# Usporedba rasta i metaboličkih karakteristika vinskih izolata kvasca iz roda Brettanomyces

**Šelendić, Ana Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:204:853448

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

# USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES*

DIPLOMSKI RAD

Ana Marija Šelendić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

# USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES*

DIPLOMSKI RAD

Ana Marija Šelendić

Mentor: doc.dr.sc. Leo Gracin

Neposredni voditelj: dr.sc. Stela Križanović

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Marija Šelendić**, JMBAG 0178091790, rođen/a dana 04.06.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom: **USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES***

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 studenta/ice **Ana Marija Šelendić**, JMBAG 0178091790, naslova
**USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. doc.dr.sc. Leo Gracin mentor _____

   dr.sc. Stela Križanović neposredni voditelj _____

2. prof.dr.sc. Sanja Sikora član _____

3. prof.dr.sc. Ana Jeromel član _____

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

# IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Ana Marija Šelendić**, JMBAG 0178091790, naslova
**USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. doc.dr.sc. Leo Gracin mentor _____

   dr.sc. Stela Križanović neposredni voditelj _____

2. prof.dr.sc. Sanja Sikora član _____

3. prof.dr.sc. Ana Majdak član _____

# Zahvala

Ovime zahvaljujem doc.dr.sc. Gracinu i dr.sc. Križanović sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, koji su mi pružili mogućnost izrade diplomskog rada na drugom fakultetu i koji su mi posvetili svoje vrijeme da steknem nova saznanja i praktično iskustvo rada u laboratoriju. Veliko vam hvala.

Zahvaljujem i prof.dr.sc. Sikori, koja je podržala izradu rada, te prof.dr.sc. Jeromel na prihvaćanju poziva u komisiju.

Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji koja mi je bila oslonac kroz sve godine školovanja.

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta "Novi enološki postupci kao alternativa sumporovom dioksidu u proizvodnji visokokvalitetnih vina" (IP-09-2014-3796) financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Lea Gracina te uz pomoć dr.sc. Stele Križanović.

# Sadržaj


1. Uvod ..... 1

2. Razrada literature ..... 2

2.1. Taksonomija i osnovne karakteristike roda *Brettanomyces* ..... 2

2.2. Čimbenici koji utječu na rast kvasca iz roda *Brettanomyces* ..... 3

2.2.1. Izvor ugljika ..... 3
2.2.2. Izvor dušika ..... 3
2.2.3. Kisik ..... 4
2.2.4. Temperatura ..... 4
2.2.5. pH vrijednost ..... 4

2.3. Produkti metabolizma roda *Brettanomyces* ..... 5

2.3.1. Etanol ..... 5
2.3.2. Hlapivi fenoli ..... 5
2.3.3. Hlapivi esteri ..... 6
2.3.4. Hlapive masne kiseline ..... 7
2.3.5. Octena kiselina ..... 7
2.3.6. Tetrahidropiridini ..... 7
2.3.7. Spojevi koji utječu na smanjenje boje crnih vina ..... 7

2.4. Mjesta izolacije kvasaca iz roda *Brettanomyces* ..... 8

2.5. Prisutnost kvasca iz roda *Brettanomyces* u proizvodnji vina ..... 8

2.5.1. Maceracija ..... 8
2.5.2. Alkoholna fermentacija ..... 8
2.5.3. Jabučno-mliječna fermentacija ..... 9
2.5.4. Dozrijevanje vina ..... 9
2.5.5. Čuvanje vina ..... 10

2.6. Metode za utvrđivanje prisutnosti kvasca iz roda *Brettanomyces* ..... 10

2.6.1. Hranjive podloge ..... 10
2.6.2. PCR metoda ..... 11

2.7. Metode za kontrolu rasta kvasca iz roda *Brettanomyces* ..... 12

2.7.1. Kemijske metode ..... 12

2.7.2. Fizikalne metode ..... 13
2.7.3. Biološke metode ..... 13

2.8. Metode za analizu pojedinih sastojaka vina ..... 14

2.8.1. Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom ..... 14
2.8.2. Tekućinska kromatografija ..... 14
2.8.3. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije ..... 14

3. Materijali i metode ..... 16

3.1. Materijali ..... 16

3.1.1. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* ..... 16
3.1.2. Kemikalije ..... 16
3.1.3. Hranjive podloge i otopine ..... 17
3.1.4. Instrumenti ..... 20
3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor ..... 20

3.2. Metode rada ..... 21

3.2.1. Izolacija i čuvanje vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* ..... 21
3.2.2. Priprema starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* za rast u YPD podlozi s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline . 21
3.2.3. Priprema starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* za rast u sintetskom modelnom vinu (SWM) s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline ..... 21
3.2.4. Inokulacija starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* .... 22
3.2.5. Praćenje rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* ..... 22
3.2.6. Priprema uzoraka za FTIR, GC/MS i HPLC analizu ..... 23
3.2.7. GC/MS analiza hlapivih fenola ..... 24
3.2.8. HPLC analiza hidroksicimetnih kiselina ..... 25
3.2.9. FTIR metoda za određivanje octene kiseline ..... 25

4. Rezultati i rasprava ..... 26

4.1. Rast vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* u YPD podlozi s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom te u SMW s kumarinskom i ferulinskom kiselinom ..... 26

4.2. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola ..... 28

4.2.1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola u YPD podlozi s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom ..... 28
4.2.2. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola u SWM s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom ..... 30

4.3. Sadržaj octene kiseline u YPD podlozi s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom te u SWM s *p*-kumarinskom i ferulinskom kiselinom ..... 33

5. Zaključak .....35

6. Literatura .....37

Životopis .....41

# Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ana Marija Šelendić**, naslova

**USPOREDBA RASTA I METABOLIČKIH KARAKTERISTIKA VINSKIH IZOLATA KVASCA IZ RODA BRETTANOMYCES**

Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* se smatra glavnim kontaminantom crnih vina. Ovaj kvasac djeluje negativno na senzorske karakteristike vina (miris, okus i boju) zbog proizvodnje hlapivih fenola, smanjenja boje crnih vina te povećanje hlapive kiselosti vina. Budući da vino kontaminirano kvascem *B. bruxellensis* nije poželjno za konzumaciju ovaj kvasac uzrokuje značajne ekonomske gubitke u svim vinarskim regijama svijeta. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike u rastu i metaboličkoj aktivnosti (proizvodnja hlapivih fenola i octene kiseline) vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* prisutnim u hrvatskim vinarskim regijama te usporediti s referetnim izolatom kvasca *B. bruxellensis* izoliranim iz vina u Francuskoj. Uzgoj vinskih izolata je proveden u semi-anaerobnim uvjetima u dvije podloge, općoj podlozi za rast kvasaca (YPD) i sintetskom modelnom vinu (SWM). Uočeno je kako rast izolata kao i metabolička aktivnost ovise o podlozi u kojoj se uzgajaju, ali i o samom izolatu. Brži rast i potrošnja hidroksicimetnih kiselina te veća proizvodnja hlapivih fenola i octene kiseline uočena je tijekom uzgoja izolata kvasca *B. bruxellensis* u YPD podlozi u odnosu na SWM.

**Ključne riječi**: kvasac uzročnik kvarenja, *Brettanomyces bruxellensis,* hlapivi fenoli, hidroksicimetne kiseline, octena kiselina

# Summary

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

**COMPARISON OF GROWTH AND METABOLIC CHARACTERISTICS OF *BRETTANOMYCES* YEAST WINE ISOLATES**

*Brettanomyces bruxellensis* yeast is considered as the main spoilage yeast of red wines. This yeast has negative impact on sensory wine characteristics (odor, flavor and color) because it produces volatile phenols and causes loss of colour in red wines and increase of volatile acidity in wine. It causes significant financial losses in all geographic wine regions in the world because wine contaminated by this yeast is not desirable for consumption. The aim of this study was to investigate diversity of growth and metabolic characteristics (production of volatile phenols and acetic acid) of *B. bruxellensis* wine isolates collected from Croatian wine regions and to compare them to the referent isolate collected from wine in France. Growth of the wine isolates was evaluated in two media, general medium for yeast growth (YPD) and synthetic wine medium (SWM), under semi-anaerobic conditions. It was determined that growth and metabolic activity of wine isolates depend on growth medium and also on the wine isolate itself. Faster growth and consumption of hydroxycinnamic acids and also higher production of volatile phenols and acetic acid were determined when *B. bruxellensis* wine isolates were grown in YPD medium than in SWM.

**Key words:** spoilage yeast, *Brettanomyces bruxellensis*, volative phenols, hydoxycinamic acids, acetic acid

# 1. Uvod

U proizvodnji vina mogu biti prisutni različiti rodovi kvasca koji mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na sastav i organoleptička svojstva vina. Kvasac iz roda *Brettanomyces* smatra se glavnim uzročnikom kvarenja crnih vina jer negativno utječe na senzorske karakteristike i kvalitetu vina. Iako je vino nepoželjni medij za rast većine mikroorganizama zbog visokog udjela alkohola, niske pH vrijednosti, prisutnosti sumporovog dioksida te ograničavajuće koncentracije hranjivih tvari i kisika kvasac *Brettanomyces bruxellensis* je prilagođen ovim uvjetima. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* može kontaminirati vino u različitim fazama proizvodnje, ali najčeće tijekom spore alkoholne fermentacije, jabučno-mliječne fermentacije i starenja/odležavanja vina u bačvama. Također kvasac *B. bruxellensis* može rasti u buteljiranom vinu. Ovaj kvasac proizvodi hlapive fenole, spojeve koji negativno utječu na aromu crnih vina, tj. uzrokoju miris vina po štali, konjskom znoju, mokroj vuni. Kvasac *B. bruxellensis* može utjecati i na gubitak boje crnih vina, zatim stvaranje biofilma na površini vina, mutnoću te povećanje hlapive kiselosti vina. Zbog navedenih promjena vino kontaminirano kvascem *B. bruxellensis* se opisuje kao vino s „Brett“ karakterom i nije poželjno za konzumaciju. Stoga je izazov suvremenog vinarstva spriječiti pojavu ovog kvasca, a u slučaju pojave kontrolirati rast kvasca *B. bruxellensis* kako bi se spriječili značajni ekonomski gubici.

Sojevi kvasca *B. bruxellensis* prisutni u pojedinim regijama razlikuju se po sposobnosti sinteze hlapivih fenola i octene kiseline kao i po brzini rasta te preživljavanju u vinu. Jedan od glavnih izazova suvremenog vinarstva je kontrola rasta i/ili suzbijanje populacije ovog kvasca, čime bi se značajno smanjili i ekonomski gubici obzirom da se vino kontaminirano ovim kvascem smatra nepoželjnim za konzumaciju. Kako bi se spriječila kontaminacija hrvatskih vina kvascem *B. bruxellensis* važno je okarakterizirati izolate kvasca *B. bruxellensis* prisutne u hrvatskim vinarskim regijama.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sličnosti odnosno razlike u rastu i metaboličkim karakteristikama izolata kvasca *B. bruxellensis* sakupljenih u različitim vinarskim regijama Hrvatske tijekom različitih faza proizvodnje crnih vina. Tijekom istraživanja praćen je rast izolata kvasca *B. bruxellensis* i referetnog soja kvasca *B. bruxellensis* CBS 2499, izoliranog iz vina u Francuskoj te potrošnja hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinske i ferulinske kiseline) i proizvodnja metabolita (hlapivih fenola i octene kiseline). Istraživanja su provedena u semi-anaerobnim uvjetima u dvije podloge, općoj podlozi za rast kvasaca (YPD) i modelnom sintetskom vinu (SWM).

# 2. Razrada literature

## 2.1. Taksonomija i osnovne karakteristike kvasca iz roda *Brettanomyces*

Kvasci iz roda *Dekkera/Brettanomyces* mogu biti zastupljeni u vinima, prvenstveno crnim, ali i u bijelim vinima. Uz vina se uglavnom vežu u negativnom kontekstu, kao uzročnici kvarenja crnih vina u različitim vinarskim regijama svijeta. Odgovorni su za „Brett" karakter crnih vina, odnosno za neželjeni miris vina na konjski znoj, štalu i slično. Ipak, kod pojedinih vina (npr. francuska vina „*Château de Beaucastel*") se smatra kako je kvasac *Brettanomyces bruxellensis* odgovoran za njihove specifične arome. Također ovaj kvasac pozitivno djeluje i na aromu belgijskih „lambic" piva. Nadalje, kvasci ovog roda istražuju se za mogućnost proizvodnje biogoriva, odnosno bioetanola, dok se *B. bruxellensis* koristi i kao model za istraživanje evolucije kvasaca (Schifferdecker i sur. 2014.). Podaci dobiveni proučavanjem evolucije kvasaca nastoje se iskoristiti za razumjevanje opstanka kvasaca iz roda *Dekkera/Brettanomyces* kao i njihove sposobnosti proizvodnje specifičnih spojeva (hlapivih fenola, estera i dr.) u „ekstremnim" uvjetima okoliša poput vrlo niske pH vrijednosti, visoke koncentracije etanola te niskih koncentracija hranjivih tvari, posebice dušika.

Ime roda *Brettanomyces* povezano je sa mjestom izolacije kvasaca, dakle prvotno su izolirani iz piva, kao vodeći mikroorganizmi sekundarne fermentacije (Claussen, 1904). Ime je nastalo od grčkog „*brettano*", (britansko ili britanski pivar) i „myces" (gljive). Arome koje su stvarali upravo *Brettanomyces* kvasci bile su karakteristične za pojedina tadašnja britanska piva (Schifferdecker i sur. 2014.).

Klasifikacija roda *Brettanomyces*:

- Carstvo: Gljive/Fungi
- Koljeno/Odjeljak: *Ascomycota*
- Pododjeljak: *Saccharomycotina*
- Razred: *Saccharomycetes*
- Red: *Saccharomycetales*
- Porodica: *Saccharomycetaceae*
- Rod: *Brettanomyces*

S vremenom je dolazilo do izmjena u taksonomiji roda, ali danas se na temelju molekularnih analiza u rod *Brettanomyces* ubraja slijedećih pet vrsta:

- *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* i *B. nanus*.

Dvije vrste (*Brettanomyces. bruxellensis*/*Dekkera bruxellensis* te *Brettanomyces anomalus/Dekkera anomala*) mogu postojati u anamorfnom obliku (*B. bruxellensis* kao aseksualni oblik) i u telemorfnom obliku (*D. bruxellensis* kao seksualni oblik koji proizvodi askospore) (Steensels i sur. 2015.).

Oba imena *Dekkera/Brettanomyces* se i dalje često koriste kao ime roda. Ime *Dekkera* dolazi od Nellie Margaretha Stelling-Dekker, koja je doprinijela taksonomiji askosporogenih kvasaca (Schifferdecker i sur. 2014.).

Boja kolonija ovisi o mediju rasta, tijekom rasta na općoj kvaščevoj podlozi kolonije su uglavnom kremaste do svijetlo smeđe te glatke i svjetlucave (Schifferdecker i sur. 2014.).

## 2.2. Čimbenici koji utječu na rast kvasca iz roda *Brettanomyces*

### 2.2.1. Izvor ugljika

Kvasci roda *Brettanomyces* mogu metabolizirati više izvora ugljika. *B. bruxellensis* iskorištava prvenstveno glukozu, ali i druge izvore ugljika poput maltoze, fruktoze, saharoze i galaktoze. Osim glukoze, kvasci koriste i produkt glikolize, piruvat koji se iskorištava za provođenje fermentacije iako je kisik prisutan (*Crabtree* efekt). Bitna kompetitivna prednost roda *Brettanomyces* je iskorištavanje složenih šećera poput celobioze i dekstrina, što im omogućava enzim β-glukozidaza. Celobioza je prisutna u drvu, samim time u drvenim bačvama, koje se koriste za provođenje fermentacije i kasnije za dozrijevanje vina (Steensels i sur. 2015.). Korištenje etanola, kao jedinog izvora ugljika, događa se u uvjetima kada je glukoza iscrpljena i etanol, inače produkt metabolizma kvasca tada postaje supstrat. Metaboliziranje etanola kao i glicerola i octene kiseline odvija se u aerobnim uvjetima. Ovisnost o kisiku povezana je sa potrebom kvasca za konačnim akceptorom elektrona. Nadalje, zahvaljujući glikozidnoj aktivnosti opstanak *B. bruxellensis* u crnim vinima, može se povezati sa iskorištavanjem glukoze iz monoglukozidnih antocijana i manoze iz manoproteina nastalih lizom kvaščeve stanice. Veliki dio ukupne koncentracije glikozida u grožđu čine monoglukozidi antocijana koji su najvažniji crveni pigmenti, tj. odgovorni za boju crnih vina (Smith i sur. 2016.).

### 2.2.2. Izvor dušika

Pripadnici roda *Dekkera/Brettanomyces* mogu koristiti različite izvore dušika. Mogućnost iskorištavanja određenog izvora dušika kod *B. bruxellensis* nije sasvim razjašnjen (Smith i sur. 2016.). Ovaj kvasac ima sposobnost korištenja nitrata kao jedinog izvora dušika (Steensels i sur. 2015; Blomquist i Passoth 2015.), ali ga može koristiti i u prisutnosti drugih izvora poput amonijaka. Korištenje oba izvora dušika pozitivno je utjecalo na rast kvasca u anaerobnim uvjetima. Asimilacija nitrata, to jest redukcija nitrata do amonijaka održava ravnotežu u konverziji NADH, čime je omogućeno odvijanje glikolize i ne dolazi do zaustavljanja rasta („Custer“ efekt) kvasca *B. bruxellensis* u anaerobnim uvjetima (Steensels i sur. 2015.). Kasnijim istraživanjima je utvrđeno da kvasac *B. bruxellensis* koristi aminokiseline kao izvore dušika u anaerobnim uvjetima jer aminokiseline (poput prolina i arginina) ostaju prisutne nakon primarne fermentacije kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. Količine

nitrata i nitrita u vinu su vrlo male, dok je u moštu puno zastupljeniji amonijak (Smith i sur. 2016.).

### 2.2.3. Kisik

Ovisno o specifičnosti okoliša, kisik kao čimbenik koji utječe na rast mnogih mikroorganizama može biti različito dostupan.
Kvasce, u ovisnosti prema dostupnom kisiku, možemo podijeliti na:

- obligatne aerobe (isključivo provode respiraciju)
- fakultativne anaerobe (provode respiraciju i fermentaciju)
- obligatne anaerobe (provode fermentaciju)

*B*. *bruxellensis* pripada grupi fakultativnih anaeroba. Prisutnost kisika je važan faktor za stimuliranje rasta i provođenja alkoholne fermentacije kod *Brettanomyces* spp. Prilikom rasta u striktno anaerobnim uvjetima dolazi do nedostatka konačnog akceptora elektrona koji je inače kisik (Schifferdecker i sur. 2014.). *B. bruxellensis* je „*Crabtree*“ pozitivan kvasac, što znači da stvara etanol pri aerobnim uvjetima, odnosno da provodi fermentaciju iako uvjeti omogućavaju provođenje respiracije. U mediju s visokom koncentracijom šećera uz etanol se još proizvode i octena kiselina te glicerol u malim količinama. Proizvodnja octene kiseline uzrokuje neravnotežu u redoks potencijalu stanica te se blokira proces glikolize i privremeno zaustavlja rast stanica dok ne dođe do mijenjanja uvjeta iz aerobnih u uvjete sa smanjenim kisikom, odnosno anaerobne. Ta pojava naziva se „*Custers*“ efekt (Blomquist i Passoth 2015.). Neki kvasci, poput *S*. *cerevisiae*, redoks neravnotežu nadoknađuju proizvodnjom glicerola, ali *B. bruxellensis* ga proizvodi u vrlo malim količinama. Tek kada se uspiju aktivirati drugi intracelularni enzimi za reoksidaciju NADH, prestaje lag faza i ponovno počinje proizvodnja etanola (Steensels i sur. 2015.).

### 2.2.4. Temperatura

*B. bruxellensis* raste pri temperaturama između 19 °C i 35 °C, dok u rasponu od 37 °C i 42 °C dolazi do razlika u rastu ovisno o soju. Kod temperature od 45 °C nema rasta (Schifferdecker i sur. 2014.). Dok drugi autori navode kako je temperatura od 25 °C do 28 °C optimalna za rast ovog kvasca, a rast je moguć sve do temperature od 37 °C. Sposobnost rasta kvasca *B. bruxellensis* u širokom temperaturnom rasponu ukazuje na izrazitu prilagodljivost kvasca *B. bruxellensis* različitim uvjetima i staništima ili na manji utjecaj temperature na rast kvasca u odnosu na druge spomenute čimbenike (Steensels i sur. 2015.).

### 2.2.5. pH vrijednost

Kvasci su otporni na kiseli pH. Kod crnih vina pH je uglavnom između 3,3 – 3,8 dok je kod bijelih vina niži, kreće se od 3,0 – 3,4.

## 2.3. Produkti metabolizma kvasca iz roda *Brettanomyces*

### 2.3.1. Etanol

Kvasci iz roda *Brettanomyces* otporni su na visoke koncentracije etanola, što je jedna od osnovnih karakteristika koja im omogućava preživljavanje u uvjetima gdje se odvijaju fermentacije. Proizvodnja etanola u aerobnim uvjetima može se smatrati jednim od mehanizama kojim kvasci iz roda *Brettanomyces* onemogućavaju rast drugim mikroorganizmima (Steensels i sur. 2015.). Istraživanja provedena s kvascem *B. bruxellensis* u sintetskom mediju ukazuju na sposobnost ovog kvasca da tolerira volumni postotak etanola do 14,5 odnosno 15% volumnih (Steensels i sur. 2015; Kheir i sur. 2013.) Istovremeno je uočen važan utjecaj i drugih čimbenika poput pH i koncentracije slobodnih sulfita. Dakle, visoki volumni udio etanola stvara „stresne uvjete“ samim kvascima što se odražava i na proizvodnju spojeva arome (Steensels i sur. 2015.).

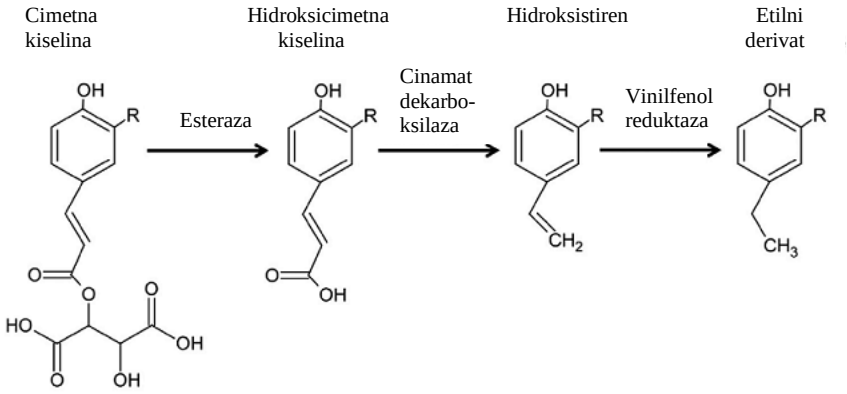
### 2.3.2. Hlapivi fenoli

Fenolni spojevi značajno utječu na aromu i boju vina, starenje vina, te imaju antioksidativni učinak. Dijele se na flavonoide i neflavonoide. Flavonoidima pripadaju antocijani, flavonoli i flavanoli. Dok se u neflavonoidima ubrajaju derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline, koji se najvećim dijelom nalaze u kožici bobica grožđa, te u drvetu (Grba 2010.).

Hlapivi fenoli su također aromatski spojevi, koji su zapravo odgovorni za senzorske promjene vina kontaminiranih kvascem iz roda *Brettanomyces*/*Dekkera* spp. i glavni su uzročnici „Brett karaktera“. Senzorne promjene opisuju se kao miris na štalu, dim, vlažan kožni materijal, miris na znoj, konjski znoj, miris na miševe i slični. Senzorski je moguće na osnovu prisutnih fenola detektirati prisutnost kvasca iz roda *Brettanomyces*/*Dekkera* spp. u vinima. Nastanak fenola ovisi o koncentracijama njihovih prekursora u mediju. Prekursori (hidroksicimetne kiseline) su inicijalno prisutni u grožđu. Prisutnost hlapivih fenola nije sasvim nepoželjna, kada su prisutni u niskim koncentracijama doprinose aromi, a mladim crnim vinima daju osobit, „zreliji“ karakter. Zastupljeniji su kod crnih vina zbog jače ekstrakcije prekursora iz kožice grožđa prilikom maceracije (Steensels i sur. 2015.).

Prekursori fenola su hidroksicimetne kiseline. Hidroksicimetne kiseline su zapravo toksične za mnoge mikroorganizme pa je moguće da upravo zato dolazi do njihove dekarboksilacije (Valdetara i sur. 2017.). S početkom alkoholne fermentacije dolazi do enzimatskih reakcija kojima nastaju fenolni spojevi. Dakle, dekarboksilacijom hidroksicimetnih kiselina (ferulinska kiselina, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina) nastaju 4-vinil gvajakol, 4-vinil fenol i 4-vinil katehol. Zatim njihovom redukcijom nastaju etilne forme fenola: 4-etil gvajakol, 4-etil fenol i 4-etil katehol.

Dekarboksilaciju provodi enzim cinamat dekarboksilaza, a redukciju vinilfenol reduktaza (slika 2.3.2.1.). Pojedini fenolni spojevi uzrokuju različite senzorske promjene, tako se 4-etil fenol povezuje sa medicinskim mirisom i mirisom konjskog znoja. 4-etil gvajakol stvara oštar, neprijatan miris, dok 4-etil katehol također podsjeća na medicinski miris (Kheir i sur. 2013.).




| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| R = H | ρ-Kutarna kiselina | ρ-Kumarinska kiselina | 4-Vinilfenol | 4-Etilfenol |
| R = OCH | Fertarna kiselina | Ferulinska kiselia | 4-Vinilgvajakol | 4-Etilgvajakol |
| R = OH | Kaftarna kiselina | Kafeinska kiselina | 4-Vinilkatehol | 4-Etilkatehol |

Slika 2.3.2.1. Nastanak hlapivih fenola iz hidroksicimentnih kiselina
Izvor: Šućur i sur. 2016.

Drugi rodovi kvasaca (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia* spp.) i određene bakterije, imaju sposobnost provođenja dekarboksilacije, ali ne i redukcije do etilnih formi ili nemaju sposobnost stvaranja značajnijih koncentracija etil fenola, što govori u prilog detekciji kvasaca iz roda *Brettanomyces* spp. pomoću prisutnih etilnih spojeva (Kheir i sur. 2013; Scifferdecker i sur. 2014; Šućur i sur. 2016.). Drugim riječima, aktivnost enzima vinil-fenol reduktaze je ključna u potvrđivanju ovih kvasaca kao proizvođača etil fenola (Valdetara i sur. 2017.).
Također su provedena istraživanja korelacije između faza rasta i proizvodnje viših koncentracija etil fenola. Jedno istraživanje ukazuje na proizvodnju 4-vinil fenola usporedno sa početkom eksponencijalne faze rasta kvasca *B. bruxellensis*, dok se proizvodnja 4-etil fenola poklapa sa sredinom eksponencijalne faze rasta i ulaskom u stacionarnu fazu. Drugim istraživanjem je utvrđen porast proizvodnje 4-etil fenola od lag faze pa do kraja eksponencijalne faze raste (Kheir i sur. 2013.).

## 2.3.3. Hlapivi esteri

Hlapivi esteri pripadaju skupini aromatskih spojeva. U fermentiranim pićima u kojima su zastupljeni stvaraju cvjetne i voćne arome. Kvasci iz roda *Brettanomyces*/*Dekkera* spp. stvaraju esteraze odgovorne za nastanak hlapivih estera, poput etil acetata i etil laktata (Steensels i sur. 2015.)

### 2.3.4. Hlapive masne kiseline

Kvasci iz roda *Brettanomyces* spp. mogu razgradnjom pojedinih aminokislina proizvesti hlapive masne kiseline koje uvelike pridonose nepoželjnim promjenama u aromi vina. Također, mogu utjecati na povećanje intenziteta drugih hlapivih spojeva u aromi (Steensels i sur. 2015.). Hlapive masne kiseline koje nastaju su izovalerična, kao dominantna, izobutirična i 2-metil butirična kiselina. Promjene u aromi opisuju se kao pokvareno ili miris na sir (Oelofse i sur. 2008.).

### 2.3.5. Octena kiselina

Pod pojmom hlapive kiselosti zapravo se govori o octenoj kiselini, kao najzastupljenijoj u odnosu na ostale hlapive kiseline prisutne u vinu. Proizvodnja octene kiseline u aerobnim uvjetima rezultira većim koncentracijama. Suprotno tome, u semiaerobnim uvjetima proizvodnja octene kiseline se smanjuje, dok je u anaerobnim uvjetima njezin nastanak gotovo zanemariv. *B*. *bruxellensis* sojevi koriste i glukozu i etanol za njezinu proizvodnju. Proizvodnja octene kiseline uzrokuje neravnotežu u redoks reakcijama unutar stanica kvasaca, te dolazi do privremenog zaustavljanja glikolize i rasta kvasaca („*Custers*“ efekt). Koncentracija octene kiseline u vinu može varirati između 0,2 i 0,6 g/L, dok u višim koncentracijama od 1,2 g/L može ukazivati na aktivnost octenih bakterija ili drugih nepoželjnih mikroorganizama (Steensels i sur. 2015.).

### 2.3.6. Tetrahidropiridini

Tetrahidropirdini su zapravo odgovorni za karakterističnu senzornu promjenu koja podsjeća na mišji miris („*mousy-off*“). Potječu od dušikovih heterocikličkih spojeva, dok se kvasac *B*. *bruxellensis* uglavnom povezuje sa proizvodnjom 2-acetil-tetrahidropiridina i 2-etil-tetrahidropiridina koji nastaju iz lizina (Blomquist i Passoth 2015.).

### 2.3.7. Spojevi koji utječu na smanjenje boje crnih vina

Kvasci iz roda *Brettanomyces* spp. mogu uzrokovati zamućenost vina i degradaciju boje. Jedan od uzroka gubitka boje je prisutnost enzima β-glukozidaze u kvascu *B. bruxellensis*, koji omogućuje razgradnju antocijana, tj. uklananje glukoze iz mono-glukozidnih antocijana stvarajući neobojene pseudo forme antocijana. Drugi uzrok može biti degradacija vinil fenolnih piranoantocijana u svrhu oslobađanja vinifenola i proizvodnje etilfenola, iako je vjerojatnije da kvasac *B. bruxellensis*. prvenstveno koristi slobodne vinil fenole.

## 2.4. Mjesta izolacije kvasaca iz roda *Brettanomyces*

Kvasci iz roda *Brettanomyces* spp. izolirani su u vinarijama, prvenstveno s opreme za proizvodnju vina odnosno dijelova opreme koji se teže čiste. Najčešća mjesta izolacije su:

- zidovi vinarije
- preša
- fermentacijski tankovi
- drvene bačve
- cijevi (dio opreme)
- zrak
- insekt *Drosophila melanogaster*

Rijeđe se mogu izolirati sa kožice grožđa, gdje mogu biti prirodno prisutni.
*B. bruxellensis* je izrazito kompetitivan kvasac i jednom kada se pojavi unutar vinarije, teško ga je potpuno ukloniti (Blomquist i Passoth 2015.).

## 2.5. Prisutnost kvasca iz roda *Brettanomyces* u proizvodnja vina

Važno je istaknuti da se kvasac *B. bruxellensis* može pojaviti u različitim fazama proizvodnje vina pa i kasnije tijekom njegovog dozrijevanja te čuvanja.

### 2.5.1. Maceracija

Maceracija je postupak u proizvodnji crnog vina koji prethodi alkoholnoj fermantaciji. Ova faza je odgovorna za veliku zastupljenost prekursora fenolnih spojeva kod crnih vina jer se tijekom ove faze polifenolni spojevi ekstrahiraju iz kožice grožđa (Steensels i sur. 2015.).

Prilikom maceracije veći broj mikroorganizama može dospjeti u mošt, što je još jedna razlika u odnosu na bijelo vino. Bijelo vino u pravilu sadrži manje mikroorganizama, što se odražava i na manjoj proizvodnji etil fenola (Kheir i sur. 2013.).

### 2.5.2. Alkoholna fermentacija

Alkoholnu fermentaciju provodi kvasac *S. cerevisiae*, s kojim *B. bruxellensis* može koegzistirati, dok ga ne nadvlada. *B. bruxellensis* dobiva kompetitivnu prednost pred kraj fermentacije, kada uvjeti medija postaju ekstremniji, ali ih ovaj kvasac može nadvladati, uz privremeni zastoj u rastu („*Custers*“ efekt). Iako su količine fermentabilnih šećera smanjene, kvasac *B. bruxellensis* u odnosu na *S. cerevisiae* može koristiti druge izvore ugljika kao zamjenu za glukozu. Osim izvora uglika na kraju alkoholne fermentacije i izvori dušika su uglavnom iscrpljeni, a koncentracija etanola je povišena. Prednost kvasca *B. bruxellensis* je i efikasnije stvaranje

energije, tj. ne stvara veće količine energetski zahtjevnog glicerola (Blomquist i Passoth 2015.).

Koncentracija nastalog etanola može utjecati na proizvodnju fenolnih spojeva. Više koncentracije etanola „toksične“ su i smanjuju aktivnost mikroorganizama. Jedno od istraživanja ukazuje na prestanak aktivnosti hidroksicimetnih dekarboksilaza nakon jednog sata kod koncentracija etanola od 10 i 12% vol., te smanjenje aktivnosti vinil fenol reduktaze za 80 i 88% pri 10 i 12% vol. etanola (Kheir i sur. 2013.).

### 2.5.3. Jabučno-mliječna fermentacija

Sojevi kvasca *B. bruxellensis* se kao kontaminanti često pojave tijekom jabučno-mliječne fermentacije. Uvjeti su slični kao pri kraju alkoholne fermentacije, koncentracije šećera su niske (ostatak neprevrelih šećera), a etanola visoke (Blomquist i Passoth 2015.).

Jabučno-mliječna fermentacija smatra se sekundarnom fermentacijom, koja se provodi kod crnih, te određenih bijelih vina. Poželjno je da to bude kontrolirani proces pri kojem se u vino inokuliraju bakterije iz rodova *Oenococcus*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Opasnost spontanog odvijanja procesa je što često ne završi na jesen nego tek slijedećeg proljeća s porastom temperatura i ponovnim stimuliranjem rasta bakterija. Takvim pristupom se smanjuje svrha jabučno-mliječne fermentacije kao što je osiguravanje veće mikrobiološke stabilnosti vina. Jabučno-mliječna fermentacija je važna za stvaranje blažih, voćnih aroma kao i porast pH za 0,2 (Bartowsky 2017.). Vina sa višim pH podložnija su proizvodnji etil fenola (Kheir i sur. 2013.). Međutim, prisutne mliječno-kisele bakterije (*Lb*. *plantarum*, *Lb*. *brevis*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus spp*.) također mogu metabolizirati hidroksicimetne kiseline.

### 2.5.4. Dozrijevanje vina

Dozrijevanje najkvalitetnijih vina vrši se tradicijski u drvenim bačvama, uglavnom hrastovim, što doprinosi karakterističnim aromama vina. Važan čimbenik tijekom dozrijevanja vina je vremenski period odležavanja vina. Osim vremena dozrijevanja, važan je utjecaj temperature kao i mikrobna aktivnost koja uzrokuje degradaciju lignina i oslobađanje vanilina, gvajakola, ferulinske i *p*-kumarinska kiseline, te stvaranje 4-etil gvajakola i 4-etil fenola (Kheir i sur. 2013.). Sljedeći vrlo važan čimbenik je kisik, čija prisutnost snižava koncentraciju molekularnog sulfita i dodatno stimulira rast kvasaca. Nastanjivanje kvasaca unutar porozne strukture drveta i stvaranje pseudomicelija također im pruža zaštitu od sulfita (Malfeito-Ferreira 2018.). Kvasac *B*. *bruxellensis* ima i sposobnost stvaranja biofilma što mu pomaže u pričvršćivanju za površinu drva (Schifferdecker i sur. 2014.). U novim bačvama također dolazi do stvaranja nižih koncentracija etil fenola, ali koje mogu porasti s vremenom. „Prednost“ korištenih bačva je prestanak oslobađanja polifenola iz drva.

Korištenje inoks spremnika, kao alternativa drvenim bačvama, osigurava se stvaranje 20 – 40% manje 4-etil fenola. (Kheir i sur. 2013.).

### 2.5.5. Čuvanje vina

Čuvanje vina u bocama podrazumijeva osiguravanje striktno anaerobnih uvjeta, što je glavna razlika u odnosu na dozrijevanje u bačvama (Kheir i sur. 2013.). Buteljirana vina koja su duže dozrijevala u bačvama, a nisu filtrirana te imaju i niže koncentracije ugljikovog dioksida, povezuju se sa rastom kvasca iz roda *Brettanomyces* spp. (Oelofse i sur. 2008.). Jedno od istraživanja u kojem su obuhvaćena različita buterljirana vina ukazuje na prisutnost sojeva kvasca *B*. *bruxelensis* u svim uzorcima kao i njihovu proizvodnju etil fenola. Ovo istraživanje skreće pozornost na zaštitu vina od kisika u različitim fazama proizvodnje, u samom podrumu, tijekom homogenizacije kao i neposredno prije buteljiranja (Coulon i sur. 2010.).

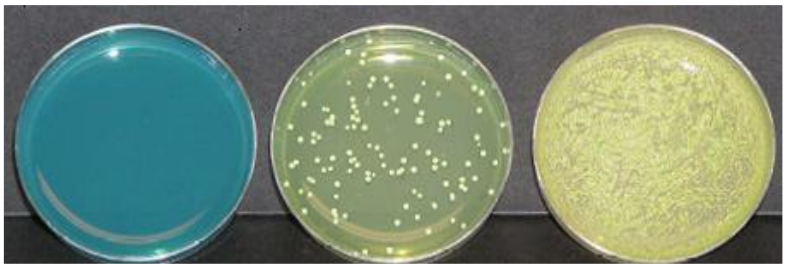
## 2.6. Metode za utvrđivanje prisutnosti kvasca iz roda *Brettanomyces*

Metode kojima se najčešće otkriva prisutnost kvasca iz roda *Brettanomyces* su klasične mikrobiološke metode koje se temelje na rastu stanica na čvrstoj podlozi. Koriste se različite podloge za rast kvasaca, a nedostatak je vremenski period potreban da kolonije izrastu (5 do 10 dana). Brže, ali i skuplje, su molekularne metode, na primjer PCR metoda. Iz enološkog aspekta velika prednost molekularnih metoda je prepoznavanje kvasaca na razini soja (Schifferdecker i sur. 2014.).

### 2.6.1. Hranjive podloge

U enološkoj praksi za izolaciju i određivanje broja kvasca *B. bruxellensis* primjenjuju se različite selektivne mikrobiološke podloge (Agnolucci i sur. 2009.). Najčešće upotrebljavane su DBDM agar (*Dekkera*/*Brettanomyces* Differential Medium); WL agar (Wallerstein Laboratories) uz dodatak 100 mg/L cikloheksimida i 60 mg/L kloramfenikola; *Brettanomyces* podloga C (10 mg/L kloramfenikola, 30 mg/L cikloheksimida and 100 mg/L *p*-kumarinske kiseline) te *Brettanomyces* agar (100 mg/L kloramfenikola, 10 mg/L cikloheksimida and 100 mg/L *p*-kumarinske kiseline) (Conda, Španjolska).

Metoda za detekciju *Brettanomyces* spp. koja također uključuje korištenje selektivne mikrobiološke podloge je tzv. „*sniff*“ metoda/test. Podloga može biti čvrsta ili tekuća, također sadrži cikloheksamid i ρ-kumarinsku kiselinu. Prednost metode je detekcija mirisa karakterističnog za *Brettanomyces* spp. (fenolni miris), može se osjetiti za 24 – 48 sati ili više, dok kolonijama treba 2 – 10 dana da narastu na podlozi, ovisno o brojnosti populacije kvasca (Edinger 2010.).



Slika. 2.6.1.2. Detekcija *Brettanomyces* kvasca na selektivnoj podlozi Easy-blue kod „sniff“ metode
(izvor www.lebrunlabs.com)

Slika 2.6.1.2. prikazuje selektivnu podlogu plave boje (lijevo) na koju se nanosi uzorak vina. Uzorak vina može biti profiltriran (filter 0,45 µm), što nije nužno za metodu. Kada su u uzorku vina prisutni *Brettanomyces* kvasci njihova detekcija se očituje na tri načina, tj. boja podloge se mijenja iz plave u žutu, vidljiv je rast kolonija i može se osjetiti specifičan „Brett“ miris (srednja podloga). Kod velike brojnosti populacije, kolonije gusto narastu po cijeloj podlozi i nemoguće ih je izbrojati (TNTC – too numerous to count) (desno). Najranija detekcija moguća je za 2 dana, najviše 12 dana (Web 1).

Prilikom primjene selektivnih podloga za detekciju prisutnosti kvasca *B. bruxellensis* u vinu može doći do pojave lažnog negativnog rezultata ako je kvasac *B. bruxellensis* u specifičnom stanju engl. „*viable but not culturable*“ (VBNC stanje). To je stanje u kojem su stanice metabolički slabije aktivne, ali ne dolazi do rasta ili razmnožavanja na krutoj ili tekućoj podlozi. Stanje je reverzibilno (Steensels i sur. 2015.) i zapravo je reakcija na stresne uvjete, najvjerojatnije na koncentracije sumporovog dioksida i etanola u vinu (Oelofse i sur. 2018.). Prestankom stresnih uvjeta stanica kvasca izlazi iz VBNC stanja te nastavlja svoj rast i razmnožavanje te metaboličku aktivnost (Agnolucci i sur. 2010.). Primjena klasičnih mikrobioloških metoda za analizu prisutnosti kvasca *B. bruxellensis* u vinu predlaže se nakon što su prošla 3 tjedna od posljednjeg sumporenja vina.

## 2.6.2. PCR metoda

„Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda eksponencijalnog umnažanja željenog odsječka DNA *in vitro*“. Umnažanje se vrši prema unaprijed poznatom dijelu slijeda nukleotida DNA. PCR ciklus zapravo podrazumijeva nekoliko reakcija koje se višestruko ponavljaju. Reakcije su denaturacija, sparivanje pa produljenje dijela DNA lanca, što rezultira velikim brojem kopija ciljanog PCR produkta. Završni korak je elektroforeza produkta u agaroznom gelu (Mrkonjić Fuka 2014.).

PCR metoda koristi se za utvrđivanje prisutnosti vrsta iz roda *Brettanomyces*, detektiraju se prema polimorfizmu ITS regije. U istu svrhu koristi se i kvantitativna *real-time* PCR metoda. Dok se za identifikaciju na razini soja koristi modificirana PCR

metoda, odnosno PCR-RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) kod koje cijepanje DNA vrše restrikcijski enzimi/endonukleaze i metoda gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE) (Schifferdecker i sur. 2014.).

## 2.7. Metode za kontrolu rasta kvasca iz roda *Brettanomyces*

### 2.7.1. Kemijske metode

Sumporov dioksid ($SO_2$) je zasigurno najzastupljenije sredstvo za zaštitu vina u različitim fazama proizvodnje vina, prije i poslije alkoholne fermentacije. Neki autori navode kako je koncentracija od 30 mg/L slobodnog $SO_2$ dovoljna, dok drugi navode da treba biti iznad 30 mg/L zbog rezistentnosti pojedinih sojeva kvasca *B. bruxellensis* (Kheir i sur. 2013.). Molekularni $SO_2$ zapravo ima antimikrobni učinak, ali ovisi o pH vina. Dakle, 30 mg/L slobodnog $SO_2$ zapravo osigurava 0,4 mg/L molekularnog $SO_2$ pri pH 3,7 odnosno 0,8 mg/L kod pH 3,4. Preporuča se 0,5 – 0,8 mg/L molekularnog $SO_2$ (Oelofse i sur. 2018.). Dok neki autori preporučuju koncentracija od 100 mg/L ukupnog $SO_2$ za inhibiciju kvasaca (Edwards i Oswald 2017.). Također, doze slobodnog $SO_2$ od 15, 20, 25 i 30 mg/L tijekom dozrijevanja crnog vina pH vrijednosti 3,65 se kroz 4 mjeseca reduciraju u količine od 6, 11, 10 i 15 mg/L (Šućur i sur. 2016.). Tijekom svih faza proizvodnje vina važno je pratiti koncentraciju slobodnog $SO_2$, primjerice smanjenje koncentracije može se dogoditi prilikom dozrijevanja vina u bačvama jer bačve adsorbiraju dio $SO_2$. $SO_2$ može potaknuti prijelaz kvasca *B. bruxellensis* u VBNC stanje, a prisutnost kisika može stimulirati ponovni rast.

Dimetil-dikarbonat (DMDC) se također koristi kao zaštitno sredstvo. Njegovo korištenje se preporuča nakon jabučno-mliječne fermentacije, zbog mogućeg djelovanja na *S. cerevisiae* i *O. oeni*. Minimalna doza za suzbijanje *B. bruxellensis* je 100 mg/L, dok je maksimalna dopuštena 200 mg/L i primjenjuje se kod porasta populacije kvasca do $10^6$ CFU/mL. Njegovo djelovanje se može povećati dodatkom 100 mg/L kalijevog metabisulfita (Kheir i sur. 2013.).

Primjena ozona u cilju dezinfekcije opreme i bačava osigurava kontrolu rasta mikroorganizama, štoviše kod koncentracija manjih od $10^3$ CFU/mL moguće je suzbiti kontaminirajuće mikroorganizme. Suprotno tome, kod znatnog povećanja brojnosti kolonija, organska tvar smanjuje djelovanje ozona (Kheir i sur. 2013.).

Hitozan, polisaharid porijeklom od hitina, može reducirati rast sojeva kvasca *B. bruxellensis*, uz primjenu 3 – 6 g/L. Dodatna prednost primjene je što nema utjecaj na koncentraciju alkohola, druge kvasce poput *S. cerevisiae* ili na odvijanje jabučno-mliječne fermentacije. Iako se preporuča 8 dana nakon primjene napraviti inokulaciju mliječno kiselih bakterija (Kheir i sur. 2013.)

### 2.7.2. Fizikalne metode

Filtracija osigurava bolju mikrobiološku stabilnost zato što reducira prisutnu mikrofloru, osim u slučaju kada je kvasac *B. bruxellensis* u VBNC stanju pri čemu je značajno manja veličina stanice te stanice mogu proći kroz pore od 0,45 µm. Zbog navedenog predlaže se kombinacija filtracije sa membranama od 0,22 µm uz dodatak 0,5 mg/L molekularnog $SO_2$.

Preostale fizikalne metode koje se mogu koristiti su nove netoplinske tehnike poput ultrazvuka visokih snaga (HPU), visokog hidrostatskog tlaka (HHP), hladne plazme (NTP), pulsirajućeg električnog polja (PEF) itd. HUP u kombinaciji s vodom temperature najmanje 60 °C je ispitan za suzbijanje sojeva kvasca *B. bruxellensis* na površini bačava. Dok, primjena visokog hidrostatskog tlaka je potencijalno zanimljiva kao moguća alternativa za inaktivaciju nepoželjnih mikroorganizama u vinu poput kvasca *B. bruxellensis* kod sobnih temperatura bez utjecaja na senzorske karakteristike i kvalitetu vina tzv. „hladna pasterizacija“ (Kheir i sur. 2013.).

Inaktivacija kvasca *B*. *bruxellensis* ultrazvukom visoke snage (20 kHz) pokazala se djelomično učinkovitom. Tretman ultrazvukom u trajanju 15 minuta pri temperaturi od 25 °C nije značajno inaktivirao populaciju kvasca *B*. *bruxellensis* u uzorcima crnog vina. 90 dana nakon tretmana, populacija *B*. *bruxellensis* se reducirala za oko 3 log CFU/mL u tretiranim uzorcima, dok se u netretiranim uzorcima reducirala za oko 1 CFU/mL. U svrhu efikasnije redukcije *B*. *bruxellensis* populacije ultrazvuk je kombiniran sa višim temperaturama. Pri temperaturi od 43 °C u trajanju 3 minute postignuta je potpuna inaktivacija *B*. *bruxellensis* populacije. Kod temperature od 35 °C nije došlo do značajne promjene u populaciji kvasca, dok je na temperaturi od 40 °C došlo do redukcije za 1 log CFU/mL. Ultrazvuk djeluje tako da dolazi do oštećenja stanica kvasca što utječe i na smanjenu enzimatsku aktivnost (produkcija etil fenola), dok termosonifikacija uzrokuje koagulaciju intercelularnih proteina, što značajnije reducira *B*. *bruxellensis* populaciju (Gracin i sur. 2017.).

### 2.7.3. Biološke metode

Biološke metode, osim antimikrobnog djelovanja na kvasac *B. bruxellensis*, mogu utjecati na prisutnost fenolnih spojeve u vinu zahvaljujući primjeni određenih enzima (Benito i sur. 2008.). Na primjer, korištenjem hidroksi-cinamat dekarboksilaza moguće je reducirati etil fenole čak do 70%, na način da se hidroksicimetne kiseline prisutne u vinu prevedu u stabilne pigmente – vinilfenolne piranoantocijane.

Biološka metoda sa antimikrobnim učinkom na sojeve kvasca *B*. *bruxellensis* je primjena „*killer“* toksina (PMKT2), kojeg proizvodi *Pichia membranifaciens*. Isti učinak ima i toksin (KP6) kojeg proizvodi *Ustilago maydis*. U oba slučaja moguća je primjena

tijekom vinifikacije jer je kvasac *S. cerevisiae* rezistentan. Primjenom manjih količina ovih toksina može se smanjiti proizvodnja hlapivih fenola u vinu (Kheir i sur. 2013.).

## 2.8. Metode za analizu pojedinih sastojaka vina

### 2.8.1. Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom

Plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography* – GC) je separacijska metoda koja se obično koristi za analizu lako hlapljivih komponenti (estera, viših alkohola, hlapivih fenola itd.) vina. Mobilnu fazu čini inertan plin, poput helija, argona, vodika, ugljikov dioksida ili dušika. Dok stacionarnu fazu čini kruta tvar u koloni. Analiti se injektiraju u struju plina nosača pomoću kojeg dospijevaju u kolonu. Za detekciju analita mogu se koristiti različiti detektori. U svrhu povećanja osjetljivosti metode, za analizu pojedinog sastojka, GC se kao i druge analitičke metode koristi u kombinaciji sa masenim spektrometrom (Butorac i sur. 2013.). Osnove spektrometrije masa podrazumijevaju razlučivost metode, to jest djelotvornost odvajanja iona približno istih masa. Sposobnost spektrometra masa je da odredi molekulsku masu čim bliže točnoj (izotopna masa) masi (Cindrić i sur. 2009.).

### 2.8.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography* – LC) je separacijska metoda kojom se otopina različitih spojeva razdvaja tijekom prolaska kroz kromatografsku kolonu. Odijeljivanje komponenata postiže se prolaskom tekuće mobilne faze sa komponentama, kroz stacionarnu fazu koju čini kolona sastavljena od čvrstih čestica. Djelovanje dviju različitih faza te kemijskih i fizikalnih sila na komponente rezultira izdvajanjem pojedinih komponenti. Bilo kakav utjecaj na intermolekularne sile, odražava se i na stupanj razdvajanja u koloni (Fallon i sur. 1987.). Dakle, izdvajanje analita događa se u kromatografskoj koloni što se prikazuje kao kromatogram. Važni dijelovi sustava su crpke koje omogućavaju stalan dotok mobilne faze te injekcioni sustav za ubrizgavanje uzorka (Cindrić i sur. 2009.).

Veću razlučivost osigurava metoda tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC). Koristi se za analizu pojedinih sastojaka hrane i pića (Butorac i sur. 2013). U analizi vina, koristi se za kvantifikaciju polifenola u vinu. Sustav normalnih faza koristi se za analizu flavanoida, dok se za analizu drugih polifenola češće koristi metoda s obrnutim fazama (Rastija i Medić-Šarić 2009.).

### 2.8.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

*Fourierova* spektroskopija generalno podrazumijeva analizu bilo kojeg signala prema njemu pripadajućoj frekvenciji. Velika prednost metode je mogućnost primjene u velikom dijelu spektra, od ultraljubičastog, vidljivog do infracrvenog, koji se još

specifičnije dijeli na *near infrared*, *mid infrared* i *even far infrared*. Odnosno, metoda se koristi za mjerenje apsorpcije i emisije infracrvenog spektra pojedinog materijala, kojima se dobivaju kvantitativni, ali i kvalitativni podaci. Moguća je analiza i molekula niskih frekvencija (izvor: https://www.researchgate.net/publication/226147743).

Princip rada temelji se na izvoru zračenja, koji treba imati najveći intenzitet upravo kod traženih valnih duljina za pojedine analite. Zatim, optički sustav osigurava dolazak zračenja do detektora signala uz minimalne gubitke. Važan dio je interferometar, ugl. se koristi modificirani *Michelsonov* interferometar, na kojem zapravo dolazi do apsorpcije i emisije zračenja, te se modulirana zraka registrira u detektoru kao interferogram. Daljna pretvorba interferograma odvija se na računalu, kao *Fourierova* transformacija (Günzler i Gremlich 2006.).

# 3. Materijali i metode

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis*

U svrhu izrade diplomskog rada korišteni su vinski izolati kvasca *B. bruxellensis* izolirani iz crnih vina proizvedenih u različitim hrvatskim vinarskim regijama tijekom različitih faza proizvodnje vina (tablica 3.1.1.1.) te referetni soj kvasca *B. bruxellensis* CBS 2499 (iz zbirke mikroorganizama Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Nizozemska).

Tablica 3.1.1.1. Vinski izolati kvasca *B. bruxellensis* korišteni u ovom radu

| izolat | geografska regija | faza proizvodnje crnog vina |
|---|---|---|
| K11 | Primorska Hrvatska (priobalje) | buteljirano vino |
| K13 | Južna Dalmacija | dozrijevanje u inoks bačvi |
| K14 | Srednja Dalmacija | dozrijevanje u inoks bačvi |
| K15 | Slavonija | malolaktična fermentacija |
| K16 | Slavonija | malolaktična fermentacija |
| K17 | Slavonija | dozrijevanje u inoks bačvi |
| K18 | Sjeverna Dalmacija | dozrijevanje u drvenoj bačvi |
| K19 | Slavonija | malolaktična fermentacija |
| K21 | Slavonija | dozrijevanje u inoks bačvi |
| K22 | Južna Dalmacija | buteljirano vino |

### 3.1.2. Kemikalije

Popis kemikalija sa navedenim proizvođačima:

- Agar, Biolife, Italija
- Pepton, Biolife, Italija
- Kvaščev ekstrakt, Biolife, Italija
- Glukoza, Biolife, Italija
- Fruktoza, Biolife, Italija
- Jabučna kiselina (DL-malic acid, 99 + %), Acros Organics
- Etanol, 96%, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- Apsolutni etanol, HPLC čistoće, Merck, Njemačka

- Kumarinska kiselina, Sigma, SAD
- Ferulinska kiselina, Sigma, SAD
- Ortofosforna kiselina, Kemika, Hrvatska
- Brettanomyces podloga (Conda, Španjolska)

### 3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Tablica 3.1.3.2. Sastav čvrste selektivne Brettanomyces podloge za izolaciju kvasca iz roda *Brettanomyces*

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Dekstroza | 10 g |
| Pepton | 5 g |
| kvaščev ekstrakt | 3 g |
| sladni ekstrakt | 3 g |
| kvaščeva dušična baza | 3 g |
| Kloramfenikol | 100 mg |
| bromkrezol zeleno | 22 mg |
| Tiamin | 200 mg |
| kumarinska kiselina | 100 mg |
| Cikloheksamid | 10 mg |
| Agar | 20 |
| Etanol | 16 mL |
| destilirana voda | 1000 mL |

Čvrsta selektivna *Brettanomyces* podloga (tablica 3.1.3.2.) priprema se na način da se 44,2 g *Brettanomyces* podloge izvaže u jednu litru destilirane vode, a zatim se dobro promiješa i otopi zagrijavanjem uz povremeno mućkanje do potpunog otapanja. Sljedeći korak je dodavanje 16 mL etanola i miješanje. Slijedi zagrijavanje u trajanju od 10 minuta te izljevanje u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene ploče čuvaju se na temperaturi 8 °C – 15 °C.

Tablica 3.1.3.3. Sastav tekuće YPD (eng. *Yeast Peptone Dextrose*) podloge

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Glukoza | 20 g |
| Pepton | 20 g |
| kvaščev ekstrakt | 10 g |
| destilirana voda | 1000 mL |

Sastojci podloge (glukoza, pepton, kvaščev ekstrakt) se otope u destiliranoj vodi (tablica 3.1.3.3.) nakon čega se pH vrijednost korigira na 3,5 uz pomoć 20% ortofosforne kiseline. Zatim se podloga sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 10 minuta.

Tablica 3.1.3.4. Sastav tekuće YPD podloge s etanolom

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Glukoza | 20 g |
| Pepton | 20 g |
| kvaščev ekstrakt | 10 g |
| Etanol | 40; 80 ; 120 mL |
| destilirana voda | 1000 mL |

Sastojci podloge (glukoza, pepton, kvaščev ekstrakt) se otope u destiliranoj vodi (tablica 3.1.3.4.) nakon čega se korigira pH vrijednost na 5,4 uz pomoć 20% ortofosforne kiseline. Zatim se podloga sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 10 minuta. Nakon sterilizacije, a ovisno o željenom udjelu alkohola (4 – 12%), u podlogu se doda apsolutni etanol.

Tablica 3.1.3.5. Sastav tekuće YPD podloge s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Glukoza | 20 g |
| Pepton | 20 g |
| kvaščev ekstrakt | 10 g |
| p-kumarinska kiselina | 10 mg |
| ferulinska kiselina | 5 mg |
| destilirana voda | 1000 mL |

Sastojci podloge (glukoza, pepton i kvaščev ekstrakt) otope se u destiliranoj vodi (tablica 3.1.3.5.) nakon čega se pH vrijednost korigira na 3,5 uz pomoć 20% ortofosforne kiseline. Nakon toga se podloga sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 10 minuta. Nakon sterilizacije podloga se ohladi na temperaturu od 50 °C te se doda koncentrirana otopina *p*-kumarinske kiseline odnosno ferulinske kiseline, pripremljene otapanjem *p*-kumarinske kiseline odnosno ferulinske kiseline (obje HPLC čistoće) u apsolutnom etanolu kako bi se dobila koncentracija *p*-kumarinske kiseline u podlozi od 10 mg/L i ferulinske kiseline od 5 mg/L.

Tablica 3.1.3.6. Sastav čvrste YPD  podloge s dodatkom *p*-kumarinske kiseline

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Agar | 20 g |
| Glukoza | 20 g |
| Pepton | 20 g |
| kvaščev ekstrakt | 10 g |
| *p*- kumarinska kiselina | 100 mg |
| destilirana voda | 1000 mL |

Sastojci podloge (glukoza, pepton i kvaščev ekstrakt) otope se u destiliranoj vodi nakon čega se pH vrijednost korigira na 5,4 uz pomoć 20% ortofosforne kiseline i doda agar (tablica 3.1.3.6.). Nakon toga se podloga sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 10 minuta. Nakon sterilizacije podloga se ohladi na temperaturu od 50 °C te se doda koncentrirana otopina *p*-kumarinske kiseline, pripremljenih otapanjem *p*-kumarinske kiseline (HPLC čistoće) u apsolutnom etanolu kako bi se dobila koncentracija *p*-kumarinske kiseline u podlozi od 100 mg/L. Podloga se zatim izljeva u sterilne Petrijeve ploče.

- 0, 85 % Fiziološka otopina

Sterilizirana fiziološka otopina korištena je za decimalna razrjeđenja. 0,85%-tna otopina dobivena je otapanjem 8,5 grama natrijevog klorida u 1000 ml destilirane vode. Nakon toga se otopina sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 10 minuta.

- 10 M otopina NaOH

40 grama natrijevog hidroksida (NaOH) se otopi u 100 mL destilirane vode.

Sastojci (glukoza, fruktoza, kvaščev ekstrakt,octena kiselina, jabučna kiselina, kalijev sulfat i magnezijev sulfat) se otope u destiliranoj vodi (tablica 3.1.3.7) nakon čega se pH vrijednost korigira na 3,5 uz pomoć 10 M otopine NaOH. Nakon sterilizacije podloga se ohladi i doda se apsolutni etanol te koncentrirana otopina *p*-kumarinske kiseline odnosno ferulinske kiseline, pripremljenih otapanjem *p*-kumarinske kiseline odnosno ferulinske kiseline (obje HPLC čistoće) u apsolutnom etanolu kako bi se dobila koncentracija *p*-kumarinske kiseline u podlozi od 10 mg/L i ferulinske kiseline od 5 mg/L.

Tablica 3.1.3.7. Sastav sintetskog modelnog vina (eng. *synthetic wine medium*) (SWM) s 10 mg/L *p*-kumarinske i 5 mg/L ferulinske kiseline

| SASTOJCI | sadržaj |
|---|---|
| Etanol | 140 mL |
| octena kiselina | 0,1 mL |
| jabučna kiselina | 3 g |
| kalijev sulfat | 0,1 g |
| magnezijev sulfat | 0,025 g |
| kvaščev ekstrakt | 1 g |
| Glukoza | 1,5 g |
| Fruktoza | 1,5 g |
| *p*-kumarinska kiselina | 10 mg |
| ferulinska kiselina | 5 mg |
| destilirana voda | 1 000 mL |

### 3.1.4. Instrumenti

- Autoklav, Sutjeska, Srbija
- Vorteks, Ika, Njemačka
- Sterilni mikrobiološki kabinet, Klima oprema, Hrvatska
- pH metar, Inolab, Njemačka
- Centrifuga, Rotina 380 R, Hettich, Njemačka
- Analitička vaga, Sartorius, Njemačka
- Tehnička vaga, Sartorius, Njemačka
- Termostat, Inko, Hrvatska
- spektrofotometar Specord 50 Plus AnalytikJena, Jena, Njemačka
- GC MS, Agilent Gas Chromatography 6890, USA
- HPLC uređaj 1200, Agilent USA
- FTIR-spektrometar Bacchus II, TDI, Španjolska

### 3.1.5. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Stakleno laboratorijsko posuđe (menzure, epruvete, čaše)
- Sterilne epruvete sa čepovima za uzorke
- Sterilne Erlenmeyerove tikvice sa čepovima za uzroke, 250 mL
- Sterilni tipsevi za mikropipete
- Staklene pipete (1 mL i 10 mL)

- Propipeta
- Mikropipete (100 µL i 1000 µL)
- Kivete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Eppendorfice (1,5 mL)
- Stalak za eppendorfice
- Stalak za epruvete
- Bunsenov plamenik
- Pinceta

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Izolacija i čuvanje vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis*

Uzorci vina izuzeti iz različitih faza proizvodnje crnih vina su nacijepljeni na selektivnu *Brettanomyces* podlogu. Nacjepljene podloge su inkubirane pri 24 °C 7 – 10 dana. Kolonije koje su pokazale mikroskopsku morfologiju tipičnu za *Brettanomyces bruxellensis*, izdvojene su sa podloga i napravljeno je dodatno pročišćavanje kolonija, uzastopnom tehnikom razmazivanja na selektivnoj *Brettanomyces* podlozi. Sakupljeno je 10 vinskih izolata (K11, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K21 i K22), koji su pohranjeni u 20%-tnom (v/v) glicerolu na - 80 °C.

### 3.2.2. Priprema starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* za rast u YPD podlozi s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

Čiste kulture vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* su sterilno prenesene u 10 mL YPD podloge i inkubirane na temperaturi od 28 °C oko 2 dana.

### 3.2.3. Priprema starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* za rast u sintetskom modelnom vinu (SWM) s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

Uzgoj vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* proveden je u nekoliko koraka kako bi se kvasac postupno adaptirao na alkohol prisutan u sintetskom modelnom vinu: Izolati kvasca *B. bruxellensis* su prvotno uzgojeni u termostatu pri 28 ºC u 10 mL tekuće YPD podloge koja je nacijepljena dodatkom čiste kulture pojedinog izolata kvasca *B. bruxellensis* čuvane u 20%-tnom glicerolu. YPD podloga s 4% volumnih etanola inokulirana je s 10% tako uzgojene kvaščeve suspenzije. Zatim je 10% kvaščeve suspenzije iz YPD podloge s 4% vol. etanola preneseno u YPD podlogu s 8% vol. etanola, nakon čega je 10% kvaščeve suspenzije iz YPD podloge s 8% vol. etanola preneseno u YPD podlogu s 12% vol. etanola.

### 3.2.4. Inokulacija starter kultura vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis*

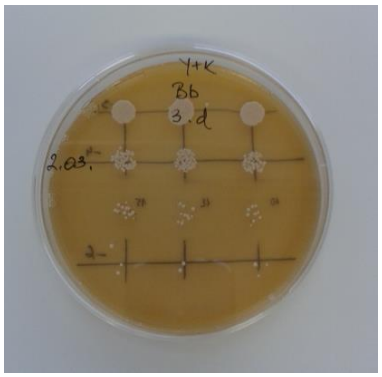
1 mL starter kulture svakog vinskog izolata kvasca *B. bruxellensis* je inokuliran u 200 mL tekuće YPD podloge s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline. Nakon postupne adaptacije na alkohol, starter kulture svakog vinskog izolata kvasca *B. bruxellensis* su inokulirane i u 200 mL SWM s 10 mg/L ρ-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline (slika 3.2.4.1.). Uzgoji su provedeni u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL s vatenim čepom pri temperaturi od 28 °C. Inicijalna populacija svakog vinskog izolata kvasca *B. bruxellensis* iznosila je oko 6 log CFU/mL.



Slika 3.2.4.1. Uzgoji u Erlenmayerovim tikvicama u YPD podlozi (lijevo) i SMW (desno)

### 3.2.5. Praćenje rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis*

Budući da je kvasac *B. bruxellensis* spororstući kvasac tijekom uzgoja stanica kvasca povećanje kvaščeve biomase je praćeno: mjerenjem optičke gustoće pri 640 nm (Agnolucci i sur. 2009.) te nacjepljivanjem na čvrste YPD podloge s *p*-kumarinskom kiselinom (slika 3.2.4.2.).




Slika 3.2.4.2. Brojanje kolonija referetnog vinskog izolata CBS 2499 kvasca *B. bruxellensis* na čvrstoj YPD podlozi uz dodatak *p*-kumarinske kiseline

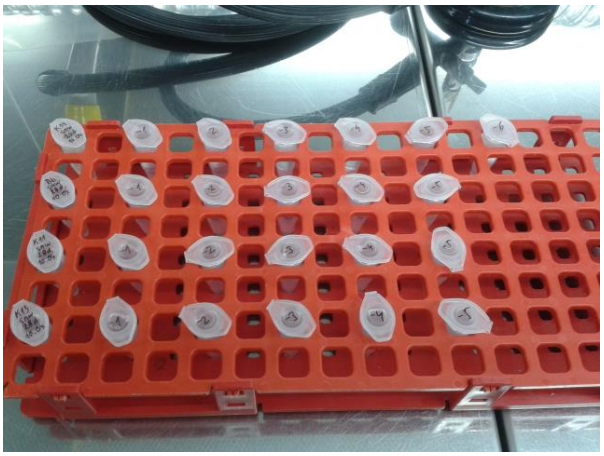
- Određivanje optičke gustoće stanica

Suspenzija stanica prenese se u kivetu od 1,5 mL nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 640 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Područje linearnosti spektrofotometra je između 0,2-1,0, te ukoliko je očitana vrijednost apsorbancije iznad tog područja, uzorak je nužno razrijediti i ponoviti mjerenje (Agnolucci i sur. 2009.).

- Određivanje brojnosti kvasca *B. bruxellensis*

Decimalna razrjeđenja su pripremljena u plastičnim kivetama na način da je volumen od 100 µL izuzetog uzorka pomiješan s 900 µL sterilne fiziološke otopine za prvo razrjeđenje. Volumen od 100 µL tako pripremljenog decimalnog razrjeđenja prenesen je u novu fiziološku otopinu volumena 900 µL kako bi se dobilo drugo decimalno razrjeđenje. Postupak je ponavljan do četvrtog razrjeđenja (slika 3.2.4.3.). Volumeni od 10 µL svakog decimalnog razrjeđenja su potom nacijepljeni na čvrste YPD podloge. Nakon 7 – 10 dana inkubacije pri 24 ˚C izbrojane su izrasle kolonije u onom decimalnom razrjeđenju unutar kojeg je poraslo između 10 i 50 kolonija. Broj poraslih kolonija (engl. *Colony Forming Units*, CFU), predstavlja srednju vrijednost tri paralelna nacjepljenja. Na osnovu izbrojenih kolonija izračunat je broj stanica kvasaca u mL YPD ili SWM. Ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica (log CFU/mL). Formula za izračun broja stanica:

$$CFU = \frac{broj\ poraslih\ kolonija}{upotrebljeni\ volumen\ uzorka} \times recipročna\ vrijednost\ decimalnog\ razrjeđenja$$

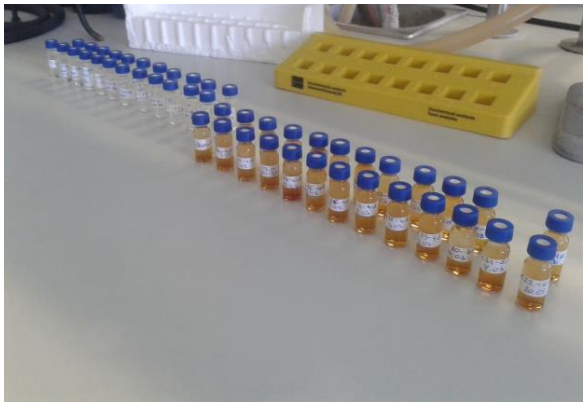


Slika 3.2.4.3. Postupak pripreme decimalnih razrjeđenja tijekom određivanje brojnosti populacije izolata kvasca *B. bruxellensis*

## 3.2.6. Priprema uzoraka za FTIR, GC/MS i HPLC analizu

Na kraju eksponencijalne faze rasta i tijekom stacionarne faze rasta (5 dana nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta) biomasa određenog vinskog izolata kvasca *B.*

*bruxellensis* je odcentrifugirana pri 4000 o/min u trajanju od 10 minuta. Supernatanti (slika 3.2.4.4) su pohranjeni na -20 ºC za kasnije FTIR, HPLC i GC/MS analize.



Slika 3.2.4.4. Prikaz supernatanta za HPLC analizu

## 3.2.7. GC/MS analiza hlapivih fenola

Hlapivi fenoli su ekstrahirani mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME) i analizirani plinskom kromatografijom u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC/MS), korištenjem uređaja Agilent Gas Chromatography 6890 sa 5973 *Inert mass selective* detektorom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME) hlapivi fenoli su adsorbirani na polimerno vlakno, 100 µm polidimetilksiloksan (PDMS). 10 mL uzorka sa standardom (0,5 mg/L p-krezola) stavljeno je kivetu od 20 mL, sa natrijevim kloridom (2 g) i zatvoreno s metalnim i silikonskim poklopcem (PTFE *septum*). Vlakno je bilo izloženo uzorku 30 minuta na 40 °C uz konstantno miješanje uzorka. Slijedila je termalna desorpcija u injektoru, 5 minuta na 250 °C.

Ciljani spojevi odvojeni su plinskom kromatografijom pri čemu je bila korištena kapilarna kolona BP20, dimenzija 50 x 220 µm, sa filmom debljine 0,25 µm. Temperatura detektora je 250 °C, a temperatura izvora iona (EI mod, 70 eV) 280 °C. Plin nositelj bio je helij 5.0 (Messer Croatia Plin d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Inicijalna temperatura bila je podešena na 40 °C i održavana je 5 minuta, zatim je porasla na 200 °C u trajanju 3 minute, te konačno na 240 °C sljedećih 30 minuta (Tomašević i sur. 2017). Hlapivi spojevi identificirani su i kvantificirani pomoću softvera *Enhanced Chemstation* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) i usporedbom prema retencijskom vremenu autentičnih standarda, te bazom podataka *Nist05 library* (Wiley & Sons, Hoboken, NJ, SAD). Identificirani hlapivi spojevi bili su 4-etil fenol i 4-etil gvajakol. Kvantifikacija je napravljena pomoću baždarne krivulje sa p-krezolom kao internim standardom.

### 3.2.8. HPLC analiza hidroksicimetnih kiselina

Prije samog injektiranja supernatanti su filitrirani kroz filter s porama veličine 0,45 µm. Analiza je provedena na HPLC uređaju serije 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sa automatski očitavanjem uzoraka (autosampler HiP-ALS G1367B), binarnom pompom (SL G1312B), diodnim detektorom (DAD SL G1315C) povezanih s softerom (Agilent Chemstation data analysis software). Izdvajanje hidroksicimetnih kiselina učinjeno je pomoću kolone *Phenomenex Gemini* C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 µm). Analiza je ponovljena tri puta i izražena kao srednja vrijednost u mg/L. Prilikom analize, mobilnu fazu činili su otapalo A: voda/mravlja kiselina i otapalo B: metanol, uz sljedeći gradijent : 5 – 12% B kroz period 0 – 12 min, 12 – 14% B za 12 – 18 min, 14 – 25% B za 18 – 30 min, 25 – 100% B za 30 – 31 min, 100% B za 31 – 34 min, 100 – 5% B za 34 – 35 min, sa re-ekvilibracijom, to jest uravnotežavanjem kolone od 35 – 40 min, prema inicijalnim uvjetima. Hidroksicimetne kiseline analizirane su u uvjetima: protok od 1 mL/min, temperatura 25 °C, volumen injektiranja 20 µL, te detekcija pri 280 i 320 nm (Komes i sur. 2007). Identifikacija hidroksicimetnih kiselina provedena je usporedbom njihovog retencijskog vremena i UV spektra u odnosu na odgovarajuće standarde. Kvantitativno određivanje provedeno je prema kalibracijskim krivuljama (*p*-kumarinska kiselina y = 76,113 x – 1,568, $R^2$ = 0,9999; ferulinska kiselina y = 66,287 x – 8,548, $R^2$ = 0,9999).

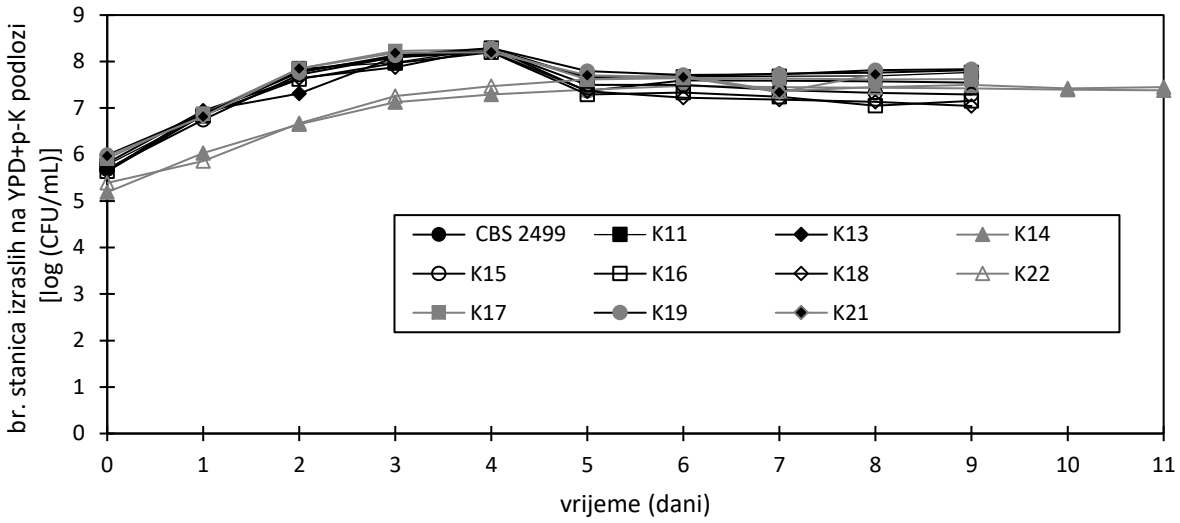
### 3.2.9. FTIR metoda za određivanje octene kiseline

Fouier-ova transformacija infracrvene spektroskopije (Fouirer Transform Infrared Spectroscopy) koristila se za određivanje hlapive kiselosti odnosno octene kiseline prisutne u supernatantima. Korišten je uređaj FTIR-spektrometar Bacchus II, Microdom, sa automatskim uzimanjem uzoraka (*autosampler*).

# 4. Rezultati i rasprava

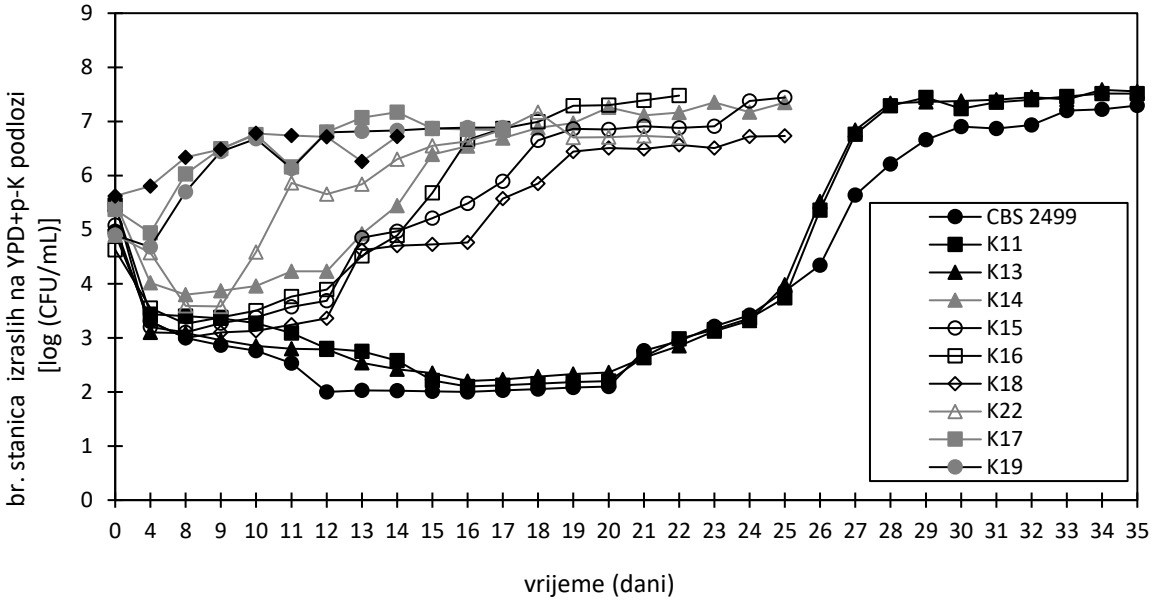
## 4.1. Rast vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* u YPD podlozi s kumarinskom i ferulinskom kiselinom te u SMW s kumarinskom i ferulinskom kiselinom

S ciljem utvrđivanja sličnosti odnosno razlika u rastu pojedinih vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* proveden je uzgoj izolata kvasca *B. bruxellensis* izoliranih iz hrvatskih crnih vina (tablica 3.1.1.1.) te izolata CBS 2499 izoliranog iz vina u Francuskoj u općoj kvaščevoj podlozi (YPD) i sintetskom modelnom vinu (SWM). Uzgoj ovih izolata proveden je u semi-anaerobnim uvjetima jer su to uvjeti koji su prisutni u proizvodnji vina.




Slika 4.1.1. Brojnost populacije vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* u YPD podlozi s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

YPD podloga sadži glukozu kao osnovni izvor ugljika, te pepton i kvaščev ekstrakt kao izvore dušika te vitamina i faktora rasta. Sastav YPD podloge osigurava dobar rast i metaboličku aktivnost izolata kvasca *B. bruxellensis*. Uzgojem u YPD podlozi većina izolata kvasca *B. bruxellensis* (slika 4.1.1.) je rasla podjednakom brzinom. Osam sojeva je završilo eksponencijalnu fazu rasta nakon 4 dana uzgoja (CBS 2499, K11, K13, K15, K16, K17, K18, K19), dok je jedan soj završio nakon 3 dana (K21), a preostala dva soja nakon 6 dana (K14 i K22) pri čemu su postigli brojnost od oko 7 log CFU/mL (slika 4.1.1.). Dosadašnjim istraživanjima uočeno je da brzina rasta odnosno potrošnja glukoze kod kvasca *B. bruxellensis* ovisi o prisutnosti kisika (Rozpędowska i sur. 2011.). Nadalje, budući da kisik povoljno utječe na rast kvasca *B. bruxellensis* posebnu pažnju je potrebno posvetiti kontroli mikrobiološke populacije tijekom provedbe mikrooksigenacije u proizvodnji vina (Wedral i sur. 2010.).




Slika 4.1.2. Brojnost populacije vinskih izolata kvasca B. *bruxellensis* u SWM s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

Također su navedeni izolati uzgojeni u sintetskom modelnom vinu (SWM) s 14% vol. alkohola. Sintetsko modelno vino po svom sastavu odgovara vinu nakon završetka alkoholne fermentacije (Serpaggi i sur. 2012.; Vigentini i sur. 2008.). Iako su svi izolati kvasca *B. bruxellensis* adaptirani na etanol, tijekom uzgoja u SWM rasli su različitom brzinom, odnosno različitom dinamikom su trošili šećere (glukozu i fruktozu). Zbog razlika u fiziološkim karakteristika sojevi su u različito vrijeme završili eksponencijalnu fazu rasta te ušli u stacionarnu fazu rasta pri čemu su postigli podjednaki broj stanica od oko 7 log CFU/mL (slika 4.1.2.). Izolatu K21 je bilo potrebno 9 dana rasta u SMW do kraja eksponencijalne faze rasta, a izolatima K17 i K19 je bilo potrebno 12 dana, dok izolatima K16 i K22, 17 dana. Najduže su rasli izolati K14, K15 i K18 kojima je bilo potrebno 20 dana odnosno izolati CBS 2499, K11 i K13 kojima je bilo potrebno 30 dana (slika 4.1.2.).

Uočene razlike u rastu izolata u YPD i SWM su vjerojatno posljedica različitog sastava medija, prvenstveno prisutnost alkohola u SWM mediju koji djeluje stresno na stanicu kvasca (Kheir i sur. 2013.). Tijekom rasta u SWM mediju sve izolate karakterizira duža faza adaptacije, tj. lag faza rasta. Produžena lag faza rasta je najduže trajala kod izolata CBS 2499, K11 i K13, odnosno 20 dana, dok je kod izolata K14, K15, K16 i K18 trajala 12 dana, te 9 dana kod izolata K22. Najkraću lag fazu imali su izolati K17, K19 i K21, 4 dana. Ranijim istraživanjem je također uočeno da porast volumnog udjela alkohola u mediju s 10 do 14% uzrokuje produženje lag faze odnosno faze adaptacije na uvjete u okolini (Oswald i Edwards 2017.).

## 4.2. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola

Metaboličke karakteristike tj. biokonverzija hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinske i ferulinske kiseline) u hlapive fenole (4-etil fenol i 4-etil gvajakol) praćena je na kraju eksponencijalne faze rasta i tijekom stacionarne faze rasta kvasca *B. bruxellensis* jer u navedenim fazama rasta dolazi do produkcije sekundarnih metabolita (hlapivih fenola) (Dias i sur. 2003.).

### 4.2.1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola u YPD podlozi s kumarinskom i ferulinskom kiselinom

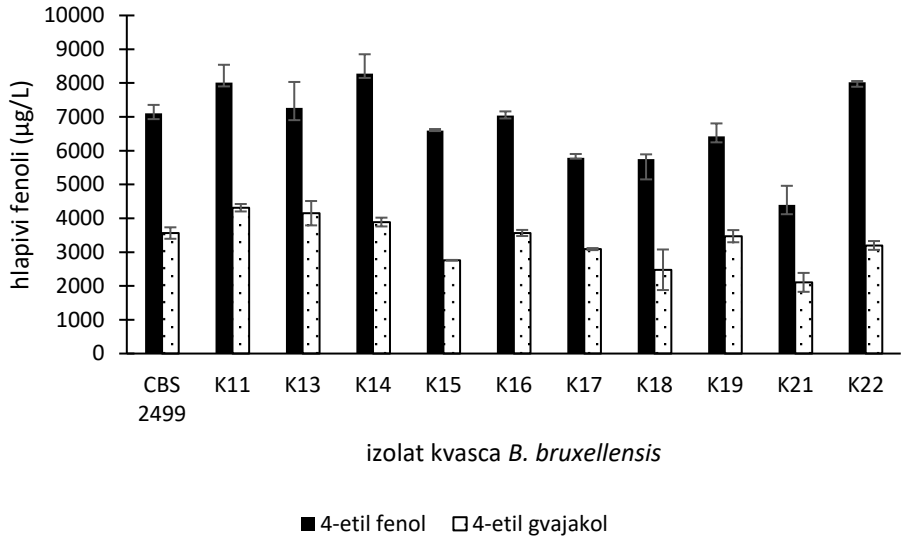
Početna koncentracija *p*-kumarinske kiseline u YPD podlozi je iznosila 10 mg/L odnosno 5 mg/L ferulinske kiseline jer su najviše koncentracije hidroksicimetnih kiselina u vinu 20 mg/L (Kheir i sur. 2013.).

Tablica 4.2.1.1. Koncentracija hidroksicimetnih kiselina na kraju eksponencijalne faze rasta vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* u YPD podlozi s 10 mg/L p-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

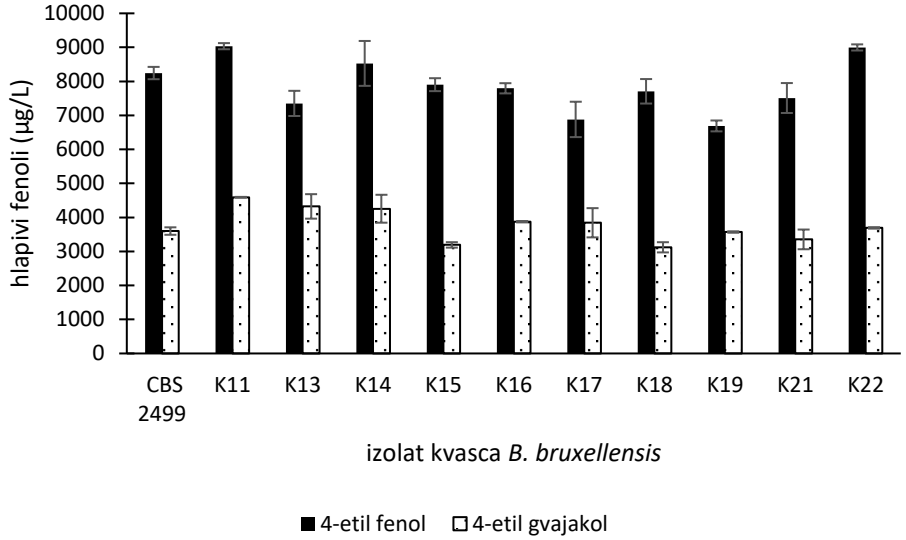
| Izolat | *p*-kumarinska kiselina (mg/L) | ferulinska kiselina (mg/L) |
|---|---|---|
| YPD bez kvasca | 10,1 ± 0,1 | 5,1 ± 0,5 |
| CBS 2499 | n.d. | n.d. |
| K11 | n.d. | n.d. |
| K13 | n.d. | n.d. |
| K14 | n.d. | n.d. |
| K15 | n.d. | n.d. |
| K16 | n.d. | n.d. |
| K17 | n.d. | n.d. |
| K18 | n.d. | n.d. |
| K19 | n.d. | n.d. |
| K21 | n.d. | n.d. |
| K22 | n.d. | n.d. |

n.d.-nije detektirano

Na kraju eksponencijalne faze rasta svi vinski izolati kvasca *B*. *bruxellensis* su u potpunosti potrošili *p*-kumarinsku kiselinu i ferulinsku kiselinu (tablica 4.2.1.1.) pa nije bilo potrebno pratiti koncentraciju navedenih hidroksicimetnih kiselina tijekom stacionarne faze rasta. Utvrđen je podjednaki trend potrošnje obje hidroksicimetne kiseline kod svih ispitivanih vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis*.




Slika 4.2.1.3. Koncentracija hlapivih fenola na kraju eksponencijalne faze rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* u YPD podlozi s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline.




Slika 4.2.1.4. Koncentracija hlapivih fenola u stacionarnoj fazi rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* u YPD podlozi s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

Poznato je da sastav podloge bez prisustva etanola osigurava potpunu aktivnost enzima hidroksicimetne dekarboksilaze i vinilfenol reduktaze koji sudjeluju u konverziji hidroksicimetnih kiselina u hlapive fenole (Kheir i sur. 2013.). Nadalje, kod svih ispitivanih izolata uočena je proizvodnja hlapivih fenola tijekom eksponencijalne (slika 4.2.1.3.) i stacionarne faze rasta (pet dana nakon kraja eksponencijalne faze rasta) (slika 4.2.1.4.). Produženim uzgojem tijekom stacionarne faze kod svih izolata kvasca *B. bruxellensis* je došlo do porasta koncentracije hlapivih fenola. Ulaskom u stacionarnu fazu rasta, pojedini izolati su postigli različite koncentracije 4-etil fenola i 4-etil gvajakola (slika 4.2.1.4.). Također je stupanj konverzije hidroksicimetnih kiselina u hlapive fenole različit kod pojedinih izolata. Tako stupanj konverzije *p*-kumarinske kiseline u 4-etil fenol iznosi od 67% kod izolata K19 do 90% kod izolata K11 i K22 dok je stupanj konverzije ferulinske kiseline u 4-etil gvajakol iznosi od 64% kod izolata K15 do 92% kod izolata K11. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Dias i sur. (2003.) koji su utvrdili kako je maksimalni stupanj konverzije *p*-kumarinske kiseline u 4-etil fenol u podlogama koje sadrže glukozu 92,5%.

### 1.1.1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina i hlapivih fenola u SWM s kumarinskom i ferulinskom kiselinom

Tablica 4.2.2.2. Koncentracija hidroksicimetnih kiselina na kraju eksponencijalne faze rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis* u SMW s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

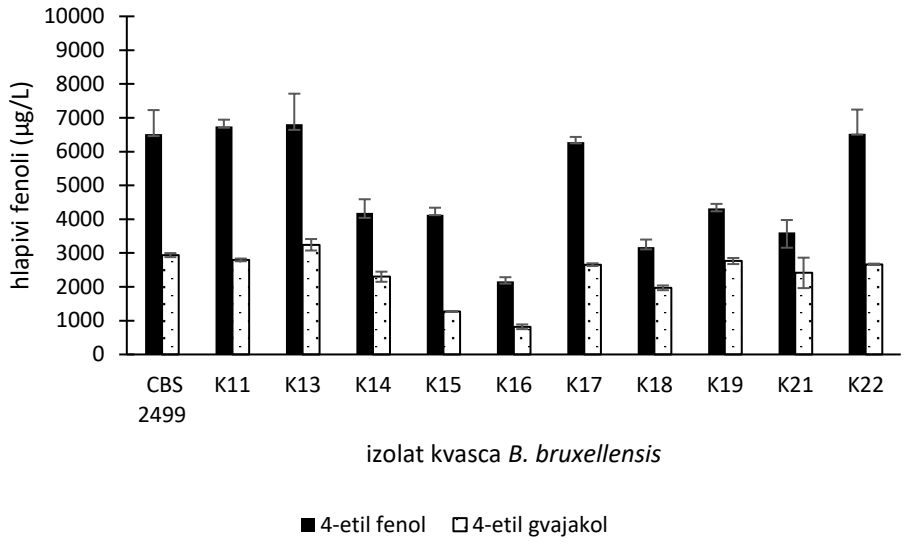
| izolat | *p*-kumarinska kiselina (mg/L) | ferulinska kiselina (mg/L) |
|---|---|---|
| SWM bez kvasca | 10,0 ± 0,1 | 5,1 ± 0,5 |
| CBS 2499 | 0,2 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 |
| K11 | 0,1 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K13 | 0,1 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K14 | 1,6 ± 0,1 | 1,1 ± 0,3 |
| K15 | 4,3 ± 0,2 | 2,9 ± 0,3 |
| K16 | 6,9 ± 0,7 | 3,6 ± 0,4 |
| K17 | 0,4 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K18 | 1,9 ± 0,4 | 1,7 ± 0,4 |
| K19 | 0,4 ± 0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K21 | 1,1 ± 0,1 | 0,7 ± 0,1 |
| K22 | 0,6 ± 0,1 | 0,7 ± 0,1 |

Nastanak hlapivih fenola ovisi o prisutnosti hidroksicimetnih kiselina i aktivne populacije kvasca *Brettanomyces* te sposobnosti različitih sojeva *B. bruxellensis* da proizvode i akumuliraju ove spojeve (Kheir i sur. 2013.).
Početna koncentracija *p*-kumarinske kiseline u SWM je iznosila 10 mg/L, odnosno 5 mg/L ferulinske kiseline. Na kraju eksponencijalne faze rasta nijedan soj nije u potpunosti potrošio *p*-kumarinsku kao ni ferulinsku kiselinu (tablica 4.2.2.2.). Odnosno nakon prestanka intezivnog rasta (na kraju eksponencijalne faze rasta) u SWM je zaostalo 0,1 do 6,9 mg/L *p*-kumarinske kiseline odnosno 0,5 to 3,6 mg/L ferulinske kiseline. Uočen je podjednaki trend potrošnje obje hidroksicimetne kiseline. Ipak, postoje razlike u potrošnji hidroksicimetnih kiselina ovisno o izolatu kvasca *B. bruxellensis*. Navedeni trend je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja (Kheir i sur. 2013.).

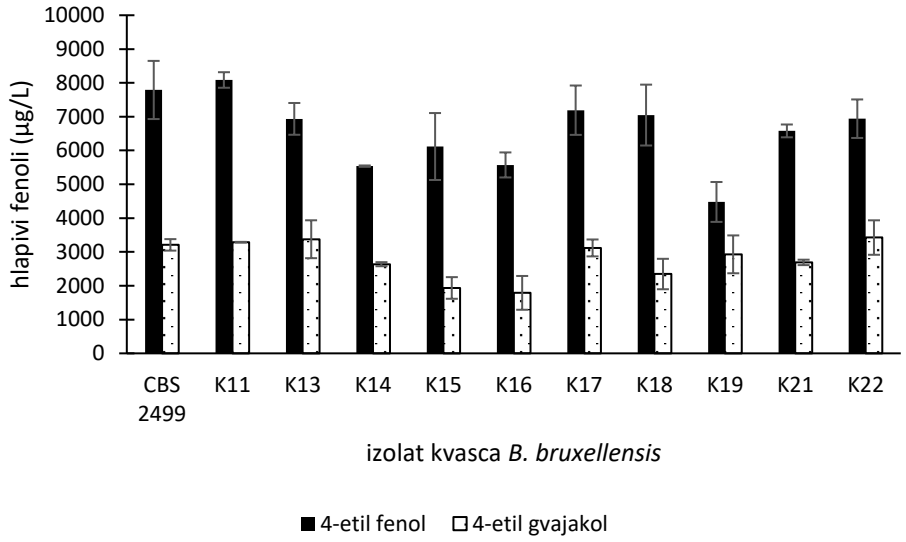
Tablica 4.2.2.3. Koncentracija hidroksicimetnih kiselina u stacionarnoj fazi rasta vinskih izolata kvasca B. bruxellensis u SWM s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

| izolat | *p*-kumarinska kiselina (mg/L) | ferulinska kiselina (mg/L) |
|---|---|---|
| YPD bez kvasca | 10,1 ± 0,1 | 5,1 ± 0,5 |
| CBS 2499 | <0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K11 | <0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K13 | <0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K14 | <0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| K15 | <0,1 | 0,7 ± 0,1 |
| K16 | <0,1 | 0,6 ± 0,1 |
| K17 | <0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| K18 | <0,1 | 0,5 ± 0,1 |
| K19 | <0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| K21 | 0,03 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 |
| K22 | <0,1 | 0,4 ± 0,3 |

Najviše *p*-kumarinske i ferulinske kiseline zaostalo je u SWM sa slijedećim kvascima *B. bruxellensis* K16, K15, K18, K14 i K21, dok je najmanja koncentracija navedenih kiselina zaostala u SWM u kojem su nacijepljeni izolati K11, K13, K17 te referentni izolat CBS 2499. Daljnim praćenjem rasta izolata kvasca *B. bruxellensis* tijekom stacionarne faze rasta utvrđeno je i daljnje smanjenje koncentracije analiziranih hidroksicimetnih kiselina. Pritom je koncentracija *p*-kumarinske kiseline iznosila manje od 0,1 mg/L, a ferulinske kiseline na 0,2 do 0,7 mg/L (tablica 4.2.2.3.).




Slika 4.2.2.5. Koncentracija hlapivih fenola na kraju eksponencijalne faze rasta vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* u SWM s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline



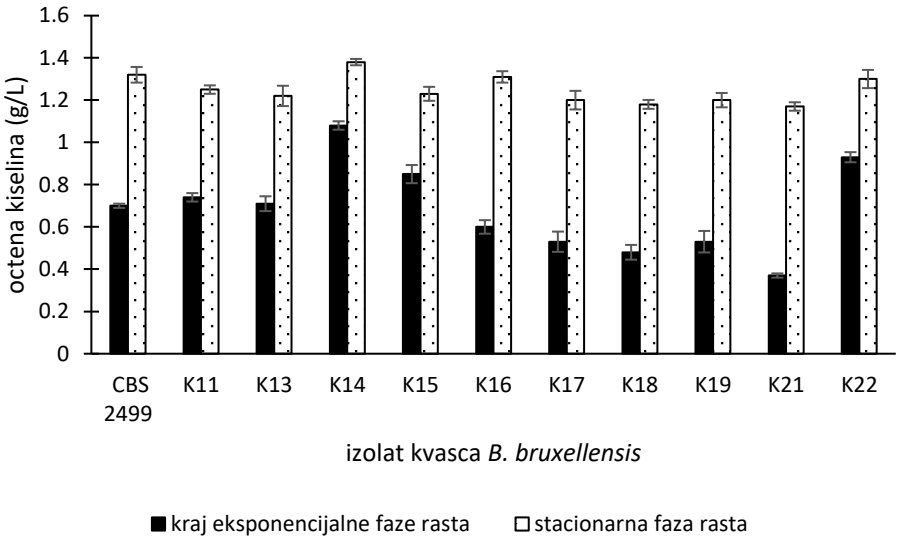

Slika 4.2.2.6. Koncentracija hlapivih fenola u stacionarnoj fazi rasta vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* u SWM s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline

Kod svih ispitivanih izolata utvrđena je proizvodnja hlapivih fenola tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta u SWM (slika 4.2.2.5. i slika 4.2.2.6.). Ulaskom u stacionarnu fazu rasta, različita produkcija 4-etil fenola i 4-etil gvajakola je utvrđena, ovisno o pojedinom vinskom izolatu (slika 4.2.2.6.). Također je stupanj konverzije hidroksicimetnih kiselina u hlapive fenole različit kod pojedinih izolata u stacionarnoj fazi rasta. Tako stupanj konverzije *p*-kumarinske kiseline u 4-etil fenol

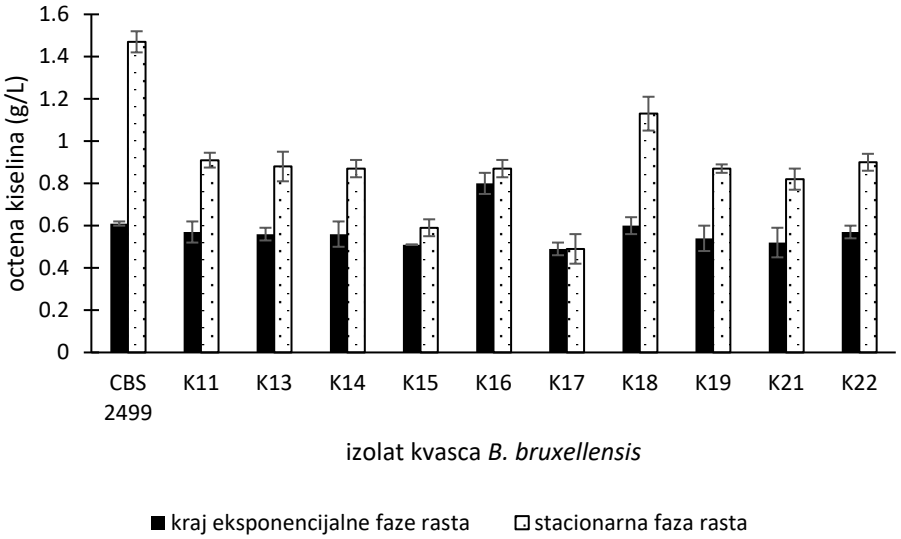
iznosi od 45% kod vinskog izolata K19 do 82% kod vinskog izolata K11, dok je stupanj konverzije ferulinske kiseline u 4-etil gvajakol u rasponu od 41% kod vinskog izolata K16 do 74% kod vinskog izolata K22. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Oelofse i sur. (2009.) koji su utvrdili kako se stupanj konverzije hidroksicimetnih kiselina u hlapive fenole mijenja ovisno o izvoru ugljika koji stanice kvasca *B. bruxellensis* koriste za svoj rast. Također su Dias i sur. (2003.) utvrdili kako je maksimalni stupanj konverzije *p*-kumarinske kiseline u 4-etil fenol u podlogama koje sadrže glukozu 92,5%, a u podlogama s etanolom 80%.

## 4.3. Sadržaj octene kiseline u YPD podlozi s kumarinskom i ferulinskom kiselinom te u SWM s kumarinskom i ferulinskom kiselinom

Osim proizvodnje hlapivih fenola praćen je i nastanak octene kiseline jer kvasac *B. bruxellensis* može proizvoditi i druge metabolite poput octene kiseline, kratkolančanih masnih kiselina te i-amil alkohola kao i njihove estere (Curtin i sur. 2013.).




Slika 4.3.7. Sadržaj octene kiseline u YPD mediju s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline tijekom rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis*




Slika 4.3.8. Sadržaj octene kiseline u SMW s 10 mg/L *p*-kumarinske kiseline i 5 mg/L ferulinske kiseline tijekom rasta vinskih izolata kvasca *B. bruxellensis*

Kod svih ispitivanih izolata utvrđena je proizvodnja octene kiseline tijekom eksponencijalne faze rasta u obje podloge, YPD i SWM (slika 4.3.7. i slika 4.3.8.). Produžetkom uzgoja izolata s kraja eksponencijalne faze rasta u stacionarnu fazu rasta povećava se proizvodnja octene kiseline tijekom stacionarne faze rasta kod svih izolata osim kod jednog izolata u SWM. Tijekom rasta izolata u YPD podlozi uočena je veća razlika u proizvodnji octene kiseline tijekom eksponencijalne faze rasta nego tijekom stacionarne faze rasta, kada je viša koncentracija octene kiseline uočena kod izolata CBS 2499, K14, K16 i K22 i iznosi oko 1,3 g/L u odnosu na ostale ispitane izolate (K11, K13, K15, K17, K18, K19 i K21) gdje iznosi oko 1,2 g/L. Nadalje proizvodnja octene kiseline se značajnije razlikuje kod izolata tijekom stacinarne faze rasta u SWM. U SWM, na kraju eksponencijalne faze svi izolati osim izolata K16 su proizveli oko 0,6 g/L octene kiseline dok je izolat K16 proizveo 0,87 g/L. Tijekom stacionarne faze rasta u SWM uočena je veća razlika u koncentraciji octene kiseline: koncentracija octene kiseline je iznosila oko 0,8 g/L za izolate K11, K13, K14, K16, K19, K21 i K22, oko 1,2 g/L za izolat K18, a 1,5 g/L kod izolata CBS 2499 dok se kod izolata K17 kocentracija octene kiseline nije promjenila u odnosu na kraj eksponencijalne faze rasta. Dosadašnjim istraživanjima je uočeno da većina sojeva kvasca *B*. *bruxellensis* koriste i glukozu i etanol za proizvodnju octene kiseline (Steensels i sur. 2015.).

# 5. Zaključak

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Većina hrvatskih vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* (K11, K13, K15, K16, K17, K18, K19) ima podjednaku dinamiku rasta u YPD podlozi kao i referetni izolat kvasca *B*. *bruxellensis* izoliran iz vina u Francuskoj, ali se međusobno razlikuju u metaboličkim karakteristikama (proizvodnji hlapivih fenola i octene kiseline).
2. Vinski izolati kvasca *B*. *bruxellensis* se međusobno razlikuju u dinamici rasta i metaboličkim karakteristikama (proizvodnji hlapivih fenola i octene kiseline) u sintetskom modelnom vinu (SWM). Prema fiziološkim i metaboličkim karakteristikama hrvatski vinski izolati K11 i K13 su najsličniji referetnom vinskom izolatu kvasca *B. bruxellensis* izoliranom iz vina u Francuskoj.
3. Vinski izolati kvasca *B*. *bruxellensis* razlikuju se prema trajanju lag faze rasta prilikom uzgoja u sintetskom modelnom vinu (SWM). Najkraću lag fazu imaju vinski izolati K17, K19 i K21, 4 dana, dok najdužu lag fazu imaju vinski izolati CBS 2499, K11 i K13, 20 dana. Stoga, vinski izolati se razlikuju i prema početku eksponencijalne faze, te ulasku u stacionarnu fazu rasta.
4. Tijekom rasta u YPD podlozi svi ispitani vinski izolati kvasca *B*. *bruxellensis* su u potpunosti metabolizirali hidroksicimetne kiseline prisutne u podlozi do kraja eksponencijalne faze rasta dok tijekom rasta u SWM ni tijekom stacionarne faze rasta hidroksicimetne kiseline nisu u potpunosti metabolizirane (ispod 0,1 mg/L).
5. Biokonverzija hidroksicimetnih kiselina (*p*-kumarinske i ferulinske kiseline) u hlapive fenole (4-etil fenol i 4-etil gvajakol) se odvija tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta svih ispitivanih vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis*. Prilikom rasta u YPD podlozi, odnosno u stacionarnoj fazi rasta izolata, stupanj konverzije kumarinske kiseline u 4-etil fenol iznosi od 67% (izolat K19) do 90% (izolati K11 i K22), dok stupanj konverzije ferulinske kiseline u 4-etil gvajakol iznosi od 64% (izolat K15) do 92% (K11). Tijekom rasta u SWM stupanj konverzije kumarinske kiseline u 4-etil iznosi od 45% (izolat K19) do 82% (izolat K11), dok je stupanj konverzije ferulinske kiseline u 4-etil gvajakol od 41% (izolat K16) do 74% (izolat K22).
6. Proizvodnja hlapivih fenola i octene kiseline ovisi o metaboličkim karakteristikama vinskih izolata kvasca *B*. *bruxellensis* kao i o sastavu podloge u kojoj vinski izolati rastu. Sastav podloge (prisutnost etanola) utječe na aktivnost enzima koji provode biokonverziju hidroksicimetnih kiselina do etilnih fenola.
7. Svi vinski izolati *B*. *bruxellensis* proizveli su octenu kiselinu tijekom eksponencijalne faze rasta u obje podloge, YPD i SWM. U YPD podlozi došlo je do većih varijacija u proizvodnji octene kiseline tijekom eksponencijalne faze rasta, dok su se u SWM veće razlike u proizvodnji octene kiseline pokazale tijekom stacionarne faze rasta izolata. U YPD podlozi, sadržaj octene kiseline

u stacionarnoj fazi rasta iznosi oko 1,2 – 1,3 g/L, dok sadržaj octene kiseline u SWM iznosi od 0,8 – 1,5 g/L. Veći sadržaj octene kiseline u oba medija, YPD i SWM, može biti u korelaciji sa semiaerobnim uvjetima uzgoja vinskih izolata, kod kojih prisustvo kisika može doprinjeti proizvodnji octene kiseline.

# 6. Literatura


1. Agnolucci M., Vigentini I., Capurso G., Merico A., Tirelli A., Compagno C., Foschino R., Nuti M. (2009). Genetic diversity and physiological traits of Brettanomyces bruxellensis strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. International Journal of Food Microbiology. 130(3): 238-244.

2. Agnolucci M., Rea F., Sbrana C., Cristani C., Fracassetti D., Tirelli A., Nuti M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by Brettanomyces/Dekkera bruxellensis. International Journal of Food Microbiology. 143(1–2): 76-80.

3. Bartowsky E. (2017) Microbiology of winemaking. Microbiology Australia. [online] <https://pdfs.semanticscholar.org>. Pristupljeno 29. lipnja 2018.

4. Benito S., Palomero F., Morata A., i sur. (2009). Factors affecting the hydroxyciamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera*/*Brettanomyces*: application for *Dekkera*/*Brettanomyces* control in red wine making. Journal of Food Science. 74: 15-22.

5. Blomqvist J., Passoth V. (2015). *Dekkera bruxellensis* – spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. FEMS Yeast Research. 15(21).

6. Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013). Analitičke metode u forenzici hrane. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition. 8(3-4), 90-101, [online] < https://hrcak.srce.hr/115923>. Pristupljeno 30. srpnja 2018.

7. Cindrić M., Marković A., Horvatić A. (2009). Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Medicina. [online] 45(3), 218-232, <https://hrcak.srce.hr/43663>. Pristupljeno 14. srpnja 2018.

8. Coulon J., Perello M. C., Lonvaud-Funel A., De Revel G., Renouf V. (2010). *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. Journal of Applied Microbiology. 108(4): 1450-1458.

9. Curtin C.D., Langhans G., Henschke P.A., Grbin P.R. (2013). Impact of Australian Dekkera bruxellensis strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. Food Microbiology. 36(2): 241-247.

10. Dias L., Pereira-da-Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. Food Microbiology. 20: 377-384.

11. Edinger W. (2010). Finding Brett Before It Finds You. Issue of Wines & Vines. [online] <https://www.winesandvines.com/features/article/79303/Finding-Brett-Before-It-Finds-You>. Pristupljeno 04. rujna 2018.

12. Edwards G. C., Oswald T. A. (2017). Interactive effects between total $SO_2$, ethanol and storage temperature against *Brettanomyces bruxellensis*. Letters in Applied Microbiology. doi: 10.1111/lam.12816 [online] 66(1), 71-76, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/lam.12816>. Pristupljeno 06. srpnja 2018.

13. Fallon A., Booth R. F. G., Bell L. D. (1987). The theory of HPLC U: Applications of HPLC in biochemistry. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 8-20.

14. Gracin L., Križanović S., Režek Jambrak A., Tomašević M., Kelšin K., Lukić K., Kovačević Ganić K. (2017). Monitoring the influence of high power ultrasound treatment and thermosonification on inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition 12(3-4): 107-112.

15. Grba S. (2010). Proizvodnja vina U: Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji (Orlić S., Jeromel A.) Plejada, Zagreb 131-185.

16. Günzler H., Gremlich H. U. (2006). Spektrometar U: Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Školska knjiga, Zagreb 41-65.

17. Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R. (2013). Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces*/*Dekkera* yeasts. European Food Research and Technology. 237(5): 655-671.

18. Komes D., Ulrich D., Kovačević Ganić K., Lovrić T. (2007). Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage. Journal of Grapevine Research. 46(2): 77-84.

19. Malfeito-Ferreira, M. (2018). Two Decades of „Horse Sweat“ Taint and *Brettanomyces* Yeasts in Wine: Where do We Stand Now? Beverages. [online] 4(2), <http://www.mdpi.com/2306-5710/4/2/32/htm>. Pristupljeno 06. Srpnja 2018.

20. Mrkonjić Fuka M. (2014). Lančana reakcija polimerazom (PCR) U: Molekularne metode u Mikrobnoj Agroekologiji. Priručnici/nastavni tekst Agronomskog fakulteta, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 10-18.

21. Oelofse A., Pretorius I. S., du Toit M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A Synoptic Review. South African Journal of Enology + Viticulture. [online] 29(2), 128-144, <http://www.sawislibrary.co.za/Textbase/sajev.htm>. Pristupljeno 07. srpnja 2018.

22. Oelofse A., Lonvaud-Funel A., Du Toit M. (2009). Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. Food Microbiology. 26(4): 377-385.

23. Oswald T. A., Edwards C. G. (2017). Interactions between storage temperature and ethanol that affect growth of *Brettanomyces bruxellensis* in Merlot wine. American Journal of Enology and Viticulture. [online] <http://dx.doi.org/10.5344/ajev.2017.16102>. Pristupljeno 14. srpnja 2018.

24. Rozpędowska E., Hellborg L., Ishchuk O.P., Orhan F., Galafassi S., Merico A., Woolfit M., Compagno C., Piškur J. (2011). Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in Saccharomyces and Dekkera yeasts. Nature Communications. doi:10.1038/ncomms1305 [online] 2:302, <https://www.nature.com/articles/ncomms1305>. Pristupljeno 30. srpnja 2018.

25. Rastija V., Medić-Šarić M. (2009). Kromatografske metode analize polifenola u vinima. Kemija u industriji. [online] 58(3), 121-128. <https://hrcak.srce.hr/32964> Pristupljeno 30. srpnja 2018.

26. ResearchGate (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. doi: 10.1007/0-387-37590-2_9, [online] <https://www.researchgate.net/publication/226147743>. Pristupljeno 14. srpnja 2018.

27. Serpaggi V., Remize F., Recorbet G., Gaudot-Dumas E., Sequeira-Le Grand A., Alexandre H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiology. 30: 438-447.

28. Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx G., Verachtert H., Verstrepen K. J. (2015). *Brettanomyces* yeast – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. International Journal of Food Microbiology. 206: 24-38.

29. Smith B. D., Divol B. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared fot the wine apocalypse and other beverages. Food Microbiology. 59: 161-175.

30. Schifferdecker A.J., Dashko S., Ishchuk O.P., Piškur J. (2014). The wine and beer yeast Dekkera bruxellensis. Yeast. 31(9): 323-332.

31. Šućur N., Čadež N., Košmerl T. (2016). Volatile phenols in wine: Control Measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. Acta agriculturae Slovenica. [online] 107(2), 453-472, <http://ojs.aas.bf.unilj.si/index.php/AAS/article/view/269/156>. Pristupljeno 07. srpnja 2018.

32. Tomašević M., Gracin L., Ćurko N., Kovačević Ganić K. (2017). Impact of pre-fermentative maceration and yeast strain along with glutathione and $SO_2$ additions on the aroma of Vitis vinifera L. Pošip wine and its evaluation during bottle aging. LWT-Food Science and Technology. [online] 81, 67-76, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817301810>. Pristupljeno 02. kolovoza 2018.

33. Valdetara F., Fracassetti D., Campanello A., Costa C., Foschino R., Compagno C., Vigentini I. (2017). A Response Surface Methodology Approach to Investigate the Effect of Sulfur Dioxide, pH, and Ethanol on DbCD and DbVPR Gene Expression and on the Volatile Phenol Production in *Dekkera*/*Brettanomyces bruxellensis* CBS2499. Frontiers in Microbiology. [online] 8, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601905/>. Pristupljeno 06. srpnja 2018.

34. Vigentini I., Romano A., Compagno C., Merico A., Molinari F., Tirelli A., Foschino R., Volonterio G. (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera*/*Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. FEMS Yeast Research. 8(7): 1087-1096.

35. Wedral D, Shewfelt R, Frank J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. LWT-Food Science and Technology. 43, 1474-1479.

**Internetske stranice:**

1. Web 1 https://www.google.hr/search?q=brettanomyces+detection+guide&rlz=1C1GGRV_enHR751HR751&oq=brett&aqs=chrome.0.69i59j69i57j69i60l4.3814j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8. Pristupljeno 04. rujna 2018.

# Životopis

Ana Marija Šelendić rođena je u Zagrebu, Republici Hrvatskoj, datuma 04.06.1993. godine. Srednju školu pohađala je u Zagrebu, opću gimnaziju „VII gimnazija“, Križanićeva ul. 4., u periodu 2008. – 2012. godine.
U periodu 2012. – 2018. godine, redovna je studentica Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Završila je prediplomski smjer Agroekologija, zatim upisala diplomski smjer Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.
Služi se engleskim i njemačkim jezikom na B2 razini u razumijevanju, govoru i pisanju. 2016. godine sudjelovala je na projektu „World in the city“, u organizaciji AIESEC Zagreb, gdje je učila francuski jezik u trajanju od 5 tjedana.
Poznaje rad na računalu, MS office.
Nekoliko godina bavila se folklorom u HKUD Prigorec.
Bavi se vježbanjem yoge i od 2018. godine pohađa školu za učitelja Zenyoge u Zagrebu.