

Prítomnosť *Torulaspora delbrueckii* v procese fermentácie vína v spojitosti s histamínom

The presence of *Torulaspora delbrueckii* in the wine fermentation process in connection with histamine

Regecová I., Výrostková J., Semjon B., Marcinčák S., Očenáš, P.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

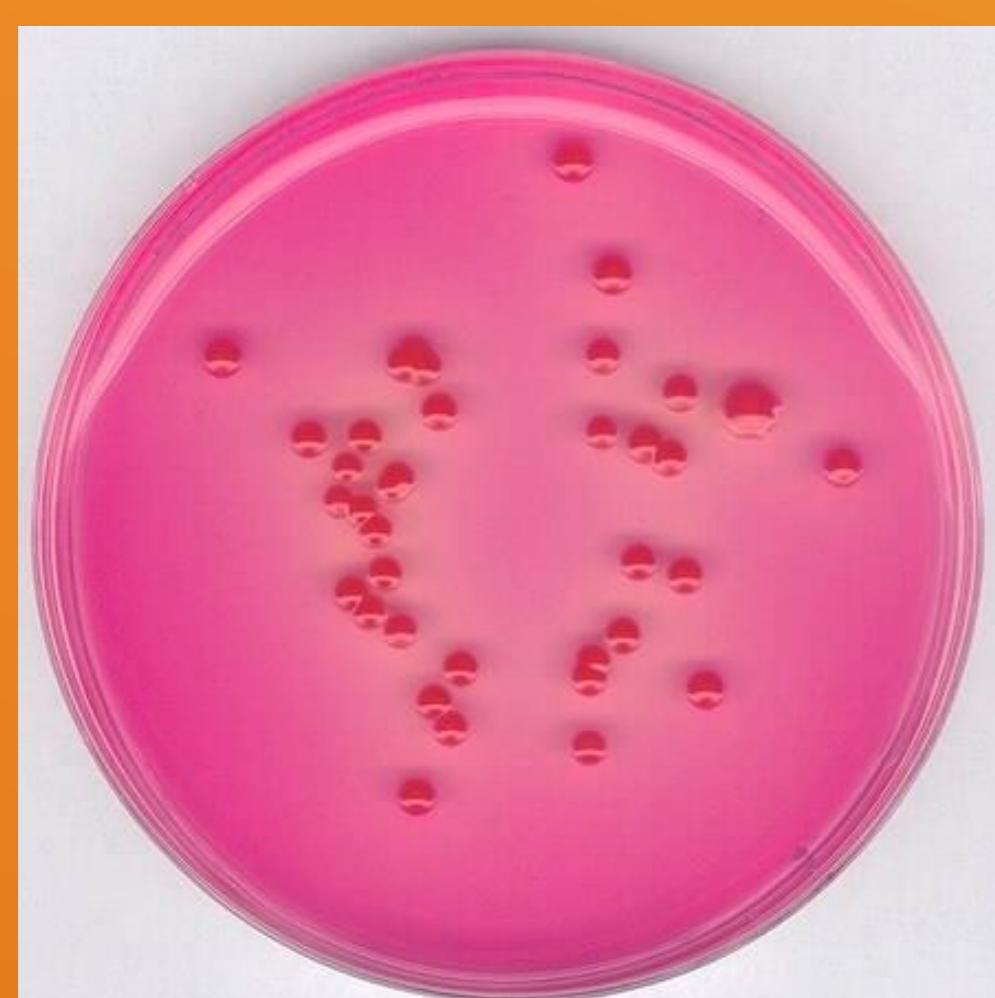
Súhrn

Štúdia je zameraná na detekciu *Torulaspora delbrueckii* vo vzorkách pôdy, listov a bobúľ hrozna a vzoriek odobratých z kvasiaceho muštu a mladého vína (odroda Tramín červený) vo vzťahu k zisteným koncentráciám histamínu počas fermentačného procesu. V skúmaných vzorkách bol kultivačným vyšetrením stanovený počet kvasiniek a plesní (od 3,8 do 6,8 log cfu/g alebo ml). Najvyššia koncentrácia histamínu a najvyšší počet kvasiniek bol zistený na 6. deň v skúmaných vzorkách muštu. Pomocou ITS-PCR-RFLP sa následne identifikoval druh *Torulaspora delbrueckii*. Kvantitatívne vyšetrenie potvrdilo variabilitu rastu *Torulaspora delbrueckii* počas procesu fermentácie, v súvislosti s koncentráciou histamínu v skorých štádiách procesu kvasenia muštu a mladého vína Tramínu červeného.

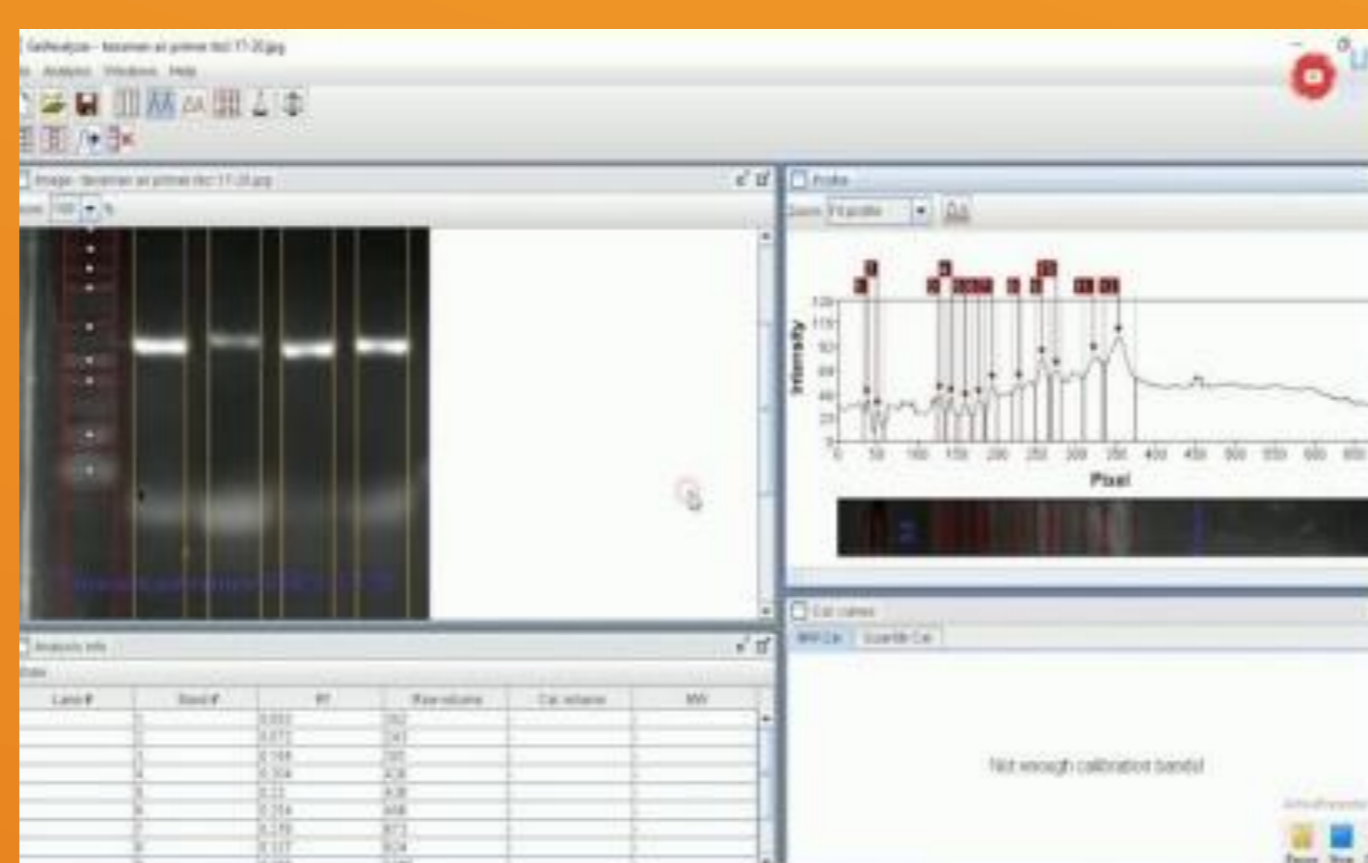
Kľúčové slova: biogénne amíny, PCR, *Torulaspora* sp., víno

Materiál a metodika

- Skúmané vzorky boli odobraté z pôdy, bobúľ, listov viniča a z muštu **Tramínu červeného**. Vzorky boli odobraté z Východoslovenskej vinohradníckej oblasti, Sobraneckého regiónu a vo vinohradníckej obci Orechová. Vzorky boli odobraté v septembri 2022. Vzorka muštu s cukratosťou 21,5 °Brix bola naplnená do 100 litrovej nerezovej nádoby. Následne došlo k spontánnej fermentácii a v dňoch 0., 2., 4., 6., 8. a po 4 týždňoch fermentácie boli z kvasiaceho muštu odobraté vzorky na analýzu prítomnosti biogénneho amínu a mykobioty kvasiaceho muštu a mladé víno.
- Zásobná suspenzia a ďalšie 10-násobné riedenia sa pripravili zo sterilných 1 ml vzoriek podľa pokynov normy **ISO 6887-1 (2017)**.
- Kvantitatívne stanovenie sa uskutočnilo podľa normy **ISO 21527-1 (2010)** na agare Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC) (Hi-Media, India).
- Identifikácia druhu *Torulaspora delbrueckii* sa uskutočnila pomocou pomôcok **ITS-PCR-RFLP** podľa **White et al. (1990)**.
- Získané produkty PCR boli štiepené reštrikčnými endonukleázami *HhaI*, *HaeIII* a *HinI* (New England BioLabs®inc., USA). Veľkosti jednotlivých fragmentov boli zisťované pomocou programu **GelAnalyzer 19.1.** (verzia 14.0.0.0; Oracle Corporation, Kalifornia).
- Stanovenie biogénneho amínu v mušte a mladom víne bolo uskutočnené pomocou ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s fluorescenčným detektorom. Na analýzu biogénnych amínov (histamínu) bol použitý **Thermo Scientific UHPLC systém (Dionex UltiMate 3000 RS)** spojený s fluorescenčným detektorom (FLD).



Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC)
(Hi-Media, India)



GelAnalyzer 19.1. systém



Thermo Scientific UHPLC systém (Dionex UltiMate 3000 RS)

Výsledky a diskusia

Kvantifikácia kvasiniek bola sledovaná pri mikrobiologickom vyšetrení vzoriek pôdy, listov, bobúľ a muštu. Počet kvasiniek v každej vzorke (pôda, list, bobule) sa pohyboval od $3,8 \pm 0,1$ do $5,3 \pm 0,1$ log cfu/g. Vyššie počty kvasiniek boli zistené vo vzorke pôdy $5,3 \pm 0,1$ log cfu/g, po ktorej nasledovali vzorky listov viniča so zastúpením $5,0 \pm 0,1$ log cfu/g. Z muštu boli odobraté vzorky pred fermentáciou (deň 0) a v dňoch 2, 4, 6, 8 a po 4 týždňoch fermentácie. Počet kvasiniek a plesní vo vzorke muštu sa pohyboval od $4,5 \pm 0,1$ do $6,9 \pm 0,1$ log cfu/ml. Počas fermentácie muštu sa počty kontinuálne zvyšovali **do 6. dňa** fermentácie. Následne došlo ku klesajúcemu trendu až do 4 týždňa kvasenia. Súčasne sa sledovala prítomnosť a zmena koncentrácií biogénneho amínu (histamínu) v mušte počas fermentácie. Prudký nárast koncentrácie histamínu v mušte bol zaznamenaný **medzi 2. a 6. dňom** fermentácie muštu. Najvyššie koncentrácie sledovaného BA boli zaznamenané **na 6. deň**, kde v tých istých vzorkách boli zaznamenané aj najvyššie počty kvasiniek.

Následne bola vykonaná presná identifikácia druhu *Torulaspora delbrueckii* metódou ITS-PCR-RFLP pomocou endonukleáz *HaeIII*, *HinI*, *HhaI*. Jednotlivé veľkosti produktov PCR a reštrikčných fragmentov sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Produkt PCR a reštrikčný vzor kvasiniek druhu *Torulaspora delbrueckii* (bp)

Druh kvasiniek	PCR produkt bp	RFLP-ITS-PCR		
		<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>	<i>HhaI</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	850	845	410;380;100	210;130;100

Jednotlivé percentá kvasiniek *Torulaspora delbrueckii* po predchádzajúcej identifikácii boli prepočítané retrospektívne na základe fenotypovej exprese a rastu kolónií na naočkovaných platniach (tabuľka 2). Ako vyplýva z výsledkov detegovaný druh bol prítomný vo všetkých skúmaných vzorkách. Na začiatku spontánnej fermentácie boli zistené nižšie percentá tohoto druhu kvasiniek. Najvyššie percento výskytu sa zistilo **na 6. deň** fermentačného procesu vína. Pri poslednom odbere vzoriek mladého vína po 4 týždňoch kvasenia bolo identifikované už len 1 % týchto kvasiniek.

Tabuľka 2: Percentá kvasiniek druhu *Torulaspora delbrueckii* v jednotlivých vzorkách

Druh kvasiniek	mušt a mladé víno								
	pôda	list	bobule	0.deň	2. deň	4.deň	6.deň	8. deň	4 týždne
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	2%	2%	3%	7%	11%	16%	22%	5%	1%

Záver

Štúdia potvrdila prítomnosť druhu *Torulaspora delbrueckii* v odrode Tramín červený pochádzajúcej z vinohradníckej oblasti Východné Slovensko ako aj počas skorej fermentácie mladého vína. Poukázala aj na súvislosť medzi kvasinkami tohoto druhu a produkciou histamínu.