

Der Einfluß von Methionin und Cystein auf die SO_2 -Bildung einiger Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* bei der Vergärung von Traubenmost

von

R. ESCHENBRUCH¹⁾

The influence of methionine and cysteine on the SO_2 formation of some strains of *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation

S u m m a r y . — The addition of methionine and cysteine, both separately and combined, to grape must or to a synthetic substrate brought about, when compared to an untreated control, an up to 90% reduction of SO_2 formation during fermentation, by two normal and three so-called SO_2 -forming strains of *Saccharomyces cerevisiae*. As well as the repression of the separate stages of the sulphate reduction sequence, the paper also discusses the regulation of sulphate absorption by cysteine.

Ein wesentlicher Aspekt der Übersichtsartikel von MAW (1965) sowie LAWRENCE und COLE (1968) über den Schwefelmetabolismus von Brauereihefen und die Bildung von Schwefelwasserstoff bei der Würzevergärung ist deren Beeinflussung durch Methionin, Cystein, Pantothenat und Pyridoxin. Besonders WAINWRIGHT (1970) erklärt, wie wichtig ein ausreichender Methioningehalt und die dazu relativen Konzentrationen von Serin, Glycin, Threonin und Lysin in der Würze sind, um effektiv genug H_2S -Bildung zu verhindern. Diese setzt sofort ein, wenn Methionin synthetisiert werden muß und dieser Prozeß nicht ausreichend mit den entsprechenden Vorstufen versorgt wird.

Wie alle Aminosäuren, so regulieren auch Methionin und Cystein ihre eigene Biosynthese, zu welcher als S-Quelle H_2S nötig ist. Sie bestimmen daher auch wieviel Sulfat zu Sulfid reduziert wird. Da SO_2 ein Zwischenprodukt dieser Sequenz ist (z. B. ROY und TRUDINGER 1970), unterliegt seine Anreicherung im Substrat ebenfalls diesem Regulationsmechanismus.

In vorangegangenen Untersuchungen (ESCHENBRUCH 1972) konnten wir zeigen, daß auch bei der Vergärung von Traubenmost durch verschiedene Hefestämme die Bildung von H_2S und SO_2 wesentlich vom Substrat abhängt. Trotzdem blieb zu erklären, warum manche Stämme eine hohe SO_2 -Bildungsrate aufweisen und andere nur eine normale — ein Phänomen, das zur Einteilung in sogenannte SO_2 -bildende und normale Hefen geführt hatte (z. B. WÜRDIG und SCHLOTTER 1970). Vergären Stämme beider Gruppen ein einfaches synthetisches Substrat mit Asparagin als einziger N-Quelle, d. h. ohne Methionin und Cystein, so bilden sie durchschnittlich zwei- bis dreimal mehr SO_2 als in dem komplexen Substrat Most.

Diese kurz skizzierten Verhältnisse führten zu der Frage, ob die SO_2 -Bildung sowohl bei normalen als auch bei SO_2 -bildenden Stämmen von Methionin und Cystein beeinflußt wird. Mit Most sowie mit synthetischem Substrat war dies zu prüfen.

Material und Methoden

Es wurde ein Most der Varietät „Steen“ verwendet mit 21,3% Zucker, Gesamtsäure 6,8 g/l und pH 3,6. Das synthetische Medium bestand aus Glucose 100 g/l,

¹⁾ FrI. H. KRITZINGER sowie FrI. A. VAN WYK möchte ich für wertvolle technische Assistenz danken.

Tabelle 1

Die Bildung von SO_2 (mg/l) durch verschiedene Hefestämme bei der Vergärung von Steen-Most nach Zugabe von Methionin oder Cystein (Mittelwerte aus fünf Wiederholungen)

Stamm	Kontrolle unbehandelt	Zugabe von Methionin mg/100 ml Substrat			Zugabe von Cystein mg/100 ml Substrat		
		10	50	100	10	50	100
WE 1	16,5	11,5	5,6	5,8	14,0	7,9	6,8
WE 14	18,7	11,9	6,4	8,5	15,6	9,8	6,7
R	68,5	43,3	26,8	25,6	70,5	53,6	25,1
O	64,2	63,3	46,7	39,3	74,0	62,4	33,6
M	63,4	10,0	7,5	7,3	29,2	19,7	6,8

Asparagin 10 g/l, MgSO_4 5 g/l und KH_2PO_4 5 g/l. Alle Versuchsansätze, jeweils 100 ml in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Gäraufsatz, wurden 5 Minuten bei 0,5 atm autoklaviert. Methionin und Cystein wurden immer nach der Sterilisation zugegeben. Die Beimpfung erfolgte so, daß der fertige Ansatz 1500 Zellen/mm³ enthielt; die Gärtemperatur betrug 25° C. Die Hefestämme waren die gleichen wie beschrieben (ESCHENBRUCH 1972). Am Ende der Gärung, deren Verlauf durch Wägung des CO_2 -Verlustes verfolgt worden war, wurde SO_2 nach PAUL (1958) bestimmt. Gleichzeitig wurden die Zellen gezählt, um eventuelle Wachstumsbeeinflussungen zu erkennen.

Ergebnisse

Tabelle 1 stellt die Ergebnisse dar, die bei der Vergärung von Most durch die beiden normalen Stämme (WE 1, WE 14) und die sogenannten SO_2 -bildenden Hefen (R, O, M) gewonnen wurden. Gegenüber den Kontrollen vermindert die Zugabe von 10 mg Methionin oder Cystein bereits deutlich die SO_2 -Bildung, abgesehen von Cystein bei den Stämmen R und O, die eine geringe Erhöhung zeigen. Der Trend der SO_2 -Abnahme verstärkt sich, wenn man 50 mg/100 ml zugibt. 100 mg/100 ml scheinen besonders bei WE 1, WE 14 und M die Sättigungskonzentration überschritten zu haben, nicht bei R und O. Durchschnittlich vermögen Methionin und Cystein die SO_2 -Bildung um 40–75% zu drosseln.

Tabelle 2 gibt die entsprechenden Werte wieder, die in einem synthetischen Substrat bestimmt wurden. Auffällig ist zunächst, daß die Kontrollen zwei- bis

Tabelle 2

Die Bildung von SO_2 (mg/l) durch verschiedene Hefestämme bei der Vergärung eines synthetischen Substrates nach Zugabe von Methionin oder Cystein (Mittelwerte aus drei Wiederholungen)

Stamm	Kontrolle unbehandelt	Zugabe von Methionin mg/100 ml Substrat			Zugabe von Cystein mg/100 ml Substrat		
		10	50	100	10	50	100
WE 1	51,4	7,0	5,3	5,6	5,9	7,2	7,5
WE 14	59,4	30,1	5,1	5,9	7,0	5,4	7,9
R	199,6	57,3	33,7	26,0	120,0	89,3	42,5
O	135,7	54,6	18,3	19,2	85,9	44,7	12,8
M	183,0	53,5	27,9	18,6	114,9	21,7	12,8

Tabelle 3

Die Bildung von SO₂ (mg/l) durch die Stämme R und O bei der Vergärung von Most und synthetischem Substrat nach gleichzeitiger Zugabe von Methionin und Cystein (Mittelwerte aus fünf Wiederholungen)

Stamm	Kontrolle	Zugabe von Methionin + Cystein im Verhältnis 1 : 1 zu Most, mg/100 ml Substrat			Kontrolle	Zugabe von Methionin + Cystein im Verhältnis 1 : 1 zu synthetischem Substrat, mg/100 ml Substrat		
	unbehandelt	10	50	100	unbehandelt	10	50	100
R	68,5	6,9	8,2	5,0	199,6	21,1	6,8	8,9
O	64,2	23,9	6,7	5,8	135,7	28,5	4,7	4,5

dreimal mehr SO₂ bilden im Vergleich zu den Mostkontrollen in Tabelle 1. Weiterhin zeigt sich: die mit Most erhaltenen Daten sind in einem einfachen synthetischen Medium klar reproduzierbar.

Versucht man nun die SO₂-Bildung der Stämme R und O durch höhere Dosen Methionin oder Cystein noch mehr einzuschränken, so ist dies nur noch unwesentlich möglich. 100 mg/100 ml scheinen eine Art Sättigungskonzentration darzustellen, über die hinaus die Sulfatreduktion nicht weiter beeinflussbar ist. Werden jedoch Methionin und Cystein kombiniert in gleichen Mengenverhältnissen zu beiden Substraten zugegeben (Tabelle 3), so kann die SO₂-Bildung noch weiter bis auf 5—9 mg/l reduziert werden. Beide Aminosäuren zusammen wirken offenbar kumulativ.

Diskussion

Vergegenwärtigt man sich erneut, daß die Hefezelle Sulfat über die Zwischenstufen Adenosin-5'-phosphosulfat (APS), 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zu Sulfit und in einem weiteren Schritt zu Sulfid reduziert (vgl. ROY und TRUDINGER 1970), daß dieses H₂S zur Synthese von Methionin und Cystein benötigt wird und daß diese beiden Aminosäuren den Durchsatz von Sulfat zu Sulfid regulieren, dann wird die Wirkung von Methionin auf die SO₂-Bildung der fünf Hefestämme (Tabellen 1 und 2) erklärbar. Methionin reprimiert nämlich den ersten Schritt der Sulfatreduktion zu APS. Solange ein ausreichender Methioninspiegel verfügbar ist, bleibt die Neusynthese unterbunden, d. h. es wird kaum SO₂ gebildet und konsequenterweise auch weniger H₂S. Letzteres läßt sich in entsprechenden Experimenten messen (ESCHENBRUCH, unveröffentlicht).

Cystein reprimiert den letzten Schritt der Sulfatreduktionssequenz vom Sulfit zum Sulfid (vgl. ROY und TRUDINGER 1970). Das sollte grundsätzlich zu einer Anreicherung von SO₂ führen. Jedoch genau das Gegenteil tritt ein: auch Cystein reduziert sehr stark die SO₂-Bildung (Tabellen 1 und 2). Dieser Gegensatz wird deutbar, wenn angenommen wird, daß Cystein außer der Sulfitreduktion auch die Aufnahme von Sulfat in die Zelle beeinflusst. Bei verschiedenen Mikroorganismen ist die Sulfataufnahme nämlich ein aktiver und regulierbarer Prozeß (vgl. ROY und TRUDINGER 1970). Ein ausreichendes Cysteinangebot vermindert also ebenfalls den Sulfatumsatz.

Die kumulative Wirkung einer gleichzeitigen Methionin- und Cysteinzugabe (Tabelle 3) könnte so erklärt werden, daß Cystein die Aufnahme des Sulfates in die Zelle reduziert und Methionin dessen Aktivierung zu APS. Zusammengenommen sind beide Prozesse effektiv genug, um sogar die anomal hohe SO₂-Bildung

einiger Hefestämme zu unterbinden. Das Wachstum der Hefen blieb bei allen diesen Untersuchungen von der Aminosäurezugabe unbeeinflusst.

Über den Gehalt freier Aminosäuren in Traubenmosten liegen mehrere Untersuchungen vor, z. B. KLIEWER (1970, dort weitere Literatur), die jedoch wegen unterschiedlicher Preßmethoden nicht miteinander verglichen werden können und keine Angaben über Cysteinkonzentrationen aufweisen. BERGNER und HALLER (1960) berichten von 12 mg Methionin/l in einem frischen Traubenmost und unterstreichen, daß mit steigendem Preßdruck die freien Aminosäuren eines Mostes zunehmen. DITTRICH *et al.* (1970) analysierten vier Moste mit einem Methioningehalt von 17—31 mg/l. RAPP und REUTHER (1971) fanden bei verschiedenen Rebsorten wechselnde Mengen von 17—90 mg/l.

Diese Daten sind im Augenblick hinsichtlich eines Einflusses auf die SO_2 -Bildung kaum zu korrelieren. Es ist höchstens vorstellbar, daß in einem Most mit 90 mg Methionin/l weniger SO_2 gebildet wird als in einem Most mit nur 17 mg/l. Die Resultate in den Tabellen 1 und 2 nach Zugabe von 10 mg/100 ml unterstreichen diese Annahme. Wir sind momentan damit beschäftigt, den Aminosäuregehalt verschiedener Moste zu bestimmen und diesen in Beziehung zu setzen zu dem während der Vergärung gebildeten SO_2 und H_2S .

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, in welchem Ausmaß die SO_2 -Bildung normaler und auch sogenannter SO_2 -bildender Hefestämme vom Gehalt des Substrates an Methionin und Cystein abhängt. Der recht weite Begriff „Substratabhängigkeit“ wurde wesentlich präzisiert: Die Aminosäuren Methionin und Cystein sind entscheidend — wenn sicherlich auch nicht ausschließlich — an der SO_2 -Bildung durch die Hefezelle beteiligt. In der Analyse der SO_2 -Synthese während der Mostvergärung ist das ein Schritt vorwärts. Die eingangs gestellte Frage „Warum bilden manche Stämme unter gleichen Bedingungen mehr SO_2 als andere?“ ist jedoch mit den vorliegenden Daten noch nicht zu beantworten.

Zusammenfassung

Die Zugabe von Methionin und Cystein, einzeln und kombiniert, zu Traubenmost oder synthetischem Substrat vermag die SO_2 -Bildung während der Gärung durch zwei normale und drei sogenannte SO_2 -bildende Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um bis zu 90% zu reduzieren.

Neben der Reprimierung einzelner Schritte der Sulfatreduktionssequenz durch die beiden Aminosäuren wird eine Regulierung der Sulfataufnahme durch Cystein diskutiert.

Literaturverzeichnis

- BERGNER, K. G. und HALLER, H. E., 1969: Das Verhalten der freien Aminosäuren von Weißweinen im Verlauf der Gärung, bei Ausbau, Lagerung und Umgärung. Mitt. Klosterneuburg 19, 264—288.
- DITTRICH, H. H., LEIDENFROST, E. und TEPE, W., 1970: Überträgt sich eine hohe NO_3 -Düngung der Reben auf den NO_3 -Spiegel im Most? Wein-Wiss. 25, 130—132.
- ESCHENBRUCH, R., 1972: Zur Substratabhängigkeit der H_2S - und SO_2 -Bildung bei *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen. Wein-Wiss. 27, 40—44.
- KLIEWER, W. M., 1970: Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. J. Food Sci. 35, 17—21.
- LAWRENCE, W. C. and COLE, E. R., 1968: Yeast sulfur metabolism and the formation of hydrogen sulfide in brewery fermentations. Wallerst. Lab. Commun. 31, 95—115.
- MAW, G. A., 1965: The role of sulphur in yeast growth and in brewing. Wallerst. Lab. Commun. 28, 49—70.
- PAUL, F., 1958: Die alkalimetrische Bestimmung der freien, gebundenen und gesamten schwefeligen Säure mittels des Apparates von LIEB und ZACHERL. Mitt. Klosterneuburg 8, 21—27.

- RAPP, A. und REUTHER, K. H., 1971: Der Gehalt an freien Aminosäuren in Traubenmosten von gesunden und edelfaulen Beeren verschiedener Rebsorten. *Vitis* 10, 51—58.
- ROY, A. B. and TRUDINGER, P. A., 1970: The biochemistry of inorganic compounds of sulphur. Cambridge Univ. Press.
- WAINWRIGHT, T., 1970: Hydrogen sulphide production by yeast under conditions of methionine, pantothenate or vitamin B₆ deficiency. *J. Gen. Microbiol.* 61, 107—119.
- WÜRDIG, G. und SCHLOTTER, H. A., 1970: SO₂-Bildung durch Sulfatreduktion während der Gärung. II. Beeinflussung durch das Substrat und die Gärungsbedingungen. *Wein-Wiss.* 25, 283—297.

Eingegangen am 3. 12. 1971

Dr. R. ESCHENBRUCH
Research Institute for Oenology
and Viticulture
Private Bag 5026
Stellenbosch
Rep. of South Africa