Važnost ne-Saccharomyces kvasca u modernoj vinarskoj proizvodnji

Benko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:650037

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

VAŽNOST NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODERNOJ VINARSKOJ PROIZVODNJI

DIPLOMSKI RAD

Ana Benko

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

VAŽNOST NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODERNOJ VINARSKOJ PROIZVODNJI

DIPLOMSKI RAD

Ana Benko

Mentor:

Doc. dr. sc. Nataša Hulak

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Benko**, JMBAG 0178104387, rođena 29.10.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

VAŽNOST NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODERNOJ VINARSKOJ PROIZVODNJI

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ana Benko**, JMBAG 0178104387, naslova

VAŽNOST NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODERNOJ VINARSKOJ PROIZVODNJI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	doc. dr. sc. Nataša Hulak ¸	mentor	_____
2.	doc. dr. sc. Marin Mihaljević Žulj	član	_____
3.	doc. dr. sc. Luna Maslov Bandić	član	_____

ZAHVALA

Prije svega, željela bih zahvaliti svojim roditeljima, a potom i sestri, što su mi bili podrška tijekom cijelog obrazovanja, motivirali me i poticali da uvijek težim boljem, a pritom ne gubim sebe. Cijenim to više nego što sam vam ikada mogla reći i pokazati.

Nakon njih, željela bih zahvaliti ljudima koji su vremenom postali obitelj, a i mnogo više od toga, ponajprije Marku, a zatim i svima onima koji su sa mnom dijelili dobre i loše trenutke. Ne moram ih imenovati, oni znaju.

Naposljetku, hvala mentorici i članovima povjerenstva što su pristali biti dio izrade ovog diplomskog rada te svojim znanjem, stručnošću i komentarima doprinijeli tome da ovaj rad bude nešto čime se mogu ponositi.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. OPĆENITO O NE-SACCHAROMYCES KVASCIMA 2

3. NE-SACCHAROMYCES KVASCI U LITERATURI 20. STOLJEĆA 6

4. ZNAČAJNI NE-SACCHAROMYCES KVASCI U VINARSKOJ PROIZVODNJI 8

4.1. *Torulaspora delbrueckii* 8

4.2. *Metschnikowia pulcherrima* 9

4.3. *Candida stellata*/*Candida zemplinina* 10

4.4. *Lachancea thermotolerans* 11

4.5. *Rod Hanseniaspora* 11

5. NE-SACCHAROMYCES KVASCI U FERMENTACIJI MOŠTA 13

5.1. Fermentativna sposobnost ne-*Saccharomyces* kvasaca 15

5.2. Ne-*Saccharomyces* kvasci u dozrijevanju vina 18

6. UTJECAJ NE-*SACCHAROMYCES* KVASACA NA SENZORNA SVOJSTVA VINA 19

6.1. Starter kulture 19

6.2. Esteri 23

6.3. Fenolni spojevi 25

7. DALJNJI POTENCIJAL NE-*SACCHAROMYCES* KVASACA 28

8. ZAKLJUČAK 30

9. POPIS LITERATURE 31

Životopis .....

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ana Benko**, naslova

VAŽNOST NE-SACCHAROMYCES KVASACA U MODERNOJ VINARSKOJ PROIZVODNJI

U ovom radu sakupljena su i interpretirana istraživanja vezana uz primjenu ne-*Saccharomyces* kvasaca u modernom vinarstvu i vinogradarstvu. Tijekom 20. stoljeća smatrano je da negativne karakteristike ovih kvasaca prevladavaju nad njihovom korisnošću, ali su se iscrpnim istraživanjima utvrdila i njihova izrazito pozitivna i komplementarna svojstva sa inače korištenim *Saccharomyces* kvascima u proizvodnji vina. Tržište i konzumacije vina usmjeravaju ka novim trendovima u proizvodnji vina sa kompleksnijim aromatskim profilima te smanjenim količinama alkohola. Upotrebom ne-*Saccharomyces* kvasaca postiže se i povratak izvornom mikrobiomu vinograda i podruma kao i izbjegavanje primjene različitih sintetičkih pripravaka za poboljšanje tijeka fermentacije, a upravo njihov iznimni potencijal je nešto što je jedna od središnjih tema istraživanja enologa današnjeg vremena.

Ključne riječi: ne-*Saccharomyces* kvasci, *S. cervisiae*, inokulacija, esteri

Summary

Of the master's thesis – student **Ana Benko,** entitled

THE IMPORTANCE OF NON-SACCHAROMYCES YEASTS IN MODERN WINEMAKING INDUSTRY

In this paper, gathered and interpreted is the research related to the application of non-*Saccharomyces* yeasts in modern winemaking and viticulture. During the 20th century, the negative characteristics of these yeasts were considered to outweigh their usefulness, but with the development of technology, the perspective also changed. In order to satisfy the increasingly demanding desires of consumers, the production of wines that have a more complex aromatic profile and lower amounts of alcohol has proven to be one of the ways to go. With the use of non-*Saccharomyces* yeasts the return to the original microbiome of vineyards and cellars is being accomplished and at the same time the use of various synthetic preparations to improve the course of fermentation is being avoided. It is their exceptional potential that is one of the central topics of research by oenologists today.

Keywords: non-*Saccharomyces* yeasts, *S. cerevisiae*, inoculation, esters

1. UVOD

U modernoj vinarskoj proizvodnji, kao i u većini drugih industrija, tehnolozi imaju želju i potrebu za dobivanjem što kvalitetnijeg konačnog proizvoda čiji proces proizvodnje ne zahtijeva prevelike troškove i utrošeno vrijeme. Međutim, prilikom proizvodnje vina potrebno je svakoj sorti, berbi ili kupaži pristupiti individualno jer na svaki od konačnih proizvoda utječe veliki niz faktora, kao što su klima, geografski položaj vinograda, zahvati u vinogradu, bolesti uzrokovane insektima i mikroorganizmima. U samoj srži, proizvodnja vina je jednostavan proces koji se učenjem i evolucijom ljudi i tehnologije mijenjao, a u današnjoj proizvodnji se primjenom modernih i tradicionalnih tehnologija žele dobiti kompleksniji proizvod koji će udovoljiti sve zahtjevnijim potrošačima. Iz tog razloga, stručnjaci su počeli proučavati utjecaj mikroorganizama koji se nalaze na grožđu i njihov pozitivan utjecaj na organoleptička i senzorna svojstva vina. Ne-*Saccharomyces* kvasci dug period vremena smatrani su isključivo negativnim faktorima u proizvodnji vina, ali se kroz brojna istraživanja i ispitivanja polako ističe njihov potencijal u proizvodnji. U procesu fermentacije, ovi kvasci razvijaju specifične kemijske spojeve koji vino čine kompleksnijim i originalnim sa vrlo istančanim ugodnim aromama.

U ovom radu sabrane su najznačajnije opisane vrste i karakteristike ne-*Saccharomyces* kvasaca, njihov odnos sa *Saccharomyces* kvascima koji se inače koriste prilikom procesa fermentacije u proizvodnji vina, te komplementarnim i kompetitvnim odnosima koji oni mogu imati.

2. OPĆENITO O NE-SACCHAROMYCES KVASCIMA

Prilikom korištenja pojma ne-*Saccharomyces* kvasci, uobičajeno je da se misli na askomicete i bazidiomicete. *Ascomycota*, odnosno gljive mješinarke, najveće su koljeno u carstvu gljiva, one su jednostanični organizmi, a toj skupini pripadaju jednostanične gljive, kvasci i neke plijesni. Spolnim razmnožavanjem ovih organizama nastaje askus, karakteristična tvorevina u kojem se nalaze askospore, seksualne spore nastale mejozom. Osim navedenog, neki kvasci pripadaju koljenu *Basidiomycota*, organizmima koji su u vegetativnom stanju i razmnožavaju se pupanjem ili binarnim cijepanjem i koje na podlozi gdje se odvija rast ne tvore spolni oblik. Taksonomski je opisano gotovo 1500 vrsta kvasaca koji tvore 149 rodova, a među njima je više od 40 vrsta izolirano iz mošta (Jolly i sur., 2014). U prirodi, kvasci tvore kolonije na različitim vrstama staništa, a u vinarskoj proizvodnji prisutni su na samim bobicama grožđa, ali i u podrumskom okolišu – strojevima, bačvama, alatu, na podovima i zidovima podruma. Kod gljiva, ime vrste određuje se s obzirom na stadij u kojem se nalaze (Tablica 1.) – prvi je telemorfni oblik, koje se odnosi na kvasac koji je u stadiju spolnog razmnožavanja i proizvodi askospore, a drugi, anamorfni oblik, odnosi se na stanje vegetativnog razmnožavanja kod kojeg ne dolazi do stvaranja askospora (Kurtzmann i sur., 2011). Osim toga, klasifikacija kvasaca često je podložna promjenama zbog primjene naprednijih metoda identifikacije kvasaca, a imena vrsta kvasaca u ovom radu pisana su prema nazivima u citiranim literarnim izvorima.

Brojni čimbenici utječu na vrstu i populaciju kvasaca i njihovu prisutnost na vinovoj lozi. Neki od tih čimbenika uključuju klimatske čimbenike, stupanj zrelosti grožđa i vrijeme berbe, fizikalna oštećenja i upotrebu fungicida. Također, površine i alati koje se koriste u podrumu za vrijeme fermentacije mošta na sebi razvijaju mikrokolonije kvasaca, a njihove populacije ovise o čistoći opreme i inokulaciji (Grba i sur., 2010). Osim toga, Bisson i sur (2009) navode i niske temperature, odnosnu hladnu maceraciju, kao potencijalni medij za rast različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca prije početka same fermentacije i dominacije *S. cerevisiae*. Unatoč napretku u istraživanju uloge i utjecaja ne-*Saccharomyces* kvasaca, smatra se da je potrebno provesti brojna istraživanja o bioraznolikosti, ekologiji i biogeografiji kvasaca i njihovog metabolizma kako bi se mogli još učinkovitije koristiti u inokulacijama kao starter kulturi koje se primjenjuju tijekom fermentacije mošta. Jedan od načina identifikacije, ali i spoznaje biologije ne-*Saccharomyces* kvasaca je sekvencioniranje njihovog genoma. Nekoliko vrsta je sekvencionirano i njihov genetički zapis je poznat, kao i njihov

biotehnološki potencijal, no za veliku većinu ti podatci još uvijek nisu dostupni ili su u tijeku izrade (Jolly i sur., 2014).

Tablica 1. Nazivi telemorfnih i anamorfnih oblika te sinonima ne-Saccharomyces kvasaca (Jolly i sur., 2014.)

Telemorfni oblik	**Anamorfni oblik**	**Sinonim**
Hanseniaspora uvarum	*Kloeckera apiculata*	-
Hanseniaspora vinae	*Kloeckera africana*	-
Lachancea kluyveri	-	*Saccharomyces kluyveri*
Lachancea thermotolerans	-	*Kluyveromyces thermotolerans; Candida dattlia*
Metschnikowia pulcherrima	*Candida pulcherrima*	*Torulopsis pulcherrima*
Pichia kluyveri	-	*Hansenula kluyveri*
Torulaspora delbrueckii	*Candida colliculosa*	*Saccharomyces rosei*
Zygosaccharomyces bailii	-	*Saccharomyces bailii*
-	*Candida zemplinina*	-
-	*Candida stellata*	*Torulopsis stellata*

Redoslijed pojave mikroorganizama u vinu često je uobičajen i u praksi prati određeni raspored pojavljivanja, a prisutnost specifičnih vrsta kvasaca pripisuje se klimatskim utjecajima, vinogradarskoj praksi i sorti grožđa (Bisson i sur., 2009). Ista grupa autora navodi da se na površini grožđa promjena u vrstama mikroorganizama odvija usporedno s dozrijevanjem. Prvi se pojavljuju bazidiomicetni kvasci (rodovi *Aureobasidium, Cryptococcus, Rhodosporidium*), zatim sazrijevanjem grožđa dolazi do prisutnosti askomicetnih kvasaca (rodovi *Hanseniaspora, Candida, Metschnikowia*), a kasnije pri krajnjem dozrijevanju i početku fermentacije dolazi do prisutnosti *S. cerevisiae*.

Osim na grožđu, ne-*Saccharomyces* kvasci koji sudjeluju u fermentaciji mošta, mogu potjecati i iz vinarije, odnosno podruma u kojem se proces odvija. Ocón i sur. (2010) promatrali su populacije ne-*Saccharomyces* kvasaca u četiri podruma vinogradarske regije Rioja u Španjolskoj (Slika 1.) Autori predlažu da bi se kvasci koji su se nalazili u okolišu vinarija mogli koristiti kao inokulum koji bi sudjelovao u fermentaciji mošta. Uzorci su bili uzimani s podova i zidova podruma, ali i opreme koja dolazi u direktni kontakt s grožđem i moštom. Detektirane kvasce autori su podijelili u tri skupine: rodovi koji nemaju fermentativnu sposobnost i ne sudjeluju u procesu vrenja (*Cryptococcus, Aureobasidium*), rodovi i vrste koji imaju sposobnost razvitka u tankovima tijekom vinifikacije i imaju djelomičnu fermentativnu sposobnost (*T. delbrueckii, K. apiculata, M. pulcherrima,* rodovi *Pichia* i *Candida*) te treća skupina u koju su svrstali glavne fermentativne kvasce (*S. cerevisiae*). Rezultati su bili slični u sva četiri podruma – 60-70% populacija činili su ne-*Saccharomyces* kvasci, a jedino rodovi *Pichia* i *Cryptococcus* pojavili su se u sve četiri vinarije. Ti rezultati su pozitivni budući da među najčešće pronađenim kvascima nema onih koji potencijalno mogu kontaminirati mošt ili vino i time utjecati na nepovoljan konačni proizvod.



Slika 1. Podrum vinarije R. López de Heredia, regija Rioja

(Izvor: https://www.lookphotos.com/en/images/70241869-Old-winery-in-Rioja-wine-region-Spain-Lopez-Heredia-cellar-Haro)

Ne-*Saccharomyces* kvasci u vinarskoj proizvodnji najčešće se koriste koinokulirani sa *S. cerevisiae*. Takav postupak postao je praksa jer vina u kojima je fermentacija provedena samo pomoću *S. cerevisiae* imaju „industrijski“ i uniformni okus, dok je fermentacija koju provode

isključivo ne-*Saccharomyces* kvasci nekontrolirana i nije uniformna. Stoga, današnji tehnolozi i enolozi provode koinokulaciju i sekvencionalnu inokulaciju kako bi se postiglo sigurno i brzo provođenje fermentacije zbog *S. cerevisiae*, a ne-*Saccharomyces* kvasci se dodaju fermentaciji kako bi se proizvelo vino s poželjnim senzornim i tehnološkim karakteristikama (Zhao i sur., 2021). Međutim, ne-*Saccharomyces* kvasci imaju i neke negativne karakteristike – većina rodova ne može u potpunosti provoditi fermentaciju zbog niskog kapaciteta pretvorbe šećera u etanol te slaba otpornost na tvari koje se dodaju vinu, poput sulfata (Benito i sur, 2019). Unatoč svim čimbenicima koji utječu na vinogradarsku i vinarsku proizvodnju, uključujući sortu vinove loze, klimu, tlo, položaj i tehnologiju proizvodnje, vrste kvasaca na grožđu i u podrumima u vinarskoj industriji vrlo su slične, a najveća razlika je u vrsti i broju kvasaca na određenom području (Jolly i sur., 2014). Doprinos ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina ističe se u izlučivanju enzima, proizvodnji sekundarnih metabolita, doprinos stabilnosti boje vina i ispuštanje manoproteina (Padilla i sur., 2016). Međutim i te osobine razlikuju se s obzirom na vrstu i soj ne-*Saccharomyces* kvasca stoga je i u tom slučaju važan odabir odgovarajućeg soja.

3. NE-SACCHAROMYCES KVASCI U LITERATURI 20. STOLJEĆA

Ne-*Saccharomyces* kvasci tijekom dugog perioda vremena smatrani su štetnom i nepoželjnom pojavom u proizvodnji vina budući da su se uglavnom izolirali iz pokvarenih vina te se nije pridavala važnost i mogući pozitivni utjecaj u vinarskoj proizvodnji. Velik broj istraživanja povezanih s ulogom i utjecajem ne-*Saccharomyces* kvasaca provedeno je u Južnoafričkoj Republici tijekom 50-ih, 60-ih i 70-ih godina 20. stoljeća te su upravo dva istraživanja iz tog područja navedena u ovom radu, kao prvotna istraživanja koja su objasnila važnost ne-*Saccharomyces* kvasaca. Van Der Walt i sur. (1958) su analizirali 60 uzoraka različitih vina ne bi li prikupili dovoljnu količinu raznovrsnih kvasaca i utvrdili njihov potencijalni utjecaj na vino. Brojnost kvasaca roda *Brettanomyces* iznosio je 50% od ukupnog broja svih kvasaca izoliranih iz uzoraka vina te je smatrano da su ti kvasci uzrokovali zamućenje vina i povećane količine hlapljivih kiselina. Osim toga, utvrđeno je da su kvasci roda *Brettanomyces* prilikom pristupa kisiku, doprinijeli razvoju nepoželjnog sedimenta i prekomjernoj količini octene kiseline. U uzorcima su, osim *Brettanomyces* roda, pronađeni i *S. acidifaciens* (danas: *Zygosaccharomyces bailii*), *S. oviformis* (danas: *S. cerevisiae*), *S. cerevisiae* i *Pichia membranaefaciens* (danas: *P. membranifaciens*).

Le Roux i sur. (1973) u istražili su povezanost djelovanja sive plijesni (*Botrytis cinerea*) uz prisutnost različitih vrsta divljih kvasaca, poput *Torulopsis bacillaris* (danas: *Starmellera bacillaris*; sinonim *Candida zemplinina*), *Candida krusei* i *Kloeckera apiculata*. U istraživanju prikupljeni su kvasci i bakterije iz vina u kojem se nije izvorno nalazila siva plijesan i uzorci koji su bili inokulirani sivom plijesni. Njihova saznanja upućuju da u vinu napravljenom od grožđa zaraženog sivom plijesni bio i veći broj različitih vrsta kvasaca, a kvaliteta tog vina bila je lošija od onog koje nije bilo inokulirano sivom plijesni te je zbog toga smatrano da i ne-*Saccharomyces* kvasci imaju negativan utjecaj na kvalitetu, kvarenje i okus vina. Ovo istraživanje je uvelike usmjerilo daljnju negativnu interpretaciju ne-*Saccharomyces* kvasaca u kvarljivost vina te je zaključeno je da su to štetni mikroorganizmi. Tijekom 20. stoljeća smatralo se i da loše provode fermentaciju te da nisu tolerantni na veće količine etanola koje se razvijaju u moštu. Njihov rast tijekom fermentacije je inhibiran dodavanjem sumporovih oksida (Jolly i sur., 2014).

Šafar je još davne 1966. godine uočila da bi se u proizvodnji vina autohtonih sorata trebali primjenjivati, ne samo selekcionirani vinski kvasci, već i oni autohtoni koji se mogu izolirati iz vinograda kako bi se dobivala bolja i kvalitetnija vina. Iz različitih vinogorja izolirane su različite vrste kvasaca: 83 soja *S. vini*, 5 sojeva *S. oviformis*, 4 soja *S. pastorianus*, 2 soja *S. steineri* i dr. Izolirani kvasci u narednim su godinama determinirani i primjenjivani u fermentaciji vina u testnim pokusima te su se zabilježili pozitivni rezultati u gotovo svim proizvedenim vinima, sa zaključkom da su potrebna dodatna istraživanja, kao i veći broj testiranih uzoraka, kako bi se pozitivna svojstva mogla sa sigurnošću utvrditi. Zanimljivost je u tome što primjerice, *S. vini* i *S. oviformis* zapravo nisu dvije različite vrste, već *S. cerevisiae*, stoga je potrebno s oprezom pristupiti starijim istraživanjima u kojima se iznosi, zbog nedostatka tehnologije i nedovoljno razvijenih molekularnih metoda, njihovoj identifikaciji i determinaciji vrsta, odnosno sojeva kvasaca.

Du Toit i sur. (2000) objavljuju istraživanje koje donosi podatke o negativnom djelovanju ne-*Saccharomyces* kvasaca, točnije kako određeni rodovi kvasaca utječu na kvarenje vina. U radu se nazivaju tzv. „divljim kvascima“ koji provode djelomičnu fermentaciju i tvore estere, ali mogu biti čimbenici kvarenja vina. Kao uzroke kvarenja, autori navode kvasac *Candida spp*., sa sposobnošću stvaranja film na površini, ukoliko je vino izloženo zraku te sposobnost oksidiranja etanola koje vodi ka povećanom stvaranju većih količina acetaldehida i hlapljivih kiselina. Za rod *Hanseniaspora* navodi se da proizvode veće količine octene kiseline i njezinih nepoželjnih estera kao što je etil acetat, dok se za kvasac *Metschnikowia pulcherrima* navodi da stvara film na površini te time dolazi do stvaranja prekomjernih koncentracija acetaldehida i etil acetata, a slično je utvrđeno i za *Pichia spp*. gdje je zabilježeno da ovaj kvasac stvara praškasti film i veće količine acetaldehida. Do sekundarne fermentacije vina u boci i smanjivanja kiselosti dolazi zbog aktivnosti *Schizosaccharomyces pombe*, dok zbog prisutnosti *Zygosaccharomyces bailii* uočena neželjena sekundarne fermentacije s velikim količinama CO_2 te zamućenja i stvaranja taloga u vinu.

4. ZNAČAJNI NE-SACCHAROMYCES KVASCI U VINARSKOJ PROIZVODNJI

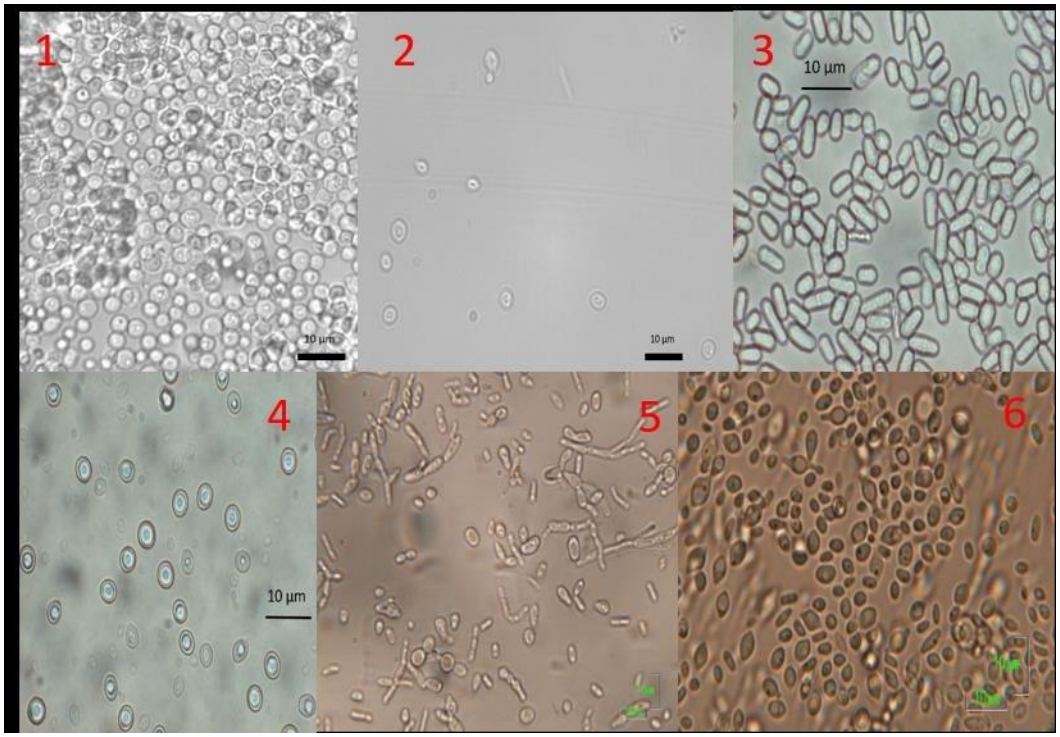
4.1. *Torulaspora delbrueckii*

Rod *Torulaspora* čini 6 vrsta, i taj broj će se gotovo sigurno promijeniti zbog napretka u metodama identifikacije; vrste *Zygosaccharomyces magii* i *Z. microellipsoides* su reklasificirane i svrstaju se u rod *Torulaspora* zbog slijeda nukleotida u njihovoj rRNA sekvenci (James i sur., 1996). Sojevi za koje se smatralo da pripadaju vrsti *T. delbrueckii* reklasificirani su u rodove *Debaryomyces* i *Saccharomyces* (Oda i sur., 1997).

Stanice roda *Torulaspora* uglavnom su sferičnog oblika (Slika 2.), veličine 2-6 x 3-7 µm te rijetko proizvode pseudohife, a prave hife nikada. Sve vrste ovog roda razmnožavaju se uzdužnom diobom (mitozom), te su poznata 3 tipa konjugacije (Ramirez i sur., 2018). Za većinu kvasaca koji pripadaju ovom rodu nema opsežnih studija i količine dostupnih informacija o njihovom biotehnološkom potencijalu i karakterizaciji budući se njihova klasifikacija i identifikacija konstantno mijenja i nadopunjuje.

Vrsta *Torulaspora delbrueckii* (anamorfni oblik: *Candida colliculosa*) mogla bi biti gotovo jednako djelotvorna u vinogradarstvu i vinarstvu kao i *S.cerevisiae.* Istraživanja su pokazala da sojevi *T. delbrueckii* imaju bolje fermentativne sposobnosti i navodi se kao najučinkovitiji od ne-*Saccharomyces* kvasaca (Ramirez i sur., 2018). S obzirom na to da je *T. delbrueckii* u prošlosti pripadao rodu *Saccharomyces*, može biti pretpostavljeno kako su pozitivna biotehnološka svojstva ovog kvasca predmet interesa mnogih znanstvenika tijekom dugog niza godina. Moguće prednosti nad *S. cerevisiae* su bolja tolerancija na etanol, veća otpornost na pH i osmotski stres (De La Cruz Pech-Canul i sur., 2018). *T. delbrueckii* također proizvodi niske koncentracije nepoželjnih hlapljivih komponenti, kao što su sulfidi te smanjuje hlapljivu kiselost u fermentacijama s visokim razinama šećera kada je primijenjena sa *S. cerevisiae* (Albertin i sur., 2014). *T. delbrueckii* moguće je izolirati s različitih vrsta staništa – tla, biljka i insekata. Također, utvrđena je njihova prisutnost i u kliničkim izolatima, što ih ne čini ljudskim patogenima. U tom slučaju, karakteriziramo ga kao anamorfni oblik ovog kvasca, *Candida colliculosa* (Albertin i sur., 2014). Rijetki su slučajevi gdje se *C. colliculosa* pojavila kao ljudski patogen, ali je zabilježen slučaj gdje je rastom tog kvasca u krvnoj kulturi čovjeka došlo do endokarditisa (Kaygusuz i sur., 2003). U odnosu na *S. cerevisiae*, kvasac *T. delbrueckii* pokazuje sporiji rast u uobičajenim uvjetima fermentacije vina kao što su striktno

anaerobna okolina, što može predstavljati problem u proizvodnji bijelih i pjenušavih vina, a osim toga fermentacija se u odnosu na *S. cerevisiae* odvija sporije (Ramirez i sur., 2018). U istraživanjima o nastanku različitih estera koji pružaju mirisne arome (izoamil acetat, etil heksanoat, 3-hidroksibutanoat) dobiveni su različiti, čak i kontradiktorni rezultati – neki od njih navode da se koinokulacijom *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* sadržaj estera značajno povećao (Herraiz i sur., 1990), dok su Jolly i sur. (2006) zabilježili da su koinokulirani spomenuti sojevi u vinima Sauvignon bijeli i Chenin bijeli bili ocijenjeni bolje nego ta vina inokulirana samo sa *S. cerevisiae*. Nasuprot tome, Sadoudi i sur. (2012) navode u svojim rezultatima da je reakcija koinokulacije bila neutralna i nije došlo do značajnog porasta sadržaja estera u fermentaciji.



Slika 2. Mikroskopski prikaz stanica kvasaca *Torulaspora delbrueckii* (1), *Lachancea thermotolerans* (2), *Schizosaccharomyces pombe* (3), *Metschnikovia pulcherrima* (4), *Meyerozyma guilliermondi* (5) i *Hanseniaspora uvarum* (6) (Benito i sur., 2019).

4.2. *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima vrsta je kvasca koja se često pojavljuje u spontanim fermentacijama. Anamorfni oblik ovog kvasca je *Candida pulcherrima*, a stanice su eliptičnog oblika i promatranjem pod mikroskopom ne razlikuje se od *S. cerevisiae* (Slika 1.)

M. pulcherrima u prirodi se nalazi u bobicama grožđa, svježem i trulom voću i cvijeću te neki kukci mogu biti vektori (Morata i sur., 2019). Različiti autori navode da *M. pulcherrima* ima antagonistički odnos s mnogim vrstama kvasaca, među njima je i *S. cerevisiae*, što dovodi do odgađanja fermentacije (Jolly i sur., 2014). *M. pulcherrima* učinkovitija je kada se primjenjuje s drugim kvascima u starter kulturama. Do smanjenja količine etanola dolazi kombiniranom primjenom s *C. zemplinina*, a bilo je i zabilježeno značajnije smanjivanje količine hlapljive kiselosti kada su *T. delbrueckii* i *M. pulcherrima* bili koinokulirani (Comitini i sur., 2012), poput drugih ne-*Saccharomyces* kvasaca, *M. pulcherrima* učinkovit je u stvaranju estera, posebice etil oktanoata. Važno je napomenuti da djelovanje više vrsta kvasaca ima različiti učinak s obzirom na fermentaciju sorte u kojoj se nalaze, u istraživanju sekvencionalne fermentacije predvođene *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae* u vinima Sauvignon bijeli i Chenin bijeli, bili pokazala su bolje karakteristike u odnosu na kontrolna vina u kojima se nalazio samo *S. cerevisiae*, ali u slučaju vina Chardonnay, koji je bio tretiran na jednaki način kao navedena vina rezultirao je inferiornijom kvalitetom od kontrolnog vina. Vina su bila degustirana 5 i 18 mjeseci od početka fermentacije, a ocjenjivana po McCloskey metodi[1] (Jolly i sur., 2014).

4.3. *Candida stellata*/*Candida zemplinina*

Stanice ovog kvasca sfernog su oblika i u prirodi se mogu naći kao pojedinačne stanice ili kolonije zvjezdastog oblika te ne stvaraju hife ili pseudohife (Garcia i sur., 2018). Neki od sojeva *Candida stellata* reklasificirani su te sada pripadaju vrsti *C. zemplinina*, stoga u starijim literaturnim navodima može doći do navođenja *C. stellata* kao *C. zemplinina* (Kurtzmann i sur., 2011). Zabilježeno je da vijabilnost *C. stellata* produžena i nakon fermentacije (Ciani i sur., 1998), a u ranijim stadijima fermentacije *C. stellata* prilikom povećane koncentracije etanola njezina vijabilnost je konstantna, te kao i drugi ne-*Saccharomyces* kvasci, ima utjecaj na aromu vina (Garcia i sur., 2018). *C. stellata* proizvodi velike količine glicerola u vinu koje se mogu kretati do 14 g/L, u usporedbi s tim, *S. cerevisiae* proizvodi između 4 i 10,4 g/L glicerola. Glicerol u vinu pridonosi kompleksnosti vina, a koncentracije iznad 5,2 g/L doprinose slatkom okusu prilikom degustacije (Jolly i sur., 2014). Osim toga, *S. cerevisiae* više iskorištava glukozu, a *C. stellata* fruktozu prilikom fermentacije za proizvodnju etanola. Budući da je *S. cerevisiae* glukofilni kvasac, moguća je

[1] Metoda senzoričkog ocjenjivanja vina koju su McCloskey i sur. (1995) osmislili kako bi postigli uniformnost u deskriptivnim analizama vina u Sjedinjenim Američkim Državama.

pojava rezidualnih šećera nakon fermentacije, stoga su se vina u istraživanju sekvencionalno inokulirala *C. stellata* koja je konzumirala fruktozu. Time je postignuto da nema rezidualnih šećera u vinu, što je dovelo do bržeg odvijanja i skraćivanja vremena fermentacije. Istraživanja su pokazala da su vina promatrana u ovom pokusu imala povećanu koncentraciju glicerola i jantarne kiseline od uobičajene, a manje količine viših alkohola i octene kiseline (Ciani i sur., 1998).

4.4. *Lachancea thermotolerans*

Lachancea thermotolerans, prije klasificirana kao *Kluyveromyces thermotolerans*, kvasac je koji se nalazi na površini bobica grožđa, ali i u tlu i na insektima. Morfološki se gotovo uopće ne razlikuje od *S. cerevisiae*, elipsoidnog je oblika i u tekućim medijima se nalazi kao pojedinačna jedinka (Slika 1.) Najčešće se pojavljuje u telemorfnom obliku te se spolno razmnožava tvorbom askospora, a vegetativno multilateralnim pupanjem (Morata i sur., 2018). Odlikuje se sposobnošću zakiseljavanja vina na prirodni način proizvodnjom mliječne kiseline, ali djelovanje je učinkovito samo koinokulacijom sa *S. cerevisiae* (Jolly i sur., 2014). Međutim, upravo zbog sposobnosti proizvodnje mliječne kiseline, ovaj kvasac odlikuje se vrlo poželjnim biotehnološkim svojstvom te je iz tog razloga jedan od rijetkih ne-*Saccharomyces* kvasaca koji se komercijalno proizvodi i prodaje. Budući da se tvorbom mliječne kiseline smanjuje udio alkohola u vinu, djelovanje ovog kvasca poželjno je pri proizvodnji laganijih vina (Morata i sur., 2018). Zajedničkom primjenom *L. thermotolerans* i *S.cerevisiae* u vinu se može povećati koncentracija glicerola i različitih polisaharida, a smanjuje se količina hlapljivih kiselina (Gobbi i sur., 2013). Senzoričke i kemijske promjene u kojima se ističu niži sadržaj etanola, kao sve poželjnija karakteristika u modernoj vinarskoj proizvodnji, te esteri koji rezultiraju cvjetnim aromama čine ovu vrstu kvasca korisnom u proizvodnji i crnih i bijelih vina. Osim navedenog, Morata i sur. (2018) u svom su istraživanju opisali da se određeni sojevi *L. thermotolerans* mogu koristiti u biološkom tretmanu vinove loze i grožđa za inhibiranje rasta plijesni roda *Aspergillus*, a da pritom ti sojevi nemaju negativni utjecaj na metabolizam i učinak *S. cerevisiae* tijekom fermentacije.

4.5. *Rod Hanseniaspora*

Rod *Hanseniaspora* pripada apikulatnim kvascima te su dominantna vrsta prisutna u zrelom grožđu te ima značajnu ulogu u fermentaciji aromatskih spojeva čijom pojavom dolazi do poboljšavanja različite osobine vina poput boje, okusa i mirisa (Martin i sur, 2018). Slabe su

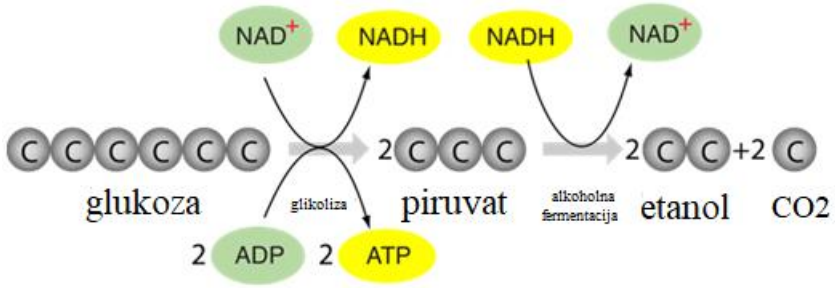
fermentativne sposobnosti, ali imaju važnu ulogu u proizvodnji hlapljivih spojeva vina značajnih za senzorička svojstva (Jolly i sur., 2014). Rod *Hanseniaspora* ima slabu fermentativnu sposobnost, ali pri kombiniranoj inokulaciji sa *S. cerevisiae* uloga kvasaca ovog roda značajna je jer poboljšavaju kemijski sastav vina i važni su za nastanak hlapljivih komponenti te se zbog toga vina koinokulirana ovim dvama kvascima smatraju kvalitetnijima u odnosu na ona u kojima se nalazi samo *S. cerevisiae* (Jolly i sur., 2014).

Međutim, zabilježeno je da pojava roda *Hanseniaspora* može imati antagonistički utjecaj na rast *S. cerevisiae*, što može dovesti do zastoja fermentacije (Jolly i sur., 2014).

Hanseniaspora uvarum (anamorfni oblik *Kloeckera apiculata*) najčešća je vrsta kvasca koja se nalazi u vinogradima (Slika 1.), stoga se smatra da ima iznimno velik utjecaj na kvalitetu vina (Jolly i sur., 2014). U vinima koinokuliranim *H. uvarum* i *S. cerevisiae* bile su povećane koncentracije viših alkohola, acetata, masnih kiselina srednjeg lanca i etilnih estera (Andorra i sur., 2010).

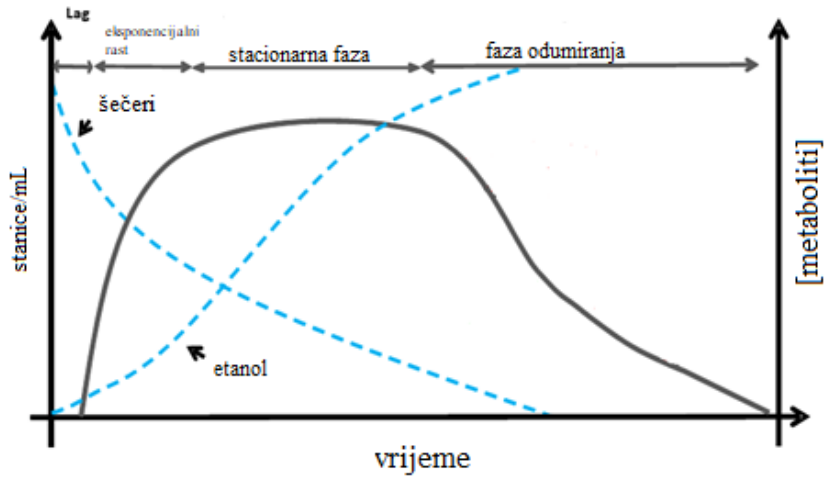
5. NE-SACCHAROMYCES KVASCI U FERMENTACIJI MOŠTA

Alkoholno vrenje ili fermentacija mošta anaerobni je proces kojim kvasci razgrađuju šećere u moštu, a najvažniji produkti fermentacije su etanol i CO_2 (Slika 3.) Fermentacija je ujedno najvažniji proces u proizvodnji vina u kojem enolog može utjecati na konačni proizvod – promjenom temperature, inokulacijom, ali i količinom dušika dostupnim za kvasce koji služi za nutritivne potrebe kvasaca (YAN – yeast assimible nitrogen).



Slika 3. Proces alkoholne fermentacije (Audesirk i sur., 1999)

Tijekom samog procesa fermentacije moguće je izdvojiti četiri stadija rasta populacije kvasaca – lag faza (suzdržani rast), faza eksponencijalnog rasta, stacionarna faza i faza odumiranja (Slika 4.) Na početku fermentacije uobičajeno je učestalije pojavljivanje ne-*Saccharomyces* vrsta koje kasnije odumiru i zamjenjuje ih *S. cerevisiae* zbog bolje fermentativne sposobnosti i otpornosti na stres. U novije vrijeme, kao posljedica klimatskih promjena i loše vinogradske prakse, koncentracija šećera u grožđu se znatno povećala što utječe i na fiziologiju kvasaca zbog osmotskog stresa, jer je količina dostupnog šećera povećana već od mošta (Lleixà,i sur., 2016).



Slika 4. Faze odvijanja fermentacije s obzirom na rast kvasaca, konzumaciju šećera i stvaranje etanola (Aranda i sur., 2019).

Mošt je nesterilni supstrat u kojem se nalaze organizmi koji provode fermentaciju, a najčešće se u njemu nalaze kvasci roda *Hanseniaspora* iako ih nakon 3-4 dana zamjenjuju kvasci *S. cerevisiae*, a tijekom različitih stadija fermentacije moguće je iz mošta izolirati kvasce roda *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Metschnikowia* i dr. (Jolly i sur., 2014). Različite vrste i sojevi kvasaca koji sudjeluju u cjelokupnom fermentativnom procesu najviše djeluju na sastavne dijelove mošta – šećere, hlapljive i nehlapljive komponente koje utječu na vrstu i koncentraciju produkata metabolizma. Ti produkti doprinose aromatskim osobinama vina. Kao najznačajniji hlapljivi spojevi metabolizma kvasaca ističu se etanol i ugljikov dioksid, koji imaju relativno mali utjecaj na aromu vina, međutim, organske kiseline, viši alkoholi i esteri ističu se kao grupa spojeva koji gotovo u potpunosti utječu na *bouquet* i osebujnost vina (Combina i sur, 2005). Način na koji kvasci provode fermentaciju može se podijeliti u dva stadija: primarni metabolizam, koji je nužan za rast kvasaca i diobu stanica te proizvodnju etanola, glicerola, acetaldehida i octene kiseline, dok sekundarni metabolizam proizvodi manje molekule i nije nužan za rast. Međutim, u sekundarnom metabolizmu dolazi do stvaranja spojeva nužnih za aromatski profil vina (Mina i sur., 2017). Utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na fermentaciju i konačnu kvalitetu vina trenutan je predmet istraživanja u enologiji.

Prema Jolly i sur. (2014), ne-*Saccharomyces* kvasci koji se nalaze u moštu i sudjeluju u fermentaciji, mogu se podijeliti u tri skupine:

1. Izrazito aerobni kvasci (*Pichia spp.*, *Debaromyces spp.*, *Candida spp.*)
2. Apikulatni kvasci sa slabom fermentativnom aktivnošću (*Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*)

3. Kvasci s fermentativnim metabolizmom (*Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima, Zygosaccharomyces spp.*)

Ista grupa autora navodi stadij rasta i vrijeme fermentacije kao najvažnije faktore prilikom broja i vrsti kvasaca. U svježem moštu mala je brojnost kvasaca rodova *Hanseniaspora, Pichia, Candida* i *Metschnikowia*. Međutim, većina ne-*Saccharomyces* kvasaca izgubi vijabilnost tijekom ranijih stadija fermentacije zbog slabog rasta i inhibicije djelovanjem niskog pH, visoke količine etanola, nedostatka kisika i utjecajem sumpornih spojeva (Combina i sur., 2005). Vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca koje su prisutne u vinu i nakon završetka fermentacije imaju bolju toleranciju na alkohol i anaerobne uvjete. Vilela (2020) navodi da se značaj ne-*Saccharomyces* kvasaca u spontanim i inokuliranim fermentacijama očituje u ranijim stadijima fermentacije, prije nego što *S. cerevisiae* postane dominantna kultura. Osim utjecaja na okus vina stvaranjem aromatskih spojeva, pojava ne-*Saccharomyces* kvasaca u vinu također ima utjecaj na rast i aktivnost bakterija u vinu – u početnim fazama fermentacije mogu utjecati na smanjenje esencijalnih hranjiva i time inhibirati rast bakterija mliječne kiseline nužne za provođenje malolaktične fermentacije (Jolly i sur., 2014). Lleixà,i sur. (2016) istraživali su utjecaj dostupnosti hranjivog dušika i šećera na rast i razvoj *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca u različitim uvjetima. Fermentacije s optimalnim količinama šećera odvile su se najbrže (5-13 dana), a u onim uzorcima gdje je bilo manje dostupnog šećera i fermetnacija se sporije odvila. One fermentacije u kojima su količine hranjivog dušika bile ograničavajuće, zaustavljene su i nisu provedene do kraja te je u tim uzorcima bilo rezidualnog šećera. Autori zaključuju da dostupnost dušika daleko važnija za kvasce nego li uloga koju ima šećer iz mošta.

5.1. Fermentativna sposobnost ne-*Saccharomyces* kvasaca

Kod većine ne-*Saccharomyces* kvasaca koji sudjeluju u fermentaciji mošta postoje određena ograničenja koja se odnose na njihovu slabu fermentativnu sposobnost zbog sporog rasta i inhibicije uzrokovane sumpornim spojevima, anaerobnim uvjetima, niskog pH i visokim koncentracijama etanola (Božič i sur., 2019), a kao jedini rod ne-*Saccharomyces* kvasaca koji bi mogao preživjeti u tim uvjetima ističe se *Schizosaccharomyces* (Benito i sur., 2019). Tijekom fermentacije, populacije kvasaca mijenjaju se s obzirom na kemijska obilježja i uvjete – u prvoj fazi fermentacije aktivni su kvasci koji toleriraju niske količine etanola, poput rodova *Hanseniaspora*, *Candida* i *Pichia*. Tijekom srednjeg stadija fermentacije aktivni su

kvasci s umjerenom otpornošću na alkohol, kao što su *Lachancea* i *Torulaspora* koji su duži period vijabilni zbog navedenih osobina. U posljednjoj fazi fermentacije prevladava *S. cerevisiae* koji je najučinkovitiji u uvjetima viših koncentracija etanola (Benito i sur., 2019). U uzorcima gdje su provedene fermentacije u čistim kulturama ne-*Saccharomyces* kvasaca, volumen alkohola iznosio je od 9,6% (*H. guillermondii*) do 9,9% (*H. uvarum*) što nisu uobičajene koncentracije za vina u komercijalnoj prodaji (Moreira i sur., 2008). Međutim, inokulacijom *S. cerevisiae* s ne-*Saccharomyces* kvacima, negativne osobine mogu biti modificirane i umanjene (Jolly i sur., 2014). Sekvencionalna inokulacija i koinokulacija pokazale su se vrlo važnima u sprečavanju zastoja fermentacije (Sadoudi i sur., 2012). Također, dodatkom *S. cerevisiae* žele se izbjeći spontane fermentacije. Kod spontanih fermentacija ne vrši se inokulacija drugim kvascima, nego se fermentacija provodi samo s autohtonim vrstama kvasaca koji su u moštu kako bi se istaknule najvažnije karakteristike područja na kojem je uzgojena vinova loza. Vina dobivena spontanom fermentacijom puno su kompleksnijeg okusa i arome su istaknutije u odnosu na vina gdje je fermentacija kontrolirana inokulacijom drugih kvasaca, ali glavni nedostatak je što se lakše kvare (Jolly i sur., 2014). Danas, u praksi, neki vinari i dalje prakticiraju spontane fermentacije, međutim zbog brzine i pouzdanosti, sve se više koriste kontroliranim, inokuliranim fermentacijama. Zbog shvaćanja značaja i doprinosa ne-*Saccharomyces* kvasaca u kvaliteti vina, jedna od važnijih stvari danas u tehnologiji proizvodnje vina je proučavanje pozitivnih i negativnih interakcija kvasac-kvasac kako bi se sekvencionalnom inokulacijom i koinokulacijom postigao što kvalitetniji konačni proizvod. Međutim, prije odabira vrste inokulacije treba obratiti pozornost na vrstu vina koju se želi proizvesti s obzirom na željena organoleptička svojstva (Loira i sur., 2020) Također, prilikom odabira kvasaca za inokulaciju, vinari trebaju obratiti pozornost na to da poboljšanjem jednog svojstva dodavanjem određenih kvasaca, primjerice smanjenje etanola i veća koncentracija estera koji doprinose voćnim okusima, ne pogoršaju drugo svojstvo, na primjer boju vina (Božič i sur., 2019). Ciani i sur. (2015) navode da je jedna od najznačajnijih inhibitornih interakcija upravo ona koju *S. cerevisiae* ima s drugim rodovima kvasaca zbog stvaranja visokih koncentracija etanola. Osim etanola, stvaranje masnih kiselina srednjeg lanca i povećanih količina octene kiseline mogu imati negativan učinak na rast koinokuliranih kvasaca. Dostupnost kisika također se ističe kao jedan od važnijih faktora za razvoj kvasaca koji ne mora nužno biti povezan uz temperaturu vrenja i koncentraciju etanola (Jolly i sur., 2014), primjerice, *L. thermotolerans, M. pulcherrima* i *T. delbrueckii* imaju vrlo nisku toleranciju na anaerobne uvjete i dominacijom *S. cerevisiae* vrlo brzo dolazi do njihovog odumiranja. Capozzi i sur. (2015) opisali su negativne karakteristike vina dobivenih

fermentacijom ne-*Saccharomyces* kvasaca, poput acetoina, octene kiseline i acetaldehida koji su nepoželjni čak i u minimalnim koncentracijama. Međutim, također su naveli da ta negativna svojstva mogu biti modificirana ili u potpunosti izbjegnuta pravilnom i dobrom praksom.

Hierro i sur. (2006) proučavali su kako hladna maceracija i različiti stupnjevi zrelosti grožđa utječu na raznolikost i evoluciju ne-*Saccharomyces* kvasaca. Korištena su tri različita mošta sorte Tempranillo, koji su dobiveni od grožđa branog u razmaku od tjedan dana, a koji su se međusobno razlikovali po pH – najniži je bio u moštu koji je napravljen od najkasnije ubranog grožđa. Uzorci kvasaca za izolaciju i identifikaciju uzimani su u različitim fazama fermentacije: tijekom hladne maceracije, na prvi dan fermentacije, tijekom najintenzivnije faze fermentacije i na kraju fermentacije. PCR metodom iz uzoraka prikupljenih tijekom fermentacije identificirano je 11 vrsta iz 5 različitih rodova. Osim *C. stellata* i *H. uvarum,* koji su se u najvećoj količini nalazili u uzorcima, autori navode pojavu *H. osmophila,* koji se u najvećoj količini nalazio u moštu od najzrelijeg grožđa, vrlo neobičnom. Tu pojavu povezali su s visokim koncentracijama šećera zbog zrelosti grožđa. Također, proces hladne maceracije pridonio je rastu stanica ove vrste, a do ovog istraživanja bilo je smatrano da ova vrsta nije od velike važnosti jer se ne pojavljuje često u uzorcima izoliranim iz fermentacija. Upravo to autori navode kao potencijal za daljnje istraživanje i karakteristike ove vrste kao jedan od mogućih interesa enologa.

Unatoč tome što se kao jedna od negativnih stvari u fermentativnoj sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca ističe nemogućnost potpunog provođenja fermentacije, Contreras i sur. (2015) tu osobinu ističu kao pozitivnu stvar zbog trenda u proizvodnji koji se okreće popularizaciji vina s manjim postotkom alkohola. U istraživanju je bilo korišteno 33 vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca koji su pripadali 21 rodu. Cilj pokusa bilo je spoznavanje rodova ne-*Saccharomyces* kvasaca koji bi se u koinokulaciji sa *S. cerevisiae* koristili u proizvodnji vina sa smanjenom količinom alkohola. Unutar četiri dana od početka fermentacije, za daljnju koinokulaciju odabrani su oni kvasci koji su razgradili minimalno 30 % šećera. U četiri provedena tretmana primjenjivale su se različite količine kisika, a kao kontrolni uzorak koristio se inokulirani *S. cerevisiae* u anaerobnim uvjetima. Tijekom prvog tretmana 5 mL/min kisika je bilo uvođeno u spremnike s medijima tijekom cijelog trajanja fermentacije. Uzorak *T. delbrueckii* bio je koinokuliran sa *S. cerevisiae* nakon 3 dana, a fermentacija je bila u potpunosti završena 6 dana od početka. Osim toga, vina proizvedena tom koinokulacijom sadržavala su niže koncentracije alkohola te više koncentracije glicerola i jantarne kiseline nego drugi uzorci prvog tretmana. U drugom tretmanu kisik je bio dostupan samo tijekom

prva 24 sata fermentacije te je aeracija primjenjivana u koncentraciji 5 mL/min, a po gustoći rasta, *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* bili su gotovo izjednačeni, dok je u slučaju *Z. bailii* fermentacija trajala nešto duže. U slučaju oba korištena ne-*Saccharomyces* kvasca, količina glicerola i jantarne kiseline bila je viša nego u uzorku koji je sadržavao samo *S. cerevisiae*. Prilikom trećeg tretmana prevladavali su aerobni uvjeti dok nije bilo razgrađeno 50 % šećera u uzorcima ne-*Saccharomyces* kvasaca uz 5 mL/min kisika, a rast kvasaca bio je sličan kao u prethodna dva slučaja. Međutim i ovdje su zabilježene niže koncentracije etanola u svim koinokuliranim uzorcima gdje su se nalazili ne-*Saccharomyces* kvasci u odnosu na kontrolni uzorak gdje se nalazila čista kultura *S. cerevisiae*. U četvrtom tretmanu bilo je dozirano 10 mL/min kisika dok ne-*Saccharomyces* kvasci nisu razgradili 50 % šećera. Koinokulirani uzorci *T. delbrueckii* i *Z. bailii* sa *S. cerevisiae* završili su fermentativni proces u 6, odnosno 7 dana. Najveći pad u koncentraciji etanola bio je u uzorcima gdje su koinokulirani *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae*, dok su vina koja su bila proizvedena kombinacijom *Z. bailii* i *S. cerevisiae* sadržavala najviše koncentracije polisaharida za koje autori navode da mogu istaknuti pozitivne karakteristike vina. Dostupnost kisika ne-*Saccharomyces* kvascima autori ističu kao vrlo pozitivnu karakteristiku u poboljšanju njihovog djelovanja.

5.2. Ne-*Saccharomyces* kvasci u dozrijevanju vina

Proces dozrijevanja vina značajan je ukoliko enolog smatra da je vino pogodno za odležavanje i da će se time postići dodatna senzorička, tehnološka i prodajna vrijednost. Bisson i sur. (2009) navode da ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasci koji sudjeluju u fermentaciji, tijekom dozrijevanja nemaju važnu direktnu biološku ulogu budući da dolazi do odumiranja stanica i njihove vijabilnosti. Međutim, rodovi *Candida* i *Pichia* mogu se nalaziti u bačvama gdje se čuva vino ukoliko sanitarni i higijenski uvjeti proizvodnog podruma nisu dobri. U tom slučaju, ti kvasci pogodovat će kvarenju vina zbog stvaranja filma u vinu i uzrokovanja organoleptički neugodnih okusa. Osim navedenih kvasaca, u vinu se tijekom starenja može pojaviti i rod *Zygosaccharomyces* zbog otpornosti na sulfate tijekom fermentacije te također može uzrokovati kvarenje vina.

6. UTJECAJ NE-*SACCHAROMYCES* KVASACA NA SENZORNA SVOJSTVA VINA

6.1. Starter kulture

Kako bi se postignula željena aroma vina, ukoliko se ne primjenjuje spontana fermentacija, važno je odabrati pravilnu kombinaciju starter kulture kvasaca za sekvencionalnu inokulaciju i koinokulaciju *S. cerevisiae* i ne-*Saccharomyces* kvasaca. Pojam sekvencionalna inokulacija uključuje primjenu *S. cerevisiae* nakon što su ne-S*accharomyces* kvasci imali određeni vremenski period za proces fermentacije, a koinokulacijom se smatra istovremena primjena visokih koncentracija ne-*Saccharomyces* kvasaca sa *S. cerevisiae* (Padilla i sur., 2016). Način primjene kvasaca ovisit će o vrsti i soju kvasaca koji se primjenjuju te željenim svojstvima vina koja je potrebno postići. Učinak starter kultura ovisi o mikrobiološkoj kontroli koja se postiže tijekom proizvodnje vina. Ne-*Saccharomyces* kvasci u starter kulturama koriste se kako bi se izrazila kompleksnost vina, stilske razlike i specifičnost određenih berbi. Koinokulacijom *Saccharomyces* s ne-*Saccharomyces* kvascima dolazi do ranijeg smanjenja vijablilnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca, stoga neki autori predlažu sekvencionalnu inokulaciju kao bolje rješenje za primjenu u fermentacijama s ne-*Saccharomyces* kvascima. U sekvencionalnim fermentacijama, rast ne-*Saccharomyces* kvascaca odvija se u periodu od sat vremena do 15 dana prije inokuliranja sa *S. cerevisiae* (Jolly i sur., 2014). Osim nedostatka kisika za rast ne-*Saccharomyces* kvasaca, njihova vijabilnost u koinokuliranim fermentacijama će se smanjiti i djelovanjem peptida ili tzv., „*killer*“ faktorima koje proizvodi *S. cervisiae* (Vilela, 2020). Kompetitivni odnos pri usvajanju hranjiva među kvascima u takvim miješanim kulturama izazovan je proces – smatra se da konzumacija dušika koja se odvija kod ne-*Saccharomyces* kvasca na početku fermentacije može spriječiti pravilni razvoj *S. cerevisiae* u kasnijim stadijima fermentacije (Lleixà,i sur., 2016).

Prilikom proizvodnje i primjene starter kultura, potrebno je obratiti pozornost na vino kakvo se želi proizvesti i željena organoleptička svojstva. Primjenom inokuliranih kultura želi se postići stabilnije i brže odvijanje fermentacije. González i sur. (2011) izdvojili su sljedeće kriterije koji bi se trebali uzeti u obzir prilikom odabira i proizvodnje starter kultura:

- Fermentativna sposobnost – sposobnost kvasaca da u što kraćem vremenu provedu proces fermentacije, konzumacija što većih količina šećera iz mošta i skraćivanje lag faze
- Otpornost na etanol i oksidacijski stres

- Potreba za dušikom – nedostatkom dušika kao hranjiva za kvasce, može doći do zaustavljanja fermentacije
- Otpornost na sumporenje vina – većina ne-*Saccharomyces* kvasaca odumire od većih količina sulfata u vinu; *S. cerevisiae* ima dobro razvijenu otpornost
- Otpornost na termalni stres – nakon uvođenja raznih sustava za kontrolu temperature moguće lakše kontrolirati; važna je i otpornost na niže temperature (<15°C) ukoliko se provodi hladna maceracija

Brojna istraživanja upućuju na poželjnu upotrebu miješanih starter kultura, a Viana i sur. (2008) koristili su 38 sojeva ne-*Saccharomyces* i 9 komercijalnih sojeva *Saccharomyces* kvasaca u vinifikacijama kojima su istraživali njihov učinak pri stvaranju estera. Korišteni ne-*Saccharomyces* kvasci pripadali su rodovima *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces*. Učinci ne-*Saccharomyces* kvasaca razlikovali su se ovisno o promatranom svojstvu. Rod *Hanseniaspora* istaknuo se kao najveći proizvođač estera octene kiseline, dok su sojevi roda *Torulaspora* bili najveći proizvođači etil-oktanoata. Kvasci roda *Hanseniaspora* također su pokazali najbolji učinak pri stvaranju 2-fenil etil acetata. S obzirom na to da *S. cerevisiae* nije u mogućnosti u potpunosti reducirati fruktozu, što ostavlja rezidualne šećere koji mogu biti neželjeno svojstvo u proizvodnji suhih vina, ne-*Saccharomyces* kvasci pokazali su se kao iznimno korisni zbog fruktofilnih svojstava, a *H. uvarum* se pritom najviše istaknuo. U sintetičkom mediju, gdje su se mjerile koncentracije estera, u najvećoj koncentraciji pojavio se etil acetat. Navedeni ester ističe se kao najznačajniji ester u vinu koji može doprinijeti voćnoj aromi vina, a u prekomjernim koncentracijama se ističe kao mana vina. Upravo koncentracije tog estera, ali i svih onih značajnih za senzoriku vina bile su najviše u fermentacijama koje su uključivale kvasce roda *Hanseniaspora*. Ovo istraživanje pokazalo je iznimno pozitivne osobine sojeva roda *Hanseniaspora* i njihov potencijal u korištenju pri proizvodnji vina. Sadoudi i sur. (2012) istraživali su utjecaj interakcija kvasaca u starter kulturama i njihov utjecaj na aromatski profil Sauvignona bijelog. Ne-*Saccharomyces* kvasci bili su izolirani iz vinarija s područja Burgundije, a korišteni kvasci bili su *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* i *C. zemplinina*. *Saccharomyces* kvasci su bili komercijalnog porijekla. Promatrajući čiste kulture, *S. cerevisiae* je u najkraćem periodu proces fermentacije priveo kraju (6 dana), dok je kod ne-*Saccharomyces* kvasaca taj proces trajao duže (15 dana), ali su oni uz glukozu djelomično ili u potpunosti razgradili i fruktozu. Međutim, u monokulturi *C. zemplinina* bilo je rezidualne glukoze te su vina bila slađa. U fermentacijama gdje su starter kulture bile kombinirane *S.*

cerevisiae sa svakim od ne-*Saccharomyces* kvasaca, fermentacije su u svima od njih bile provedene od 6 do 11 dana. Proces se najbrže odvio u uzorku u kojem su se nalazili *S. cerevisiae* i *C. zemplinina* – oba kvasca nalazila su se u moštu, a fermentacija je u potpunosti bila završena nakon 7 dana. Također, zbog fruktofilnog karaktera *C. zemplinina*, veće količine fruktoze su bile razgrađene u odnosu na monokulturnu fermentaciju koristeći *S. cerevisiae*. Nasuprot tome, miješanom koinokuliranom fermentacijom sa *M. pulcherrima* i S. cerevisiae, zbog antagonističkog odnosa kvasaca nakon 8 dana nije bilo vijabilnih stanica *M. pulcherrima*. Autori smatraju da je to toga došlo zbog ograničenih količina kisika prisutnih za vrijeme fermentacije, a budući da *S. cerevisiae* može rasti i u anaerobnim uvjetima, došlo je do odumiranja stanica *M. pulcherrima*. U ovom istraživanju mjerene su koncentracije 48 hlapljivih komponenti, a količine svih senzorički bitnih spojeva bile su veće u uzorcima gdje su bili koinokulirani ne-*Saccharomyces* kvasci sa *S. cerevisiae*. Vezano uz interakcije kvasaca, autori navode tri moguća odnosa s obzirom na proizvodnju biomase:

- Sinergistički odnos među, primjerice, *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae* rezultirao je višim koncentracijama aromatskih spojeva, nego zbroj aromatskih spojeva prisutan u svakom monokulturnom vinu odvojeno.
- Do pasivne interakcije došlo je između *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* gdje je koncentracija aromatskih spojeva bila slična kao u monokulturnim uzorcima.
- Negativna interakcija bila je zabilježena u slučaju koinokulacije *C. zemplinina* i *S. cerevisiae* gdje je bilo manje aromatskih spojeva nego u uzorcima kada su bili pojedinačno inokulirani što može biti indikator negativnog utjecaja jednog kvasca na drugi.

Moreira i sur. (2008) proučavali su interakciju i učinak kvasaca u pojedinačnim i miješanim starter kulturama. Njihova istraživanja su obuhvatila ne-*Saccharomyces* kvasce *H. uvarum* i *H. guillermondii* kao apikulatne kvasce koji su provodili pojedinačne, ali i miješane fermentacije sa *S. cerevisiae*. Apikulatni kvasci nisu bili u mogućnosti završiti proces fermentacije zbog svojih fruktofilnih osobina te su nakon 3-4 dana počeli gubiti svoju vijabilnost i odumirati, dok je u miješanim fermentacijama glukoza bila brže razgrađena zbog jačeg fermentativnog kapaciteta *S. cerevisiae*. Međutim, prilikom stvaranja estera, uzorci u kojima su se nalazile kulture roda *Hanseniaspora* bilježile su veće količine 2-feniletil acetata, izoamil acetata i etil-heksanoata, dok su vina proizvedena od čiste kulture *S. cerevisiae* imala znatno manje količine estera. Navedeni esteri značajni su jer vinu daju voćne arome banane i jabuke. Autori izdvajaju taj pozitivni utjecaj apikulatnih kvasaca na stvaranje estera koji ih čini vrlo korisnim u koinokulaciji sa *S. cerevisiae* u proizvodnji vina karakterističnih aroma.

Navode i da njihovim djelovanjem ne dolazi do stvaranja velike količine štetnih sumpornih spojeva. Međutim, utvrđeno je da je potrebno provođenje većeg broja vinifikacija u svrhu dodatnih istraživanja kao i dodatnih senzoričkih procjena prilikom upotrebe različitih kombinacija ovih starter kultura kako bi se u potpunosti iskoristio njihov potencijal.

Medina i sur. (2013) također su proučavali utjecaj *Hanseniaspora* kvasaca, ali u sekvencionalnoj inokulaciji sa *S. cerevisiae* u proizvodnji vina Chardonnay. Uspoređivale su se tri različite fermentacije: konvencionalna inokulacija *S. cerevisiae,* sekvencionalna inokulacija *H. vinae* sa *S. cerevisiae* i spontana fermentacija sa *S. cerevisiae*. Uzorak u kojem se odvijala fermentacija sekvencionalne inokulacije imao je značajno veće koncentracije estera octene kiseline i nekih etilnih estera te smanjenje koncentracije viših alkohola. Proizvedena vina degustirali su profesionalni vinari. Rezultati za vina proizvedena miješanom fermentacijom imala su snažnije okuse i kompleksnost te su značajnije punijeg okusa u odnosu na ona u kojima se nalazio samo *S. cerevisiae*. U odnosu na vina u kojima se nalazio samo *S. cerevisiae,* vina inokulirana *H. vinae* imala su značajnije izraženiju aromu banane, kruške, jabuke i citrusa, a manje su bile prisutne zemljane i vlažne arome. Zbog kompleksnosti i punoće okusa ovih vina, vinari su ga istaknuli kao najboljeg od degustiranih uzoraka.

Osim odnosa među kvascima, važno je promatrati vrijeme potrebno prilikom sekvencionalnog inokuliranja u odnosu na dostupnost hranjiva i količine šećera u moštu. Ti faktori značajni su za kinetiku fermentacije i njezino daljnje odvijanje. Lleixà,i sur. (2016) testirali su uspješnost fermentacije prilikom sekvencionalne inokulacije sa *S. cerevisiae* u različitim uvjetima dostupnosti dušika u moštu, gdje su se nalazili ne-*Saccharomyces* kvasci. U optimalnim uvjetima koncentracija dušika, fermentacija nakon sekvencionalne inokulacije (24-48h) trajala je duže, nego kada je *S. cerevisiae* dodan 5 dana od početka fermentacije. Autori to pripisuju činjenici da je nakon 5 dana života ne-*Saccharomyces* kvasaca padao broj živih stanica, a time je i kompetitivnost među vrstama bila manja. Pritom, smatra se da se gubitkom vijabilnosti stanica i autolizom ne-*Saccharomyces* kvasaca povećala koncentracija dostupnog dušika za *S. cerevisiae*. Sekvencionalnom inokulacijom u uvjetima smanjene dostupnosti dušika većina procesa fermentacije bila je zaustavljena. Međutim, koinokulacijom triju vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca i *S. cerevisiae*, proces fermentacija uspješno je završen. Zaključuju da je *S. cerevisiae* potrebno dodati unutar 24 sata od početka fermentacije kako ne-*Saccharomyces* kvasci ne bi smanjili količinu dostupnog dušika, te na taj način utjecali na rast i razmnožavanje *S. cerevisiae*.

6.2. Esteri

Najznačajniji aromatski spojevi po kojima se vina razlikuju međusobno i imaju karakteristične okuse su esteri, terpeni i tioli. Grba i sur. (2010) navode da se aromatske spojeve u vinu može podijeliti u tri glavne skupine:

- Aromatski spojevi porijeklom iz grožđa – terpeni, norisoprenoidi i pirazini
- Aromatski spojevi nastali tijekom alkoholne fermentacije – alkoholi, esteri, kiseline, aldehidi i ketoni
- Aromatski spojevi nastali tijekom dozrijevanja i dozrijevanja vina

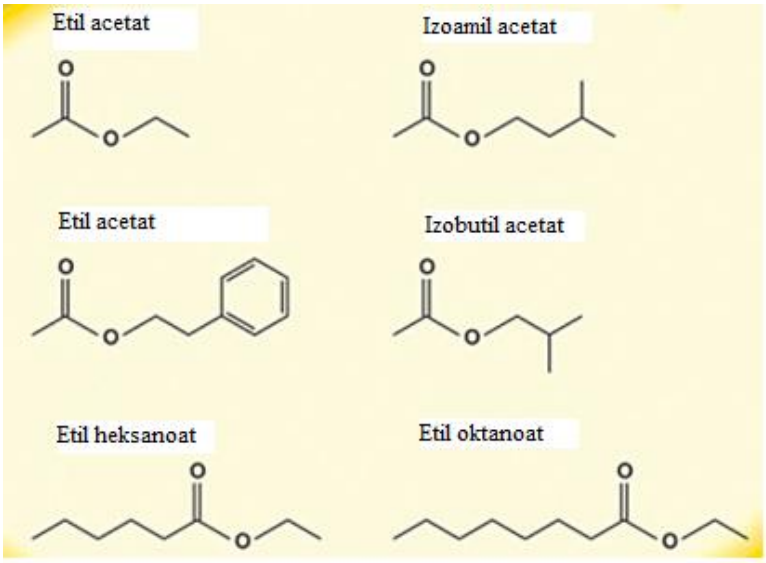
Esteri su spojevi koji imaju najveći utjecaj na konačni okus vina, a postoje dvije grupe – prvi nastaju enzimatskom aktivnošću kvasaca, a drugi starenjem vina (Mina i sur., 2017). U vinu je prisutno oko 160 različitih vrsta estera, a najznačajniji su alifatski esteri, nastali sintezom karboksilne skupine iz kiseline i hidroksilne skupine alkohola (Slika 5.) Promatrajući alifatske estere, ističu su oni koji nastaju reakcijom masnih kiselina i etanola te reakcijom octene kiseline i etanola (Grba, 2010). Nastanak estera odvija se tijekom alkoholnog vrenja kada ne-*Saccharomyces* kvasci otpuštaju β-glukozidaze koje hidroliziraju glikozidne veze nehlapljivih glikozida bez mirisa u obliku monoterpena otpuštajući mirisne sojeve u vino (Vilela, 2020). Kao esteri koji imaju najznačajniji utjecaj na okus i aromu vina istaknuti su izoamil-acetat koji izražava aromu banane (Tablica 2.), etil acetat koji naglašava aromu ljepila, izobutil acetat koji se ističe aromama slatkog voća, etil heksanoat čija glavna karakteristika je kiselkasti miris jabuke i 2-fenil acetat u kojem se ističu arome meda i ruža (Vilela, 2020).

Tablica 2. Prikaz najčešćih estera u vinu i njihovih karakterističnih aroma

Ester	**Karakteristična aroma**
Izoamil-acetat	Banana
Etil acetat	Ljepilo
Izobutil-acetat	Slatko voće
Etil heksanoat	Kiselkasti okus jabuke
2-fenil acetat	Med i ruža
Geranil acetat	Cvjetna, voćna aroma

U istraživanju Viana i sur. (2008) ispitivala se koncentracija različitih estera nastalih fermentacijom. Njihova opažanja su obuhvatila 38 različitih vrsta sojeva ne-*Saccharomyces* i 9 sojeva *Saccharomyces* kvasaca u tekućem mikrobiološkom mediju, koji je sadržavao mošt.

Rezultati su pokazali da je rod *Hanseniaspora* bio najveći proizvođač estera octene kiseline, a najznačajniji je 2-feniletil acetat. Rod *Pichia* pokazao je slične količine estera octene kiseline kao i rod *Hanseniaspora* te je bio drugi najveći proizvođač izbobutil acetata i izoamil acetata. Između rodova *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces* nije bilo značajne razlike u stvaranju estera octene kiseline, ali se rod *Torulaspora* bio istaknuo u proizvodnji etil-oktanoata. Benito i sur. (2019) povezali su na koji način varijacije u kemijskom sastavu vina inokuliranim ne-*Saccharomyces* kvascima, može imati utjecaj i na aromu vina. Smatraju da je bolje upotrebljavati *T. delbrueckii* ili *L. thermotolerans* prilikom smanjivanja kiselosti vina u hladnijim područjima, gdje je to češća pojava, nego kemijske spojeve poput kalcijevog karbonata ili kalijevog karbonata koji se tradicionalno koriste u vinarstvu za smanjivanje kiselosti vina. Ne-*Saccharomyces* kvasci pokazali su se vrlo učinkoviti u smanjivanju kiselosti – njihovom primjenom došlo je do smanjenja pH za 0,5. Rojas i sur. (2001) također su proučavali učinkovitost ne-*Saccharomyces* kvasaca, ali u stvaranju estera octene kiseline. U tu skupinu spadaju etil acetat, geranil acetat, izoamil acetat i 2-feniletil acetat. Za istraživanje je bilo odabrano 11 sojeva ne-*Saccharomyces* i 2 soja *Saccharomyces* kvasaca. Rezultati su pokazali da su ne-*Saccharomyces* kvasci stvarali estere koji posjeduju voćne arome, a kao iznimno korisne izdvojili su *P. anomala* i *H. guillermondii*, posebice u stvaranju 2-feniletil acetata i izoamil acetata, dok u uzorku gdje se nalazio *S. cerevisiae* nije došlo do stvaranja nijednog promatranog estera. Međutim, do stvaranja estera u uzorcima ne-*Saccharomyces* kvasaca došlo je samo u aerobnim uvjetima, dok je s manjom dostupnošću kisika padala i koncentracija proizvedenih estera. U strogo anaerobnim uvjetima, ne-*Saccharomyces* kvasci nisu stvarali estere octene kiseline. Autori su istaknuli pozitivne karakteristike *P. anomala* i *H. guillermondii* te mogućnost upotrebe tih kvasaca u miješanim starter kulturama.



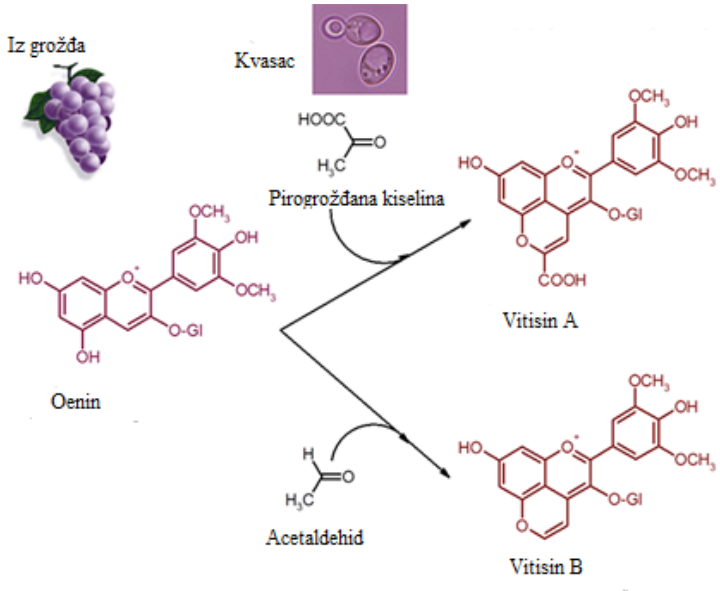
Slika 5. Kemijske strukture najznačajnijih estera u vinu (Vilela, 2020)

6.3. Fenolni spojevi

Osim estera, fenolni spojevi su također vrlo važni za senzorna svojstva vina, a flavonoidi su skupina fenolnih spojeva koja se u vinu i moštu nalazi u najvećim koncentracijama. Flavonoidna skupina spojeva dijeli se na flavanole, flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijani (Božič i sur., 2019). Antocijani su skupina organskih spojeva koja voću, povrću i drugim biljkama daje karakterističnu plavu, crvenu ili ljubičastu boju. Kod vinove loze, ti pigmenti se kod većine sorata nalaze u kožici bobica. Koncentracija antocijana u vinu ovisi o uvjetima tijekom fermentacije, poput dužine maceracije i temperature tijekom fermentacije. Također sorta grožđa, vinarske tehnike tijekom proizvodnje te starenje vina, mogu dovesti do promjene koncentracije antocijana (Božič i sur., 2019).

Medina i sur. (2016) proveli su istraživanje o utjecaju ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasaca na povećanje koncentracije i akumulaciju acetaldehida te njegov utjecaj na stvaranje stabilnijih derivata pigmenta antocijana. Koristili su 6 sojeva rodova *Hanseniaspora* i *Metschnikowia* te *S. cerevisiae* kao čiste i mješovite starter kulture, a kao medij za proces fermentacije služio je umjetni sok crvenog grožđa koji je sadržavao polifenolne ekstrakte sorte Tannat. Rezultati su pokazali da je koinokulacijom *S. cerevisiae* s ne-*Saccharomyces* kvascima došlo do značajnijeg stvaranja vitisina B u odnosu na fermentacije u kojima su bile primijenjene čiste starter kulture. Vitisini su derivati pigmenata koji nastaju tijekom fermentacije vina kondenzacijom spojeva prisutnih u moštu kao što su antocijani i metabolita poput acetaldehida i pirogrožđana kiselina (Slika 5.), a u usporedbi s antocijanima otporniji su na oksidacijski stres i manje su osjetljivi na gubitak boje djelovanjem sulfata (Božič i sur.,

2019). Vitisini nastaju reakcijom antocijana i metabolita koji nastaju tijekom fermentacije, poput pirogrožđane kiseline i acetaldehida, a smatra se da mehanizam nastanka vitisina A počinje cikloadicijom metabolita na poziciju ugljika i hidroksilnu skupinu antocijana, a prati ga dehidracija i daljnja oksidacija. Vitisin A u vinu se pojavljuje u najvećoj koncentraciji, a nastaje iz oenina. Vitisin B strukturom se razlikuje od vitisina A nedostatkom karboksilne skupine na C10 poziciji D prstena. Molekula vitisina B formira se cikloadicijom acetaldehida na antocijan (Marquez i sur., 2013).

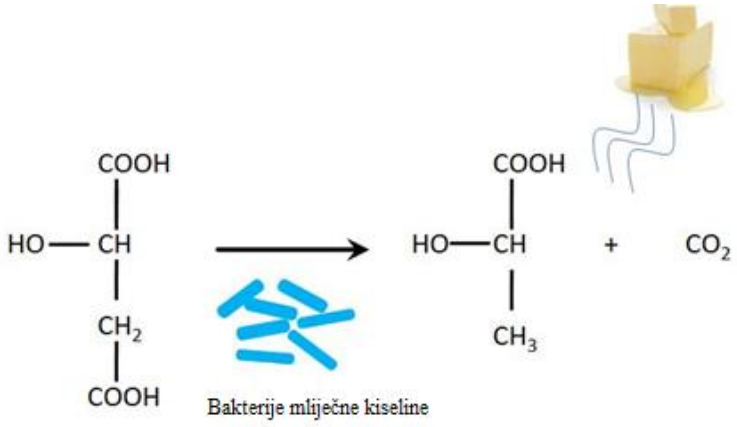


Slika 6. Formacija molekula vitisin A i vitisin B iz oenina
(Izvor: Morata i sur., 2016)

Loira i sur. (2015) također su promatrali utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na poboljšanje senzornih svojstava crnih vina. Korišteni su kvasci *Schizosaccharomyces pombe* i *Torulaspora delbrueckii* koji su bili sekvencionalno inokulirani i koinokulirani sa *S. cerevisiae*. Zabilježeno je da je upotrebom *S. pombe* sinteza vitisina u sekvencionalnim fermentacijama bila viša, dok je *T. delbrueckii* sintetizirala veće koncentracije istog spoja u miješanim fermentacijama. Smatraju da upotrebom ne-*Saccharomyces* kvasaca može doći do poboljšanja senzoričkih svojstava i boje vina, a time i do stabilizacije pigmenata u vinu te boljeg izražavanja karakterističnosti vinogradarskih područja na kojima je grožđe uzgajano (Božič i sur., 2019). Prilikom fermentacije, ne-*Saccharomyces* kvasci imaju bolji učinak u aerobnim uvjetima, međutim to dovodi do oksidacije vina i gubljenja boje (Contreras i sur., 2015) na što je posebno važno obratiti pozornost prilikom proizvodnje crnih vina da

pozitivnim djelovanjem na jedno svojstvo, odnosno djelovanje ne-Saccharomyces kvasaca na stvaranje aromatskih spojeva ne dolazi do pogoršavanja drugog, tj. oksidacije i blijeđe boje vina.

Benito i sur. (2015) su svoja istraživanja usmjerili na nekoliko vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca i ulozi koju oni mogu imati u procesu malolaktične fermentacije. Malolaktična fermentacija je proces pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu uz pomoć bakterija mliječne kiseline, a okus vina kod kojih je provedena mekši je, zaobljeniji, a aroma kompleksnija (Slika 7.) Budući da u toplijim vinogradarskim regijama, kao što je jug Španjolske, može doći do devijacija tijekom malolaktične fermentacije zbog visokog pH mošta, smatralo se da se sekvencionalnom primjenom *L. thermotolerans* i *S. pombe* može postići stabilnost vina. U tom postupku, *S. pombe* bio je introduciran kao konzument jabučne kiseline, a *L. thermotolerans* bio je proizvođač mliječne kiseline čime se postigla mikrobiološka stabilizacija. Prilikom proizvodnje vina u kojima se nalazilo više vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca, boja je bila stabilnija nego li u uzorcima gdje se odvila malolaktična fermentacija. Autori zaključuju da su piruvati proizvedeni u vinima s više ne-*Saccharomyces* kvasaca jedan od čimbenika koji doprinose stvaranju iznimno stabilnih spojeva važnih za boju vina.



Slika 7. Malolaktična fermentacija
(izvor: https://www.smartwinemaking.com/post/malolactic_fermentation)

7. DALJNJI POTENCIJAL NE-*SACCHAROMYCES* KVASACA

Kako bi se olakšala primjena tehnika identifikacije ne-*Saccharomyces* kvasaca u samoj proizvodnji, smatra se kako bi bilo vrlo korisno razviti mikrobiološke i molekularne analize kojima bi se u stvarnom vremenu mogla promatrati mikrobna populacija u vinogradu i podrumu bez potrebe za provođenjem analiza u laboratoriju (Bisson i sur., 2009). Budući da je brojnost i raznolikost populacija mikroorganizama na grožđu, u vinogradu i u podrumu iznimno velika, postoji širok prostor za daljnja istraživanja njihovog utjecaja na konačni proizvod. Smatra se da je jedna od glavnih prednosti korištenja ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina isticanje obilježja vinogradarske regije, a time i razlikovanje vina međusobno (Božič i sur., 2019). Jolly i sur. (2006) također ističu da je potrebno istražiti selekciju ne-*Saccharomyces* kvasaca koja bi uključivala specifične kombinacije miješanih starter kultura ovisno o sorti grožđa i vremenu primjene specifičnih kultura prilikom inokulacije. Smatra se da bi se time moglo doći do poboljšanja aroma i stilova vina. Autori također ističu da bi se time mogla proizvesti vina s određenim karakteristikama vinogradarskih regija i izvornosti.

Osim korištenja u starter kulturama, potrebno je proučiti interakcija ne-*Saccharomyces* kvasaca i bakterija u vinu, poput onih koje sudjeluju u malolaktičnoj fermentaciji vina. Jolly i sur. (2014) smatraju da se boljim razumijevanjem interakcija kvasaca i bakterijama mliječne kiseline mogu proizvesti vina s istaknutijim obilježjima geografskih područja. Međutim, i dalje se kao najvažniji ciljevi navode poboljšanje proizvodnje poželjnih hlapljivih estera, terpenoida i glicerola kako bi se unaprijedio okus i druga senzorička obilježja vina na koja se može utjecati ne-*Saccharomyces* kvascima (Pretorius, 2000). Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju alternativu genetskom inženjeringu usmjerenom ka *S. cerevisiae*, a kao cilj se navodi dobivanje željenih svojstava, ali različite grupe autora navode da, ukoliko se dogodi da genetski modificirani organizmi postanu dozvoljeni i prihvaćeni, genetske modifikacije odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu još i više poboljšati njihov utjecaj i ulogu u proizvodnji vina (Jolly i sur., 2014). Osim pravilnog odabira sojeva kvasaca u miješanim kulturama ne-*Saccharomyces* kvasca sa *S. cerevisiae*, pojavljuje se i potencijal za istraživanjem korištenja više različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca s različitim vremenom inokulacije u jednom procesu fermentacije. Smatra se da bi se više kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca trebalo testirati na industrijskoj razini kako bi se utjecaj mogao bolje

procijeniti jer smatra da bi stvaranje različitih metabolita moglo biti uvjetovano volumenom u procesa fermentacije kao i uvjetima dostupnosti kisika (Padilla i sur., 2016).

8. ZAKLJUČAK

Ne-*Saccharomyces* kvasci predstavljaju potencijalne promjene u daljnjem napretku razvijanja procesa vinifikacije i poboljšanja organoleptičkih svojstava vina. Budući da su i dalje česte taksonomske promjene prilikom identifikacije kvasaca, potrebno je postići uniformnost u imenima. Time bi se vinarima i vinogradarima još više približila mogućnost razumijevanja i pozitivnih utjecaja koje bi upotreba tih kvasaca imala na njihov konačni proizvod. Također je potrebno provesti brojna ispitivanja kako bi se utvrdila vrsta i količina ne-*Saccharomyces* kvasaca za potencijalne startere vina. Upravo tim ispitivanjima i utvrđivanjima najpogodnije koinokulacije miješanim kulturama prilikom procesa fermentacije vina, može predstaviti velik napredak u kvaliteti, aromatskom profilu i senzornim obilježjima vina. Osim toga, ta vina će zbog djelovanja kvasaca biti više autentična i bolje predstavljati geografske posebnosti područja gdje su proizvedena. Unatoč postojanju negativnih osobina, poput nemogućnosti provođenja potpunog procesa fermentacije i mogućem kvarenju vina djelovanjem ovih kvasaca, učestalo je mišljenje da se sekvencionalnom koinokulacijom taj učinak može gotovo u potpunosti izbjeći. Kao jedno od najznačajnijih područja interesa vezanih uz ovu tematiku, ističe se proučavanje interakcije kvasac-kvasac tijekom fermentacija i utjecaj tih interakcija na mošt s obzirom na sortu vina od koje se proizvodi vino. Uklanjanjem negativnih stereotipa o ne-*Saccharomyces* kvascima i njihovim učestalijim korištenjem, mogućnosti za poboljšanje i unapređenje okusa vina iznimno su brojne. Znanstvenici, enolozi, vinari i vinogradari će svakako otkriti potencijal koji ovi kvasci posjeduju.

9. POPIS LITERATURE

1. Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., Schacherer, J. (2014). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast Torulaspora delbrueckii. PLoS ONE, 9(4), e94246–.
2. Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N. et al. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. Eur Food Res Technol 231, 215–224 (2010).
3. Aranda, A., Orozco, H., Picazo, C. and Matallana, E. (2019). Yeast Life Span and its Impact on Food Fermentations. *Fermentation*, 5(2), p.37.
4. Benito, Á., Calderón, F. and Benito, S. (2019). The Influence of Non-Saccharomyces Species on Wine Fermentation Quality Parameters. Fermentation, 5(3), p.54.
5. Bisson, L.F. and Joseph, C.M.L. (2009). Yeasts. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, pp.47–60.
6. Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F. and Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181, pp.75–83.
7. Ciani M., Ferraro L., (1998). Combined use of immobilized Candida stellata cells and Saccharomyces cerevisiae to improve the quality of wines. Dipartimento di Biologia Vegetale sez. Microbiologia Applicata, Universita di Perugia. Perugia, Italy. Journal of Applied Microbiology 85, 247-254
8. Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int J Food Microbiol. 99(3):237-243.
9. Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. Food Microbiology, 28(5), pp.873–882.
10. Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtin, C. and Varela, C. (2015). The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, 205, pp.7–15.

11. Du Toit, M. & Pretorius, I. S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine : using weapons for nature's own arsenal. South African Journal of Enology and Viticulture, 21(1):74-96
12. García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. and Arroyo, T. (2018). Advances in the Study of Candida stellata. Fermentation, 4(3), p.74.
13. Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. and Ciani, M. (2013). Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. Food Microbiology, 33(2), pp.271–281.
14. González, R., Muñoz, R. and Carrascosa, A.V. (2011). Production of Wine Starter Cultures. *Molecular Wine Microbiology*, pp.279–302.
15. Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Mrvčić, J., Marić, V., Orlić, S., Jeromel, A., Zgaga, Z., Svetec, I. K., Krpan, M. (2010). Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji. Zagreb. Plejada.
16. Herraiz, G., Reglero, M., Herraiz, P., Alvarez, M., Cabezudo, M. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulphur dioxide. Am. J. Enol. Vitic. 41, 313–318
17. Hierro, N., González, Ã., Mas, A. and Guillamón, J.M. (2006). Diversity and evolution of non-Saccharomycesyeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research*, 6(1), pp.102–111.
18. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=1247836
19. James, S. A., Collins, M. D., & Roberts, I. N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera Zygosaccharomyces and Torulaspora. International journal of systematic bacteriology, 46(1), 189–194.
20. Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. (2006). The role and use of non Saccharomyces yeasts in wine production. South Afr. J. Enol. Vitic. 27, 15–39.
21. Jolly, N.P., Varela, C. and Pretorius, I.S. (2014). Not your ordinary yeast: non-Saccharomycesyeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Research, 14(2), pp.215–237.
22. Kaygusuz, I., Mulazimoglu, L., Cerikcioglu, N., Toprak, A., Oktay, A. and Korten, V. (2003). An unusual native tricuspid valve endocarditis caused by Candida colliculosa. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(4), pp.319–322.

23. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 1, 5th edn. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
24. le Roux, G., Eschenbruch, R. and de Buidn, S. I. (1973). The microbiology of South African wine making. Part VIII. The microflora of healthy and Botrytis cinerea infected grapes. Phytophylactica, 5(2), 51-54.
25. Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A. and Portillo, M. del C. (2016). Saccharomyces and non-Saccharomyces Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions. *Frontiers in Microbiology*, [online] 7. Dostupno na: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01959/full.
26. Loira, I., Morata, A., Bañuelos María, A. and Suárez-Lepe José, A. (2020). Isolation, Selection, and Identification Techniques for Non-Saccharomyces Yeasts of Oenological Interest. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, pp.467–508.
27. Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M.J., González, C., Calderón, F. and Suárez-Lepe, J.A. (2015). Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Research International*, 76, pp.325–333.
28. Marquez, A., Serratosa, M.P. and Merida, J. (2013). Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking. *Journal of Chemistry*, 2013, pp.1–15.
29. Martín, Valentina & Valera, Maria Jose & Medina Rland, Karina & Boido, Eduardo & Carrau, Francisco. (2018). Oenological Impact of the Hanseniaspora/Kloeckera Yeast Genus on Wines—A Review. Fermentation. 4.,76.
30. Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Dellacassa, E. and Carrau, F. (2016). Non-Saccharomyces and Saccharomyces strains co-fermentation increases acetaldehyde accumulation: effect on anthocyanin-derived pigments in Tannat red wines. *Yeast*, 33(7), pp.339–343.
31. Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M.E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E. and Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with Hanseniaspora vineae. *Food Chemistry*, 141(3), pp.2513–2521.

32. Mina, M. and Tsaltas, D. (2017). Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour. *Yeast - Industrial Applications*.
33. Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J.M., Bañuelos, M.A., Suárez-Lepe, J.A. (2019). Applications of Metschnikowia pulcherrima in Wine Biotechnology. Fermentation. 5(3):63.
34. Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M.A., González, C., Suárez Lepe, J.A. (2018). Lachancea thermotolerans Applications in Wine Technology. Fermentation 4, 53.
35. Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. and Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of Hanseniaspora uvarum and Hanseniaspora guilliermondii grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, [online] 124(3), pp.231–238. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160508001499 [Accessed 12 Jun. 2020].
36. Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., López, R. and Santamaría, P. (2010). Presence of non-Saccharomyces yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*, 27(8), pp.1023–1027.
37. Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., & Fukunaga, M. (1997). Reexamination of yeast strains classified as Torulaspora delbrueckii (Lindner). International journal of systematic bacteriology, 47(4), 1102–1106.
38. Padilla, B., Gil, J.V. and Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, [online] 7. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4814449/
39. Rojas, V., Gil, J.V., Piñaga, F. and Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), pp.283–289.
40. Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. Food microbiology, 32(2), 243–253.

41. Šafar, O. (1966). Primjena čistih kultura kvasaca u vinarstvu. Agronomski glasnik, 16(4-5), str. 325-330. Preuzeto s: https://hrcak.srce.hr/166954 (Datum pristupa: 18.07.2021.)
42. Topić Božič, J., Korte, D., Mozetič Vodopivec, B. and Butinar, L. (2019). Yeasts and wine colour. *Croatian journal of food science and technology*, 11(2), pp.291–302.
43. Van Der Walt, J.P. and Van Kerken, A.E. (1958). The wine yeasts of the cape. Antonie van Leeuwenhoek, 24(1), pp.239–252.
44. Vilela, A. (2020). Modulating Wine Pleasantness Throughout Wine-Yeast Co-Inoculation or Sequential Inoculation. *Fermentation*, 6(1), p.22.
45. Zhao, Y., Sun, Q., Zhu, S., Du, F., Mao, R., Liu, L., Tian, B. and Zhu, Y. (2021). Biodiversity of non-Saccharomyces yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Shangri-La wine region, China. Scientific Reports, 11(1).

Životopis

Ana Benko rođena je u Zagrebu, 29. 10. 1996. Školovanje je i započela u Zagrebu, pohađajući Osnovnu školu Dragutina Kušlana, a 2011. upisuje XVI. Gimnaziju gdje je maturirala 2015. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Agroekologije na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a završni rad piše na temu „Škrlet – autohtona vinska sorta i najpopularnije vino Moslavine.“ Nakon završetka preddiplomskog studija upisuje diplomski studij na Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu. Služi se engleskim jezikom C2 stupnja i talijanskim B1 stupnja.