

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

V predchádzajúcich prácach sme uviedli, že niektoré kmene vínnych kvasiniek patriacich botanicky k rôznym druhom rodu *Saccharomyces* [*cerevisiae*, *carlsbergensis*, *pastorianus*] redukujú sulfát len po sulfit počas alkoholického kvasenia hroznových muštov v laboratórnych i štvrťprevádzkových podmienkach [Minárik 1972a, 1972b]. Enzymatická redukcia pritom neprebehne, ako to je obvyklé u väčšiny kmeňov druhov rodu *Saccharomyces* po sulfid, ktorý je východiskom pre ďalšiu syntézu sírnych aminokyselín, najmä l-cysteínu a metionínu [obr. 1].



Ako medzistupne vznikajú zo sulfátu po aktivácii ATP-sulfurylázou napred adenosín-5'-fosfosulfát (APS), ktorý predchádza APS-kinázou na 3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfát (PAPS), ktorý kvasničné bunky ďalej redukujú sulfidovou reductázou na sírovodík (sulfid); bunky ho využívajú na výstavbu sírnych aminokyselín metionínu a cysteínu.

Ďalšie pokusy poukazujú, že predchádzajúce hypotézy o „genetickom“ defekte buniek takýchto SO_2 produkujúcich kmeňov v zmysle *Dittricha* a *Staudenmayera* (1968, 1970) nemožno jednoznačne dokázať práve tak, ako skoršie názory o schopnosti či neschopnosti produkovať sulfit zo sulfátu podľa toho, či substrát obsahuje alebo neobsahuje dostatok látok viažucich SO_2 v muštoch a vínach [Mayer a Pause 1968, Rankine a Pocock 1969, Weeks 1969, Pamir 1971]. Skôr sa zdá pravdepodobné, že vážnu úlohu pri produkcii a akumulácii sulfitu vo vínach redukciou sulfátu má celkové zloženie muštu [Würdig a Schlotter 1970], najmä však pôvodný počiatkový obsah sulfátu a sírnych aminokyselín metionínu a l-cysteínu pred kvasením [Eschenbruch 1972a, 1972b, 1972c]. Vlastnosť kmeňa kvasiniek spojená s neúplnou schopnosťou ďalšej redukcie sulfitu je viac-menej kvantitatívneho rázu, ktorú možno pozorovať pri rôznych kmeňoch a druhoch rodu *Saccharomyces*.

V ďalšej sérii pokusov sme chceli dokázať, resp. potvrdiť predpoklady, že

1. zloženie muštu ovplyvňuje schopnosť kmeňov redukovať sulfát len po sulfit a spôsobovať tak akumuláciu siričitanu vo víne,
2. vlastnosť kvasiniek redukovať sulfát len po sulfit je vlastnosť kmeňa,
3. východisková koncentrácia sulfátu a inaktivácia oxidačných enzýmov sterilizáciou či pasterizáciou muštu majú vplyv len na kmene s výraznou schopnosťou redukovať sulfát len po sulfit,
4. zvýšená východisková koncentrácia sírnych aminokyselín v mušte pred kvasením potláča aktiváciu ATP-sulfurylázy a APS-kinázy resp. redukčnú schopnosť PAPS-reductázy, čo má za následok supresiu produkcie siričitanu u kvasiniek s výraznou schopnosťou redukovať sulfát na sulfit.

Pokusy smerujúce k experimentálnemu dôkazu hypoté-

zy uvedenej ad 4, ktorú uvádza Eschenbruch (1972b, 1972c) sú t. č. ešte v prúde; uverejníme ich neskôr.

V tomto príspevku prinášame výsledky týkajúce sa prvých troch predpokladov. Výsledky sa opierajú o experimenty uskutočnené v rokoch 1970–1972. Nakoľko sme časť výsledkov už zverejnili na stránkach tohoto časopisu [Minárik 1972a], uvádzame len výsledky pokusov z kampane 1972.

Materiál a metodika

V podstate sme podrobnejší metodický postup popísali skôr [Minárik 1972a, 1972b]. Egalizovaný hroznový mušt odrody Rizling vlašský r. 1972 upravený repným cukrom na 23° ČSNM s obsahom titrovateľných kyselín 11,1 g/l (počítaných ako kyselina vínna), pH 3,15, sme rozdelili na dve časti: v jednom sme ponechali pôvodnú koncentráciu K_2SO_4 — 509 mg/l, v druhej sme túto upravili na 927 mg/l. Časť muštu sme sterilizovali v prúdiacej pare po dobu 30 min, druhú časť sme použili ako čerstvý od lisu tečúci mušt. Egalizovaný mušt sme rozdelili jednotne do 10 a 5 lit. kvasných fliaš opatrených kvasnou rúrkou, pričom sa predbežne upravovala východisková koncentrácia celkového SO_2 pred kvasením. Použili sa 3% zákvasy 3dňových kultúr *Hliník 1* [*Sacch. cerevisiae*], *W 72* [*Sacch. bayanus-pastorianus*] a *W 36* [*Sacch. bayanus-pastorianus*], resp. spontánne kvasenie. Všetky pokusné variácie sa uskutočnili v 3 opakovaníach. Sledovala sa refrakcia (úbytok cukru), hladina titrovateľných kyselín, fermentačná teplota, hladina celkového SO_2 a sulfátu [K_2SO_4] v prvých 3–4 týždňoch kvasenia. Teplota kvasenia v pivnici bola 14 °C. Obsah SO_2 sme stanovili obvyklou jódometrickou metódou, obsah sulfátu podľa Rebeleina (1969)*].

Označenie pokusov 1972

- I. Mušt čerstvý s 38,4 mg/l SO_2 s pôvodnou konc. K_2SO_4
 - 1 ... zakvasený kmeňom *Hliník 1*
 - 2 ... zakvasený kmeňom *W 72*
 - 3 ... zakvasený kmeňom *W 36*
- II. Mušt čerstvý s 38,4 mg/l SO_2 , so zvýš. konc. K_2SO_4
 - 1 ... zakvasený kmeňom *Hliník 1*
 - 2 ... zakvasený kmeňom *W 72*
 - 3 ... zakvasený kmeňom *W 36*
- III. Mušt sterilizovaný s 38,4 mg/l SO_2 , s pôvodnou konc. K_2SO_4
 - 2 ... zakvasený kmeňom *W 72*
 - 3 ... zakvasený kmeňom *W 36*
- IV. Mušt sterilizovaný s 38,4 mg/l SO_2 , so zvýšenou konc. K_2SO_4
 - 2 ... zakvasený kmeňom *W 72*
 - 3 ... zakvasený kmeňom *W 36*
- V. Mušt čerstvý s 38,4 mg/l SO_2 , s pôvodnou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený
- VI. Mušt čerstvý s 38,4 mg/l SO_2 , so zvýšenou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený
- VII. Mušt čerstvý s 50 mg/l SO_2 s pôvodnou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený
- VIII. Mušt čerstvý s 50 mg/l SO_2 , so zvýšenou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený
- IX. Mušt čerstvý so 75 mg/l SO_2 , s pôvodnou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený
- X. Mušt čerstvý so 75 mg/l SO_2 so zvýšenou konc. K_2SO_4 , spont. kvasený

Výsledky a ich zhodnotenie

Najvyšší úbytok sulfátu sme zaznamenali v sérii pokusov IV/2 a IV/3, t. j. u sterilizovaných muštov s in-

*) Autor ďakuje s. M. Matlákovéj a s. A. Peškovi za technickú spoluprácu.

aktiváciou oxidačných enzýmov pri zvýšenej hladine sulfátu (927 mg/l) pred alkoholickým kvasením (tabuľka 1). Úbytok sulfátu tu bol 920 resp. 910 mg/l K_2SO_4 pri kmeňoch W 72 resp. W 36. Prakticky sa teda všetok sulfát spotreboval (99 resp. 98 %), pričom vzniklo max. 231 resp. 224 mg/l celkového SO_2 .

Tabuľka 1

Označenie pokusu	Max. spotreba sulfátu (K_2SO_4 mg/l)	Max. produkcia SO_2 mg/l	Percento zredukovaného K_2SO_4	Percento sulfátu znovunájdeného ako SO_2
I/1	345	28,2	68	22
I/2	505	102,5	99	55
I/3	485	89,7	95	50
II/1	308	28,2	33	25
II/2	627	116,6	68	51
II/3	558	92,3	60	45
III/2	505	108,9	99	59
III/3	505	108,9	99	59
IV/2	920	230,6	99	68
IV/3	910	224,2	98	67
V	309	29,5	61	26
VI	394	25,7	42	18
VII	276	29,4	54	29
VIII	371	33,3	40	24
IX	246	14,7	46	16
X	321	21,1	35	18

V sterilnom mušte s pôvodnou koncentráciou sulfátu (509 mg/l) sa pri pokusoch III/2 a III/3 spotrebovalo 505 mg/l sulfátu, čo znamenalo opäť 99 % redukciu pri kmeňoch W 72 resp. W 36. Súčasne vzniklo v oboch prípadoch max. 109 mg/l celkového SO_2 .

V čerstvých (nesterilizovaných) od lisu tečúcich muštotoch, pokusy I. a II., sa zaznamenala pozoruhodnejšia produkcia kyslíčnika siričitého vždy len pri kmeňoch W 72 a W 36, pričom zvýšenie hladiny sulfátu v mušte pred kvasením nemalo taký významný vplyv na množstvo zredukovaného sulfátu ako u sterilizovaných muštov. Pri kmeni Hliník 1 sa zaznamenala menšia tvorba celkového SO_2 (28 mg/l), pri kmeňoch W 72 a W 36 sa vytvorilo max. 92 až 117 mg/l celkového SO_2 .

Pozoruhodné je porovnanie aj percenta sulfátu znovunájdeného ako celkový SO_2 : toto je pri tzv. SO_2 produkujúcich kmeňoch (W 72, W 36) vždy podstatne vyššie ako pri tzv. SO_2 -neproduktujúcich kmeňoch alebo pri spontánnom kvasení muštu. Pri SO_2 -produktujúcich kmeňoch dosahuje až 68 % (u sterilizovaných muštov); minimum leží pri 50 %. Pri kmeni Hliník 1 sa toto percento pohybuje medzi 22–25 %, pri spontánnom kvasení medzi 16 až 29 %. Tieto hodnoty sú v súlade s našimi skoršími pozorovaniami (Minárik 1972b).

Pri spontánnom kvasení sa vytvorilo len max. 15 až 33 mg/l celkového SO_2 ; aj množstvo spotrebovaného sulfátu tu bolo najnižšie (246–394 mg/l). Ukázalo sa však, že množstvo zredukovaného sulfátu v muštotoch so zvýšenou počiatočnou hladinou K_2SO_4 pred kvasením (927 mg/l) bolo oproti muštom s pôvodnou nižšou koncentráciou sulfátu (509 mg/l) vždy zreteľne vyššie (321–394 mg/l oproti 246–309 mg/l K_2SO_4). Sulfát sa tu však

zrejme zredukoval až na sulfid resp. využil na syntézu sírnych aminokyselín.

Pokusy s vínom r. 1972 potvrdili v plnom rozsahu, že zvýšená počiatočná koncentrácia sulfátu v mušte pred kvasením má všeobecne stimulačný vplyv na redukciu sulfátu, avšak len pri kmeňoch, ktoré vykazujú vlastnosť zvýšenej schopnosti aktivovať a redukovat sulfát len po sulfít ($SO_4^{2-} \rightarrow APS \rightarrow PAPS \rightarrow SO_3^{2-}$). Kvasinky, ktoré redukujú sulfát po sulfid resp. posledný využívajú sčasti na syntézu sírnych aminokyselín (napr. kmeň Hliník 1), produkujú len malé množstvo sulfitu alebo ho netvorí vôbec (Minárik 1972b). Pri takýchto kmeňoch je aj celková spotreba sulfátu nižšia, ako jasne vidieť aj z našich pokusov (I/1, II/1). V tabuľke 1 sú zahrnuté výsledky jednotlivých pokusných sérií roč. 1972. Vidieť, že kvasinky *Sacch. pastorianus* W 72 a W 36 majú vždy vyššiu spotrebu sulfátu ako *Sacch. cerevisiae*, kmeň Hliník 1. Prvé produkujú aj vždy značne vyššie množstvo sulfitu podľa podmienok kvasenia, najmä počiatočného obsahu sulfátu a podľa toho, či bol mušt sterilizovaný alebo nie. Inaktivácia oxidačných enzýmov sterilizáciou, ako aj zvýšená hladina sulfátu muštu pred kvasením nemajú vplyv na tzv. SO_2 -neproduktujúce kvasinky (Hliník 1 a pod.). V muštotoch s nižšou koncentráciou sulfátu pred kvasením nemá sterilizácia pred kvasením značnejší vplyv na tvorbu sulfitu v porovnaní s čerstvými muštami ani u tzv. SO_2 -produktujúcich kmeňov (Minárik 1972a, 1972b).

Kmeň Hliník 1 (*Sacch. cerevisiae*) vykazuje len malú schopnosť redukovat sulfát len po sulfít, teda minimálnu schopnosť akumulovať siričitan vo víne, čo poukazuje na jeho vynikajúce vlastnosti pri výrobe vín. Ako je známe, vyznačuje sa kmeň Hliník 1 dobrou toleranciou voči SO_2 , pre ktorú vlastnosť je u nás používaný už dávnejšie v praxi (Minárik 1955).

Pri spontánnom kvasení muštu sme r. 1972 zaznamenali akumuláciu 15–33 mg/l celkového SO_2 . Počas kampane v r. 1971 sme zistili pri spontánnom kvasení produkciu 20–30 mg/l celkového SO_2 . Zdá sa, že vyššie počiatočné koncentrácie SO_2 v mušte pred kvasením mierne brzdia redukciu sulfátu na sulfít.

Literatura:

- [1] Dittich, H. H. - Staudenmayer, Th.: SO_2 -Bildung, Böckser-Bildung und Böckserbeseitigung - „Deutsche Weinzeitung-Rebe und Wein“, 50, 1968: 707–709.
- [2] Dittich, H. H. - Staudenmayer, Th.: Über die Zusammenhänge zwischen der Sulfat-Bildung und Schwefelwasserstoff-Bildung bei *Saccharomyces cerevisiae* - „Zentralblatt für Bakteriologie etc.“ II. Abt., 124, 1970: 113–118.
- [3] Eschenbruch, R.: Zur Substratabhängigkeit der H_2S und SO_2 -Bildung bei *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen - „Die Wein-Wissenschaft“ 27, 1972a: 40–44.
- [4] Eschenbruch, R.: Der Einfluss von Methionin und Cystein auf die SO_2 -Bildung einiger Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* bei der Vergärung von Traubenmost - „Vitis“ 11, 1972b: 53–57.
- [5] 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, 1972c: 222–227.
- [6] Mayer, K., - Pause, G.: Über die Bildung von schwefeliger Säure und Schwefelwasserstoff während der Weingärung - „Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene“ 59, 1968: 387–392.
- [7] Minárik, E.: Selekcija vinných kvasiniek. In: „Práce Výskumného ústavu pre vinohradníctvo a vinárstvo“. Vyd. SAV, Bratislava 1955.
- [8] Minárik, E.: Tvorba kyseliny siričitej redukciou síranov počas kvasenia hroznového muštu - „Kvasný průmysl“ 18, 1972a: 104–107.
- [9] Minárik, E.: SO_2 -Bildung durch Sulfatreduktion bei verschiedenen Hefearten der Gattung *Saccharomyces* - „Mitteilungen Klosterneuburg“ 22, 1972b: 245–252.
- [10] Pamir, H.: Einfluss der Hefestämme auf die SO_2 -bindenden Substanzen des Weines und die SO_2 -Bildung im Wein - In: „Jahrbuch der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Ankara“, s. 51–64, 1970.
- [11] Rankine, B. C. - Pocock, K. K.: Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation - „Journal of the Science of Food and Agriculture“ 20, 1969: 104–109.
- [12] Rebelein, H.: Beitrag zur Bestimmung der Schwefelsäure in Traubenmost und Wein - „Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie“ 23, 1969: 107–109.

[13] Weeks, C.: Production of sulphur dioxide-binding compounds and of sulphur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. „American Journal of Enology and Viticulture“, 20, 1969: 32—39.

[14] Würdig, G., - Schlotter, H. A.: SO₂-Bildung durch Sulfatreduktion während der Gärung. II. Mitteilung. Beeinflussung durch das Substrat und die Gärungsbedingungen - „Die Wein-Wissenschaft“, 25, 1970: 283—297.

Minárik, E.: Redukcia sulfátu na sulfit u vínnych kvasiniek. Kvas. prŕm. 19, 1973, č. 8, s. 180—182.

Štvrtprevádzkové pokusy uskutočnené v r. 1972 zamerané na štúdium schopnosti 3 rôznych kmeňov rodu *Saccharomyces* redukovať sulfát len po sulfit potvrdili v podstate skúsenosti z r. 1970 a 1971. Tzv. SO₂-produktujúce kvasinky typu W 72 a W 36 (*Sacch. bayanus/pastorianus*) vytvárajú v mladom víne viac celkového SO₂ najmä za predpokladu, že mušty obsahujú vyššiu počiatočnú koncentráciu sulfátu a /alebo ak sa mušty pred kvasením sterilizujú (pasterizujú). Čisté kultúry vínnych kvasiniek typu Hliník 1 (*Sacch. cerevisiae*) produkujú len minimálne množstvá celkového SO₂ bez ohľadu na koncentráciu sulfátu muštu pred kvasením. V muštoch s nižšou hladinou sulfátu nemá sterilizácia vplyv na výraznejšie zvýšenie tvorby sulfitu ani u SO₂-produktujúcich kmeňov. Pri spontánnom kvasení býva celková produkcia SO₂ v kvasiacom mušte max. 30 mg/l. V práci sa poukazuje na význam zloženia hroznového muštu, najmä obsahu sírnych aminokyselín pred kvasením, na schopnosť kvasiniek redukovať sulfát len po sulfit, teda na schopnosť akumulovať siričitan v mladom víne. Výsledky štúdií v tomto smere budú predmetom ďalšej práce.

Минарик, Э.: Восстановление сульфатов в сульфиту винными дрожжами. Квас. прѣм. 19, 1973, № 8, стр. 180.

Эксперименты проведенные в 1972 г. с целью изучения способности трех разных штаммов дрожжей семейства *Saccharomyces* восстанавливать сульфаты в сульфиты, полностью подтвердили заключения, выведенные из результатов исследовательских работ осуществленных в 1970 и 1971 гг. Дрожжи типа W 72 а также типа W 36 *Saccharomyces bayanus (pastorianus)* образуют в молодом вине значительное количество SO₂ в особенности в том случае, когда осходное сусло содержит много сульфатов. Также в сусле подвергнутом перед сбраживанием стерилизации или пастеризации количество SO₂ возрастает. Чистая культура дрожжей типа Глиник 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) образует минимальное количество SO₂ независимо от концентрации сульфатов до сбраживания. На сусло с низким содержанием сульфатов стерилизация не имеет с точки зрения образования SO₂ — заметного влияния, независимо от того, применяются ли дрожжи образующие SO₂ или нет. При самопроизвольном брожении сусла количество образующегося SO₂ не превышает 30 мг/л. Автор подчеркивает значение состава сусла, главным образом содержания в нем сернистых аминокислот, так как они влияют на способность дрожжей восстанавливать сульфаты в сульфиты, т. е. увеличивать содержание сульфитов в молодом вине. Постепенно будут отпечатаны результаты дальнейших исследовательских работ в этой области.

Minárik, E.: Sulphate to Sulphite Reduction by Wine Yeasts. Kvas. prŕm. 19, 1973, No. 8, p. 180—182.

Pilot plant experiments carried out in 1972 to study the ability of three different *Saccharomyces* strains to reduce sulphate to sulphite confirmed the conclusions derived from previous research (1970 and 1971). The yeasts W 72 and W 36 (*Saccharomyces bayanus-pastorianus*) produced considerable amounts of SO₂ in young wine, especially under certain conditions, viz. when the must is characterized by initial higher sulphate concentration or when it was sterilized or pasteurized prior to fermentation. Pure cultures of wine yeasts Hliník 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) produce little SO₂ regardless of the sulphate concentration in must prior to fermentation. Sterilization has no significant effects on sulphite formation when the initial percentage of sulphate is low regardless of the strain (SO₂ producing or not). Spontaneous fermentation of must results in SO₂ formation not exceeding 30 mg/l. The author underlines the role of sulphur containing amino acids in must prior to fermentation, since the composition determines the ability of the yeasts to reduce sulphate to sulphite, i. e. the ability to accumulate sulphite in young wine. Further results of research will be published in due course.

Minárik, E.: Sulfatreduktion zu Sulfit durch Weinhefen. Kvas. prŕm. 19, 1973, Nr. 8, S. 180—182.

1972 durchgeföhrte Kellerversuche zur Feststellung der Sulfitbildung durch Sulfatreduktion bei 3 verschiedenen *Saccharomyces* — Hefearten haben erneut Erfahrungen der Jahrgänge 1970—1971 bekräftigt, dass die sog. SO₂-bildenden Hefen (Würdigs Stämme W 72 und W 36 — *Sacch. bayanus-pastorianus*) im Jungwein während der Gärung mehr Gesamt-SO₂ bilden, vor allem, wenn der Most eine erhöhte Ausgangskonzentration an Sulfat aufweist und/oder dass der Most sterilisiert (pasteurisiert) worden war. Reinkulturen von Weinhefen vom Typ Hliník 1 (*Sacch. cerevisiae*) bilden minimale Gesamt-SO₂-Mengen ungeachtet des Sulfatgehaltes des Weines vor der Gärung. In Mosten mit einem geringeren Sulfatgehalt verursacht die Sterilisation des Mostes auch bei SO₂-bildenden Stämmen keine nennenswerte Erhöhung der Sulfitbildung. Bei der Spontangärung ist eine Gesamt-SO₂-Bildung von max. 30 mg/l zu verzeichnen. Es wird auf die Bedeutung der Zusammensetzung des Mostes hingewiesen, vor allem auf den Gehalt von schwefelhaltigen Aminosäuren im Most, der die Fähigkeit der Hefen Sulfat nur bis zu Sulfit zu reduzieren, bzw. Sulfit im Jungwein zu akkumulieren, beeinflusst. Weitere Ergebnisse der Forschung in dieser Richtung sind Gegenstand einer weiteren Arbeit.