

VPLYV KVASINIEK NA AROMATICKÝ PROFIL VÍNA

INFLUENCE OF YEAST ON THE AROMA PROFILE OF WINE

KATARÍNA FURDÍKOVÁ, FEDOR MALÍK

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava / *Department of Biochemical Technology, Slovak Technical University, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovak Republic*, e-mail: fedor_malik@stuba.sk

Furdíková, K. – Malík, F.: Vplyv kvasiniek na aromatický profil vína. Kvasny Prum. 53, 2007, č. 7-8, s. 215–221.

Na vzniku širokého spektra aróm a chutí vína sa vedľa iných faktorov významnou mierou podieľa proces fermentácie, a to ako použitá kultúra kvasiniek, tak prirodzená mikroflóra viniča. V článku sa diskutuje zastúpenie a mechanizmus vzniku senzorycky najvýznamnejších skupín organických zlúčenín – alkoholov, esterov, acetaldehydu, prchavých kyselín, terpenov, prchavých sírnych a fenolických zlúčenín.

Furdíková, K. – Malík, F.: The influence of the yeast on aromatic profile of the wine. Kvasny Prum. 53, 2007, č. 7–8, p. 215–221.

The proces of wine fermentation altogether with other factors have significant impact on the origin of broad bouquet and flavour spectrum of the wine, both used yeast strain and natural microflora of the grapes. The mechanism of the origin of sensoric most important groups of organic compounds – alcohols, esters, acetaldehydes, volatile acids, terpenoids, sulphuric compounds and volatile phenols and its composition are discussed in this article.

Furdíková, K. – Malík, F.: Der Einfluss der WeinhefePilze auf den aromatischen Profil des Weines. Kvasny Prum. 53, 2007, Nr. 7-8, S. 215–221.

Auf die Bildung eines breiten Spektrums der Weinaromaten und des -geschmacks neben anderen Faktoren nimmt bedeutend der Gärungsprozess teil und zwar sowohl die angewandte Hefepilzkultur als auch die natürliche Mikroflora des Traubens. Im Artikel wurde die Zusammensetzung und Bildung der bedeutendsten Gruppen von organischen Verbindungen – Alkohole, Ester, Azetaldehyde, flüchtigen Säuren, Terpenoids, Schwefelverbindungen und flüchtigen Phenols diskutiert.

Фурдикова, К. – Малик, Ф.: Влияние дрожжей на ароматический профиль вина. Kvasny Prum. 53, 2007, No. 7–8, стр. 215–221.

В образовании широкого спектра букета и привкусов вина значительно участвует помимо других факторов процесс брожения, как культура дрожжей, так и натуральная микрофлора винограда. В статье обсуждается замещение и механизм образования крупнейших по сенсорике групп органических соединений – спиртов, эфиров, ацетальдегида, летучих кислот, терпенов, летучих серосодержащих и фенольных соединений.

Klíčová slova: *víno, aroma, kvašení, senzorycky aktivní látky*

Keywords: *wine, aroma, fermentation, sensory active substances*

1 ÚVOD

Aróma a chuť vína sú dôležité charakteristiky, ktoré definujú rozdiely medzi obrovským množstvom druhov a typov vín po celom svete. Výsledný aromatický profil vína je utváraný primárnou arómou odrody viniča, sekundárnou arómou vznikajúcou v procese fermentácie a terciárnou arómou (buketom) v procese zrenia vína. Na sekundárne vznikajúcu arómu má popri technológii najväčší vplyv prirodzená mikroflóra viniča, prípadne použitá čistá kultúra kvasiniek. Kvasinky tieto senzorycky aktívne látky do fermentovaného muštu uvoľňujú priamo, alebo ich nepriamo vytvárajú pôsobením extracelulárnych enzýmov. Ich metabolizmom tak v kvasiacom mušte narastá koncentrácia rôznych prchavých sírnych a fenolických zlúčenín, aldehydov, alkoholov, prchavých kyselín, aminokyselín, terpenov a esterov (*obr. 1*).

2 ALKOHOLY

Vyššie alkoholy sú vedľajšími produktami alkoholovej fermentácie a sú významnou zložkou arómy vín a najmä destilátov (*tab. 1*). Koncentrácie vyšších alkoholov pod 300 mg/l dodávajú vínu komplexnosť a plnosť, zatiaľ čo koncentrácie presahujúce 400 mg/l vedú k silnej, zvieravej vôni a chuti. Celková koncentrácia vyšších alkoholov vo vínach je približne 100–500 mg/l, v červených vínach 140–417 mg/l a v bielych 162–266 mg/l [1].

Použitie rôznych kmeňov kvasiniek počas fermentácie vedie k rozmanitosti profilov vyšších alkoholov aj ich koncentrácií [2]. Koncentrácia aminokyselín (prekurzorov vyšších alkoholov) v mušte priamo úmerne vplyva na koncentráciu vyšších alkoholov vo víne. Konečná koncentrácia týchto látok závisí tiež od koncentrácie etanolu, fermentačnej teploty, pH, zloženia muštu, aerácie, odrody, vyzretosti hrozna a času nakvážania. Nesaccharomycétne kvasinky všeobecne prispievajú k vyšším hladinám vyšších alkoholov.

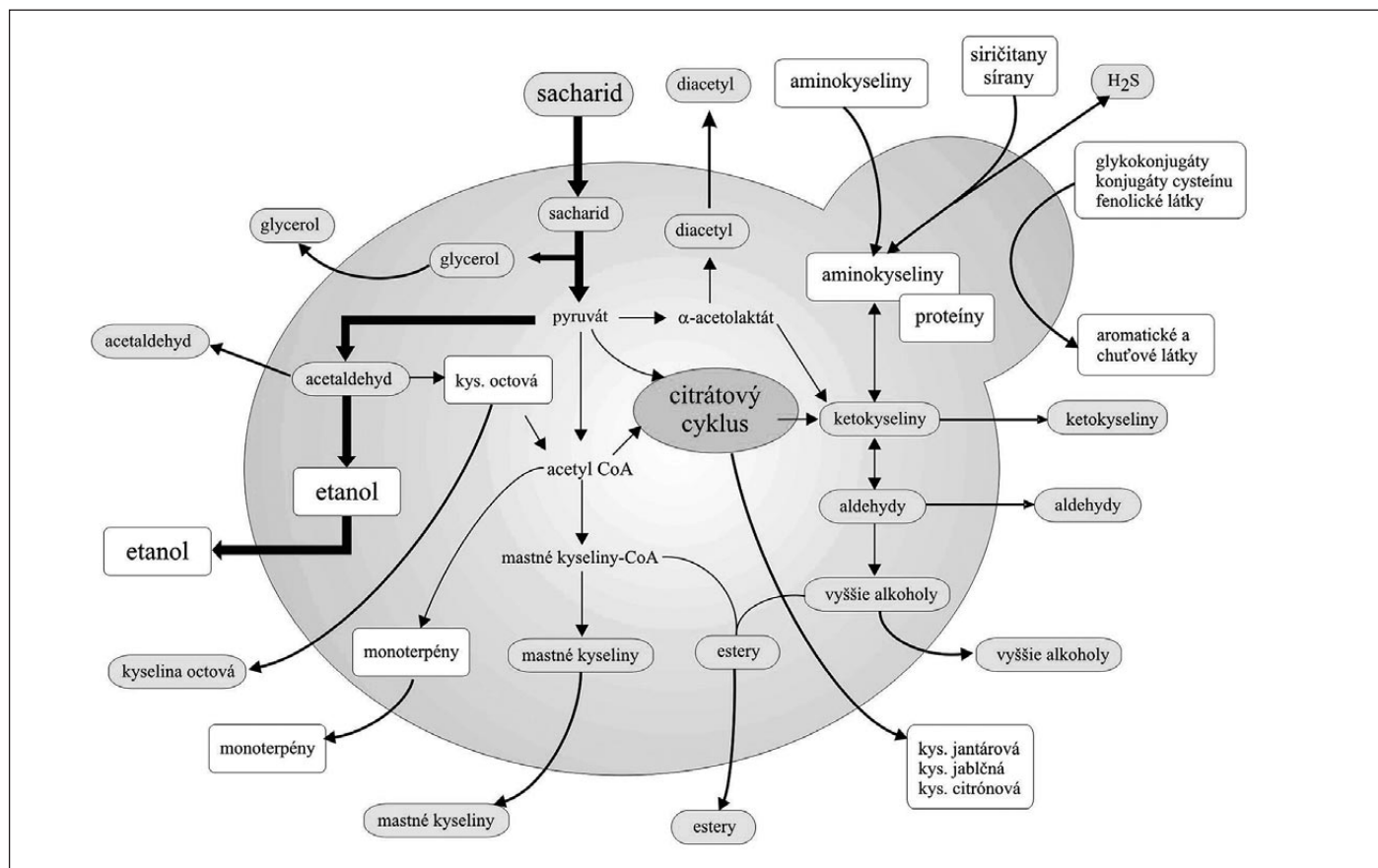
1 INTRODUCTION

Wine aroma and flavour are important characteristics, which define differences between the vast number of kinds and types of wine all over the world. The resultant aroma profile of wine is formed by the primary aroma of the grapevine variety, secondary aroma that forms during fermentation and tertiary aroma (bouquet) from the wine secondary fermentation. Apart from technology, natural grapevine microflora, perhaps the pure yeast culture used, has the greatest influence on the secondarily produced aroma. Yeast releases these sensory active substances into the fermenting must directly, or produce them indirectly by the action of extracellular enzymes. Their metabolism causes a growing concentration of some volatile sulphur and phenolic compounds, aldehydes, alcohols, volatile acids, amino acids, terpenes and esters in the fermenting must (*Fig. 1*).

2 ALCOHOLS

Higher alcohols are by-products of alcohol fermentation and are an important component of aroma of wines and especially distillates (*Tab. 1*). Concentrations of higher alcohols below 300 mg/l give wine complexity and fullness, while concentrations exceeding 400 mg/l lead to a strong, astringent aroma and flavour. The total concentration of higher alcohols in wines is approximately 100–500 mg/l, 140–417 mg/l in red wines and 162–266 mg/l in white wines [1].

The use of various yeast strains for wine fermentation leads to a diversity of higher alcohol profiles and their concentrations [2]. The concentration of amino acids (precursors of higher alcohols) in must directly affects the concentration of higher alcohols in wine. The final concentration of these substances also depends on ethanol concentration, fermentation temperature, pH, must composition, aeration, grape variety, grape ripeness and time of fermentation. Non-Saccharomyces yeast generally contributes to higher levels of higher alcohols.



Obr. 1 / Fig. 1 Schéma vzniku senzoryicky aktívnych látok pomocou metabolizmu vínnych kvasiniek [7] / Diagram of sensory active substances formation with the help of metabolism of wine yeast [7]

3 ESTERY

Estery vo víne vznikajú reakciou alkoholov s organickými kyselinami za pôsobenia kvasiniek a baktérií a prispievajú k ovocnému charakteru vína. V biologických systémoch je proces tvorby esterov katalyzovaný esterázami. Štúdie kvasinkových esteráz zahŕňajú mnohé rody (*Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorulla*) [3]. Estery kyseliny octovej – etylacetát a izoamylacetát sú hlavnými senzoryicky aktívnymi zložkami alkoholických nápojov fermentovaných kvasinkami. Tieto estery sú syntetizované pomocou alkoholacetyltransferázy z acetyl CoA a prí-

3 ESTERS

Esters in wine form in a reaction of alcohols with organic acids with the help of yeast and bacteria action and contribute to wine's fruity character. The process of ester production in biological systems is catalysed by esterase. Studies of yeast esterase include many strains (*Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorulla*) [3]. Esters of acetic acid – ethyl acetate and isoamyl acetate are the main sensory active components of alcoholic beverages fermented by yeast. These esters are synthesized with the help of alcohol acetyltransferase from acetyl-CoA and the corresponding alcohol. Alcohol acetyl-

Tab. 1 Alkoholy a estery vo víne [7] / Alcohols and esters in wine [7]

	Látka / Substance	Koncentrácia vo víne / Concentration in wine (mg/l)	Prah vône / Perception threshold (mg/l)	Aróma / Aroma
Alkoholy / Alcohols	Propanol	9,0–68	500*	drsná / harsh
	Butanol	0,5–8,5	150*	banán, hruška / banana, pear
	Izobutanol / isobutanol	9,0–174	40*	kvetinová, ruža, ovocná / floral, rose, fruity
	Izoamylalkohol / isoamylalcohol	6,0–490	30*	banán, ovocie / banana, fruity
	Hexanol	0,3–12,0	4*	sladká, parfémová / sweet, perfume
	2-fenyletylakohol / 2-phenylethylalcohol	4,0–197	10*	kvetinová, ružová, ovocná / floral, rose, fruity
Estery / Esters	Etylacetát / ethylacetate	22,5–63,5	7,5*	kyslá, ovocná, lak na nechty / acidic, fruity, nailpolish
	Izoamylacetát / isoamylacetate	0,1–3,4	0,03*	banán, hruška / banana, pear
	2-fenyletylacetát / 2-phenylethylacetate	0–18,5	0,25*	kvetinová, ruža, ovocná / floral, rose, fruity
	Izobutylacetát / isobutylacetate	0,01–1,6	1,6***	banán, ovocie / banana, fruity
	Hexylacetát / hexylacetate	0–4,8	0,7**	sladká, parfémová / sweet, perfume
	Etylbutanoát / ethylbutanoate	0,01–1,8	0,02*	kvetinová, ovocná / floral, fruity
	Etylhexanoát / ethylhexanoate	0,03–3,4	0,05*	zelené jablko / green apple
	Etyloktanoát / ethyloctanoate	0,05–3,8	0,02*	mydlo / soapy
	Etyldekanoát / ethyldecanoate	0–2,1	0,2*****	kvetinová, mydlová / floral, soapy
Aldehydy / Aldehydes	Acetaldehyd / acetaldehyde	30–300	100–125*	ovocná / zhnité jablká / fruity, rotten apples

*10% obj. etanol / ethanol 10% vol., **víno / wine, ***červené víno / red wine, ****pivo / beer, *****syntetické víno / synthetic wine, *****voda / water

slušného alkoholu. Alkoholacetyltransferáza je u *S. cerevisiae* kódovaná génmi ATF1 a ATF2 a je zodpovedná za syntézu etylacetátu a izoamylacetátových esterov. Gén EHT1 kóduje etanolhexanoyl transferázu a je zodpovedný za syntézu etylkaproátu. Nadexpresiou ATF1 a EHT1 významne narastá koncentrácia príslušných esterov [4]. Estery môžu byť degradované pomocou esterázy. V počiatočných fázach fermentácie pomocou *S. cerevisiae* možno zistiť silnú produkciu etyl-, izoamyl- a hexylacetátových esterov. Táto skutočnosť koreluje s nárastom aktivity alkoholacetyltransferázy. Aktivita tohto enzýmu v stacionárnej fáze poklesne, zvyšuje sa aktivita esterázy a je možné pozorovať úbytok esterov. Kožkotvorné kvasinky *S. cerevisiae* var. *capensis* rastúce na povrchu média (vína spod kože, sherry) dokážu estery utilizovať ako zdroj uhlíka [5].

4 ACETALDEHYD

Acetaldehyd tvorí približne 90 % celkového obsahu aldehydov vo víne a je jednou z najdôležitejších senzorických zložiek vína. Jeho hladina je v rôznych druhoch vína rôzna. Priemerne obsahujú červené vína 30 mg/l, biele 80 mg/l, a sherry 300 mg/l acetaldehydu [6]. V nízkych koncentráciách vytvára acetaldehyd príjemnú ovocnú arómu, vo vyšších koncentráciách aróma vína pripomína zhnité jablká. Práhová koncentrácia je 100–125 mg/l [7].

Acetaldehyd tvoria baktérie a kvasinky, najmä kožkotvorné, a to oxidáciou etanolu. Celkové množstvo acetaldehydu závisí od druhu a kmeňa kvasiniek, pretože acetaldehyd je vedľajším produktom alkoholovej fermentácie. Koncentrácia acetaldehydu závisí aj od kyslíka a SO₂. Vína fermentované v prítomnosti SO₂ obsahujú vyššie koncentrácie acetaldehydu, čo súvisí s rezistenciou ušľachtilých kvasiniek voči oxidu siričitému. SO₂ sa v podobe hydrogénsiričitanu viaže na acetaldehyd a vytvára s ním komplex – kyselinu acetaldehydsiričitú [8]. Tento komplex je senzoricky neaktívny. Prídavok SO₂ nepotláča samotnú tvorbu acetaldehydu, môže iba maskovať jeho senzorický prejav. Koncentrácia acetaldehydu stúpa so zvyšujúcou sa teplotou fermentácie.

5 PRCHAVÉ KYSELINY

Prchavé kyseliny sú organické kyseliny s krátkym uhlíkovým reťazcom. Ich koncentrácia vo víne je obvykle 500 až 1000 mg/l (10–15 % celkových kyselín). 90 % prchavých kyselín predstavuje kyselina octová. Zbytok tvoria kyselina propiónová a hexánová, ktoré sú produktami metabolizmu mastných kyselín. Kyselina octová so svojou arómou octu má negatívne prejavy pri koncentráciách 0,7–1,1 g/l, v závislosti od typu vína. Zvyčajná koncentrácia kyseliny octovej je 0,2–0,7 g/l. Kmene *Saccharomyces cerevisiae* používané vo vinárstve a vinárskom výskume produkujú rôzne množstvá kyseliny octovej (100 mg/l až 2 g/l). Majú tendenciu produkovať kyselinu octovú v nižšej koncentrácii pri suchých vínach a vo vyššej pri vínach sladkých [9]. Kryotolerantné druhy *S. cerevisiae* var. *bayanus* a *S. cerevisiae* var. *uvarum* produkujú menej kyseliny octovej než *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* [10].

Kyselina octová je produkovaná kvasinkami ako medziprodukt glykolýzy. Vzniká ako acetyl-CoA z pyruvátu pomocou série enzýmov (pyruvátdehydrogenázy, pyruvátdekarboxylázy, acetaldehyddehydrogenázy a acetyl-CoA syntetázy). Aj keď *Saccharomyces* dokáže produkovať kyselinu octovú, jej nadmerné koncentrácie sa vo víne objavujú hlavne v dôsledku pôsobenia divých nesaccharomycétnych kvasiniek [11] a oxidáciou etanolu pomocou aeróbných octových baktérií.

6 TERPENOIDY

Terpenoidy sú početná skupina aromatických látok, ktoré sú produkované vyššími rastlinami, riasami a hubami v metabolickej dráhe biosyntézy sterolov z jediného prekursora – geranylpyrofosfátu. Terpény sa vyskytujú v hrozne väčšiny odrôd, no najvyššiu koncentráciu týchto látok možno nájsť v aromatických odrodách viniča. Existuje vyše 400 prirodzené sa vyskytujúci terpenových látok, ale iba 40 ich bolo zistených v hrozne alebo víne a relatívne málo z nich je dôležitých pre arómu vína (tab. 2). Najvyššie zastúpenie terpenov majú tzv. muškátové odrody (Muškát Ottonel, Moravský muškát, Iršaj Oliver, Muškát žltý, ...). Ich aróma je tvorená kombináciou troch terpenolov: *geraniolu*, *linalolu* a *nerolu*, pričom geraniol je najdôležitejší. Terpenoidy sú v hrozne glykozidicky viazané na glukózu alebo niektoré disacharidy a vytvárajú adukty, ktoré nemajú aromatický charakter. Počas fermentácie sa viazané terpenoidy uvoľňujú pôsobením glykozidáz, ktoré sú produkované hroznom, kvasinkami a baktériami [11]. Aktivita glykozidáz priamo súvisí s procesom uvoľňovania arómy a je nástrojom pre zvýšenie

ransferase is encoded by the genes ATF1 and ATF2 for *S. cerevisiae* and is responsible for the synthesis of ethyl acetate and isoamyl acetate esters. EHT1 gene encodes ethanol-hexanoyl transfer and is responsible for the synthesis of ethylcaproate. The concentration of corresponding esters significantly increases with an increased activity of ATF1 and EHT1 [4]. Esters can be degraded with esterase. A strong production of ethyl-, isoamyl- and hexylacetate esters can be detected in the initial phases of fermentation with *S. cerevisiae*. This actually correlates with the increase of alcohol acetyltransferase activity. Activity of this enzyme decreases in stationary phase, the activity of esterase increases and a decline in esters can be observed. Velum-forming/for yeast *S. cerevisiae* var. *capensis* that grows on the surface of the medium (wine from under pellicle, sherry) are able to utilize esters as a source of carbon [5].

4 ACETALDEHYDE

Acetaldehyde accounts for approximately 90 % of total aldehydes content in wine and is one of its most important sensory components. Its level varies with kinds of wine. On average, red wines contain 30 mg/l of acetaldehyde, white wines 80 mg/l, and sherry wines 300 mg/l [6]. Lower concentrations of acetaldehyde create a pleasant fruity aroma; with higher concentrations, the wine aroma resembles rotten apples. The threshold concentration is 100–125 mg/l [7].

Bacteria and yeast, especially velum-forming/for yeast, produce acetaldehyde by ethanol oxidation. The total amount of acetaldehyde depends on the yeast type and strain, because acetaldehyde is a by-product of alcohol fermentation. Acetaldehyde concentration also depends on concentration of oxygen and SO₂. Wines fermented with SO₂ present contain higher acetaldehyde concentrations, which relates to the resistance of culture yeast against sulphur dioxide. SO₂ bonds to acetaldehyde in the form of hydrogen sulphite and forms a complex with it – acetaldehyde-sulphite acid [8]. This complex is sensory inactive. Addition of SO₂ does not suppress acetaldehyde formation; it can only mask its sensory activity. Acetaldehyde concentration increases with a growing fermentation temperature.

5 VOLATILE ACIDS

Volatile acids are organic acids with a short carbon chain. Their concentration in wine is usually 500 to 1000 mg/l (10–15% of total acids). Acetic acid represents 90 % of volatile acids. The rest comprises of propionic acid and hexanoic acid, which are products of the metabolism of fatty acids. Acetic acid with its vinegar aroma has negative effects in concentrations 0,7–1,1 g/l, depending on wine type. The usual concentration of acetic acid is 0,2–0,7 g/l. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in viniculture and wine research produce various amounts of acetic acid (100 mg/l to 2g/l). They have a tendency to produce a lower concentration of acetic acid in dry wines and a higher concentration in sweet wines [9]. Cryotolerant strains *S. cerevisiae* var. *bayanus* and *S. cerevisiae* var. *uvarum* produce less acetic acid than *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* [10].

Acetic acid is produced by yeast as an intermediate product of glycolysis. It forms as acetyl-CoA from pyruvate with the help of row of enzymes (pyruvate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, acetaldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase). Although *Saccharomyces* manages to produce acetic acid, its excess concentrations in wine occur mainly as a result of activity of wild non-Saccharomyces yeast [11] and oxidation of ethanol by aerobic acetic bacteria.

6 TERPENOIDS

Terpenoids are a plentiful group of aromatic substances, which are produced by plants, algae and fungi in the metabolic pathway of biosynthesis of sterols from a single precursor – geranyl pyrophosphate. Terpenes are found in grapes of most varieties; the highest concentration of these substances can be found in aromatic varieties of grapevines. Over 400 naturally occurring terpenic substances exist; however, only 40 of them were detected in grapes or wine and relatively few of them are important to wine aroma (Tab. 2). The so-called Muscadel/Muscat varieties (Muškát Ottonel, Moravský muškát, Iršaj Oliver, Muškát žltý, ...) have the biggest representation of terpenes. Their aroma is formed by a combination of three terpenes: *geraniol*, *linalol* and *nerol*, whereas geraniol is the most important. Terpenoids have glycosidic bonds with glucose or some disaccharides and form adducts, which have no aromatic character. During fermentation, the bonded terpenoids are released by glycosidases, which are produced by grape, yeast and bacteria [11]. Glycosidase activity is directly related to the process of releasing aroma and is a tool for increasing terpene aromas in wine. The origin of the enzyme and the structure of aglycon determine the efficiency of hydrolysis of monoterpenyl-β-

Tab. 2 Prchavé látky vo víne [7] / *Volatile substances in wine* [7]

	Látka / <i>Substance</i>	Koncentrácia vo víne / <i>Concentration in wine (µg/l⁻¹)</i>	Prah vône / <i>Perception threshold (µg/l⁻¹)</i>	Aróma / <i>Aroma</i>
Monoterpenoly / <i>monoterpenols</i>	Geraniol Linalol Citronelol	1–44 1,7–10 15–42	5*****/30* 1,5*****/25*** 8*****/100*	ružové drevo / <i>rosewood</i> ružová / <i>rose</i> citronelová, eukalyptová / <i>citronella, eucalyptus</i>
Prchavé sírne zlúčeniny / <i>Volatile sulphur compounds</i>	Sulfán / <i>sulphide</i> Metántiol / <i>methylthiol</i> Etántiol / <i>ethylthiol</i> Dimetylsulfid / <i>dimethylsulphide</i> Dietylsulfid / <i>diethylsulphide</i> Dimetyldisulfid / <i>dimethyldisulphide</i> Dietyldisulfid / <i>diethyldisulphide</i> Metionol / <i>methionol</i> Benzotiazol / <i>benzthiazole</i> Tiazol / <i>thiazole</i> 4-metyltiazol / <i>4-methylthiazole</i> 2-furánmetántiol / <i>2-furanmethylthiol</i> Tiofén-2-tiol / <i>thiophene-2-thiol</i> 4-merkapt-4-metylpentán-2-ón / <i>4-mercapto-4-methylpentan-2-ol</i> 3-merkaptohexán-1-ol / <i>3-mercaptohexan-1-ol</i> 3-merkaptohexylacetát / <i>3-mercaptohexylacetate</i>	Stopy/traces–80 2,1–5,1 1,9–18,7 1,4–61,9 4,1–31,8 2 Stopy/traces–85 140–5000 0–11 0–34 0–11 0–350 ng/l 0–11 0–30 ng/l 0,5–5 1–100 ng/l	10–80***** 0,3***** 1,1***** 25***** 0,93***** 15,2***** 4,3***** 500***** 50***** 38***** 55***** 1 ng/l***** 0,8***** 3 ng/l***** 60 ng/l***** 4 ng/l*****	hnilé vajčka / <i>rotten eggs</i> hnilá voda / <i>stale water</i> cibuľa, guma, zemný plyn / <i>onion, rubber, natural gas</i> špargla, kukurica, melasa, hluzovka / <i>beans, corn, molasses, truffle</i> varená zelenina, cibuľa, cesnak / <i>boiled vegetables, onion, garlic</i> varená kapusta / <i>boiled cabbage</i> cesnak, spálená guma / <i>garlic, burnt rubber</i> karfiol, kapusta, zemiaky / <i>cauliflower, cabbage, potatoes</i> guma / <i>rubber</i> pukance, arašidy / <i>popcorn, peanuts</i> zelený lieskovec / <i>green filberts</i> spálená guma / pražená káva / <i>burnt rubber / roasted coffee</i> spálená guma, pražená káva / <i>burnt rubber, roasted coffee</i> "Sauvignon blanc" aróma mačací moč, krušpán, čierne ríbezle / <i>Sauvignon Blanc aroma, cat urine, boxwood-box, black currant</i> granátové jablko, grapefruit / <i>pomegranate, grapefruit</i> "rizlingová" aróma, granátové jablko / <i>"riesling" aroma, pomegranate</i>
Prchavé fenoly / <i>Volatile phenols</i>	4-etylfenol / <i>4-ethylphenol</i> 4-etylguajakol / <i>4-ethylguaiacol</i> 4-vinylfenol / <i>4-vinylphenol</i> 4-vinylguajakol / <i>4-vinylguaiacol</i>	0,012–6,5 0,001–0,44 0,04–0,45 0,0014–0,71	0,14*/0,6***** 0,033*/0,11***** 0,02*** 10***	stajňa, konské sedlo / <i>stale, horse saddle</i> dymovo korenistá / <i>smoke-spicy</i> farmaceutická, leukoplast / <i>medicinal, bandage</i> fenolická, klinčeková / <i>phenolic, maiden pink</i>

*10% obj. etanol / *ethanol 10% vol.*, **víno / *wine*, ***červené víno / *red wine*, ****pivo / *beer*, *****syntetické víno / *synthetic wine*, *****voda / *water*

terpénových aróm vo víne. Pôvod enzýmu a štruktúra aglykónu determinujú efektívnosť hydrolyzy monoterpenyl-β-D-glukozidov pomocou β-glukozidáz. Ak je hrozno správne vyzreté, hydrolyza by mohla prebiehať pomocou endogénnych hroznových β-glukozidáz. Tieto enzýmy však nevykazujú voči hroznovým terpenyl-glykozidom žiadnu aktivitu. Je to spôsobené nízkou stabilitou pri nízkom pH, inhibičným vplyvom glukózy a vysokou koncentráciou etanolu.

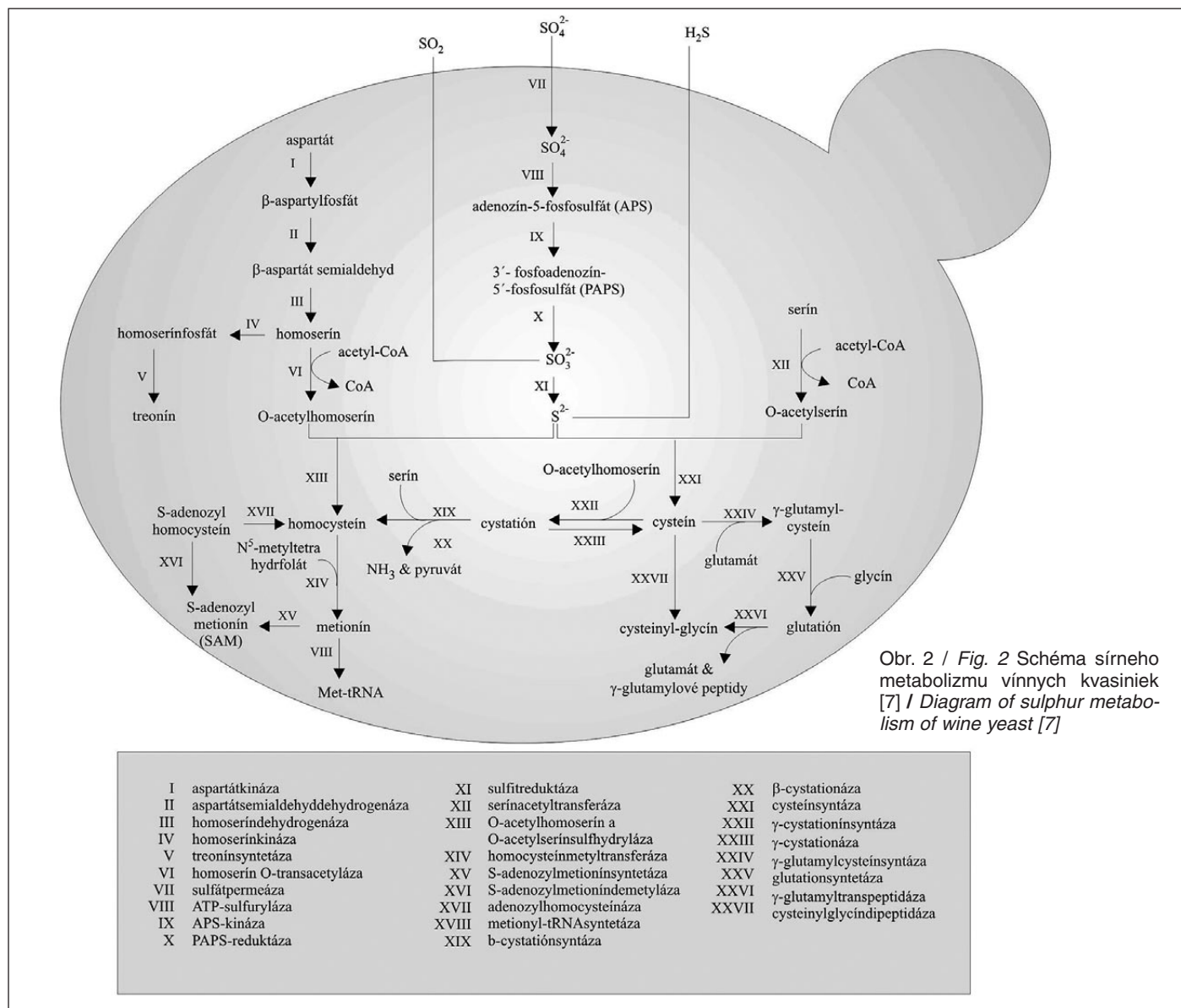
Všeobecným trendom vo vinárstve je zvyšovať produkciu monoterpenov vo víne. Mutantné kmene *Saccharomyces* s umelými defektami v sterolovej dráhe sú schopné syntetizovať terpenoidy v koncentrácii, v akej sú prítomné v hrozne. Niektoré prírodné kmene kvasiniek sú toho schopné tiež. Vyššie koncentrácie využiteľného dusíka stimulujú mimo iné aj produkciu monoterpenov [12]. Niektoré kmene *Saccharomyces cerevisiae* vykazujú β-glukozidázovú aktivitu, ale ich aktivita voči glykozidovým prekurzorom je slabá [13]. Prídavok exogénnej β-glukozidázy počas fermentácie je o mnoho efektívnejšia cesta, ako zlepšiť hydrolyzu glyko-konjugátov a rozvinúť vôňu vína. Ako producenti β-glukozidáz boli študované nesaccharomycétne rody *Brettanomyces*/Dekkera, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a *Pichia* [14, 15]. Najvhodnejšou pre vinárstvo je β-glukozidáza pôvodom z *Debaryomyces pseudopolymorphus* [16]. Je rezistentná voči všetkým inhibítorom spojeným s výrobou vína (glukóza, etanol, SO₂) a jej pH optimum je 2,5–3,8. Prídavok tohto enzýmu do muštu chardonnay vyústil do zvýšenia koncentrácií citronelolu, nerolu a geraniolu.

Iným riešením je vývoj mutantného kmeňa *S. cerevisiae* so zabudovaným β-glukozidázovým a β-L-arabinofuranosidázovým génom [17, 18, 19]. Vína produkované pomocou takýchto transformovaných kvasiniek obsahujú okrem väčšieho množstva

D-glucosides by various β-glucosidases. If the grape is well ripened, hydrolysis could proceed by endogenous grape β-glucosidases. However, these enzymes do not display any activity with grape terpenyl-glycoside. It is caused by the low stability at low pH; the inhibitory effect of glucose; and the high concentration of ethanol.

A general trend in viticulture is to increase the production of monoterpenes in wine. Mutant strains of *Saccharomyces* with artificial defects in sterol pathway are capable of synthesizing terpenoids in the same concentration as they are present in grapes. Some natural strains of yeast are capable of this as well. Higher concentrations of utilizable nitrogen stimulate among others also the production of monoterpenes [12]. Some strains of *Saccharomyces cerevisiae* display β-glucosidase activity, but their activity with glycoside precursor is weak [13]. Adding exogenous β-glucosidase during fermentation is a much more effective way of improving hydrolysis of glycoconjugates and developing the aroma of wine. Non-*Saccharomyces* strains *Brettanomyces*/Dekkera, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Pichia* were studied as producers of β-glucosidase [14, 15]. β-glucosidase originating from *Debaryomyces pseudopolymorphus* is the most suitable for viticulture [16]. It is resistant against all inhibitors related to winemaking (glucose, ethanol, SO₂) and its pH optimum is 2,5–3,8. Adding this enzyme to the must of Chardonnay resulted in increased concentrations of citronelol, nerol and geraniol.

Another solution is developing mutant strain *S. cerevisiae* with an embedded β-glucosidase and β-L-arabinofuranosidase gene [17, 18, 19]. Wines produced by such transformed yeast contain not only a larger amount of monoterpenes, but increased ester concentrations as well [20]. Ugliano et al. [21] studied hydrolytic activity of various natural strains *Saccharomyces cerevisiae* during splitting of



monoterpenolov tiež zvýšené koncentrácie esterov [20]. Ugliano a kol. [21] študovali hydrolytickú aktivitu rôznych prírodných kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* pri štiepení glykozidov aromatickej odrody White Frontignac. Hydrolyza týchto glykozidov viedla k uvoľneniu monoterpenových alkoholov, terpenových oxidov a diolov, čím demonštrovali potenciál týchto kmeňov vytvárať odrodový charakter vína počas alkoholovej fermentácie.

7 SÍRNE ZLÚČENINY

Prchavé sírne zlúčeniny hrajú významnú rolu v aróme vína. Je to spojené s ich vysokou prchavosťou, reaktivitou a intenzívnym prejavom aj pri veľmi nízkych koncentráciách [22]. Niektoré zo sírnych zlúčenín sú dôležité pre kvalitu vína, iné spôsobujú silne negatívne zápachy, a to i pri extrémne nízkych koncentráciách. Tvorbu prchavých sírnych zlúčenín ovplyvňujú organické a anorganické sírne zlúčeniny, výživové parametre muštu a metabolizmus kvasiniek (obr. 2). Väčšina prchavých sírnych látok, nachádzajúcich sa vo víne, sa vytvára počas alkoholovej fermentácie kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Nadmerná produkcia H_2S počas fermentácie, zapríčinená deficitom využiteľného dusíka a aminokyselín, vedie k nadprodukcii ďalších nepríjemných sírnych zlúčenín.

Najznámejšou sírnou zlúčeninou vo víne je sulfán (sírovodík). Jeho aróma pripomína hnilé vajcia a prah vône je 10–80 $\mu g/l$. Sulfán je vysoko reaktívna zlúčenina, ktorá generuje nové senzorycké aktívne látky [22]. Rast buniek a ich metabolizmus je podmienený dostatkom sírnych látok, ako sú cysteín, metionín, S-adenozylmetionín a glutatión. Ak tieto látky vo výžive kvasiniek absentujú, bunka ich musí syntetizovať z anorganických sírnych komponentov. Dochádza tak k redukcii siričitánov a síranov na sulfán [23], ktorý je

glycosides of the aromatic variety White Frontignac. Hydrolysis of these glycosides led to the release of monoterpene alcohols, terpene oxides and terpene diols. Whereby they demonstrated the potential of these strains to produce variety character of wine during alcohol fermentation.

7 SULPHUR COMPOUNDS

Volatile sulphur compounds play a significant role in wine aroma. It relates to their high volatility, reactivity and vigorous effect even in very low concentrations [22]. Some sulphur compounds are important for wine quality, other ones cause strong negative smells, even in extremely low concentrations. The formation of volatile sulphur compounds is influenced by organic and inorganic sulphur compounds, nutritional parameters of the must and yeast metabolism (Fig. 2). The majority of volatile sulphur substances found in wine forms during alcohol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Excessive production of H_2S during fermentation caused by a deficit of utilizable nitrogen and amino acids leads to the overproduction of other unpleasant sulphur compounds.

The most known sulphur compound in wine is sulphide. Its aroma reminds of rotten eggs and the threshold is 10–80 $\mu g/l$. Sulphide is a highly reactive compound, which generates new sensory active substances [22]. Cell growth and their metabolism depends on sufficient amount of sulphur substances like cysteine, methionine, S-adenosylmethionine and glutathione. If yeast nutrition is lacking these substances, the cell must synthesize them from inorganic sulphur components. Reduction of sulphites and sulphates into sulphide, which is the precursor of sulphuric amino acids, takes place [23]. Grape must is typically deficient in organic sulphur compounds, which is an indication of their synthesis from inorganic sources that are commonly present in the must [24, 25].

prekurzorom sírnych aminokyselín. Hroznový mušt je typicky deficientný na organické sírne zlúčeniny, čo je signálom pre ich syntézu z anorganických zdrojov, bežne prítomných v mušte [24, 25].

Počas fermentácie existujú dve fázy produkcie sulfánu. H_2S produkovaný na začiatku fermentácie je asociovaný s rastom kvasiniek a typickým nedostatkom nutričov – fosforečnanu amónneho a kyseliny pantoténovej. Hladina 60–250 mg/l asimilovateľného dusíka a 250 mg/l kyseliny pantoténovej zabezpečí významné zníženie produkcie H_2S a iných prchavých sírnych zlúčenín [26]. Pantoténát je dôležitou súčasťou koenzýmu A, ktorý je potrebný na syntézu O-acetylserínu a O-acetylhomoserínu, dusíkatých látok schopných viazať sulfán. Ak v mušte chýbajú dusíkaté látky, najmä však aminokyseliny, H_2S sa nemá na čo viazať a uvoľňuje sa do prostredia [27].

Mechanizmus tvorby sulfánu počas záverečnej fázy kvasenia nie je jasný. Predpokladá sa, že v tejto fáze je rozhodujúcim činiteľom kmeň kvasiniek [24, 28]. U *Saccharomyces cerevisiae* je sulfán produktom metabolického dráhy (*sulfate reduction sequence*) a je medziproduktom v biosyntéze sírnych aminokyselín. Schopnosť kmeňa produkovať H_2S je daná geneticky. Pri rovnakých podmienkach produkujú rôzne kmene rôzne množstvá sulfánu [28].

Merkaptány vznikajú metabolickým zásahom kvasiniek a ich prekurzorom môže byť sulfán. V závislosti od koncentrácie a typu môžu merkaptány zapáchať alebo príjemne voňať (tab. 2). Najbežnejšími merkaptánmi vo víne sú metantiol a etantiol. Sú to typicky zapáchajúce látky. Napriek tomu niektoré merkaptány v nízkych koncentráciách príjemne voňajú a tvoria tzv. odrodový charakter hrozna i vína [3]. Napríklad 4-merkaptio-4-metylpentán-2-ón (4MMP) je látka zodpovedná za odrodový charakter sorty Sauvignon blanc [29], 3-merkaptiohexylacetát (3MHA) zase za arómu Rizlingu rýnskeho.

Prchavé tioly sa v hrozne nevyskytujú vo voľnej forme, objavujú sa iba počas fermentácie. Prchavý 4MMP, typický pre Sauvignon blanc, je v mušte viazaný na cysteín a vytvára neprchavý zlúčeninu [30]. Aby sa z tohto komplexu uvoľnil, potrebuje zásah kvasiniek. *Saccharomyces cerevisiae* účinkom karbonsulfurylázy sprostredkúva štiepenie neprchavých cysteínových prekurzorov (Cys-4MMP) a uvoľňuje sa prchavý tiol. Z technologického hľadiska má voľba kmeňa kvasiniek a fermentačná teplota rozhodujúci vplyv na koncentráciu odrodových arómov Sauvignon blanc.

8 PRCHAVÉ FENOLY

Prítomnosť prchavých fenolov sa všeobecne považuje za chybu, hoci etyl-4-guajakol a v menšej miere aj vinyl-4-guajakol môžu pozitívne prispievať k atraktivnosti arómu a buketu vína. Ich pozitívny efekt závisí od odrody viniča. Vinyl-4-guajakol je považovaný za defekt u odrody Kerner, ale pozitívne vplyva na arómu odrody Traminer červený.

Skoro jedna tretina francúzskych vín obsahuje hladiny prchavých fenolov nad prahovou koncentráciou. Množstvo etyl- a vinylfenolov prítomných vo víne sa zvyšuje pri lisovaní hrozna, nedostatčnom odkalení, použití určitých kmeňov kvasiniek a dlhšom kontakte so šupkami (nakvášanie). Prchavé fenolické látky etyl-4-guajakol a etyl-4-fenol sú typickými produktami kvasiniek rodu *Brettanomyces* a vytvárajú tzv. „bretty“ arómu vína [31].

Two phases of sulphide production exist during fermentation. H_2S produced at the beginning of fermentation is associated with yeast growth and typical lack of nutrients – ammonium phosphate and pantothenic acid. The level of 60–250 mg/l of assimilable nitrogen and 250 mg/l of pantothenic acid will ensure a significant decline in production H_2S and other volatile sulphur compounds [26]. Pantothenate is an important component of coenzyme A, which is necessary for the synthesis of O-acetylserine and O-acetylhomoserine, nitrogen compounds capable of bonding with sulphide. If the must lacks nitrogen compounds, especially amino acids, then H_2S has nothing to bond to and is released into the environment [27].

The mechanism of sulphide production during the final phase of fermentation is unclear. It is assumed that the yeast strain is the deciding factor in this phase [24, 28]. When dealing with *Saccharomyces cerevisiae*, sulphide is the product of a metabolic pathway (*sulphate reduction sequence*) and is an intermediate product in the synthesis of sulphuric amino acids. The strain's ability to produce H_2S is genetically given. Under the same conditions, various strains produce various amounts of sulphide [28].

Mercaptans form by a metabolic interference of yeast and their precursor can be sulphide. Depending on the concentration and type, mercaptans can either stink or smell pleasantly (Tab. 2). The most common mercaptans in wine are methylthiol and ethylthiol. These substances smell typically. Despite that, some mercaptans smell pleasantly in low concentrations and form the so-called variety character of grape and wine [3]. For example, 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one (4MMP) is a substance responsible for the variety character of Sauvignon Blanc sort [29], 3-mercaptohexylacetate (3MHA) for the aroma of Rhine Riesling.

Volatile thiols are not found in grapes in free form; they appear only during fermentation. Volatile 4MMP, typical to Sauvignon Blanc, is bonded to cysteine and forms a non-volatile compounds in the must [30]. In order to be free from that complex, it needs yeast interference. By action of carbonsulphurylase from *Saccharomyces cerevisiae* splitting of non-volatile cysteine precursors (Cys-4MMP) appears thus volatile thiol is released. From a technological perspective, the selections of yeast strain and fermentation temperature have a deciding influence on the concentration of variety aromas of variety Sauvignon Blanc.

8 VOLATILE PHENOLS

The presence of volatile phenols is generally regarded as a mistake; although ethyl-4-guajacol and in a smaller amount also vinyl-4-guajacol can positively contribute to the attractiveness of aroma and bouquet of wine. Their positive effect depends on the grapevine variety. Vinyl-4-guajacol is considered a defect for the Kerner variety, but positively affects the aroma of Red Traminer variety.

Almost one third of French wines contain levels of volatile phenols above the threshold concentration. The amount of ethyl- and vinyl phenols present in wine is increased by grape pressing, insufficient sediment separation, use of certain strain yeast and longer contact with grape skins (maceration). Volatile phenolic substances ethyl-4-guajacol and ethyl-4-phenol are typical products of yeast of *Brettanomyces* strain and produce the so-called “bretty” (odors reminiscent of horse sweat and stables) wine aroma [31].

Translated by Marek Mikunda

Literatúra

1. Patel, V., Shibamoto, T.: Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. J. Agric. Food Chem. **50**, 2002, 5649–53.
2. Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I.: Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. Int. J. Food Microbiology **103**, 2005, 285–94.
3. Rojas, V., Gil, J. V., Pinaga, F., Manzanares, P.: Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. Int. J. Food Microbiol. **86**, 2003, 181–188.
4. Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D., Pretorius, I. S.: The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. Yeast. **23**, 2006, 641–59.
5. Mauricio, J. C., Moreno, J. J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M., Ortega, J. M.: Ester Formation and Specific Activities of *in Vitro* Alcohol Acetyltransferase and Esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during Grape Must Fermentation. J. Agric. Food Chem. **41**, 2003, 2006–2091.
6. Liu, S. Q., Pilone, G. J.: An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. International Journal of Food Science and Technology. **35**, 2000, 49–61.
7. Swiegers, J. H., Bartowsky, L. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S.: Yeast and Bacterial Modulation of Wine Aroma and Flavour: Part 7. The Australian Journal of Grape and Wine Research **11**, 2005, 139–173.
8. Nielsen, J. C. and Richelieu, M.: Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. Applied and Environmental Microbiology **65**, 1999, 740–745.
9. Erasmus, D. J., Cliff, M., van Vuuren, H. J. J.: Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. Am. J. Enol. Viticult. **55**, 2004, 371–378.
10. Eglinton, J. M., McWilliam, S. J., Fogarty, M. W., Francis, I. L., Kwiatkowski, M. J., Høj, P. B., Henschke, P. A.: The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research **6**, 2000, 190–196.

11. Strauss, M. L. A., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G., van Rensburg, P.: Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. J. App. Microbiol. **91**, 2001, 182.
12. Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., Henschke, P. A.: De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. FEMS Microbiology Letters **243**, 2005, 107–115.
13. Hernández, L. F., Espinosa, J. C., Fernandez-Gonzalez, M., Briones, A.: β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. Int. J. Food Microbiol. **80**, 2003, 171–176.
14. Fernández, M., Ubeda Iranzo, J. F., Briones Pérez, A. I.: Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. Int. J. Food Microbiol. **59**, 2000, 29–36.
15. Garcia, A., Carcel, C., Dulau, L., Samson, A., Agüera, E., Agosin, E., Günata, Z.: Influence of a mixed culture with *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. Journal of Food Science **67**, 2002, 1138–1143.
16. Cordero Otero, R. R. C., Iranzo, J. F. U., Briones-Perez, A. I., Potgieter, N., Villena, M. A., Pretorius, I. S., van Rensburg, P.: Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-Saccharomyces yeasts. Journal of Food Science **68**, 2003, 2564–2569.
17. Pretorius, I. S.: Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast **16**, 2000, 675–729.
18. Pretorius, I. S.: The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. In: Genetics and Genomics of Industrial Yeasts. Ed. J. H. de Winder. Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 2003, 99–134.
19. Pretorius, I. S.: The genetic improvement of wine yeasts. In: Handbook of Fungal Biotechnology. Eds D. K. Arora, P. D. Bridge and D. Bhatnagar, Marcel Dekker, New York, USA, 2004, 183–223.
20. Van Rensburg, P., Stidwell, T., Lambrechts, M. G., Cordero Otero, R. R., Pretorius, I. S.: Development and assessment of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast producing two aroma enhancing β -glucosidases encoded by the *Sacch. fibuligera* BGL1 and BGL2 genes. Annals of Microbiol. **55**, 2005, 33–42.
21. Ugliano, M., Bartowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P. A.: Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains. J. Agric. Food Chem. **54**, 2006, 6322–31.
22. Vermeulen, C., Gijs, L., Collin, S.: Sensorial contribution and formation pathways of thiols in foods: A review. Food Reviews International **21**, 2005, 69–137.
23. Spiropoulos, A., Tanaka, J., Flerianos, I., Bisson, L. F.: Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. Am. J. Enol. Viticult. **51**, 2000, 233–248.
24. Park, S. K., Boulton, R. B., Noble, A. C.: Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. Am. J. Enology Viticult. **51**, 2000, 91–97.
25. Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I.: Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. Anal. Chimica Acta **458**, 2002, 157–167.
26. Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., Edwards, C. G.: Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. J. App. Microbiol. **94**, 2003, 349–359.
27. Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P. A.: Determination of sulphite reductase activity and its response to assimilable nitrogen status in a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. Journal of Applied Bacteriology **81**, 1996, 329–336.
28. Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, C.: Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. Journal of Food Protection **65**, 2002, 1033–1037.
29. Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot de Gachons, C. and Murat, M. L.: The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon Blanc. Am. J. Enol. Vitic. **57**, 2006, 81–88.
30. Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., de Barros Lopes, M. A.: Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. FEMS Microbiol. Lett. **240**, 2004, 125–9.
31. Renouf, V., Lonvaud-Funel, A.: Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiol. Res. **162**, 2006, 154–167.

Lektoroval prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc.
Do redakce došlo 9. 3. 2007

Norimberk, Německo
14. – 16. 11. 2007



BRAU Beviale 2007

Suroviny – Technologie –
Logistika – Marketing

47. evropský odborný veletrh
nápojového průmyslu

Zde prezentuje branže své inovace

- Téměř 1.400 vystavovatelů Vás bude informovat o aktuálních technologiích, surovinách, inovacích v logistice a odbytu na trhu
- Naplánujte si závčas investice, které rozhodnou o Vaší pozici mezi konkurencí
- Nový tematický pavilon ENERGIE – výroba a nákup, obnovitelná energie, úsporný potenciál a obchod s emisemi

Více informací o veletrhu na:
www.ask-BRAU-Beviale.de

Informace
Česko-německá obchodní
a průmyslová komora
Tel +420 20 21 49 03 10
Fax +420 20 21 49 03 32
messe1@dtihk.cz

NÜRNBERG MESSE