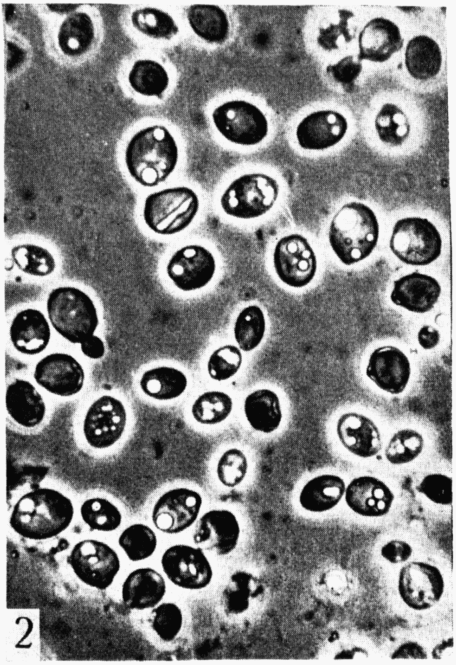
I. Gruppe mit runden Zellen, II. Gruppe mit mittelovalen Zellen und III. Gruppe mit länglichen Zellen. Die Hefe der ersten Gruppe wurde hauptsächlich aus schweren Weinen isoliert, die Hefe der zweiten Gruppe aus Tischweinen und die Hefe der dritten Gruppe aus Schaumweinen.

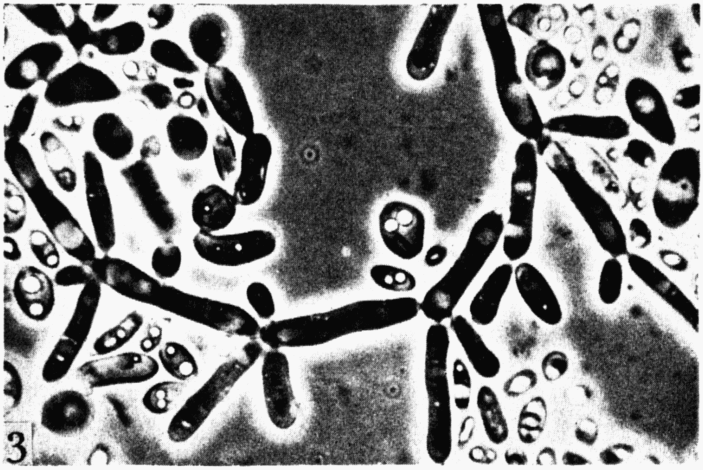
2. Der Einteilung in morphologische Gruppen entspricht auch die Art der Resistenz gegen einen höheren Alkoholgrad im Substrat. Es zeigte sich, dass die runden Stämme den zuckerreichen Mosten besser widerstehen und sie tiefer durchgären, die länglichen Hefen dagegen sind im Stande besser nachzugären.

3. Die aus dem Weingarten frisch isolierten Hefen besitzen weder der Form nach noch physiologisch spezifisch abgegrenzte Eigenschaften, sie haben eine grössere Neigung tiefer durchzugären. Sie gehören in die erste und zweite Gruppe. Es scheint, dass die dritte Gruppe durch mehr oder weniger künstliche Auslese entstand.

4. Die dritte Gruppe mit den länglichen und der Form nach wenig ausgeglichenen Zellen widersteht besser den ungünstigen Bedingungen der Konservierung der Stämme unter der Paraffinölschichte. Es zeigt sich hier der Erhaltungsdrang des Pseudomyzeliums.







A. Kocková-Kratochvílová a L. Drobnica: Roztřídění vinných kvasinek.