

Wpływ pierwiastków magnezu i wapnia na proces fermentacji winiarskiej

dr Sylwia Bonin, mgr inż. Małgorzata Stanisławczyk

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

Słowa kluczowe: wino, fermentacja, magnez, nastaw wysokocukrowy

Key words: wine, fermentation, magnesium, high-sugar musts

The influence of metal ions Mg and Ca on the fermentation process

Magnesium is involved in many essential physiological functions in cells and protects yeast against ethanol stress. There are any articles about the influence of magnesium on the process of wine fermentation of musts with high sugar concentration. In our previous work we observed the favorable influence of 240 mg/dm³ magnesium on the fermentation of the musts with sugar concentration about 320 g/dm³. The results in present study show that the addition of 160 mg/dm³ magnesium to the musts causes higher amount of ethanol in wine, higher fermentation efficiency and yeast viability.

Magnez jest pierwiastkiem, który odpowiada za wiele istotnych funkcji fizjologicznych w komórkach i działa ochronnie na drożdże w warunkach stresu etanolowego. W dostępnej literaturze brak jest doniesień o wpływie magnezu na proces fermentacji winiarskiej nastawów wysokocukrowych. W naszych wcześniejszych badaniach stwierdziliśmy, że dodatek magnezu w ilości 240 mg/dm³ do nastawów o zawartości cukrów ok. 320 g/dm³ wpływa korzystnie na proces fermentacji. W niniejszej pracy stwierdzono, że dodatek magnezu w ilości 160 mg/dm³ zwiększa ilość wytworzonego etanolu w winie, wydajność procesu fermentacji i aktywność życiową drożdży.

Drożdże, jak każdy żywy organizm, do optymalnego wzrostu i prawidłowego funkcjonowania, w tym m.in. fermentacji, wymagają nie tylko podstawowych składników podłoża, ale również mikro- i milimolowych ilości różnych jonów nieorganicznych. Odpowiednie stężenia tych jonów w środowisku fermentacyjnym pozwalają na przyspieszenie wzrostu komórek, powiększenie wydajności biomasy i produkcji etanolu.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 2 maja 2005 r. do nastawów fermentowanych napojów winiarskich można wprowadzać dwa pierwiastki ważne z technologicznego punktu widzenia – magnez oraz wapń. Drugi z nich stosuje się w postaci siarczynu i wodorosiarczynu wapnia, których głównym zadaniem jest dodatek SO₂, a nie suplementacja wapniem.

Magnez

Pierwiastek ten pełni bardzo ważną rolę we wzroście i metabolizmie komórek drożdży. Minimalna dawka magnezu dla rozwoju drożdży według Maynard [4] wynosi 0,65 mM (16 mg/dm³). Optymalne stężenie tego pierwiastka dla wzrostu komórek drożdży mieści się w przedziale od 4 do 20 mM (96–480 mg/dm³), a całkowite zahamowanie wzrostu następuje przy stężeniu 1 M (24000 mg/dm³) [3]. Walker i Maynard [12] podają, że w warunkach optymalnej zawartości magnezu w podłożu drożdże pobierają zwykle stałe ilości magnezu, a przy ograniczonej zawartości tych jonów komórki pobierają Mg²⁺ proporcjonalnie do jego dostępności. Ponadto maksymalna akumulacja w komórce jest skorelowana z maksymalną produkcją etanolu.

Jony magnezu aktywują liczne enzymy i warunkują prawidłowy przebieg podstawowych procesów życiowych, takich jak np.: glikoliza, replikacja DNA, biosynteza białek, transport przez błony cytoplazmatyczne, wpływają na kinetykę przemian oraz równowagę asocjacji i dysocjacji różnych związków oraz poziom innych jonów w komórce [5, 6, 10, 11]. Magnez uczestniczy także w budowie rybosomów. Ponadto zapewnia integralność spirali kwasu dezoksyrybonukleinowego oraz utrzymanie właściwej struktury chromosomów [5]. W warunkach stresu wywołanego wysokim stężeniem alkoholu, wysoką temperaturą lub ciśnieniem osmotycznym jony magnezu działają ochronnie na komórki drożdży poprzez stabilizację błony cytoplazmatycznej i mitochondrialnej. Magnez tworzy z fosfolipidami błony komórkowej związki kompleksowe, które powodują zmniejszenie płynności i przepuszczalności błon cytoplazmatycznych [11].

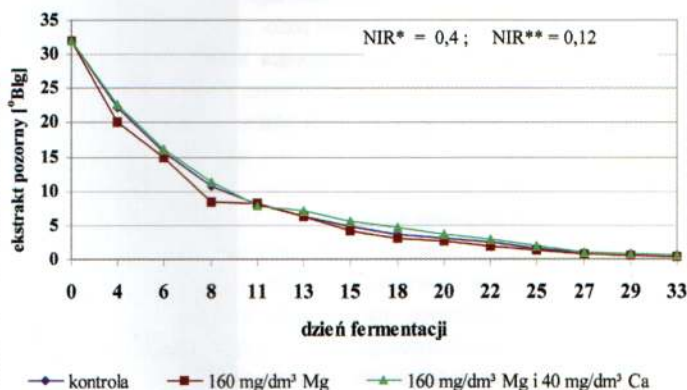
Dodatek magnezu do podłoża wpływa na wzrost liczby komórek drożdży zarówno w trakcie hodowli biomasy, jak i w czasie fermentacji [1, 5, 7].

Magnez wpływa także na wzrost ilości etanolu produkowanego przez drożdże. Jednak różne ilości tego pierwiastka podawane są jako optymalne. Przykładowo, Rees i Stewart [6, 7] stwierdzili, że dodatek magnezu w ilości ok. 500 mg/dm³ brzezki słodowej o zawartości ekstraktu 20 °B_{lg} spowodował szybszy przebieg fermentacji i wzrost zawartości alkoholu w piwie w porównaniu z próbkami kontrolnymi. W badaniach prowadzonych w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii SGGW zaobserwowaliśmy, że wzrost ilości etanolu w winie można uzyskać, stosując nie tylko tak wysokie dawki magnezu. Również 240 mg/dm³ pozwala uzyskać prawie 2% obj. alkoholu więcej w porównaniu z próbkami bez dodatku tego pierwiastka [1].

Wapń

Jony wapnia, z uwagi na dużą zdolność łączenia się z grupami karboksylowymi, stabilizują ściany komórkowe i enzymy wewnątrzkomórkowe, pełnią ważną rolę w regulacji metabolizmu azotu na poziomie mitochondriów oraz aktywują składniki białkowe odpowiedzialne za zdolność drożdży do klaczkowania. Ponadto wapń ułatwia syntezę i zapobiega wyciekaniu materiału komórkowego oraz reguluje oddziaływanie lipidowo-proteinowe [5, 9]. Minimalne stężenie wapnia w podłożu waha się od 0,25 mM (10 mg/dm³) do 0,5 mM (20 mg/dm³), natomiast przy 25 mM (1000 mg/dm³) następuje zahamowanie wzrostu komórek. Zapotrzebowanie zwiększa się w momencie narażenia komórek na działanie czynników stresowych: temperatury, pH i etanolu [5]. Natomiast Rees i Stewart [6, 7] stwierdzili, że dodatek wapnia w ilości 800 mg/dm³ brzezki piwnej powoduje obniżenie liczby komórek drożdży, tempa fermentacji i końcowej ilości etanolu w piwie w porównaniu z próbkami niezobogacanymi w ten pierwiastek. W prowadzonych przez nas badaniach [1], przy wzbogacaniu nastawu w 400 mg/dm³ wapnia zaobserwowaliśmy najmniejszą zawartość alkoholu w winach – 14,1% obj. Natomiast suplementacja w dawce 40 mg/dm³ wpłynęła korzystnie na proces fermentacji, ponieważ odnotowaliśmy 15,1% obj. alkoholu, a w próbce kontrolnej – 14,3% obj. Większa dawka wapnia wpłynęła także niekorzystnie na przyrost biomasy drożdży. W próbce z 400 mg/dm³ wapnia stwierdzono 7,7 g s.s./dm³, a przy dodatku 40 mg/dm³ – 9,2 g s.s./dm³, co było większą ilością w porównaniu z próbką kontrolną i wzbogaconą w 240 mg/dm³ magnezu.

Celem pracy było zbadanie wpływu magnezu w ilości 160 mg/dm³ oraz 160 mg/dm³ magnezu w połączeniu z 40 mg/dm³ wapnia na fermentację winiarską i przyrost biomasy drożdży w warunkach podłoża wysokocukrowych.



Rys. 1. Wpływ suplementacji nastawów na zawartość ekstraktu pozornego w czasie trwania fermentacji (średnia z trzech serii)

NIR* w czasie; NIR** pomiędzy próbkami

Tabela 1. Wpływ suplementacji nastawów na podstawowe składniki wina oraz wydajność fermentacji (średnia z trzech serii)

Parametr	Kontrola	160 mg/dm ³ Mg	160 mg/dm ³ Mg + 40 mg/dm ³ Ca	NIR
Alkohol (% obj.)	16,1	16,7	16,1	0,2
Cukry ogółem (g/dm ³)	53,5	49,0	50,5	2,9
Sacharoza (g/dm ³)	7,9	6,2	5,6	0,9
Kwasowość lotna (g/dm ³)	0,64	0,64	0,60	0,01
Kwasowość ogólna (g/dm ³)	5,1	5,0	5,1	0,1
Ekstrakt bezcukrowy (g/dm ³)	30,7	32,8	37,9	3,0
SO ₂ ogółem (mg/dm ³)	51,1	52,8	54,0	1,6
Wydajność (%)	94,5	96,8	93,6	0,8

Tabela 2. Wpływ suplementacji nastawów na ocenę sensoryczną win i liczbę oraz żywotność drożdży po fermentacji (średnia z trzech serii)

Oznaczenie	Kontrola	160 mg/dm ³ Mg	160mg/dm ³ Mg i 40 mg/dm ³ Ca
Ogólna ocena sensoryczna (pkt)	4,0	4,1	4,1
Ogólna liczba komórek (kom./cm ³)	6,2 x10 ⁷	6,8 x10 ⁷	6,4 x10 ⁷
Żywotność (%)	70	78	69

Materiały i metody

Nastawy sporządzano na bazie koncentratu jabłkowego, wody dejonizowanej oraz cukru konsumpcyjnego. Końcowe stężenie cukrów ogółem wynosiło ok. 320 g/dm³, a udział soku w nastawie – 70%. Do nastawów dodawano pożywkę azotową w postaci wodorofosforanu (V) diamonu w ilości 0,3 g/dm³ oraz siarczynu (VI) diamonu w ilości 0,2 g/dm³. Dodawano także pirosiarczyn potasu w takiej ilości, by końcowa zawartość SO₂ w nastawie wynosiła ok. 80 mg/dm³.

Wykorzystano drożdże *Saccharomyces bayanus* S.o./1AD z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW, które przed zaszczepieniem adaptowano do warunków panujących w nastawie, pasażując na podłożach o wzrastającej zawartości cukrów, od 20 do 32 °Błg, i zawartości SO₂, od ok. 25 do 90 mg/dm³. Udział matki drożdżowej w nastawach wynosił 5%. Fermentacje prowadziło przez 33 dni.

W czasie fermentacji prowadzono kontrolę dynamiki procesu poprzez pomiar ekstraktu pozornego. Młode wina poddawano analizie chemicznej przy zastosowaniu powszechnie przyjętej metodyki, prowadzono ocenę sensoryczną wina w skali pięciopunktowej o dziewięciu poziomach jakości oraz obliczano wydajność fermentacji [2]. Oznaczano także liczbę komórek drożdży przed i po fermentacji metodą liczenia bezpośredniego w komorze Thoma oraz żywotność drożdży po fermentacji metodą liczenia z dodatkiem błękitu metylenowego [1].

Wybrane wyniki poddano weryfikacji statystycznej. Stosowano analizę wariacji przy poziomie istotności $\alpha=0,05$, a najmniejszą istotną różnicę (NIR) obliczano testem Tukey'a.

Wyniki

Fermentacja wszystkich nastawów przebiegała z dużą intensywnością przez trzy tygodnie, po czym spadek ekstraktu był niewielki, co wskazywało na końcowe dofermentowanie win. Największy spadek odnotowano między 1. a 4. dniem – średnio dla wszystkich próbek 10,5 °Błg (rys. 1).

Po zakończonej fermentacji przeprowadzono podstawową analizę win (tab. 1). Stwierdzono, że największą ilość alkoholu – 16,7% obj., miały wina otrzymane z nastawu wzbogaconego w magnez. Połączenie magnezu z wapniem wpłynęło niekorzystnie na produkcję alkoholu, ponieważ końcowa zawartość była taka sama, jak w przypadku próbki bez dodatku pierwiastków, i wynosiła 16,1% obj. Uzyskane wina odznaczały się zawartością cukrów ogółem na poziomie od 49 do 53,5 g/dm³, a ilość sacharozy kształtowała się na poziomie 5,6–8,1 g/dm³. Na podstawie ilości wytworzonego alkoholu i zużytych cukrów wyliczono wydajność procesu fermentacji. Największą wydajność – 96,8% stwierdzono w przypadku fermentacji nastawów z dodatkiem magnezu, co oznacza, że do wytworzenia 1% obj. alkoholu drożdże wykorzystywały 1,61 g cukru, w przeliczeniu na glukozę. Najmniejszą – 93,6% charakteryzował się proces fermentacji nastawów suplementowanych magnezem i wapniem. Wydajność fermentacji w przypadku wina kontrolnego wyniosła 94,5%.

Kwasowość ogólna win wynosiła 5,0–5,1 g/dm³, a kwasowość lotna 0,60–0,64 mg/dm³. Zaobserwowano, że suplementacja wpłynęła istotnie na zwiększenie zawartości ekstraktu bezcukrowego w winach. Wina otrzymane z nastawów wzbogaconych w magnez i wapń zawierały go 37,9 g/dm³, a w winie kontrolnym ekstrakt bezcukrowy wynosił 30,7 g/dm³ (tab. 1).

Po zaszczepieniu „matką drożdżową” w 1 cm³ nastawu stwierdzono 6,1x10⁶ kom./cm³. Po zakończeniu procesu fermentacji najwięcej komórek drożdży – 6,8x10⁷ komórek w przeliczeniu na 1cm³ wina odnotowano w próbce z dodatkiem magnezu, zatem liczba komórek drożdży zwiększyła się 11-krotnie. W pozostałych winach liczba komórek drożdży wynosiła 6,2–6,4x10⁷ kom./cm³. Po fermentacji udział komórek aktywnych życiowo był większy w winie otrzymanym z nastawu suplementowanego magnezem i wyniósł 78%, w pozostałych był podobny 69–70% (tab. 2).

Młode wina po tygodniu leżakowania poddano analizie sensorycznej (tab. 2). Otrzymane wina charakteryzowały się zbliżoną jakością sensoryczną i otrzymały ogólną ocenę w przedziale 4,0–4,1.

Otrzymane wyniki potwierdzają korzystny wpływ magnezu na produkcję etanolu, wydajność procesu fermentacji i żywotność drożdży [6, 7, 11, 12]. Jednak cytowani autorzy w swych doświadczeniach stosowali brzeczkę, melasę oraz podłoża syntetyczne. Nie stosowali zaś nastawów wysokocukrowych i drożdży winiarskich. W naszych wcześniejszych badaniach [1] dodatek do nastawów o zawartości cukrów ok. 320 g/dm³ magnezu w ilości 240 mg/dm³, a także wapnia w ilości 40 mg/dm³ wpłynął korzystnie na proces fermentacji w porównaniu do próbki kontrolnej. W niniejszym doświadczeniu zaobserwowano, że użycie mniejszej ilości magnezu również powoduje zwiększenie ilości wytwarzanego etanolu, wydajności fermentacji i żywotności drożdży, jednak połączenie 40 mg/dm³ wapnia ze 160 mg/dm³ magnezu nie jest korzystne.

Walker i wsp. [12] stwierdzili, że zwiększenie stosunku Ca:Mg wpływa niekorzystnie na przebieg fermentacji, ponieważ wapń podobnie jak magnez jest pierwiastkiem dwuwartościowym i istnieje konkurencja między tymi metalami w komórce. Jednak w niniejszej pracy stosunek tych pierwiastków wynosił jedynie 1:4.

Wnioski

- Magnez jest pierwiastkiem, którego dodatek do nastawów wysokocukrowych wpływa korzystnie na ilość wytworzonego etanolu, wydajność procesu fermentacji i aktywność życiową drożdży.
- Korzystny wpływ magnezu na proces fermentacji jest hamowany obecnością jonów wapnia. □