

Fermentácia šťavy z červenej repy rôznymi kmeňmi *Saccharomyces cerevisiae*

MILAN DRDÁK—ROLANDO CRUZ ALTAMIRANO—ALICA RAJNIAKOVÁ
VALTER VOLLEK—MARGITA ČANIGOVÁ—DARINA BENKOVSKÁ

Súhrn: Pasterizovaná šťava z červenej repy bola inokulovaná 7 kmeňmi kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae*. Fermentácia prebiehala pri 26 °C. Pokles obsahu farbív sa sledoval spektrofotometricky ako betanín. Relatívny pokles obsahu betanínu, izobetanínu, betanidínu a izobetanidínu a sacharidov (fruktóza, glukóza a sacharóza) boli monitorované HPLC. Po 40 h fermentácii kvasinky IO 90, Tokaj 76D a Oenoferm sa ukázali ako najvhodnejšie na fermentáciu šťavy z červenej repy.

Červená repa je bohatým zdrojom prírodných farbív. Ukázalo sa, že výroba koncentráту farbív alebo prášku sa stáva efektívnejšia pri využití fermentácie kvasinkami *Torula* a *Candida utilis* [1]. Využitie kvasných procesov pri výrobe koncentrátov farbív je súčasťou niekoľkých patentov pri inokulácii kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida utilis* [2—4].

V červenej repe (*Beta vulgaris* var. *rubra*) sa nachádzajú červené a žlté dusíkaté farbivá. Skupina červených farbív sa označuje ako betakyány a žltá skupina ako betaxantíny. Spoločne sa označujú ako betalány [5]. V prvej skupine je hlavným pigmentom červenofialový betanín, ktorý tvorí 75—95 % celkovej červenej farby. Zvyšok červených farbív predstavuje izobetanín, prebetanín, izoprebetanín [6, 7]. V druhej skupine sú hlavnými žltými pigmentmi vulgaxantín I a vulgaxantín II [8]. Ďalším žltým farbivom je kyselina betalámová, ktorá vzniká rozkladom betanínu [9].

Na fermentáciu sme použili 7 kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, pričom sme sledovali zastúpenie jednotlivých farbív a súčasne rozhodujúce sacharidické zložky vo fermentovanej šťave a to sacharózu, glukózu a fruktózu.

Doc. Ing. Milan Drdák, DrSc., Ing. Rolando Cruz Altamirano, CSc., Ing. Alica Rajniaková, CSc., Ing. Darina Benkovská, Katedra sacharidov a konzervácie potravín; RNDr. Valter Vollek, Ing. Margita Čanigová, CSc., Katedra mikrobiológie, biochémie a biológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Materiál a metódy

Príprava vzoriek. Vzorky sme pripravili podľa nášho publikovaného postupu [4], ktorý sa skladá z drvenia čerstvého materiálu, lisovania, odstredenia (3000 min^{-1}), pasterizácie a fermentácie. Na fermentáciu sme použili hlboko-prekvášajúci kmeň mezofilných kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (Oenoferm, fa Erbslöh, Geisenheim) a 5 nových izolovaných kmeňov (pracovné označenie 6C, 11C, IO 90, 3A, 74F). Kmene sú charakterizované ako rezistentné proti alkoholu, vhodné na proces sekundárnej fermentácie vína a *Saccharomyces cerevisiae* Tokaj 76/D V 10-25-35 zo zbierky KVÚVV (Komplexný výskumný ústav vinársky a vinohradnícky) Bratislava, ktorý sme odporúčali v predchádzajúcich prácach [4, 10, 11]. Oenoferm bol revitalizovaný podľa pokynov výrobcu, ostatné kmene rozmnožené na sladinkovej pôde. Pasterizovanú šťavu sme inokulovali 1×10^7 živých buniek na 1 ml po úprave pH na hodnotu 5,8 5 % HCl. Fermentácia prebiehala v tme pri teplote 26°C pod kvasným uzáverom. Vzorky sme odobrali po 40, 60 a 180 h fermentácie. Všetky vzorky sme pripravili z rovnakej šťavy.

Stanovenie farbív. Na stanovenie pigmentov sme použili spektrofotometrickú metódu vypracovanú Nilssonom [12], ktorá nevyžaduje separáciu jednotlivých farbív a umožňuje bez väčšej chyby stanoviť betakyány a betaxantíny. V metóde sa všetky betakyány pokladajú za betanín a všetky betaxantíny za vulgaxantín I, ktoré spolu s izobetaniínom predstavujú až 95 % všetkých farbív. V práci sme sa zamerali na sledovanie zmien červených farbív, ktoré sa vyjadrujú ako betanín (x) podľa vzťahu

$$x = 1,095 (A_{537} - A_{600}),$$

kde A_{537} a A_{600} sú absorbancie roztokov merané pri 537, resp. 600 nm. Ak je známy absorpčný koeficient, pre betanín $E_1^{1\%} = 1120$, z nameranej absorbancie pre betanín (x) možno vypočítať koncentráciu betanínu v roztoku.

HPLC betakyánových farbív. Na rozdelenie a stanovenie betakyánov sme použili kvapalinový chromatograf (Laboratorní přístroje), ktorý pozostával z dvoch púmp HPP 4001, programátora gradienta GP 1, UV VIS detektora LCD 2563 a zapisovača TZ 4620. Vzorky (20 μl) sa dávkovali dávkovačom LCI 30.

Podmienky analýzy: kolóna Sepharon CGX C 18 5 μm (Tessek Ltd., Praha), prietok $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, tlak 10 MPa, filter s maximom 546 nm. Roztok A: $\text{CH}_3\text{OH}/0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ (18 : 82 v/v), pH upravené na 2,7 kyselinou fosforečnou. Roztok B: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (60 : 40 v/v). Gradient: 100 % A začiatok, koniec 20 % A a 80 % B.

HPLC sacharidov. Na stanovenie sacharidov sa použil kvapalinový chromatograf zložený z pumpy HPP 4001, diferenciálneho refraktometra RIDK 101

(termostatový na 26 °C), zapisovača TZ 4620 a dávkovača LCI 30 (Laboratorní přístroje, Praha).

Podmienky analýzy: kolóna SGX NH₂ 5 µm (Tessek Ltd., Praha), mobilná fáza acetonitril/voda (80 : 20 v/v), prietok 0,6 ml · min⁻¹, tlak 3,5 MPa, nástrek 20 µl vzorky. Sacharidy sa stanovili na základe štandardného nástreku zmesi 1 g glukózy + 1 g fruktózy + 1 g sacharózy v 1000 ml roztoku.

Výsledky a diskusia

Podmienkou úspešnej výroby koncentráту farbív z červenej repy pri využití fermentačného postupu je rýchly nábeh kvasného procesu a jeho prudký priebeh. Ukázalo sa, že napriek inaktivácii enzýmov v odlisovanej šťave pred vlastnou fermentáciou dochádza počas riadenej fermentácie k značnému úbytku farbív ako dôsledok rozkladných procesov rozhodujúcich farbív [11]. Priebehu oxidačných zmien možno zabrániť reguláciou atmosféry pred začatím fermentácie a následne vedením procesu pod kvasným uzáverom. Výber vhodných kmeňov sme preto robili vzhľadom na rýchly nábeh fermentácie sprevádzaný produkciou CO₂, t.j. kvasinky s vhodným enzýmovým systémom pre dané zloženie šťavy z červenej repy (vysoký podiel sacharózy) a so schopnosťou rýchlo utilizovať cukry. Konečná koncentrácia sacharidov v rozhodujúcej miere ovplyvní podiel farbív v sušine vyrobeného koncentráту farbív, resp. prášku. Pri výbere je však nutné brať ohľad i na zmeny pigmentov ako výsledok prípadných oxidačných zmien, enzýmovej činnosti a pôsobenia metabolitov kvasiniek.

Tieto dve skutočnosti viedli k tomu, že počas fermentácie v súlade s vypracovaným postupom výroby koncentráту farbív [10] sme odoberali vzorky na stanovenie cukrov a farbív, a to po 40, 60 a 180 h. Posledný odber už nemá z hľadiska výroby koncentrátu opodstatnenie. Robili sme ho s cieľom porovnať správanie sa farbív v rôznych kvasných prostrediach a možnosti ďalšieho ovplyvnenia zastúpenia farbív prítomnými enzýmami, prípadne ako možnosť ustálenia určitej rovnováhy medzi izomérmí farbív v danom prostredí a následnej i keď pomalšej chemickej hydrolýzy a iných možných zmien v danom prostredí.

V tab. 1 sú zhrnuté výsledky stanovenia jednotlivých farbív počas fermentácie. Podiel jednotlivých farbív, a to betanínu, betanidínu, izobetanínu a izobetanidínu vyjadrujeme ako relatívne zastúpenie, ktoré je vypočítané z celkovej plochy získaných chromatografických záznamov rozdelenia farbív pomocou HPLC. Osobitne uvádzame tzv. degradačné splodiny, ktoré vytvárali samostatný pík na zázname. Jednotlivé farbivá sme identifikovali na základe merania absorpčných spektier, určenia *R_f* a podľa elučných časov na záznamoch HPLC [11].

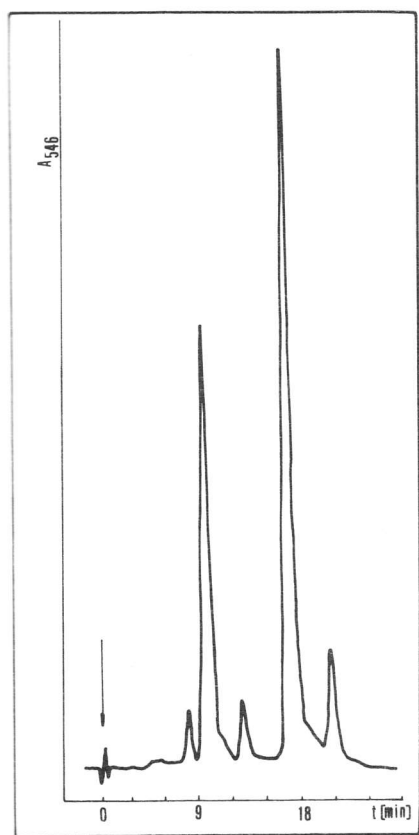
Tabuľka 1. Percentuálne zastúpenie jednotlivých farbív v červenej repe počas fermentácie
Table 1. Percentage of individual red beet dyes during fermentation

Kvasinka ¹	Čas fermentácie ² [h]	Betanín ³	Izobetanín ⁴	Betanidín ⁵	Isobetanidín ⁶	DP
		[%]				
Oenoferm	40	26,32	6,69	45,69	8,03	3,25
	60	11,59	4,29	68,33	14,23	3,54
	180	2,83	3,92	72,48	14,77	4,37
11C	40	41,46	8,78	38,13	8,36	3,25
	60	8,51	2,85	69,64	14,07	4,93
	180	7,84	2,09	70,60	14,37	5,05
IO 90	40	21,58	4,84	59,94	10,65	3,01
	60	10,63	3,75	70,37	11,74	3,52
	180	3,84	1,09	75,82	14,39	5,31
6C	40	31,21	6,00	53,15	7,09	2,25
	60	18,80	3,86	63,64	10,41	3,27
	180	10,49	2,80	65,70	14,70	6,26
3A	40	27,24	5,26	55,52	9,25	2,70
	60	14,73	5,06	67,96	10,42	2,82
	180	11,20	2,68	68,00	10,77	7,37
Tokaj 76D	40	33,24	6,79	48,87	8,12	2,96
	60	18,64	4,10	60,11	13,27	3,85
	180	25,68	6,76	47,67	8,26	8,63
74F	40	21,41	4,55	60,32	9,92	3,71
	60	13,65	3,69	66,04	12,88	3,72
	180	18,70	4,87	54,01	10,30	12,20
Pasterizovaná šťava ⁷		81,18	17,12	—	—	1,69

DP — degradačné produkty; Products of degradation.

¹Yeast strain; ²Fermentation time; ³Betanine; ⁴Isobetanine; ⁵Betanidine; ⁶Isobetanidine; ⁷Pasteurized juice.

Príklady chromatografických záznamov pre vzorky fermentované kmeňom 3A po 40, 60 a 180 h sú na obr. 1—3. Z vypočítaných priemerných údajov pre uvažované kmene kvasiniek vyplýva rozdielny vplyv na zastúpenie sledovaných farebných zložiek v konečnom produkte. Zaujímavý je i pohľad na rôzny podiel vznikajúcich degradačných splodín počas fermentácie, ako aj na rôzny stupeň odštiepenia sacharidovej zložky z heteroglykozidov. Rovnako vznik izoforiem je odlišný a pomer sa mení počas fermentácie, ako aj po ďalšom uložení vzoriek (180 h). Na základe pokusu sa nedá jednoznačne rozhodnúť, či ide o rôznu produkciu enzýmov, ktoré urýchľujú tieto procesy, alebo je výsledok ovplyvne-



Obr. 1. Zastúpenie červených farbív vo fermentovanej šťave kmeňov 3A po 40 h.

Fig. 1. Red dyes occurrence in juice fermented by strain 3A after 40 h.



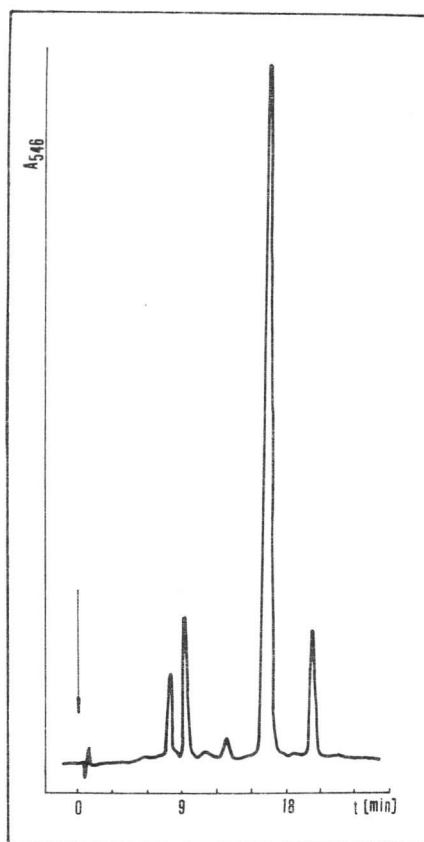
Obr. 2. Zastúpenie červených farbív vo fermentovanej šťave kmeňom 3A po 60 h.

Fig. 2. Red dyes occurrence in juice fermented by strain 3A after 60 h.

ný i možnými následnými zmenami po fermentácii (chemická hydrolyza, uštieňovanie rovnováhy medzi jednotlivými formami farbív a pod.). Na ilustráciu možno uviesť rozdielne pH vzoriek po fermentácii, a to pre Oenoferm 4,6; 11C 4,3; IO 90 4,4; 3A 4,2; 6C 4,3; Tokaj 76D 4,2 a 74F 4,2.

Zaujímavé je porovnanie poklesu obsahu červených farbív na základe spektrofotometrického stanovenia (vyjadrené ako betanín v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$). V tab. 2 sú výsledky stanovenia betakyánov vyjadrené ako retencia R (%).

Z požiadavky a odporúčania rýchlej fermentácie, ktorá sa končí v rozmedzí 40 a 48 h je možné porovnať účinok kmeňov 11C, 6C a Oenoferm, taktiež IO 90 a 3A sú porovnateľné. Z pohľadu retencie farbív, pomerneho zastúpenia



Obr. 3. Zastúpenie červených farbív vo fermentovanej šťave kmeňom 3A po 180 h.

Fig. 3. Red dyes occurrence in juice fermented by strain 3A after 180 h.

východiskových červených farbív sa dajú porovnať kmene Oenoferm, 11C, 6C, 76D a 3A.

V tab. 3 sú sumarizované výsledky stanovenia fruktózy, glukózy a sacharózy v jednotlivých vzorkách. Vzorky sme odobrali v rovnakých časových intervaloch ako na stanovenie betakyánov. Priemerné hodnoty stanovenia poukazujú na rozdielnú rýchlosť úbytku sacharózy spôsobenú kvasinkovou invertázou, ako aj na rozdielnú rýchlosť odbúrania glukózy a fruktózy. Na obr. 4 dokumentujeme chromatografickým záznamom priebeh fermentácie po 40 h pre použitý kmeň kvasiniek 76D. Zo záznamov vyplynulo, že okrem glukózy, fruktózy a sacharózy obsahuje *Beta vulgaris* var. *rubra* sacharid arabinózu, ktorá sa prakticky počas fermentácie nemení. Z hľadiska rýchleho odstránenia prítom-

Tabuľka 2. Zmena koncentrácie červených farbív počas fermentácie
Table 2. Changes in concentrations of red beet dyes in juice

Kvasinka ¹	Koncentrácia červených farbív v šťave c [mg.l ⁻¹ betanínu] ²⁾					
	40 h		60 h		180 h	
	c	R [%]	c	R [%]	c	R [%]
Oenoferm	374,5	62,0	343,2	55,4	27,8	36,8
11C	374,5	62,0	349,0	56,3	224,9	36,3
IO 90	357,8	57,7	314,8	50,8	199,5	32,2
3A	351,0	56,6	305,0	49,2	180,9	29,2
6C	371,5	59,9	310,9	50,2	177,9	28,7
Tokaj 76D	346,1	55,8	305,1	49,2	104,6	16,9
74F	339,2	54,7	300,2	48,4	84,1	13,6

R — retencia; Retention.

Počiatočná koncentrácia betanínu (619,8 ml.⁻¹) v pasterizovanej šťave reprezentuje 100 % retenciu.

Initial concentration of betanine (619.8 mg l⁻¹) in pasteurized juice represents 100% retention.

¹Yeast strain; ²Concentration of red dyes in juice c [mg l⁻¹ of betanine].

Tabuľka 3. Zmeny koncentrácie sledovaných sacharidov počas fermentácie šťavy červenej repy
Table 3. Concentration changes in investigated saccharides during red beet juice fermentation

Kvasinka ¹	c — koncentrácia sacharidov ² [g.l ⁻¹]								
	40 h			60 h			180 h		
	Fruk-tóza ³	Glu-kóza ⁴	Sacha-róza ⁵	Fruk-tóza ³	Glu-kóza ⁴	Sacha-róza ⁵	Fruk-tóza ³	Glu-kóza ⁴	Sacha-róza ⁵
Oenoferm	9,8	8,8	+	6,0	5,1	—	5,1	4,7	—
11C	23,1	10,4	5,0	11,6	5,6	1,6	7,6	3,9	—
IO 90	9,6	5,4	3,4	8,5	6,0	0,3	6,6	2,5	—
3A	18,1	10,3	7,5	11,9	11,7	1,3	5,4	10,2	+
6C	18,0	11,1	5,0	9,1	4,9	0,2	8,3	4,8	+
Tokaj 76D	10,2	9,1	1,4	7,6	7,6	+	6,3	5,1	—
74F	17,3	10,0	6,5	8,2	4,8	1,0	7,1	1,7	—

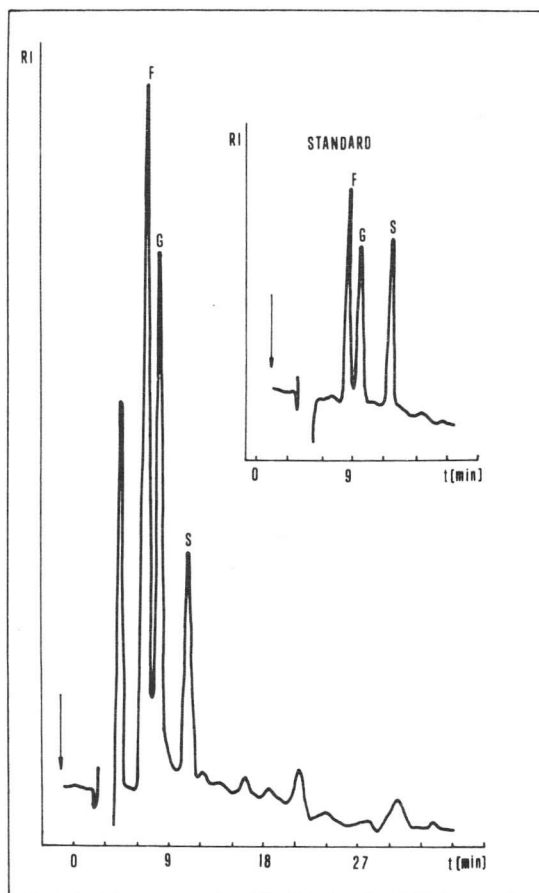
— Stopy; Traces.

— Nestanovené pri danej citlivosti detektora; Not determined at given detector sensitivity.

Koncentrácia sacharidov v pasterizovanej šťave z červenej repy bola: fruktóza — 4,7 g.l⁻¹, glukóza — 5,0 g.l⁻¹, sacharóza — 54,1 g.l⁻¹.

Concentration of saccharides in pasteurized red beet juice was: fructose — 4.7 g l⁻¹, glucose — 5.0 g l⁻¹, sucrose — 54.1 g l⁻¹.

¹Yeast strain; ²Saccharides concentration; ³Fructose; ⁴Glucose; ⁵Sucrose.



Obr. 4. Stanovenie sacharidov HPLC vo fermentovanej šťave kmeňom 76D po 40 h.
Fig. 4. Saccharides determination by HPLC in juice fermented by strain 76D after 40 h.

ných cukrov a najnižšieho obsahu zvyškových sacharidov po 40, resp. 60 h možno hodnotiť Oenoferm, IO 90 a 76D ako vlastné kmene.

Po uvážení oboch rozhodujúcich požiadaviek na kvasinky pri fermentácii šťavy z červenej repy možno odporúčať kmene Tokaj 76D, Oenoferm, IO 90 a 3A. Odporúčanie je výsledkom kompromisu vo vzťahu k retencii farbív a využitiu cukrov.

Podakovanie patrí doc. Ing. Fedorovi Malíkovi, CSc., za poskytnutie nových izolovaných kmeňov kvasiniek.

Literatúra

1. ADAMS, J. P.—von ELBE, J. H.—AMUNDSON, C. H., J. Food Sci., 41, 1976, s. 78—81.
2. CHKEIDZE, Z. K., ZSSR patent, 449922 (1974).
3. VERNIERS, S. A., Francúzsky patent, 2399467 (1977).
4. DRDÁK, M.—NAŠČÁKOVÁ, M. Československý patent, 255529 (1984).
5. MABRY, T. J.—DREIDING, A. S., Recent Advances in Phytochemistry. New York, Academic Press 1968, 148 s.
6. WYLER, H.—VINCENTI, M.—MERCIER, M.—SASSU, G.—DREIDING, A. S., Helv. Chim. Acta, 42, 1959, s. 1696—1698.
7. WYLER, H.—DREIDING, A. S., Experientia, 17, 1961, s. 23—25.
8. MAMBRY, T. J., The betacyanins and betaxantins. In: Comparative Phytochemistry (ed. T. Swain). London, Academic Press 1966, s. 231—244.
9. KIMLER, L.—LARSON, R. A.—MESSENGER, R.—MOORE, J. B.—MAMBRY, T. J., Chem. Commun., 1971, s. 1329—1340.
10. DRDÁK, M.—NAŠČÁKOVÁ, M., Bull. Potr. Výsk., 23 (3), 1984, č. 4, s. 313—322.
11. DRDÁK, M.—VALLOVÁ, M.—DAUČÍK, P.—GREIF, G., Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 188, 1989, s. 547—550.
12. SAGUY, I.—KOPELMAN, I. J.—MIZRAHI, S., J. Food Sci., 43, 1978, s. 124—127.

Do redakcie došlo: 17. 3. 1992

Red beet juice fermentation by various strains of *Saccharomyces cerevisiae*

Summary

Pasteurized red beet juice has been inoculated with the yeast of seven different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation took place at 26 °C. The decrease of red beet pigments has been spectrophotometrically determined and expressed as betanine. The average percentage of betanine, isobetanine, betanidine, isobetanidine and the saccharide components (fructose, glucose and sucrose) have been monitored by HPLC. After 40 h of fermentation, the strains Oenoferm, IO 90 and Tokaj 76D being the most suitable for fermentation of red beet juice.

Ферментирование сока из красной свеклы разными штаммами *Saccharomyces cerevisiae*

Резюме

Пастеризованный сок из красной свеклы был инокулирован 7 штаммами дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ферментирование проходило при 26 °C. Понижение яркости красок наблюдалось спектрофотометрически как бетаин. Относительное понижение бетаина, изобетанина, изобетанидина и сахаридов (фруктоза, глюкоза, сахароза) были мониторируются HPLC. После 40 часов ферментирования дрожжи IO 90, Токай 76Д и Оенофери показали наиболее подходящими для ферментирования сока из красной свеклы.