

Vplyv sírnych amínokyselín na využívanie sulfátu a tvorbu sulfitu a sulfidu u vínnych kvasiniek

863.252.41
547.466 548.22

Doc. Ing. ERICH MINÁRIK, CSc. a Ing. ANTON NAVARA, CSc. Výskumný ústav vinohradnícky a vinársky, Bratislava

Je známe, že zloženie muštu ovplyvňuje do značnej miery využívanie sulfátu vínnyimi kvasinkami a tvorbu siričitanu v kvasiacich muštoch u tzv. SO₂-produkujúcich kmeňov. Ukázalo sa, že najmä vyššia pôvodná koncentrácia sulfátu a inaktivácia oxidačných enzýmov muštu pasterizáciou túto tvorbu značne stimulujú (Minárik 1972, 1973a). Naznačili sme tiež, že niektoré sírne amínokyseliny môžu využívanie sulfátu a tvorbu resp. akumuláciu siričitanu počas kvasenia brzdiť prípadne až znemožniť (Eschenbruch 1972a, 1972b). V tomto príspevku uvádzame niektoré výsledky pokusov uskutočnených r. 1973 na objasnenie tohoto problému.

Materiál a metodika

Aby sme eliminovali vplyv zloženia muštu, používali sme k laboratórnym pokusom syntetickú pôdu s 10 % glukózy, 1 % l-asparagínu, 0,05 % síranu horečnatého a 0,05 % kyslého fosforečnanu draselného v destilovanej vode. 200 ml tekutého prostredia sa plnilo do 500 ml kvasných fľaš s kvasným uzáverom. Pôda sa sterilizovala 2krát v prúdiacej pare v 24 h intervaloch vždy po dobu 30 min. Po ochladení sa do pôdy dávali 2,5 % roztoky metioninu alebo cysteinu v koncentráciách 0,5, 1,0 a 1,5 g/l, alebo sa dözovala zmes oboch amínokyselín v pomere 1:1 tak, že výsledná koncentrácia bola opäť 0,5, 1,0 a 1,5 g/l.

Banky s pôdou sa potom zaočkovali rôznymi kmeňmi kvasiniek: W 72 a W 36 (*Saccharomyces pastorianus*), W 25 (*Saccharomyces carlsbergensis*), Hliník 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) a Myslenice 1 (*Saccharomyces oviformis*). Kmene W 72, W 36 a W 25 patria k tzv. SO₂-produkujúcim kvasinkám, kmene Hliník 1 a Myslenice 1 sa používajú ako čisté kultúry vo vinárstve v ČSSR. Používal sa vždy 3 % zákvas 3–4 dni starých kultúr.

Kvasné fľaše sa po zaočkovaní uzavreli definitívne kvasnou trubicou naplnenou glycerolom a okraj fľaš so zátkou sa zalial parafínom.

Priebeh kvasenia sa sledoval podľa úbytku CO₂ registrovaného denným vážením fľaš. 5 týždňov od začiatku kvasenia, keď úbytky na váhe neboli väčšie ako 0,02 g/24 h, sa v kvasnom médiu stanovil sulfát gravimetricky podľa Rebeleina (1969), celkový SO₂ podľa Paula (1954); v jednej sérii pokusov sa stanovil aj sírovodík podľa Blaženovej et al. (1954) s modifikáciou podľa Navaru (Minárik a Navara 1973).

Výsledky a ich zhodnotenie

V tabuľke 1 vidieť výsledky pokusov s vplyvom metioninu na tvorbu sulfitu a sulfidu počas alkoholického kvasenia. Silný inhibičný vplyv oboch amínokyselín je zjavný: 500 mg/l metioninu v prostredí pred kvasením znížilo tvorbu celkového SO₂ o 87,5 až 89 % v porovnaní s kontrolou u všetkých kmeňov kvasiniek. Pri 1000 mg/l metioninu toto zníženie bolo 85 až 88 % a pri 1500 mg/l metioninu 86 až 89 %. To prakticky znamená, že už 500 mg/l metioninu prakticky znížilo tvorbu sulfitu u SO₂-produkujúcich kmeňov na 11 až 12 % pôvodného množstva vytvoreného a nahromadeného sulfitu v prostredí bez sírnych amínokyselín.

V tabuľke 2 sú zhrnuté výsledky vplyvu cysteinu na tvorbu sulfitu a sulfidu tými istými kmeňmi kvasiniek. Inhibícia tvorby SO₂ vyvolaná cysteínom bola pri kmeňoch W 72 a W 36 takmer úplná (92 až 100 %), pri kmeni W 25 58 až 100 % a pri kmeni Hliník 1 64 až 87 %. Celkové brzdenie akumulácie SO₂ bolo najsilnejšie pri kmeňoch W 72 a W 36, teda pri kvasinkách so silnou schopnosťou využívania sulfátu a produkcie sulfitu. Najslabšia inhibícia sa zaznamenala pri „kultúrnych“ kvasinkách Hliník 1.

Tvorbu sulfidu kvasinkami sírne amínokyseliny zrejme neovplyvnili. Nenašiel sa ani vzťah medzi produkciou sulfitu a sulfidu. Je však zjavné, že tzv. SO₂-produkujúce kvasinky vytvárajú podstatne menej sírovodíka ako tzv. normálne kvasinky (Hliník 1). Tento poznatok možno

Tabuľka 1. Vplyv metioninu na tvorbu sulfitu a sulfidu

Kmeň kvasiniek	Kontrola		500 mg/l			1000 mg/l			1500 mg/l		
	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]
W 72	221,1	17,04	24,4	59,64	89	34,6	119,28	85	30,1	221,60	86
W 36	312,0	153,36	39,1	170,40	87,5	41,0	221,52	87	34,6	119,52	89
W 25	173,0	136,32	19,3	170,40	89	20,5	102,24	88	19,3	170,40	89
Hliník 1	141,6	204,48	15,4	306,70	89	16,7	289,68	88	16,7	272,60	88

Tabuľka 2. Vplyv cysteinu na tvorbu sulfitu a sulfidu

Kmeň kvasiniek	Kontrola		500 mg/l			1000 mg/l			1500 mg/l		
	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]	SO ₂ mg/l	H ₂ S μg/l	zníž. tvorby SO ₂ o [%]
W 72	221,1	17,04	10,6	102,24	92	—	954,24	100	1,0	153,36	100
W 36	312,0	153,36	4,2	76,68	99	—	110,76	100	—	357,84	100
W 25	173,0	136,32	72,2	76,68	58	18,6	51,12	89	1,0	119,28	100
Hliník 1	141,6	204,48	50,6	281,16	64	36,2	289,70	75	18,6	306,72	87

Tabuľka 3. Využívanie sulfátu na tvorbu sulfitu rôznymi kmeňmi SO_2 -produktujúcich a normálnych kvasiniek

Kmeň	Aminokyselina	W 72			W 36			W 25			Hlink 1			Myslenice 1		
		Využitý sulfát mg/l	Tvorba SO_2 mg/l	Perc. využitého sulfátu	Využitý sulfát mg/l	Tvorba SO_2 mg/l	Perc. využitého sulfátu	Využitý sulfát mg/l	Tvorba SO_2 mg/l	Perc. využitého sulfátu	Využitý sulfát mg/l	Tvorba SO_2 mg/l	Perc. využitého sulfátu	Využitý sulfát mg/l	Tvorba SO_2 mg/l	Perc. využitého sulfátu
Metionin mg/l	0	952	102,5	23,7	1010	99,9	25,1	1125	120,4	28,0	564	56,4	14,0	632	60,2	15,7
	500	204	9,6	5,1	236	12,8	5,9	208	7,7	5,2	227	7,0	5,7	212	8,3	5,3
	1000	271	11,5	6,7	236	9,6	5,9	376	19,8	9,4	275	6,4	6,8	298	7,0	7,4
	1500	324	10,2	8,1	327	11,5	8,1	436	15,4	10,9	357	8,3	8,9	339	7,7	8,4
Cystein mg/l	0	952	102,5	23,7	1010	99,9	25,1	1125	120,4	28,0	564	56,4	14,0	632	60,2	15,7
	500	244	3,2	6,0	156	3,2	3,9	257	35,8	6,3	383	70,4	9,6	241	21,6	6,0
	1000	242	3,2	6,0	522	79,2	13,0	331	32,8	8,2	370	44,8	9,2	325	15,6	8,1
	1500	454	39,2	11,3	316	3,2	7,9	298	3,2	7,4	415	28,4	10,4	319	4,8	8,0

Tabuľka 4. Tvorba sulfitu (mg/l) rôznymi kmeňmi kvasiniek pri súčasnom pridaní metionínu a cysteínu [1 : 1]

Kmeň kvasiniek	Kontrola [bez aminokyselín]	Metionin + Cysteín		
		500 mg/l	1000 mg/l	1500 mg/l
W 72	181,4	0,6	—	—
W 36	219,0	0,6	—	—
W 25	236,6	2,2	—	—
Hlink 1	129,4	2,2	—	—
Myslenice 1	141,4	—	—	—

zaznamenať tak v prostredí s metioninom alebo cysteínom, ako aj v prostredí bez týchto sírnych aminokyselín. Kmeň Hlink 1 vytvoril napr. v kontrolnej vzorke 204,5 $\mu\text{g/l}$ H_2S , v prostredí s metioninom 272,6 až 306,7 $\mu\text{g/l}$ H_2S a 281,2 až 306 $\mu\text{g/l}$ H_2S v prostredí s cysteínom. SO_2 -produktujúce kmene naproti tomu vytvárali za inak rovnakých kvasných podmienok 17 až 153 $\mu\text{g/l}$ H_2S v kontrolnej vzorke bez aminokyselín a 59,6 až 221,5 $\mu\text{g/l}$ H_2S v prostredí s metioninom. V médiu s cysteínom sa zaznamenali zatiaľ nevysvetlené výkyvy (51,1 až 954,2 $\mu\text{g/l}$ H_2S). Predpoklad, že SO_2 -produktujúce kvasinky sírovodík prakticky netvorí (Dittrich a Staudenmayer 1968), sa takto nepotvrdil.

V tabuľke 3 vidieť vplyv metionínu a cysteínu na využívanie sulfátu a tvorbu sulfitu 5 rôznymi kmeňmi kvasiniek. Využívanie sulfátu je obidvoma aminokyselinami značne brzdene už od 500 mg/l. Kontrolné vzorky bez sírnych aminokyselín vykazovali u SO_2 -produktujúcich kmeňov 23,7 až 28 % využívanie sulfátu, vo vzorkách s metioninom len 5,1 až 10,9 % a v prostredí s cysteínom iba 6,0 až 13 % využívanie sulfátu. Normálne kmene s menšou tvorbou sulfitu využívali sulfát v prostredí bez aminokyselín na 14,0 až 15,7 %, v prostredí s metioninom len na 5,3 až 8,9 % a v prostredí s cysteínom iba na 6,0 až 10,4 %.

Z tohoto vyplýva, že metionín a cysteín inhibujú síce pomerne viac kmene tvoriace veľa sulfitu ako tzv. normálne kmene, celková schopnosť využívať sulfát je za prítomnosti sírnych aminokyselín u oboch skupín kvasiniek približne rovnaká.

Paralelne s inhibíciou využívania sulfátu brzdia sírne aminokyseliny aj tvorbu sulfitu a jeho akumuláciu v kvasnom prostredí. Tak sa napr. v prostredí bez aminokyselín vytvorilo u kmeňov W 72, W 36 a W 25 takmer o 100 % viac celkového SO_2 ako u kmeňa Hlink 1 (99,9 až 120,4 mg/l oproti 56,4 až 60,2 mg/l); metionín alebo cysteín v prostredí pred kvasením znižujú túto tvorbu sulfitu; až na malé výnimky, na zlomky týchto hodnôt. Brzdíaci účinok aminokyselín na tvorbu sulfitu možno zaznamenať u oboch skupín kvasiniek.

V ďalšej sérii pokusov sa sledoval vplyv oboch sírnych aminokyselín prítomných súčasne v prostredí pred kvasením. Ako vysvitá z tabuľky 4, už 500 mg/l metioni-

nu a cysteínu (1:1) znemožňujú prakticky akúkoľvek produkciu SO_2 : kontrolné médiá bez aminokyselín vykazovali po kvasení 129,4 až 236,6 mg/l celkového SO_2 za tých istých podmienok kvasenia. Výsledky týchto pokusov potvrdili, že súčasná prítomnosť metionínu a cysteínu v prostredí vyvoláva kumulatívny účinok. Cysteín znižuje využívanie sulfátu v kvasničnej bunke a reguluje zrejme aktiváciu a transport sulfátu do bunky. Metionín znižuje aktiváciu sulfátu na adenosín-5'-fosfosulfát ATP-sulfurylázou (Eschenbruch 1972b, Minárik 1973b). Tým sa brzdí aj tvorba sulfitu. Vysoké koncentrácie metionínu a cysteínu súčasne prítomných v kvasnom prostredí pred kvasením môžu tak využívanie sulfátu až úplne znemožniť.

Všetky doterajšie pokusy v tejto oblasti dokazujú, že sulfit sa počas kvasenia tvorí takmer výlučne redukciou sulfátu: u normálnych kmeňov kvasiniek sa sulfit redukuje ďalej na sulfid, ktorý bunky využívajú na syntézu sírnych aminokyselín metionínu a cysteínu. U tzv. SO_2 -produktujúcich kvasiniek sa enzymatická redukcia zastavuje pri sulfite, ktorý sa v prostredí hromadí. Ak majú kvasinky v prostredí pred kvasením dostatok metionínu alebo cysteínu, nemusia tieto aminokyseliny syntetizovať, čím im odpadá komplikovaná a na energiu náročná redukcia sulfátu. Výsledkom toho potom je nielen minimálne využívanie sulfátu, ale aj minimálna tvorba sulfitu.

Skutočnosť, že SO_2 -produktujúce kvasinky vykazujú súčasne aj vyššie percento využívaného (zredukovaného) sulfátu, kým kmene, ktoré tvoria len málo sulfitu, využívajú aj pomerne málo síranu, poukazuje na fakt, že bunková stena kvasiniek a enzymatická aktivácia sulfátu na adenosín-5'-fosfosulfát a 3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfát hrajú významnú úlohu pri enzymatickej redukcii sulfátu i pri nahromadení sulfitu v kvasnom prostredí (Eschenbruch 1972a, 1972b). Ukázali sme, že aj pôvodná koncentrácia sulfátu v médiu pred kvasením tu hrá nemalú úlohu; ovplyvňuje však len kvasinky vytvárajúce väčšie množstvo sulfitu (Minárik 1972).

Z praxe je známe, že mušty rôznej proveniencie, ročníkov a odrôd vykazujú značné rozdiely v obsahu metionínu a cysteínu. Pri použití toho istého kmeňa kvasiniek alebo spontánneho kvasenia sa tak môžu vytvárať veľmi rozdielne množstvá celkového SO_2 . Doteraz však nie je

vysvetlené, prečo ten istý kmeň tvorí za tých istých podmienok kvasenia muštu sčasti veľmi rozdielne množstvá sulfitu.

Pokiaľ ide o tvorbu sulfidu nemožno zatiaľ jednoznačne vysvetliť, prečo sa počas kvasenia muštu nahromadí niekedy také množstvo sírovodíka, že mladé vína vykazujú také množstvo sírovodíka, že sa ani chuťovo ani vo vône vína neprejavujú. Možno však predpokladať, že vznik sírovodíka súvisí predovšetkým so zložením hroznového muštu, najmä s prítomnosťou reziduí síry a sírnych zlúčenín z pesticídov; do istej miery sa pripúšťa aj samotná vlastnosť kmeňa kvasiniek. Ďalšie štúdium podmienok vzniku H₂S v kvasiacich muštoch a v mladých vínach azda prispeje k objasneniu tohoto úkazu.

Literatúra

- [1] BLAŽENOVÁ, A. B. - ILJUJSKAJA, A. A. - RAPPAPORT, F. M.: Analyza plynu v chemickom priemysle (rus.). GISCH, Moskva 1954.
- [2] DITTRICH, H. H. - STAUDENMAYER, Th.: SO₂-Bildung, Bockser-Bildung und Bockserbeseitigung - „Deutsche Weinzeitung-Rebe und Wein“ 50, 1968: 707-709.
- [3] ESCHENBRUCH, R.: Zur Substratabhängigkeit der H₂S und SO₂-Bildung bei Saccharomyces cerevisiae-Stämmen — „Die Wein-Wissenschaft“ 27, 1972a: 40-44.
- [4] ESCHENBRUCH, R.: Sulphate uptake and sulphite formation related to the methionine and cysteine content of grape must during the fermentation by strains of Saccharomyces cerevisiae — „Vitis“ 11, 1972b, 222-227.
- [5] MINÁRIK, E.: Tvorba kyseliny siričitej redukciou síranov počas kvasenia hroznového muštu — „Kvasný průmysl“ 18, 1972: 104-107.
- [6] MINÁRIK, E.: Redukcia sulfátu na sulfit u vínnych kvasiniek — „Kvasný průmysl“ 19, 1973a: 180-182.
- [7] MINÁRIK, E.: SO₂-formation in fermenting must by wine yeasts-3rd International Specialized Symposium on Yeasts „Metabolism and Regulation of Cell Processes“, Session 4, Otaniemi-Helsinki 1973b.
- [8] MINÁRIK, E. - NAVARA, A.: Sulfid- und Sulfidbildung durch Weinhefen. Beeinflussung durch schwefelhaltige Aminosäuren. „Mitteilungen Klosterneuburg“ 23, 1973 [v tlači].
- [9] PAUL, F.: Die alkalimetrische Bestimmung der freien gebundenen und gesamten schwefligen Säure mittels des Apparates von Lieb und Zacherl — „Mitteilungen Klosterneuburg“ 8, 1958: 21-27.

Autori ďakujú s. L. Svitekovej, prom. chem. a A. Peškovi za technickú spoluprácu.

Minárik, E. - Navara, A.: Vplyv sírnych aminokyselín na využívanie sulfátu a tvorbu sulfitu a sulfidu u vínnych kvasiniek. Kvas. prům., 20, 1974, č. 1, s. 15-17.

Methionin a cysteín účinne brzdia využívanie sulfátu a tvorbu sulfitu počas kvasenia tzv. SO₂-produkujúcimi a normálnymi kvasinkami. Súčasná prítomnosť oboch aminokyselín má kumulatívny a zvlášť výrazný inhibičný

účinnok. Medzi tvorbou sulfitu a sulfidu sa nenašiel žiadny vzťah. V práci sa diskutujú teoretické aspekty týchto daností a závery vyplývajúce pre vinársku prax.

Минарик, Э. — Навара, А.: Влияние β-тио-α-аминопропионовой и α-амино-γ-метил-тиомасляной кислот на использование сульфата и образование сульфита и сульфида в процессе сбраживания винными дрожжами. Квас. прум. 20, 1974, № 1, стр. 15-17.

Метионин и цистеин весьма эффективно ингибируют использование сульфатов и образование сульфитов в процессе сбраживания как обычными винными дрожжами, так и дрожжами выделяющими SO₂. Одновременное присутствие обеих приведенных аминокислот имеет в результате кумуляцию их влияний и резкое увеличение интенсивности ингибирования. Никакой зависимости между образованием сульфитов и сульфидов не было обнаружено. В статье рассматривается теоретическая сторона проблемы и даются указания по использованию выведенных заключений на практике виноделия.

Minárik, E. - Navara, A.: Der Einfluss schwefelhaltiger Aminosäuren auf die Sulfataufnahme und auf die Sulfid- und Sulfidbildung durch Weinhefen. Kvas. prům. 20, 1974, č. 1, S. 15-17.

Methionin und Cystein weisen eine wirkungsvolle Inhibition der Sulfataufnahme und der Sulfidbildung während der Gärung bei sog. SO₂-bildenden und normalen Hefen auf. Eine gleichzeitige Anwesenheit beider Aminosäuren führt zu einer kumulativen und besonders ausgeprägten Inhibition. Zwischen der Sulfid- und Sulfidbildung konnte keine Korrelation gefunden werden. In der Arbeit werden theoretische Aspekte dieser Gegebenheiten und Rückschlüsse für die Praxis der Weinproduktion besprochen.

Minárik, E. - Navara, A.: The influence of sulphur containing amino acids on the sulphate uptake and sulphite and sulphide formation by wine yeasts. Kvas. prům. 20, 1974, č. 1, pp. 15-17.

Methionine and cysteine show an effective inhibition on the sulphate uptake and sulphite formation during the fermentation in so called SO₂-forming and normal yeasts. The simultaneous presence of both amino acids in the medium leads to a cumulated and particularly strong inhibitory effect. No correlation could be found between the sulphite and sulphide formation. Theoretical aspects of these facts are discussed and conclusions for the practice of winemaking drawn.