

DOKUMENTACE FUNKČNÍHO VZORKU

Soubor původních izolátů vinařských mikroorganismů pro fermentační technologie

Vinohradnictví a vinařství pro zachování a obnovu kulturní identity vinařských
regionů na Moravě

NAKI II – Program na podporu aplikovaného výzkumu a experimentálního
vývoje národní a kulturní identity na léta 2016 až 2022



Vypracovali:

Mgr. Iveta Bušová, Ing. Vít Paulíček, Ing. Richard Ježdík,
Ing. Miroslav Minařík, Ing. Martina Siglová, Ph.D.,
Ing. Jaromír Fiala, Ph.D., Ing. Petra Kubizniaková,
doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D., doc. Ing. Jiří Sochor, Ph.D.,
Ing. Radim Holešinský

Statutární zástupce:

Ing. Miroslav Minařík

V Kunovicích dne 29.6.2018.

1 ZÁKLADNÍ ÚDAJE O FUNKČNÍM VZORKU

Jazyk v originále		Čeština
Název	v orig	Soubor původních izolátů vinařských mikroorganismů pro fermentační technologie
	v aj	A set of original isolates of wine microorganisms for fermentation technology
Anotace	v orig	Předkládaný funkční vzorek má podobu lyofilizovaného souboru (konsorcia) vinařských mikroorganismů pro fermentační technologie. Z tohoto konsorcia byly izolovány a konzervovány jednotlivé kolonie vinařských kvasinek. Na základě laboratorních asimilačních a fermentačních testů byl ze sbírky izolátů vybrán jeden reprezentativní zástupce, který vykazoval charakteristické a zároveň nejvhodnější technologické vlastnosti. Po namnožení a lyofilizaci ve větším měřítku byl následně použit a testován vinaři na vinných moštích vinaři. Takto získaný axenický preparát vinařské kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> má uplatnění jako adekvátní náhrada spontánní fermentace s technologickými výhodami řízené fermentace. Na základě realizace jednotlivých úrovní testování byl vybrán způsob jeho propagace, konzervace a aplikace na odkalený mošt. Hlavní přidanou hodnotou tohoto preparátu oproti komerčně nabízeným produktům (preparátům kvasinek) jsou jedinečné organoleptické vlastnosti, které jsou úzce spjaty s historií regionálních zvyků vinařských komunit a především s terroir vinařské oblasti Morava.
	v aj	The present functional sample takes the form of lyophilized consortium of wine microorganisms for fermentation technology. From this consortium, individual colonies of wine yeast were isolated and preserved. Based on laboratory assimilation and fermentation tests, one representative isolate was selected from the collection of isolates, showing the most characteristic and at the same time the most suitable technological properties. The selected isolate was extensively propagated and lyophilized on a larger scale. The thus prepared isolate was subsequently used and tested by winemakers on the wine must. Such an axenic preparation of the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> has been used as an adequate substitute for spontaneous fermentation with the technological advantages of controlled fermentation. Based on the realization of the individual levels of testing have been chosen the method of propagation, preservation and application to the clarified wine must. The main added value of this preparation compared to the commercially available products (yeast preparations) are the unique organoleptic properties that are closely related to the history of the regional customs of the wine communities and, above all, to the terroir wine region of Moravia.

Autoři	Příjmení	Jméno	Titul	Podíl v %
1	Bušová	Iveta	Mgr.	15
2	Paulíček	Vít	Ing.	10
3	Ježdík	Richard	Ing.	10
4	Miroslav	Minařík	Ing.	15
5	Martina	Siglová	Ing., Ph.D.	5
6	Fiala	Jaromír	Ing., Ph.D.	15
7	Kubizniaková	Petra	Ing.	5
8	Baroň	Mojmír	doc, Ing., Ph.D.	15
9	Sochor	Jiří	doc., Ing., Ph.D.	5
10	Holešínský	Radim	Ing.	5

Podíl v % - uveďte podíl práce každého autora. Součet podílů musí být 100%. Případné další autory uveďte na druhé straně.

2 VLASTNÍK FUNKČNÍHO VZORKU

Název organizace (vlastníka)	Sídlo vlastníka	Stát vlastníka	Rok dokončení	Interní identifikace
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.	Lipová 15 120 44 PRAHA 2	ČR	2018	NAKI-FV-01
Ústav vinohradnictví a vinařství (ZF MENDELU)	Valtická 337 691 44 LEDNICE	ČR	2018	NAKI-FV-01
EPS biotechnology, s.r.o.	V Pastouškách 205 686 04 KUNOVICE	ČR	2018	NAKI-FV-01

Interní identifikace - označení produktu vlastníkem.

3 POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

Umístění	Technické parametry	Ekonomické parametry	Licence	Poplatek
EPS biotechnology, V Pastouškách 1690, 686 04 Kunovice	Lyofilizovaný preparát vinařských mikroorganismů sloužící jako náhrada spontánní fermentace s výhodami řízené fermentace.	Zařízení v ceně 300 000 Kč	1	3 [*]

Umístění – projektová sbírka Kunovice. Technické parametry - tech. parametry charakterizující výstup (např. velikost, typ instalace, jazyk, platforma apod.). Ekonomické parametry - ekon. parametry charakterizující výstup (např. cena, export apod.).

Licence - uveďte jednu z možností využití výsledku jiným subjektem: 1-vždy nutné nabytí licence, 2-bez nabytí licence, 3-v některých případech možné bez nabytí licence. Poplatek – uveďte jednu z možností požadavku poskytovatele licence na licenční poplatek: 1-požaduje, 2-nepožaduje, 3-v některých případech nepožaduje.

* pro subjekty v rámci DG16P02R017

4 VZTAH FUNKČNÍHO VZORKU K AKCÍM (GRANTŮM APOD.)

Typ vztahu	Typ akce	Název akce (uveďte alespoň část jejího názvu)	Interní číslo akce
1	G	NAKI II, ident. kód DG16P02R017 "Vinořadnictví a vinařství pro zachování a obnovu kulturní identity vinařských regionů na Moravě."	716 – EPS biotechnology, s.r.o.;

Typ vztahu - uveďte jednu možnost: 1 - vznikla v rámci, 2 - financována z, 3 - podkladem pro, 4 - podkladem pro výzk. záměr.

Typ akce - uveďte jednu z možností: VC – výzkumné centrum, G - grant, VZS - výzkumný záměr, SV - specifický výzkum.

5 KLÍČOVÁ SLOVA

Česky:	Kvasinka	Izolace	Lyofilizace	Vinifikace
Anglicky:	Yeast	Isolation	Lyophilization	Vinification

Klíčová slova anglicky - může se vložit i sousloví (např. technický výraz). Doporučuje se vyplnit více než jen jednu kolonku.

6 TECHNICKÝ POPIS FUNKČNÍHO VZORKU

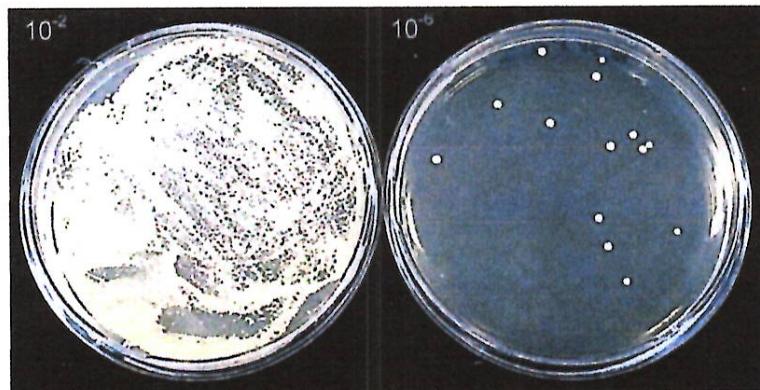
Předkládaný funkční vzorek má podobu lyofilizovaného souboru (konsorcia) vinařských mikroorganismů pro fermentační technologie. Pro tyto účely byl použit vzorek rozkvašeného vína odrůdy Sylvánské zelené (Tab. 1), které bylo připraveno selským způsobem. Po konzervaci byly z tohoto konsorcia izolovány jednotlivé kolonie vinařských kvasinek (Obr. 1). Na základě laboratorních asimilačních a fermentačních testů byl z izolátů vybrán jeden, který vykazoval charakteristické a zároveň nejintenzivnější schopnosti (viz kap. Laboratorní testy). Takový axenický preparát vinařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je určen pro vinaře jako adekvátní náhrada spontánní fermentace s technologickými výhodami řízené fermentace. Jednotlivé taxony, tvořící konsorciu byly identifikovány na pracovišti VÚPS a v lyofilizované formě ve vialkách uloženy do projektové sbírky pro možnost dalšího využití. Po namnožení a lyofilizaci ve větším měřítku byl preparát kvasinky následně použit a testován na moštích vinaři. Hlavní přidanou hodnotou tohoto preparátu je jedinečnost projevů odlišnosti vůči stávajícím nabízeným produktům (komerčně nabízené typy kvasinek) v této oblasti s důrazem na historický reglement a především terroir vinařské oblasti Morava.

Výzkum týkající se tohoto funkčního vzorku byl založen na víceúrovňovém testování, díky kterému se podařilo stanovit vhodný způsob jeho propagace, konzervace (metodou lyofilizace) a aplikace na odkalený mošt.

Tab. 1: Původ konsorcia a jednotlivých izolátů.

Odrůda	Vinařská oblast	Vinařská podoblast	Viniční trať	Vinařská obec	Vinařství
SZ*	Morava	Mikulovská	Pod Reistnou	Valtice	Vinařství Procházka Valtice

* SZ – Sylvánské zelené

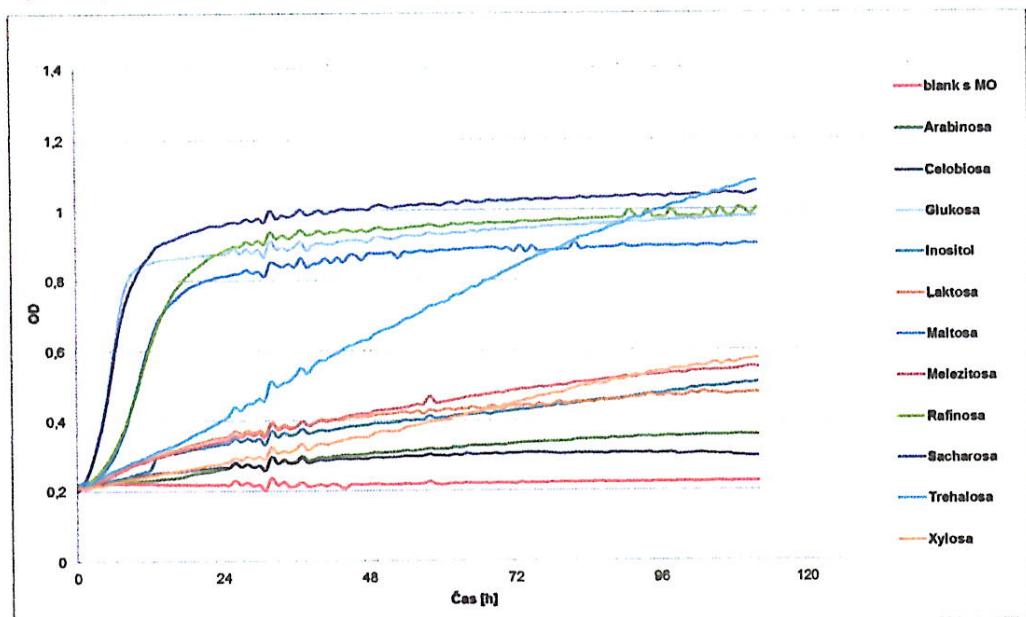


Obr. 1: Izolace vinařských kvasinek z konsorcia z rozkvašeného vína odrůdy Sylvánské zelené. Miska vpravo představuje ředění (10^{-6}), které bylo k tomuto účelu využito.

LABORATORNÍ TESTY

Charakteristické a zároveň nejintenzivnější schopnosti vykazoval izolát vinařské kvasinky, který nese projektové označení V7I2, resp. EPS145. Na základě porovnání výsledků z laboratorních testů s očekávaným průběhem asimilace a fermentace cukrů, resp. dalších substrátů bylo potvrzeno, že se jedná o kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* (Obr. 2, Tab. 2 a Tab. 3). Všechny získané informace o této kvasince byly navíc doloženy mikroskopickou kontrolou buněk s využitím metod světelné (Obr. 3A) a fluorescenční mikroskopie (Obr. 4B) a také fermentačními schopnostmi (při fermentaci moštů v lab. měřítku produkce 12 % obj. ethanolu; viz Obr. 4).

Komplexnost a účinnost izolátů vinařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla hodnocena na základě rychlosti rozkvášení moštů, prokvašení vín, chemické analýzy a senzorických projevů hotových vín. Velmi dobrá účinnost izolátu V7I2 prokává vinný mošt lze podložit laboratorními testy mikrovinifikace (Obr. 4), přičemž hlavním kritériem bylo stanovit maximální dosažitelnou koncentraci etanolu ve víně. Graf mikrovinifikace na Obr. 4 znázorňuje pouze hlavní část fermentace. Již po 168 h bylo možné pozorovat pokles cukrů přibližně na třetinu původní hodnoty a nárůst etanolu na 12 % obj. Na základě testování izolátu kvasinky V7I2 vinaři, bylo zjištěno, že její aplikace vede k zisku suchých vín. Tato schopnost byla potvrzena chemickou analýzou získaných vín. Z pohledu senzorické analýzy byla připravená vína hodnocena kladně, jelikož došlo ke zvýraznění odrůdového charakteru vín a nebyly pozorovány žádné vady, které by mohly být způsobeny tvorbou vedlejších metabolitů použitým kvasinkovým kmenem. Posledním hodnoceným kritériem izolátu V7I2 je také doba fermentace. Kvasinky mají v zákvasu nižší aktivitu, a proto je také rozkvášení vína může být zdlouhavější. Je proto nutné při přípravě zákvasu i v průběhu vinifikace dodržovat jisté zásady a odpovídající podmínky, které jsou zahrnuty v kap. 8.



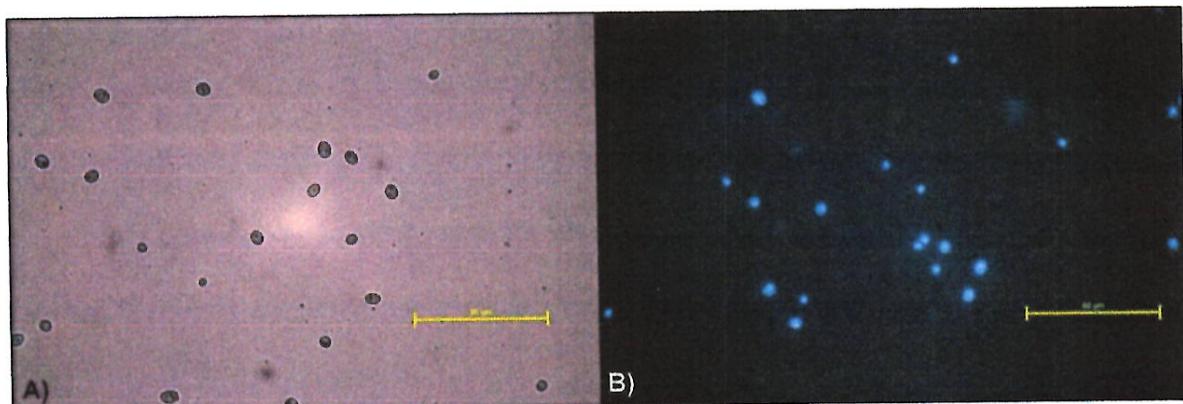
Obr. 2: Asimilace cukrů – růstové křivky.

Tab. 2: Výsledky asimilace cukrů.

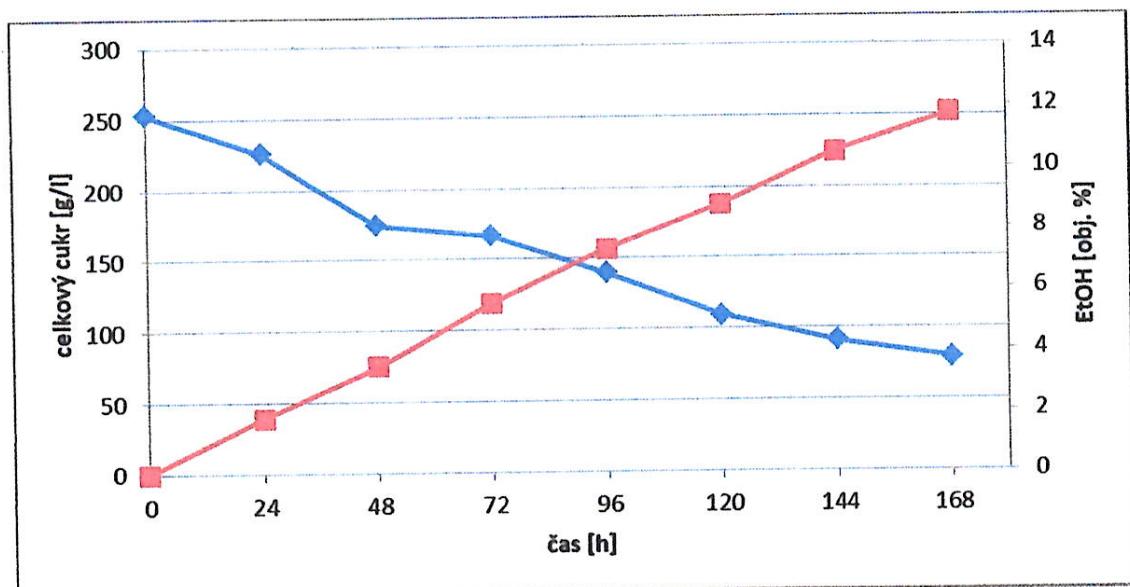
Cukr	Ara	Cel	Glc	Inl	Lac	Mal	Mlz	Raf	Sac	Tre	Xyl
Hodnocení	±	±	+	±	±	+	±	+	+	+	±

Tab. 3: Výsledky fermentace cukrů.

Cukr	Glc	Lac	Mal	Sac
Hodnocení	+	-	+	+



Obr. 3: Mikroskopie buněk izolátu EPS145. A) světelná mikroskopie (nativní preparát); B) fluorescenční mikroskopie (barvivo DAPI); měřítko 50 µm.



Obr. 4: Fermentace moště - mikrovinifikace.

7 BEZPEČNOST POUŽITÍ

Funkční vzorek je nutné používat v souladu se zásadami bezpečnosti práce v laboratoři za dodržení pravidel užívání OOPP.

Z mikrobiologického hlediska je bezpečnost práce definována použitím standardních ochranných pomůcek pro práci s mikroorganismy, jako jsou laboratorní rukavice a pracovní oblečení, případně sterilní rouška. Dále práce s aseptickými pracovními pomůckami a důsledná sterilizace biologických odpadů. Práci s mikrobiologickým agens by měl provádět pouze nato zaškolený pracovník pro minimalizaci rizik v průběhu pracovního procesu.

8 POPIS POUŽITÍ

Funkce a postup aplikace preparátu vinařské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pro účely vinifikace odkaleného moště je následující:

Příprava moště:

- Odkalení moště doporučujeme maximálně na 150 NTU. Při větším odkalení nemusí použitý mošt obsahovat dostatečné množství výživy potřebné pro úspěšnou fermentaci. Obsah asimilovatelného dusíku v moště doporučujeme alespoň 200 mg/l.

Dávkování kvasinky:

- Pro kvašení moštů dávkujeme 30 g preparátu na 100 l moště.
- Počet buněk se v preparátu vinařských kvasinek pohybuje okolo 10^{10} (vztaženo na 1 g lyofilizátu). Tento počet odpovídá komerčním preparátům kvasinek.

Příprava zákvasu:

- Vakuově zabaleny preparát se po vyndání z lednice nechá temperovat 2 h na teplotu prostředí.
- K jednomu dílu kvasinek se přidá 5 dílů moště a 5 dílů teplé vody (cca 30 °C). Vzhledem k jemné struktuře je preparát nutné velmi dobře rozmíchat.
- Aktivace kvasinek po dobu 15 až 20 min. Kvasinky obvykle netvoří pěnovou korunku.
- Po aktivaci kvasinek se takto připravený zákvas se přidá k hlavnímu podílu moště. Teplotní rozdíl mezi zákvasem a moštěm nesmí být větší než 7 °C. Velký rozdíl teplot mezi kvasinkovou suspenzí a moštěm můžezpůsobit poškození přidávaných buněk.

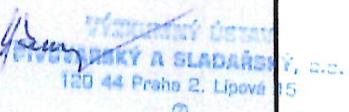
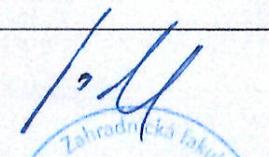
Kvašení:

- Kvašení probíhá při teplotě alespoň 18 až 20 °C. Průběh kvašení je ve většině případů s touto terroir kvasinkou pozvolný.

Skladování:

- Skladování kvasinek v suchu a chladu. Otevřená balení je nutné těsně uzavřít a co nejdříve spotřebovat.

9 UPLATNĚNÍ FUNKČNÍHO VZORKU V PRAXI

Název organizace, IČ, DIČ organizace	Sídlo organizace	Stát	Rok uplatnění výstupu	Razítka, datum, podpis zástupce organizace
EPS biotechnology, s.r.o. IČ: 262 95 059 DIČ: CZ26295059	V Pastouškách 205, 68604, Kunovice	ČR	2018	 EPS biotechnology, s.r.o. V Pastouškách 205 68604 KUNOVICE IČ: 26295059 DIČ CZ26295059 www.epsbiotechnology.cz
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. IČ: 601 93 697 DIČ: CZ60193697	Lipová 15 12044, Praha 2	ČR	2018	
Mendelova univerzita v Brně IČ: 621 56 489 DIČ: CZ62156489	Zemědělská 1665/1 613 00, Brno	ČR	2018	

V Kunovicích dne 29.6.2018



Podpis autorů


Mgr. Iveta Bušová


Ing. Vít Paulíček


Ing. Richard Ježdík


Ing. Miroslav Minařík

Siglova

Ing. Martina Siglová, Ph.D.

Radeš

Ing. Radim Holešinský

Jaromír Fiala

Ing. Jaromír Fiala, Ph.D.

Petra Kubizniaková

Ing. Petra Kubizniaková

doc., Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.

doc., Ing. Jiří Sochor, Ph.D.

Podpis odpovědné osoby

Ing. Miroslav Minařík
jednatel společnosti EPS biotechnology, s.r.o.