

Vývoj derivátov kyseliny kojovej ako protikvasinkových látok s potenciálnou možnosťou využitia pri stabilizácii vína

REGINA UJHELYIOVÁ - ERNEST ŠTURDÍK - JOZEF KOVÁČ -
ŠTEFAN BALÁŽ - MICHAL UHER - VLADIMÍR KONEČNÝ

Súhrn. Účinnosť kyseliny kojovej a jej pätnástich derivátov bola testovaná na vínnych kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaných v syntetickom živnom médiu za účelom ich možného použitia ako konzervačných prostriedkov na zabezpečenie mikrobiologickej stability vína. Protikvasinková aktivita bola charakterizovaná hodnotami ID_{50} (koncentrácie spôsobujúce 50 % inhibíciu rastu oproti kontrole) a porovnaná so sorbanom draselným ako bežne používaným stabilizátorom. Najúčinnnejšie deriváty boli s pozitívnymi výsledkami otestované aj z hľadiska stabilizácie vína. V ďalšom bola aktivita korelovaná s lipofilitou ako základnou účinnosťou určujúcou fyzikálno-chemickou vlastnosťou determinujúcou retenciu a distribúciu látky v biosystéme. Zistilo sa, že protikvasinkový efekt rastie so zvyšovaním hydrofobicity molekuly. Na základe vzťahov štruktúra - aktivita boli pre cieľnú syntézu navrhnuté deriváty so zvýšeným protikvasinkovým účinkom.

Mikrobiologickú stabilitu hroznových vín ohrozujú predovšetkým kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. V dôsledku ich schopnosti využívať zvyškový cukor vína môže nastať nielen ich rozmnoženie, ale aj sekundárne kvasenie vína. Vplyvom tejto nežiadúcej aktivity kvasiniek sa vína zakaľujú a uvoľňuje sa oxid uhličitý. Najčastejšími pôvodcami zákalov fľašových vín sú kvasinky *Saccharomyces bailii*, *S.cerevisiae* a *S.oviformis* [1]. Aby sa dosiahla mikrobiologická stabilita, používajú sa okrem striktne fyzikálnych metód (filtrácia, pasterizácia) aj chemické konzervačné prostriedky [2]. I keď celkový trend mikrobiologickej stabilizácie vín so zvyškovým

Ing.Regina Ujhelyiová, Doc.Ing.Ernest Šturdík, CSc., Doc.Ing.Štefan Baláž, CSc., Katedra biochemickej technológie, Doc.Ing.Michal Uher, CSc., Katedra organickej chémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Ing.Jozef Kováč, CSc., Stredná poľnohospodárska škola, Kostolná 3, 900 01 Modra, Ing.Vladimír Konečný, CSc., Výskumný ústav chemickej technológie, Dimitrova 34, 836 06 Bratislava.

cukrom smeruje k aplikácii fyzikálnych metód s postupným vylúčením chemických prostriedkov, hľadanie nových látok, ktoré by mohli byť vhodnými konzervačnými prostriedkami, zostáva zatiaľ aj naďalej aktuálnou úlohou.

K používaným stabilizačným prostriedkom patrí kyselina siričitá a sorbová. Pri povolených koncentráciách voľného oxidu siričitého 30, resp. 40 mg.l⁻¹ sa však nedosahuje dostatočný stabilizačný účinok a kyselina sorbová má zase pomerne úzke spektrum účinku [1]. Schanderl [3] udáva ako účinnú dávku kyseliny sorbovej 300 mg.l⁻¹, novšie sa uvádza, že mikrobicídny účinok na kvasinky sa dosahuje až pri dávke 500 mg.l⁻¹ [4], povolená dávka je 200 mg.l⁻¹ [1]. Vývoju látok so stabilizačným účinkom sa v posledných rokoch venovala veľká pozornosť. Za týmto účelom boli sledované rôzne zlúčeniny, z ktorých si pozornosť zaslúži dietylpyrouhličitan (DPK), ktorého účinná dávka je 100 - 200 mg.l⁻¹. Jeho nevýhodou je však nepriaznivý vplyv na chuť vína [5]. V USA bol navrhnutý dimetylpyrouhličitan účinný pri koncentráciách 30 - 60 mg.l⁻¹ [6,7,8]. Pozitívne výsledky pri stabilizácii vína sa dosiahli aj pri použití kyseliny 3-(5-nitro-2-furyl)-akrylovej, ktorá už pri dávke 5 - 10 mg.l⁻¹ zabezpečovala trvalú mikrobiologickú stabilitu sladkých vín [5]. Ako konzervačný prostriedok bola odskúšaná aj zlúčenina pripravená na báze aminokyseliny lyzínu Lyzín-Ex účinná pri 10 mg.l⁻¹ [5]. Pozoruhodný brzdiaci účinok proti kvasinkám vykazujú niektoré antifungálne účinné antibiotiká (aktidión, natamycín, antimycín A, mycosubtilín). Z hygienického hľadiska ako aj kvasno-fyziologického neprichádza však do úvahy ich použitie na stabilizáciu vína [1]. Pochopiteľne, u novovyvíjaných prípravkov je základnou požiadavkou popri vysokej účinnosti aj minimálna zdravotná rizikovosť. Na základe literárneho prieskumu ako aj vlastných skúseností sa nám pre vývoj stabilizačných prostriedkov javila ako vhodná kyselina kojová a na jej báze pripravené deriváty.

Kyselina kojová je produkovaná v procese aeróbnej fermentácie na rôznych uhlíkatých zdrojoch rozmanitými mikroorganizmami. Najlepšími producentmi sú plesne z rodu *Aspergillus* [9-12].

V prirodzenej forme sa kyselina kojová vyskytuje v orientálnych fermentovaných pokrmoch (mäso, saké, sójová omáčka a pod.), ktorým dodáva charakteristickú chuť a vôňu [13]. Tieto vlastnosti sú typické aj pre jej deriváty akými sú maltol, resp. etylmaltol, ktoré slúžia ako potravinárske aditíva [13-17]. Kyselina kojová a jej deriváty sú známe látky so širokým spektrom účinku (antibakteriálny, antifungálny, antiprotozoálny, insekticíd-

ny) [9,18-24]. Vďaka chelatačným, antioxidačným a antimikrobiálnym vlastnostiam sa skúma uplatnenie kyseliny kojovej a jej derivátov v kozmetike [25], humánnej medicíne [26-28] a pri vývoji biodegradabilných pesticídov [31,32]. Toxicita kyseliny kojovej je nízka. LD₅₀ kojanu sodného pre psov je 1 g.kg⁻¹ živej hmotnosti. Takmer rovnaké hodnoty ako u psov boli zistené na králikoch, potkanoch a myšiach [12]. Rôznymi typmi mutačných testov na baktériách bola zistená len slabá alebo žiadna mutagenita. Na eukaryotické bunky kyselina kojová nemá mutagénny účinok [29,30]. V ČSFR boli deriváty kyseliny kojovej vyvíjané ako fungicídne prípravky [30] pre použitie v medicíne, ale tiež v poľnohospodárstve, potravinárstve a kozmetike [32]. V článku sa popisujú možnosti ich využitia ako stabilizátorov vína.

Materiál a metódy

Použité chemikálie

Kyselina kojová bola izolovaná rekryštalizáciou fermentačného média plesne *Aspergillus tamarii* VIII [31]. Testované deriváty, ktorých štruktúrne vzorce sú uvedené v tab.1, boli syntetizované na Katedre organickej chémie CHTF STU a na Výskumnom ústave chemickej technológie v Bratislave. Syntézy boli uskutočnené postupmi uvedenými v práci [30]. Sorban draselný dodala Lachema Brno.

Mikroorganizmy

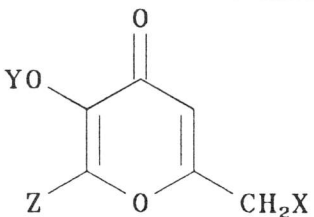
Použitý bol kmeň vínnych kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* Bratislava 1 RIVE 10-25-8 zo zbierky Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave.

Kultivačné pôdy

Na kultiváciu kvasiniek sa použilo živné médium VITA zloženia (na 1 liter): glukóza 50 g, KCl 40 g, (NH₄)₂SO₄ 4,5 g, CaCl₂.2H₂O 0,125 g, MgSO₄.7H₂O 0,125 g, FeCl₃.6H₂O 0,004 g, MnSO₄.4H₂O 2,5 mg, mezo-inozitol 25 mg, pyridoxín 5 mg, tiamín 5 mg, nikotínamid 5 mg, pantotenát vápenatý 10 mg, D-biotín 5 mg a 10 ml Sörensenovho fosfátového tlmivého roztoku (pH 6,5). Ďalšia kultivácia bola uskutočnená v bielom hroznovom víne Müller Thurgau, v ktorom bol zvýšený obsah cukru na 20 g.l⁻¹.

Tabuľka 1. Prehľad študovaných derivátov kyseliny kojovej, ich molekulová hmotnosť, rozdeľovací koeficient P (v systéme tlmový roztok pH 4 - oktanol) a hodnoty ID₅₀ [mol.l⁻¹] (koncentrácia spôsobujúca 50 % inhibíciu rastu oproti kontrole) stanovené po 20 h rastu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v živnom médiu VITA na trepačke (a) a za statických podmienok (b) pri teplote 28°C.

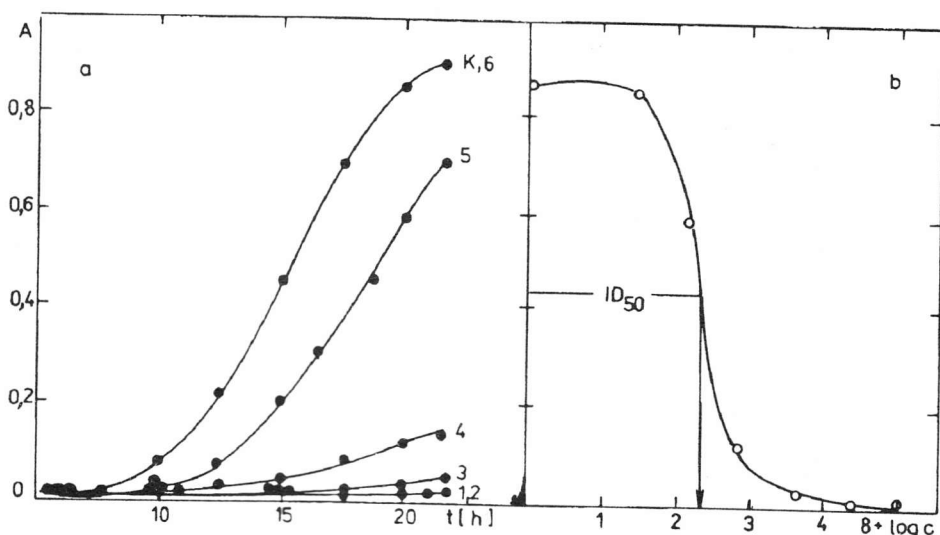
Table 1. Survey of structures of studied derivatives of kojic acid, their molecule weight, division coefficient P (in system of buffer solution pH 4 - octanol) and ID₅₀ values [mol.l⁻¹] (concentration causing 50 % inhibition of growth in comparison to controle sample) determined after 20 hours of yeast *Saccharomyces cerevisiae* growth in cultivating medium VITA in shaker (a) and during static conditions (b) at 28°C temperature.

							
Látka č. ¹	X	Y	Z	M [g.mol ⁻¹]	logP	-logID ₅₀	
						(a)	(b)
1	OH	H	H	142,11	-0,617	1,1	1,2
2	Cl	H	H	160,56	0,635	3,8	4,0
3	Br	H	H	205,01	0,615	5,7	6,1
4	I	H	H	252,05	0,672	5,8	5,9
5	N ₃	H	H	167,13	0,086	3,3	3,3
6	OH	H	Br	221,01	0,272	2,0	2,3
7	OH	H	I	268,04	0,546	2,6	2,7
8	OH	H	Ac	184,14	0,377	2,2	2,3
9	Cl	H	Br	239,46	1,085	5,6	5,7
10	Cl	H	Cl	194,99	0,950	5,3	5,4
11	Br	H	Br	299,01	1,274	6,3	6,4
12	Ac	H	Ac	226,16	-0,509	2,3	2,6
13	NCS	H	H	183,21	0,061	3,4	4,1
14	Br	Ac	H	264,09	0,505	5,7	6,0
15	Ac	Ac	H	226,16	0,250	2,3	2,6
16	Cl	CH ₃	H	194,11	0,161	3,9	3,9
Sorban draselný ²				150,11	-	4,1	4,9

1 - Matter number, 2 - potassium sorbate.

Stanovenie protikvasinkovej účinnosti

Za účelom posúdenia efektu v definovaných podmienkach bola najprv charakterizovaná účinnosť na rast *Saccharomyces cerevisiae* v syntetickej pôde VITA. Kultúra zo šikmého agaru sa preočkovala do kvapalnej pôdy a nechala sa vyrásť do exponenciálnej fázy rastu. Z tohto inokula sa pripravila suspenzia kvasiniek o výslednej koncentrácii $1,5 \cdot 10^6$ buniek v 1ml. K 4,9 ml tejto suspenzie sa pridalo 0,1 ml látky rozpustenej v etanole v odstupňovaných koncentráciách tak, aby výsledná koncentrácia bola v rozpätí 10^{-7} - 10^{-1} mol.l⁻¹. Kultivácia sa uskutočnila v skúmavkách pri teplote 28°C na trepačke i za statických podmienok. Rast sa sledoval meraním zákalu na Langeho kolorimetri (Universal-Kolorimeter UK č.1, Nemecko). Z nameraných hodnôt sa zostrojili rastové krivky ako závislosť absorbancie od času a grafickou metódou sa stanovila hodnota ID₅₀, t.j. koncentrácia spôsobujúca 50 % inhibíciu rastu v porovnaní s kontrolou (obr.1). Protikvasinková účinnosť sa ďalej sledovala v samotnom víne. Obsah cukru vo víne



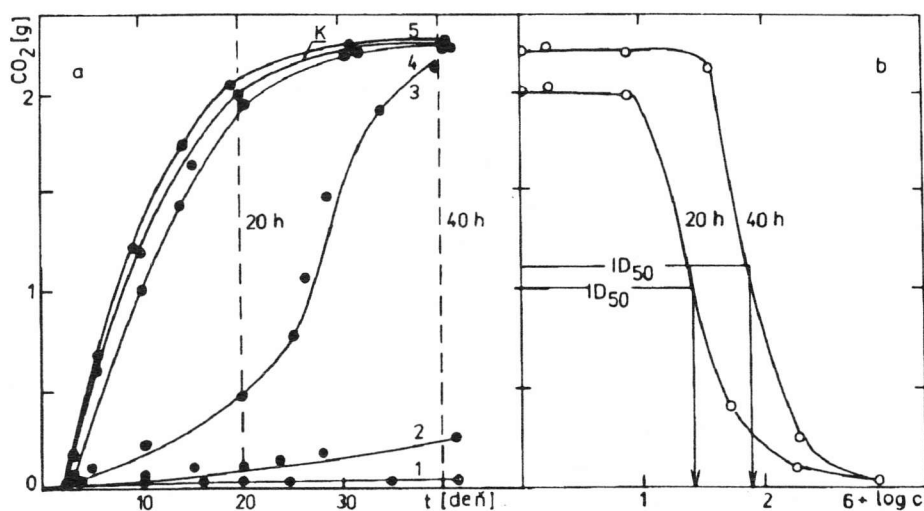
Obr. 1. Inhibícia rastu (a) *Saccharomyces cerevisiae* kyselinou 2-Cl, 6-Br kojovou (derivát č.9, tab.1) v koncentráciách [mol.l⁻¹]: 1 - 10^{-3} , 2 - $2 \cdot 10^{-4}$, 3 - $4 \cdot 10^{-5}$, 4 - $8 \cdot 10^{-6}$, 5 - $1,6 \cdot 10^{-6}$, 6 - $3 \cdot 10^{-7}$, K - 0. Kultivácia uskutočnená v syntetickom živnom médiu VITA pri 28°C na trepačke. Grafický spôsob určenia hodnoty ID₅₀ po 20 h rastu (b) charakterizujúcej inhibičný efekt.

Fig.1. Growth inhibition (a) of *Saccharomyces cerevisiae* by 2-Cl, 6-Br kojic acid (derivate No.9, tab.1) in concentrations [mol.l⁻¹]: 1 - 10^{-3} , 2 - $2 \cdot 10^{-4}$, 3 - $4 \cdot 10^{-5}$, 4 - $8 \cdot 10^{-6}$, 5 - $1,6 \cdot 10^{-6}$, 6 - $3 \cdot 10^{-7}$, K - 0. Cultivation made in synthetic cultivating medium VITA at 28°C temperature in shaker. Graphical way of ID₅₀ value determining after 20 hours of growth (b) characterizing inhibition effect.

sa zvýšil na hladinu 20 g.l^{-1} . Ako inokulum sa použil rozkvasený mušt s pridaním *Saccharomyces cerevisiae* v takom množstve, aby výsledná koncentrácia buniek bola 10^5 ml^{-1} . K 98 ml takto pripraveného média sa pridali 2 ml látky rozpustenej v etanole. Koncentrácia bola uskutočnená v bankách s kvasným uzáverom zaliatym parafínom pri laboratórnej teplote za statických podmienok. Inhibícia kvasnej schopnosti sa sledovala na základe úbytku hmotnosti spôsobenej uvoľňovaním oxidu uhličitého. Zo získaných hodnôt sa zostrojil graf vyjadrujúci úbytok oxidu uhličitého v čase a graficky sa stanovila hodnota ID_{50} , t.j. koncentrácia spôsobujúca 50 % inhibíciu sekundárnej fermentácie oproti kontrole (obr.2).

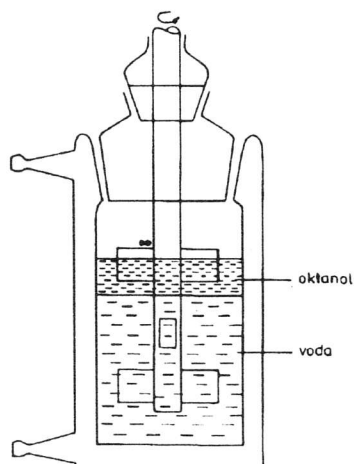
Stabilita derivátov kyseliny kojovej

Sledovala sa spektrofotometricky (Specord UV VIS Zeiss Jena, Nemec-ko) v McIlvainovom tlmivom roztoku o pH 2 počas 24 hodín.



Obr.2. Inhibícia sekundárneho kvasenia *Saccharomyces cerevisiae* (a) kyselinou 2-Br kojovou (derivát č.3, tab.1) v koncentráciách $[\text{mol.l}^{-1}]$: 1 - 10^{-3} , 2 - $2 \cdot 10^{-4}$, 3 - $4 \cdot 10^{-5}$, 4 - $8 \cdot 10^{-6}$, 5 - $1,6 \cdot 10^{-6}$, K - 0. Kultivácia uskutočnená vo víne Müller Thurgau (20 g cukru/l) pri 25°C za statických podmienok. Grafický spôsob určenia hodnoty ID_{50} po 20 a 40 dňoch kultivácie (b).

Fig.2. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* secondary fermentation (a) by 2-Br kojic acid (derivate No.3, tab.1) in concentrations $[\text{mol.l}^{-1}]$: 1 - 10^{-3} , 2 - $2 \cdot 10^{-4}$, 3 - $4 \cdot 10^{-5}$, 4 - $8 \cdot 10^{-6}$, 5 - $1,6 \cdot 10^{-6}$, K - 0. Cultivation made in Müller Thurgau wine (20 g of sugar/l) at 25°C temperature in static conditions. Graphical way of ID_{50} value determination after 20 and 40 day of cultivation (b).



Obr.3. Schematický náčrt aparatury na stanovenie rozdeľovacích koeficientov.
Fig.3. Schematic sketch of apparatus for division coefficient determination.

Stanovenie rozdeľovacích koeficientov

Uskutočnilo sa v systéme 1-oktanol-McIlvainov tlmivý roztok pH 4, imitujúcom fázové rozhranie biologických membrán. Za týchto podmienok je rozdeľovací koeficient stanovený pre neutrálnu formu molekuly, vzhľadom na to, že ide o slabé kyseliny s pK_A 5,9. Vyššie spomínaná dvojfázová sústava sa umiestnila v temperovanej nádobe (25°C) s miešadlom (obr.3) s konštantnými otáčkami ($80.\text{min}^{-1}$). Podľa rozpustnosti sa látka aplikovala do vodnej alebo oktanolovej fázy. Vo vhodných časových intervaloch bola injekčnou striekačkou odoberaná z vodnej fázy vzorka, v ktorej sa sledoval úbytok, resp. prírastok koncentrácie látky (Specord UV VIS Zeiss Jena, Nemecko). Po zmeraní bola vzorka vrátená späť do nádoby). Rozdeľovací koeficient sa vypočítal (podľa spôsobu aplikácie) zo vzťahov:

$$P = \frac{A_{10} - A_{1\infty}}{A_1 V_2 \varepsilon_1 d n_{20}}, \text{ resp. } P = \frac{\varepsilon_1 d n_{20} - A_{1\infty} V_1}{A_{1\infty} V_2}$$

kde A_1 je absorbancia látky vo vodnej fáze (0 na začiatku merania, ∞ na konci merania), V_1 - objem vodnej fázy (160 ml), V_2 - objem oktanolovej fázy (25 ml), d - hrúbka kyvety, ε_1 - molárny absorpčný koeficient látky vo vodnej fáze, n_{20} - látkové množstvo v oktanolovej fáze v čase $t = 0$.

Výsledky a diskusia

Protikvasinková účinnosť kyseliny kojovej a jej 15 derivátov sa sledovala na vinných kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Bratislava 1. V prvom štádiu sa látky testovali na kvasinkách kultivovaných v definovanom syntetickom živnom médiu VITA za statických podmienok i na trepačke. Hodnoty ID_{50} (stanovené po 20 hodinách rastu, tak ako ilustruje obr.1), charakterizujúce protikvasinkový efekt týchto zlúčenín, sú uvedené v tab.1. Ako referenčná látka (štandard) pre posúdenie účinku kyseliny kojovej a jej derivátov sa použil sorban draselný. Ako vyplýva z tab.1, samotná kyselina kojová má len veľmi slabý účinok, avšak deriváty č.3, 4, 9, 10, 11 a 14 vykazujú aktivitu vyššiu ako štandard. Najúčinnějšími boli deriváty č.4 a 11, ktoré ešte pri koncentrácii 10^{-5} mol.l⁻¹ spôsobili úplné potlačenie rastu kvasiniek. Deriváty č.2, 3, 4, 9, 10, 11 a 14 sa testovali ďalej priamo vo víne, v ktorom obsah cukru bol zvýšený na 20 g.l⁻¹ a počet buniek na 10^5 .ml⁻¹, aby sa vytvorili podmienky priaznivejšie pre sekundárne kvasenie v porovnaní s reálnym stavom vo fľašových vínach po vyskladnení. Cieľom bolo vyskúšať účinnosť študovaných látok na početnejšej populácii kvasiniek aká prichádza do úvahy v reálnych podmienkach. Pred pokusom sa vo všetkých uvedených zlúčeninách sledovala stabilita v kyslom pH. Po 24 hodinách neboli pozorované významné zmeny v elektrónašorpčných spektrách. Hodnoty ID_{50} (stanovené po 20 a 40 dňoch tak, ako ilustruje obr.2), sú uvedené v tab.2. Vyplýva z nich, že okrem derivátu č.2 u všetkých ostatných látok sa zistila aktivita vyššia ako v prípade sorbanu draselného. Najúčinnějšími sa ukázali deriváty č.11, 3, 4 a 13. Pri aplikácii derivátu č.11 ostalo víno nezakalené po 40 dňoch ešte pri koncentrácii $4 \cdot 10^5$ mol.l⁻¹, čo zodpovedá dávke 12 mg.l⁻¹, pričom farba, chuť a vôňa zostala dobrá. Koncentrácia spôsobujúca 100 %-nú inhibíciu sekundárneho kvasenia oproti kontrole sa pohybuje v rozpätí 2,4 - 12 mg.l⁻¹, u derivátov č.3, 4, 13 od 10 do 53 mg.l⁻¹. Pre reálne prípady, kedy obsah kvasiniek je podstatne menší ako v našich experimentoch, by na stabilizáciu postačovalo i množstvo 1 mg.l⁻¹.

Vzhľadom na to, že v súvislosti s biologickou účinnosťou látky je najvýznamnejšou fyzikálno-chemickou vlastnosťou jej lipofilita, pre sledované deriváty kyseliny kojovej sa stanovili ich rozdeľovacie koeficienty v systéme voda-oktanol, ktorý imituje fázové rozhranie biologických membrán. Lipofilita determinuje jednak transport látky cez lipidové oblasti membrán a jednak interakciu s hydrofóbnymi oblasťami, čím súčasne podmieňuje aj distribúciu látky v biosystéme. Hodnoty logaritmov rozdeľova-

Tabuľka 2. Hodnoty ID₅₀ (koncentrácia spôsobujúca 50 % inhibíciu kvasenia oproti kontrole) stanovené pre kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* po 20 a 40 dňoch kultivácie vo víne Müller Thurgau (20 g.l⁻¹ cukru) pri 25°C za statických podmienok.

Table 2. ID₅₀ values (concentration causing 50 % inhibition of growth in comparison to control sample) determined for yeast *Saccharomyces cerevisiae* after 20 and 40 days of cultivating in Müller Thurgau wine (20 g.l⁻¹ of sugar) at temperature of 25°C in static conditions.

Látka č.	-logID ₅₀ ^a		ID ₅₀ [mg.l ⁻¹]	
	20	40	20	40
2	3,5	3,1	50,8	127,5
3	4,6	4,1	5,1	16,3
4	4,6	4,3	6,3	12,7
9	4,0	3,6	23,9	60,1
10	3,9	3,6	24,5	49,0
11	4,8	4,6	4,7	7,5
14	4,8	4,4	4,2	9,4
S	3,5	3,3	47,0	75,0

^aID₅₀ - koncentrácia v [mol.l⁻¹], S - štandard (sorban draselný).

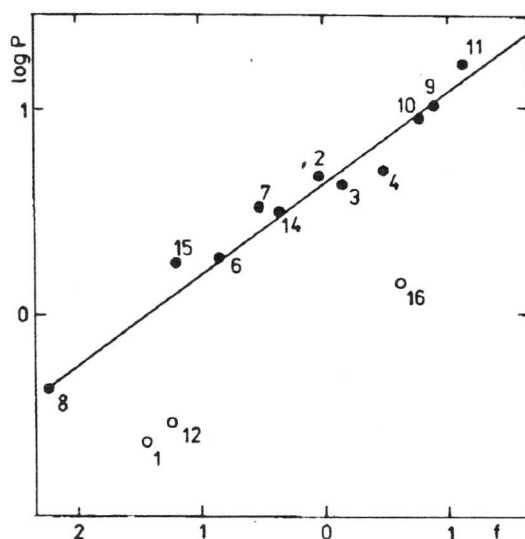
1 - Matter number, a - ID₅₀ concentration in [mol.l⁻¹], S - standard (potassium sorbate).

cích koeficientov P sú uvedené v tab.1. Už jednoduchým kvalitatívnym porovnaním súvislostí medzi biologickou odozvou (charakterizovanou hodnotou ID₅₀) a lipofilitou (charakterizovanou hodnotou log P) v tab.1 možno vyvodiť uzáver, že s rastúcou lipofilitou rastie aj protikvasinková aktivita. Znamená to teda, že zavedením lipofilnejších substituentov do molekuly by bolo možné potenciovať účinnosť a tým aj znížiť dávku. Keďže získané výsledky ukázali, že študované látky sú z hľadiska protikvasinkovej aktivity vysoko zaujímavé, sústredili sme v ďalšom pozornosť na štúdium detailnejších vzťahov medzi aktivitou a štruktúrou s cieľom navrhnúť účinnejšie deriváty s vhodnejšími substituentmi. Predstavu o vzťahu medzi lipofilitou a štruktúrou možno získať na základe závislostí medzi rozdeľovacím koeficientom a fragmentovanými konštantami f, ktoré vyjadrujú príspevok substituenta k lipofilite molekuly (obr.4). V prípade dvoch substituentov sa použil súčet hodnôt ich fragmentových konštant [33], hodnoty pre substituenty X sú z alifatických, pre Z a OY z aromatických systémov [34]. Zvýšenie lipofility molekuly, a tým aj predpokladané zvýšenie účinnosti, by sa malo dosiahnuť zavedením substituenta s vysokou hodnotou fragmen-

tovej konštanty. K tomu, aby sme mohli navrhnúť zavedenie konkrétneho substituenta, boli urobené aj exaktnejšie štúdie [35] vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou, ktoré zohľadňovali okrem lipofility aj reaktivitu študovaných derivátov, a tým aj ich afinitu k receptorom, a to na základe ich acidobázických a chelatačných vlastností charakterizovaných hodnotami disociačných konštant (pK_A) a konštant tvorby chelátových komplexov s iónmi dvojmocného kovu (pK_1 , pK_2). Pri hľadaní kvantitatívnych vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou a fyzikálno-chemickými vlastnosťami bola použitá rovnica:

$$\log(1/c) = A \log P + \sum_{i=1}^n B_i \log(C_i P + 1) + D pK_1 + \sum_{j=1}^n E_j \log(F_j K_1 + 1) + G$$

Vznikla matematickým opisom modelovej predstavy procesov, ktorých sa látka po aplikácii do biosystému zúčastňuje [34]. Hodnoty parametrov tejto rovnice boli optimalizované s využitím sady programov pre tento účel vyvinutých. Rovnica platí pre deriváty č. 1 - 13 s nesubstituovanou hydroxylovou skupinou v polohe 5 ($Y = H$), pre ktoré mohli byť stanovené aj parametre charakterizujúce "elektrónové" vlastnosti (pK_A , pK_1 , pK_2).



Obr.4. Závislosť hodnôt $\log P$ derivátov kyseliny kojovej (štruktúry pozri tab.1) od fragmentovaných konštant f vyjadrujúcich príspevok substituenta k celkovej lipofilite molekuly.

Fig.4. Dependence of kojic acid derivatives $\log P$ values (structures see in tab.1) upon fragmented invariables f expressing contribution of substituent to total molecule lipophilicity.

Na základe tejto analýzy sme zistili, že potenciálne účinnejšie deriváty by mali mať substituenty, ktoré súčasne zvyšujú lipofilitu i acidobazicitu molekuly. Tieto podmienky by mohli byť splnené, ak substituent $Z = H$, resp. $COCH_3$ a $X = OR, R, SR$ (R je rozvetvený alebo nerozvetvený alkyl). V ďalšom bude potrebné nasyntetizovať deriváty s navrhnutými substituentmi a na základe stanovenia ich účinnosti potvrdiť matematickou analýzou získané závery. V prípade pozitívnych výsledkov budú nevyhnutné ďalšie testy týkajúce sa toxicity, mutagenity, ako aj vplyvu na senzorické vlastnosti.

Literatúra

1. MINÁRIK, E. - NAVARA, A., *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava, Príroda 1986.
2. FARKAŠ, J., *Biotechnológia vína*. Bratislava, SNTL Alfa 1983.
3. SCHANDERL, H., *Die Mikrobiologie des Mostes und weines*. Stuttgart, E. Ulmer Verlag 1959, s.321.
4. RADLER, F., *Bull. O.I.V.*, 49, 1976, s.629.
5. FARKAŠ, J., *Technology and Biochemistry of Wine*. Montreux, Gordon Publ. 1988.
6. OUGH, C.S., *Amer. J. Enol. Vitic.*, 26, 1975, s.130.
7. OUGH, C.S. - LANGBEHN, L.L. - STAFFORD, P.A., *Amer. J. Enol. Vitic.*, 29, 1978, s.60.
8. BAJPAI, P. - AGRAWAL, P.K. - VISHWANATHAN, L., *J. Sci. Ind. Res.*, 41, 1982, s.185.
9. BUCHTA, K., *Biotechnology*, 3, Weinheim, Verlag Chemie 1983, s.477.
10. GRIGOROV, I. - DŽEROVA, A. - ALEKSIEVA, P., *Príroda*, 29, 1980, s.65.
11. MICHALÍK, P. - HORENITZKÝ, R., *Kvas. prům.*, 34, 1988, s.140.
12. YANG, S.S. - WEI, C.B. - CHOU, C.C., *Mem. Coll. Agr. Natl. Taiwan* 20, 1980, s.25.
13. Patent U.S. 392848, 1982.
14. Jap. patent 801 04858, 1980.
15. Jap. patent 8088677, 1980.
16. WILLIAMS, G.J. - BERNARD, R.A., *J. Food Sci.*, 46, 1981, s.1245.
17. KOTANI, T. - ICHIMOTO, I. - SAKAI, H., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 56, 1982, s.553.
18. KOTANI, T. - ICHIMOTO, I. - TATSUMI, CH. - FUJITA, T., *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1976, s.765.
19. KOTANI, T. - ICHIMOTO, I. - VEDA, H. - SAKAI, H., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 58, 1984, s.567.
20. Patent U.S. 3852444, 1974.
21. DOBIAS, J. - NEMEC, P. - BALANOVÁ, J., *Biológia*, 35, 1980, s.203.
22. DOBIAS, J. - NEMEC, P. - BRTKO, J., *Biológia*, 32, 1977, s.417.
23. TAKEYA, A., *Zoological Magazine*, 88, 1979, s.1.
24. Jap. patent 89996, 1984.
25. GRADY, R.W. - GRAZIANO, J.H. - AKERS, H. - CERAMI, A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 196, 1976, s.479.
26. TUNNICLIFF, G. - SMITH, J.A., *Neurochem. Int.*, 3, 1982, s.371.
27. Patent U.S. 392848, 1982.
28. WHINTER, F.C. - THIEL, R.G. - VAN ROBSBURG, S.J. - DEMASIUS, I.D.C., *Mutat. Res.*, 58, 1978, s.193.

29. BJELDANES, L.F. - CHEW, H., Mutat. Res., 67, 1979, s.367.
30. AO CSFR 259992, 1988.
31. BRTKO, J., Biologická aktivita semisyntetických derivátov kyseliny kojovej a jej fermentačný spôsob prípravy. Závěrečná správa. Bratislava, ÚEF SAV 1985.
32. LEO, A. - HANSCH, C., J. Org. Chem., 36, 1971, s.1539.
33. HANSCH, C. - LEO, A., Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. New York, Wiley 1979.
34. BALÁŽ, Š. - UJHELYIOVÁ, R. - ŠTURDÍK, E. - KONEČNÝ, V. - UHER, M., Chem. Biol. Inter. (pripravené do tlače).

Do redakcie došlo 7.1.1993.

Development of kojic acid derivatives as antifermenting matters with potential possibility of utilization during wine stabilizing

Summary

Effect of kojic acid and its 15 derivatives was tested on wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in synthetic cultivating medium for the purpose of possible utilization as preservative preparation for ensuring microbiologic stability of wine. Antifermenting activity were characterized by values ID_{50} (concentrations causing 50 % inhibition of growth compared with controle sample) and compared with potassium sorbate as generally used stabilizer. The most effective derivatives were with positive results tested from the point of wine stabilization too. Than the activity was corelated with lipophilicity as basic effectiveness determining physico-chemical property, determinig retention and distribution of matter in biosystem. It was found out that the antifermenting effect grows with increasing of molecule hydrophobicity. On the basis of relations structure - activity derivatives with increased antifermenting effect were proposed for aimed synthesis.