

Wpływ pożywek azotowych

na fermentację i cechy wina jabłkowego oraz napojów winopodobnych

dr Sylwia Bonin, prof. dr hab. Wiesław Wzorek, mgr inż. Marta Woźniak

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, SGGW, Warszawa

Słowa kluczowe: fermentacja, pożywki azotowe, drożdże, wino
Key words: fermentation, nitrogen nutrients, yeast, wine

Influence of the nitrogen nutrients on the fermentation and the features of apple wines and wine-like drinks

The effect of addition of the nitrogen sources, in the form of ammonium salts and complex nutrient, on the process of wine fermentation and also features of final products was investigated. Nitrogen nutrients were added to the musts, which were made from apple juice. The content of juice in musts amounted 60% in the case of wines and 30% in the case of wine-like drinks. The content of total sugars in musts was about 300 g/dm³. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain Tokay was used. It was stated that the addition of the nitrogen sources has beneficial effect on the fermentation rate. The musts supplemented with complex nutrient were fermented the most quickly and final concentration of ethanol amounted 15,7% vol. in wines and 15,3% vol. in wine-like drinks. Control samples were characterized by slow rate of fermentation and achieved the lowest content of alcohol – 11,1% vol. in wine and 8,6% vol. in drinks.

Zbadano wpływ dodatku pożywek azotowych w postaci soli amonowych oraz pożywki kompleksowej na przebieg fermentacji oraz cechy produktów. Pożywki dodawano do nastawów, które sporządzono z soku jabłkowego. Udział soku w nastawach na wina wynosił 60%, a w nastawach na napoje winopodobne – 30%. Zawartość cukrów ogółem wynosiła ok. 300 g/dm³. Wykorzystano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay. Stwierdzono, że dodatek pożywek azotowych ma korzystny wpływ na tempo procesu. Najszybciej odfermentowały nastawy z pożywką kompleksową, a po zakończeniu fermentacji stwierdzono 15,7% obj. alkoholu w winach i 15,3% obj. w napojach winopodobnych. Próbkę kontrolną odznaczały się wolnym przebiegiem fermentacji i osiągnęły 11,1% obj. alkoholu w winie, a 8,6% obj. w napojach.

Pożywki azotowe oraz ich znaczenie dla fermentacji i cech wina

Moszcze owocowe są dość zróżnicowane pod względem zawartości związków azotowych. Największe ich ilości występują w malinach i czarnych porzeczkach, natomiast miody pszczele, borówki czerwone i jabłka mają ich niedostateczną ilość [13]. Mała zawartość związków azotowych występuje szczególnie w przypadku nastawów na napoje winopodobne, ponieważ moszcz jest mocno rozcieńczony.

Substancje azotowe biorą udział w metabolizmie drożdży jako aktywatory enzymów lub elementy związków, z których zbudowana jest komórka [5]. Przystawalny azot, zwykle w postaci soli amonowych, jest konieczny do syntezy białka i wzrostu drożdży [11]. Stąd odpowiednia zawartość azotu zwiększa przyrost biomasy komórkowej, co przyspiesza zafermentowanie oraz tempo fermentacji, a w efekcie skraca czas procesu fermentacji i umożliwia uzyskanie większych ilości alkoholu. Ponadto azot wpływa na zwiększenie ogólnej ilości aminokwasów w winie [8, 13].

Jako pożywki azotowe stosuje się:

- sole amonowe w postaci fosforanu amonu lub ortofosforanu amonu, które dodaje się w ilości nieprzekraczającej 0,4 g/dm³, a także siarczan amonu lub disiarczan amonu, w ilości nieprzekraczającej 0,3 g/dm³;
- preparaty uzyskane ze ścian komórkowych drożdży w ilości nieprzekraczającej 0,4 g/dm³ [7];
- odżywki kompleksowe.

Dodatek fosforanu amonu ogranicza się ze względu na możliwość powstawania w winie karbaminianów. Związki te, zwane również uretanami, są pochodnymi mocznika o właściwościach kancerogennych. W celu obniżenia dawki fosforanu amonu wskazane jest stosowanie mieszaniny soli fosforanu amonu i siarczanu amonu [9, 13]. Pogorzelski i wsp. [10] podają, że do moszczów niesiarkowanych korzystnie jest dodawać mieszaninę soli fosforanu amonowego i siarczanu amonowego w stosunku 1:1. Drożdże wykorzystują wówczas kation amonowy, anion siarczanowy i fosforanowy, co ma wpływ na szybkość przyswajania azotu.

Poza samym wzbogacaniem moszczu w sole amonowe korzystne jest jednocześnie natlenianie. Zapobiega to takim problemom, jak późne zafermentowanie oraz zakończenie fermentacji przy pozostałości dużych ilości cukrów, skraca również czas procesu fermentacji [2, 11].

W skład odżywek kompleksowych wchodzi zarówno pożywki azotowe, jak i aktywatory fermentacji. Przykładowo, skład preparatu „Activit” [14] to nieaktywne komórki drożdży, ściany komórkowe, celuloza oraz sole amonowe, a także aminokwasy, witaminy (B₁, B₂, B₅, B₆, B₁₂, PP, cholina itp.) oraz minerały (Mg, Na, K, Ca). Dodatek pożywki do nastawu na wina, w ilości ok. 0,2–0,4 g/dm³, dostarcza niezbędnych składników potrzebnych do prawidłowego rozwoju drożdży, zapewniając ich optymalną aktywność we wszystkich fazach fermentacji, co eliminuje problem spowolnienia i zatrzymania fermentacji oraz umożliwia całkowite odfermentowanie cukrów. Rolę preparatów ścian komórkowych przedstawiono we wcześniejszym artykule [3].

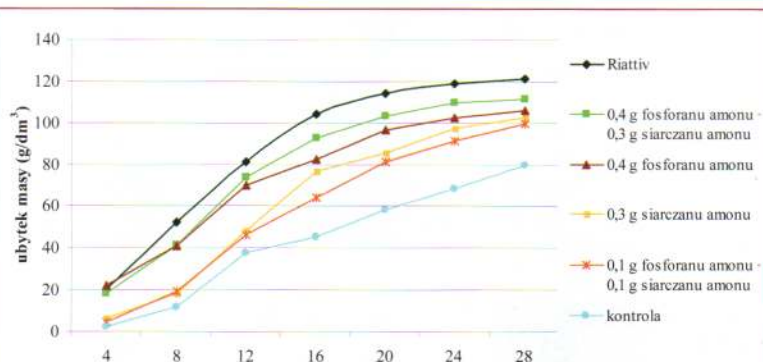
► Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku różnych pożywek azotowych do wysokocukrowych nastawów na proces fermentacji i skład chemiczny wina jabłkowego i napojów winopodobnych.

Metodyka pracy

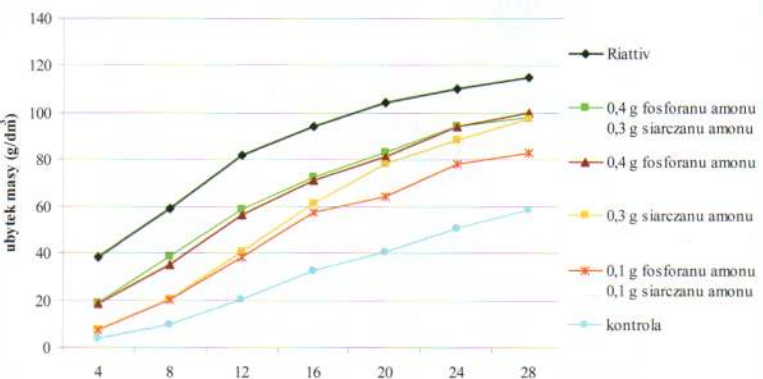
Nastawy przygotowywano z soku jabłkowego odtworzonego z koncentratu, dosładzając cukrem konsumpcyjnym do końcowego stężenia cukrów ogółem ok. 300 g/dm³. Udział moszczu w nastawach na wina wynosił 60%, a w nastawach na napoje winopodobne – 30%. Nastawy sulfutowano do zawartości SO₂ ok. 80 mg/dm³.

Sporządzono nastawy, które zawierały następujące pożywki:

– fosforan amonu – 0,4 g/dm³,



Rys. 1. Wpływ pożywek azotowych na ubytek masy nastawów na wina owocowe (średnia z 3 serii)



Rys. 2. Wpływ pożywek azotowych na ubytek masy nastawów na napoje winopodobne (średnia z 3 serii)

Tabela 1. Zawartość azotu (mg/dm³) w nastawach i po fermentacji

Próba	Riattiv	Rodzaj pożywki					kontrola	NIR
		0,4 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 0,3 g/dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g/dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 0,1 g/dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄			
Nastaw na wino	231	208	149	120	87	45	35,3	
Nastaw na nap. winopodobny	216	179	119	97	60	22	40,3	
Wino	142	134	52	37	22	19	24,3	
Napój winopo- dobny	142	97	22	19	15	11	34,1	

– siarczan amonu – 0,3 g/dm³,
 – fosforan amonu – 0,4 g/dm³ i siarczan amonu – 0,3 g/dm³,
 – fosforan amonu – 0,1 g/dm³ i siarczan amonu – 0,1 g/dm³,
 – pożywka kompleksowa Riattiv – 1 g/dm³ (firmy Marescalchi, zawierająca 35% fosforanu diamonu, 25% siarczany amonu, 0,12% tiaminy, 38% preparatu ścian komórek drożdży oraz 1,88% żelu krzemionkowego),
 – w celach kontrolnych przygotowano nastawy bez dodatku pożywki.

Fermentacje prowadzono przy użyciu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* easy Tokay, pochodzących z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności. Matki drożdżowe, w celu pobudzenia i przyzwyczajenia do warunków środowiska, namnażano na podłożach o stopniowo wzrastającym stężeniu cukru – od ok. 200 do ok. 300 g/dm³, które przygotowywano analogicznie jak na nastawy. Dodatek matki drożdżowej do nastawów wynosił 5%. Fermentacje prowadzono w temp. 18 °C przez 28 dni. Przeprowadzono trzy serie doświadczeń.

Proces fermentacji kontrolowany był przez pomiar ubytku masy poszczególnych nastawów. W nastawach, młodych winach i napojach winopodobnych oznaczano zawartość podstawowych składników oraz prowadzono analizę sensoryczną, stosując powszechnie przyjętą metodykę [4] oraz ilość azotu ogólnego metodą Kjeldahla [6]. Na podstawie ubytku ilości cukrów ogółem i ilości wytworzonego alkoholu wyliczano wydajność procesu fermentacji alkoholowej.

Wyniki poddano obróbce statystycznej wykorzystując program Statgraphics Plus. Stosowano analizę wariacji przy $\alpha = 0,05$, a najmniejszą istotną różnicę (NIR) obliczono używając testu Tukeya (jako HSD). W przypadku gdy wartość poziomu istotności była wyższa od 0,05, podawano empiryczną wartość PI.

Tabela 2. Zawartość wybranych składników win i napojów winopodobnych

Składnik (g/dm ³)/(pkt)*		Rodzaj pożywki						kontrola	NIR/PI*
		Riattiv	0,4 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 0,3 g/ dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,4 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g/dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g/dm ³ (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 0,1 g/dm ³ (NH ₄) ₂ SO ₄			
Cukry bezp. redukujące	wino	21,9	49,0	31,5	49,5	41,9	65,2	17,7	
	napój	23,0	52,0	32,5	42,3	57,8	117,0	18,5	
Ekstrakt rzeczywisty	wino	46,2	79,9	62,2	80,7	72,8	104,9	25,0	
	napój	44,2	77,4	59,8	67,8	82,2	142,2	17,7	
Kwasowość lotna	wino	0,45	0,46	0,45	0,49	0,49	0,49	0,7*	
	napój	0,48	0,45	0,44	0,51	0,46	0,47	0,06	
Kwasowość ogólna	wino	4,8	4,8	4,9	4,8	4,8	4,7	0,5*	
	napój	4,9	4,8	4,9	4,8	4,8	4,8	0,3*	
*Ocena sensoryczna	wino	4,2	3,9	4,2	3,8	3,9	4,0	0,26	
	napój	3,7	3,6	3,6	3,5	3,5	3,6	0,3*	

Wyniki

Ubytek masy nastawu związany jest z przemianą cukrów na alkohol i ulatniający się CO₂, co świadczy o tempie procesu fermentacji. We wszystkich próbkach spadki były większe w przypadku dodatku związków azotowych w porównaniu z próbką kontrolną. Największy spadek masy nastawów zaobserwowano przy dodatku pożywki Riattiv. Już 8. dnia fermentacji w przypadku napojów winopodobnych i 12. dnia w przypadku win nastawy osiągnęły taki ubytek mas, jak próbki bez dodatku azotu po 28 dniach. Z próbek wzbogaconych w związki azotowe najwolniejszym przebiegiem fermentacji charakteryzowały się nastawy wzbogacone w 0,1 g/dm³ fosforanu diamonu + 0,1 g/dm³ siarczany diamonu (rys. 1 i 2).

Pogorzelski i wsp. [10] stwierdzili, że dodatek autolizatów do nastawów skracal czas fermentacji o ok. 6–7 dni w porównaniu z nastawem wzbogaconym w 0,3 g/dm³ fosforanu diamonu. Natomiast Blateyron i Sablayrolles [2] stwierdzili, że dodatek 0,3 g/dm³ wodorooortofosforanu diamonu skrócił czas fermentacji o 35% w porównaniu z moszczami bez wzbogacania w azot.

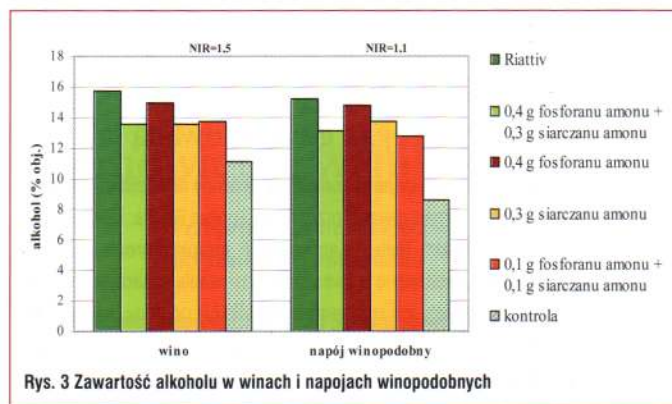
Przyjmuje się, że 140 mg/dm³ azotu to minimalna ilość zapewniająca prawidłowy przebieg fermentacji nastawów o średnim stężeniu cukrów [12]. Zdrowy moszcz gronowy zawiera od 300 do 800 mg/dm³ związków azotu [10].

Najwyższą zawartością azotu ogólnego w nastawie (tab. 1) charakteryzowały się próbki z dodatkiem pożywki Riattiv, zarówno w nastawach na wina – 231 mg/dm³, jak i na napoje winopodobne – 216 mg/dm³. Najmniejszą ilość azotu, z nastawów wzbogaconych, zawierały próbki z dodatkiem 0,1 g/dm³ (NH₄)₂HPO₄ + 0,1 g/dm³ (NH₄)₂SO₄ – 87 mg/dm³ w nastawach na wina i 60 mg/dm³ w nastawach na napoje. Próbki kontrolne zawierały odpowiednio 44,8 mg/dm³ i 22,4 mg/dm³ azotu.

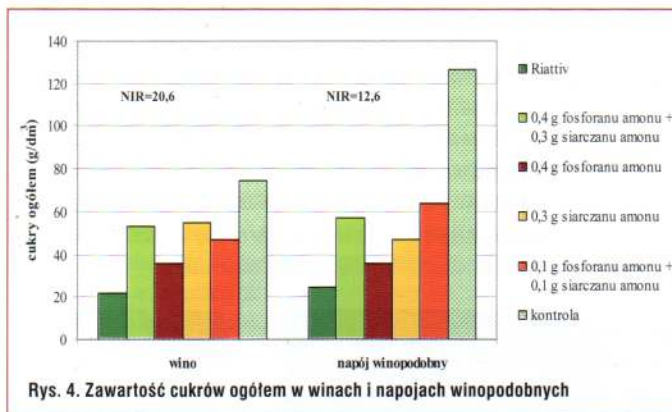
Otrzymane wina i napoje winopodobne zawierały znacznie mniej azotu niż nastawy (tab. 1). Jednak drożdże nie asymilowały całego azotu, który był w nastawach. Najwięcej azotu pozostało w próbkach z pożywką Riattiv, 142 mg/dm³. W próbkach z dodatkiem 0,1 g/dm³ fosforanu diamonu + 0,1 g/dm³ siarczany diamonu pozostały podobne ilości azotu jak w próbkach kontrolnych. Największą ilość azotu z podłoża (ok. 100 mg/dm³) drożdże wykorzystwały w próbkach wzbogaconych w 0,4 g/dm³ fosforanu diamonu.

Torrea i wsp. [12] podają, że poszczególne szczepy drożdży mają różne zapotrzebowanie na azot i przyswajają go w różnym tempie. Autorzy przeprowadzili fermentacje moszczu gronowego zawierającego 350 mg/dm³ azotu ogólnego, używając dwóch różnych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Pierwszy ze szczepów zasymilował 309 mg/dm³ azotu, w szybszym tempie od drugiego szczepu, który wykorzystał 277 mg azotu.

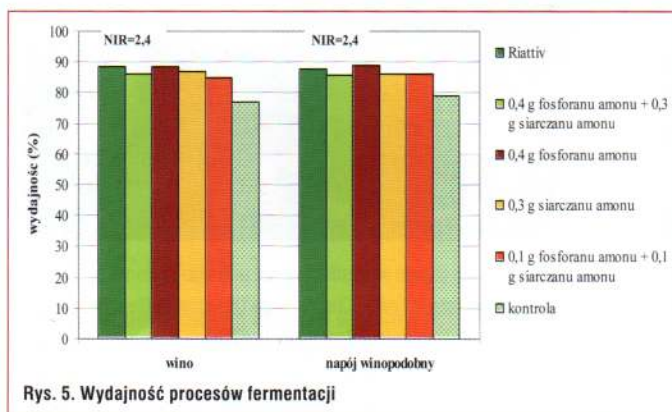
Najwyższą zawartością alkoholu – 15,7% obj. charakteryzowało się wino uzyskane z nastawu z dodatkiem pożywki Riattiv. Również wysoką zawartość alkoholu – 15,0% obj. miało trzymane z nastawu z 0,4 g/dm³ (NH₄)₂HPO₄. W próbce kontrolnej zawartość etanolu była najniższa – 11,1% obj. Pozostałe wina odznaczały się zbliżoną zawartością alkoholu (13,6–13,7% obj.). Podobne tendencje zauważono w przypadku napojów winopodobnych. Najwięcej alkoholu uzyskano również w próbce z dodatkiem pożywki Riattiv – 15,2% obj. etanolu, najmniej zaś w kontrolnej – 8,6% obj. Znaczną zawartość alkoholu – 14,8% obj. uzyskano również w napojach winopodobnych suplementowanych 0,4 g/dm³ fosforanu diamonu (rys. 3).



Rys. 3 Zawartość alkoholu w winach i napojach winopodobnych



Rys. 4. Zawartość cukrów ogółem w winach i napojach winopodobnych



Rys. 5. Wydajność procesów fermentacji

Zawartość cukrów ogółem w winach i napojach winopodobnych (rys. 4) kształtowała się na różnym poziomie w zależności od ilości dodanej pożywki do nastawu i wskazywała na niecałkowite odfermentowanie moszczu. Najwięcej cukrów pozostało próbkach kontrolnych, w napojach średnio 126,2 g/dm³, a w winach 74,4 g/dm³. Najmniej cukrów ogółem pozostało w próbkach wzbogacanych w pożywkę Riattiv – 22,9 g/dm³ w winach i 28,3 g/dm³ w napojach. W próbkach z dodatkiem 0,4 g/dm³ fosforanu diamonu pozostało ok. 35 g/dm³ cukrów ogółem, zarówno w winach, jak i napojach winopodobnych. Podobne tendencje zaobserwowano w kształtowaniu się zawartości cukrów bezpośrednio redukujących (tab. 2).

Największą wydajność procesu fermentacji – 89% osiągnięto przy dodatku 0,4 g/dm³ fosforanu diamonu. Podobny wynik – 88%, zarówno w winach, jak i w napojach, uzyskano przy wzbogacaniu w pożywkę Riattiv. Najmniejszą charakteryzowały się procesy bez pożywek azotowych, w których stwierdzono wydajność na poziomie 77% w przypadku win i 79% – napojów winopodobnych (rys. 5).

Najwyższą zawartość ekstraktu rzeczywistego, zarówno w winach, jak i napojach winopodobnych, stwierdzono w próbkach kontrolnych. Natomiast najniższym ekstraktem rzeczywistym charakteryzowały się próbki z pożywką Riattiv (tab. 2). Jest to związane z wysoką zawartością cukrów w próbkach kontrolnych i małą w przypadku stosowania pożywki Riattiv.



► Kwasowość lotna win kształtowała się na poziomie 0,45–0,49 g/dm³. Napoje winopodobne charakteryzowały się podobną kwasowością lotną, która wynosiła 0,44–0,51 g/dm³ (tab. 2). Również kwasowość ogólna win i napojów winopodobnych była podobna i wynosiła 4,7–4,9 g/dm³ (tab. 2).

Głównym składnikiem wpływającym na kwasowość lotną jest kwas octowy, który jest ubocznym produktem fermentacji alkoholowej. Ilość kwasu octowego zależy od ilości cukrów w nastawie, temperatury oraz szczepu drożdży [13]. Bely i wsp. [1] podają, że wzbogacanie moszczu w azot ma wpływ na kształtowanie kwasowości lotnej. Wraz ze wzrostem zawartości azotu w moszczu od 90 do 190 mg/dm³ obserwowali oni, że kwasowość lotna win malała od 1,5 do 0,56 g/dm³.

Wina charakteryzowały się korzystniejszymi cechami sensorycznymi od napojów winopodobnych (tab. 2). W przypadku win najwyższą ocenę ogólną – 4,2 (w skali 5-punktowej) otrzymały wina z nastawów wzbogaconych w pożywkę Riattiv oraz z nastawów z 0,4 g/dm³ fosforanu diamonu, a najniższą notę (3,8), gdy zastosowano 0,3 g/dm³ siarczanu amonu. W przypadku napojów ocena ogólna mieściła się w zakresie 3,5–3,7. Przy czym wyższą notę otrzymały napoje z nastawów z dodatkiem pożywki kompleksowej.

Wnioski

- Wzbogacanie nastawów w pożywki azotowe wpływa korzystnie na tempo fermentacji, produkcję etanolu i wydajność fermentacji.
- Najlepsze wyniki fermentacji uzyskuje się przy wzbogacaniu nastawów w pożywkę kompleksową. Z zastosowanych soli amonowych najkorzystniejszy był dodatek fosforanu diamonu w ilości 0,4 g/dm³.
- W zależności od ilości dodawanych pożywek azotowych drożdże wykorzystują różne ilości azotu.

Literatura

- [1] Bely M., Rinald A., Dubourdieu D.: 2003. *Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by Saccharomyces cerevisiae during high sugar fermentation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 6, 507–512.
- [2] Blateyron L., Sablayrolles J. M.: 2001. *Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 184–189.
- [3] Bonin S., Kolwas M.: 2009. *Fermentacja nastawów wysokocukrowych z dodatkiem preparatu ścian komórkowych*. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 5, 6–8.
- [4] Bonin S., Wzorek W.: 2005. *Wybrane zagadnienia z technologii winiarstwa*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- [5] Czyżyci A., Laskowska J., Cytlak D.: 1999. *Bilans substancji mineralnych w procesie produkcji win owocowych i napojów alkoholowych*. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 5, 26–30.
- [6] Drzazga B.: 1995. *Analiza techniczna w przetwórstwie owoców i warzyw*. WSIP, Warszawa.
- [7] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 2 maja 2005 r. w sprawie szczegółowego wyrobu fermentowanych napojów winiarskich oraz metod analiz tych napojów do celów urzędowej kontroli pod względem jakości tych wyrobów. DzU 2005 nr 88, poz. 748.
- [8] Manginot C., Sablayrolles J. M., Roustan J. L., Barre P.: 1997. *Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase*. Enzyme and Microbial Technology, 20, 373–380.
- [9] Marks V. D., van der Merwe G. K., van Vuuren H. J. J.: 2003. *Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate*. FEMS Yeast Research, 3, 269–287.
- [10] Pogorzelski E., Koch M., Fajkowski J.: 2000. *Stymulatory fermentacji alkoholowej z osadowych drożdży winiarskich*. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 1, 32–34.
- [11] Sablayrolles J. M., Dubois C., Manginot C., Roustan J.L., Barre P.: 1996. *Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82, 4, 377–381.
- [12] Torrea D., Fraile P., Garde T., Ancin C.: 2003. *Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of Saccharomyces cerevisiae with different nitrogen demands*. Food Control, 14, 565–571.
- [13] Wzorek W., Pogorzelski E.: 1998. *Technologia winiarstwa owocowego i gronowego*. Sigma-NOT, Warszawa.
- [14] http://www.ake.com.pl/spozywczy/pozywki_winiarskie/activit