

# Utjecaj kvasaca na sastav antocijana u vinu 'Trnjak'

---

Lavrić, Marina; Jeromel, Ana; Prusina, Tihomir; Preiner, Darko; Štambuk, Petra; Tomaz, Ivana; Jagatić Korenika, Ana-Marija

Source / Izvornik: **Zbornik radova 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, 2022, 569 - 574**

Conference paper / Rad u zborniku

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:582380>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



## Utjecaj kvasaca na sastav antocijana u vinu 'Trnjak'

Marina Lavrić<sup>1</sup>, Ana Jeromel<sup>2</sup>, Tihomir Prusina<sup>1</sup>, Darko Preiner<sup>2,3</sup>, Petra Štambuk<sup>2,3</sup>, Ivana Tomaz<sup>2,3</sup>, Ana-Marija Jagatić Korenika<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Mostaru, Biskupa Čule bb, Mostar, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup>Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska  
(amjagatic@agr.hr)

<sup>3</sup>Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska

### Sažetak

*Saccharomyces cerevisiae* najčešće je korištena vrsta kvasca u vinarskoj proizvodnji dok je vrsta *Lachancea thermotolerans* noviji pripadnik selekcioniranih ne-*Saccharomyces* kvasaca. Ističe se sposobnošću zakiseljavanja moštova niže ukupne kiselosti, iz toplih vinogradarskih regija, najčešće u sekvencijalnoj inokulaciji sa *S. cerevisiae*. Formiranje boje vina i sastav antocijana tijekom vinifikacije pod utjecajem su kvasaca, odnosno adsorpcijskih karakteristika stanične stijenke kvasca. Cilj ovog rada bio je utvrditi razlike u učinku sekvencijalne inokulacije komercijalnim sojevima *L. thermotolerans* x *S. cerevisiae* u usporedbi s tretmanima sa *S. cerevisiae* i epifitnim kvascima, na sastav antocijana u vinu 'Trnjak'. Rezultati analiza ukazali su na značajno niže koncentracije antocijana u tretmanu *L. thermotolerans* x *S. cerevisiae*.

**Ključne riječi:** antocijani, *Lachancea thermotolerans* ne-*Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, sekvencijalna fermentacija

### Uvod

*Saccharomyces cerevisiae* (*Sc.*) tradicionalno se najčešće koristi u proizvodnji vina zbog iznimnih fermentabilnih sposobnosti u širokom rasponu uvjeta provođenja alkoholne fermentacije. Posljednjih godina, selekcija kvasaca uključuje razvoj tehnika za selekciju sojeva koji bi mogli poboljšati vina u smislu njihove boje, strukture, mirisa i određenih zdravstvenih svojstava (Suárez-Lepe i Morata, 2012.). Među novim selekcijama ne-*Saccharomyces* kvasaca, *Lachancea thermotolerans* (*Lt.*) ističe se sposobnošću zakiseljavanja moštova iz toplih vinogradarskih regija, s višom pH vrijednosti. Sekvencijalna fermentacija s *Lt.* x *Sc.* rezultira snižavanjem pH vrijednosti i povećanjem ukupne kiselosti temeljem sinteze L-mliječne kiseline što doprinosi proizvodnji uravnoteženih vina. *Lt.* osigurava alkoholnu jakost u rasponu od 5–9 % vol., a prema novijim podacima i do 10 % vol. alkohola (Hranilović i sur. 2018.), pa se 24-72 h kasnije sekvencijalno inokulira *S. cerevisiae* zbog potpune fermentacije šećera (Morata i sur., 2019.). *Lt.* može preživjeti nekoliko dana pri 9 % vol. alkohola (Kapsopoulou, 2007.), a postojana je i kad fermentacijom dominira *Sc.* (Mills i sur., 2002.). Općenito, boja mladih crnih vina uglavnom se oslanja na koncentraciju monomernih antocijana i srodnih spojeva, koji se ekstrahiraju iz kožice bobe grožđa tijekom proces maceracije (Ribereau-Gayon i sur., 2006.) Uloga koju imaju stanične stijenke kvasca u formiranju antocijana je njihova adsorpcijska sposobnost koja je posljedica kemijske interakcije između kvasca i metabolita koje kvasci proizvode tijekom alkoholnog vrenja (Morata i sur., 2003.). Zadržavanje pigmenta u staničnoj stijenci kvasca predstavlja izravan gubitak boje (Morata i sur., 2016.).

Kvasci mogu utjecati na boju vina smanjenjem pH vrijednosti, pogodujući stvaranju stabilnih pigmenata kao što su piranoantocijanini (Morata i sur., 2006.; Morata i sur., 2007.) ili polimerni pigmenti (Escott, 2018.), smanjujući adsorpciju antocijana u staničnim stjenkama (Suárez-Lepe, 2012.) ili štiteći antocijane od oksidativnog oštećenja oslobađajući reduktivne spojeve poput glutationa tijekom fermentacije i dozrijevanja na talogu (Morata i sur., 2016.). Mliječna kiselina koju sintetizira *Lt.* tijekom fermentacije može snažno utjecati na kiselost uz smanjenje od 0,3-0,5 pH jedinica u nekim slučajevima, pa s time može značajno utjecati na boju vina (Morata i sur., 2019.). Apsorpcija antocijana u staničnim stjenkama kvasca može biti između 3 i 6 % ukupne koncentracije u vinu (Morata i sur., 2006.). Kad je u pitanju vrsta *Sc.* apsorpcija ovisi o soju (Morata i sur., 2003.), a kod *non-Saccharomyces* kvasaca ovisi o vrsti. U usporedbi s drugim vrstama, *Lt.* je pokazala srednje visok kapacitet apsorpcije (Morata i sur., 2016.). Neovisno o njihovom apsorpcijskom ponašanju tijekom fermentacije vina, oštećene stanice kvasca pokazale su istu sposobnost apsorpcije antocijana, što ukazuje na to da se sve veće razlike između apsorpcijskih sposobnosti određenih sojeva kvasaca, utvrđuju prema njihovoj sposobnosti da održe vitalnost stanice, kao i integritet stjenke i membrane tijekom fermentacije vina (Echeverrigaray i sur., 2020.).

'Trnjak crni' je sorta s još uvijek nedovoljno istraženim podrijetlom. Smatra se autohtonom sortom Imotske krajine i zapadne Hercegovine. Ističe se manjim prinosem i izrazito kvalitetnim sastavom mošta i vina. Uz visoku koncentraciju šećera od 20-26 % i nižu do srednju koncentraciju ukupnih kiselina (4,5-6 gL<sup>-1</sup>) ovisno o godini i terminu berbe, karakterizira ga i visoka koncentracija polifenola. Vina su stoga puna, ekstraktivna, s koncentracijom alkohola od 12-15 % vol, intenzivno rubinske boje i vrlo ugodne arome (Mirošević i Turković, 2003., Sokolić, 2006., Maletić i sur., 2015.), ponekad neharmonična zbog niske ukupne kiselosti.

Cilj ovog rada bio je utvrditi razlike u učinku sekvencijalne inokulacije komercijalnih sojeva *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* te tretmana sa sojem *S. cerevisiae* u odnosu na epifitne kvasce u spontanoj fermentaciji na pH vrijednost i sastav antocijana u vinu 'Trnjak'.

### Materijali i metode

Kvasci korišteni za pokretanje alkoholne fermentacije masulja sorte 'Trnjak' u kontrolnom tretmanu (i) *Spont.* bili su epifitni kvasci (spontana fermentacija), u (ii) *Lt.xSc.* primijenjena je sekvencijalna inokulacija s *Lt.* (Laktia, Lallemend) x *Sc.* (BDX, Lallemend), a (iii) *Sc.* inokuliran je sa *Sc.* sojem (Fermol Premier Cru, AEB).

Grožđe sorte 'Trnjak' s položaja Potpolje (Mostarsko vinogorje, BiH) berbe 2021., korišteno je u istraživanju. Ukupno 150 kg grožđa je prerađeno, homogenizirano i podijeljeno u 3 plastične posude zapremine 60 L te sulfitirano s 5%-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Proces maceracije masulja trajao je 8 dana uz redovitu remontažu masulja svakih 12 sati. Osnovni parametri u moštu bili su 89 °Oe, ukupna kiselost 6,3 gL<sup>-1</sup> (kao vinska), a pH vrijednost 3,45. Tretman (i) *Spont.* kao kontrolna varijanta sulfitirana je s 50 mL 5%-tne H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; tretman (ii) *Lt. x Sc.* sulfitiran je s 10 mL 5%-tne H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> te inokuliran s kvascem *L. thermotolerans* (Laktia, Lallemend; 15g 50kg<sup>-1</sup>), a nakon 24 h uslijedila je inokulacija sa *S. cerevisiae* (BDX, Lallemend; 15g 50kg<sup>-1</sup>). Tretman (iii) *Sc.* sulfitiran je s 50 mL 5%-tne H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> te inokuliran sa *S. cerevisiae* kvascem (Fermol Premier Cru, AEB; 15g 50 kg<sup>-1</sup>). Nakon 8 dana maceracije i alkoholne fermentacije, masulji sva tri tretmana prešana su hidrauličnom prešom te je mošt u fermentaciji svakog pojedinog tretmana raspodijeljen u tri ponavljanja, otakanjem u staklene posude volumena 10 L s vrenjačom, u kojima je nastavljena alkoholna fermentacija. U prvom pretoku, nakon završene fermentacije, izvršena je korekcija sulfita s 10 mL 5%-tne H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva provedena je pomoću tekućinskogromatografskog sustava (Agilent 1100) na fenil-heksilnoj koloni (Phenomenex, SAD)

Kromatogrami su istovremeno bilježeni detektorom s nizom dioda i fluorescencijskim detektorom. Identifikacija sastavnica vina provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni te pripadnih UV-Vis spektara i fluorescencije na karakterističnim valnim duljinama ekscitacije i emisije s vremenima zadržavanja, spektrima i fluorescencijom standardnih spojeva. Masene koncentracije identificiranih spojeva određene su pomoću baždarnih krivulja načinjenih analizom vanjskog standarda (Tomaz i Maslov, 2016.). pH vrijednost vina određena je mjerenjem na digitalnom pH-metru (Lab 845, SI Analytics),

Korištene statističke analize podataka uključivale su analizu varijance (ANOVA i t-test), pri čemu se srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički razlikuju pri  $p \leq 0,05$ . Za analizu ukupne varijabilnosti sadržaja pojedinačnih antocijana i pH vrijednosti kod analiziranih uzoraka vina korištena je i analiza glavnih komponenti (PCA) primjenom statističkog programa XLSTAT v.2022.1.1. (Addinsoft).

### Rezultati i rasprava

Prva istraživanja s *L. thermotolerans* i crnim vinima rezultirala su značajnim povećanjem (~10%) intenziteta boje u sekvencijalnim fermentacijama sa *S. cerevisiae* u usporedbi sa samostalnim *S. cerevisiae* tretmanom (Benito i sur., 2015., 2017.). Ta pojava pripisuje se jačem intenzitetu boje antocijana pri nižoj pH vrijednosti i povećanom stvaranju mliječne kiseline tijekom fermentacije s *Lt.* Kasnija istraživanja pokazuju smanjenje sadržaja antocijana u vinu u fermentaciji s *Lt.* uz povećanje udjela pojedinih antocijana (Benito i sur., 2019.). Analiza rezultata pojedinačnih antocijana (Tablica 1.) obuhvaćala je četiri glukozidna, te četiri alkilirana antocijana pri čemu je zabilježena značajna razlika u njihovom ukupnom udjelu na razini tretmana te značajno najveći udio u tretmanu *Spont.* Slične rezultate objavili su Del Fresno i sur. (2017.) i Escott i sur. (2018.) dok su Hranilović i sur. (2017.) zabilježili značajno povećanje antocijana u tretmanu s *Lt.*

Malvidin-3-glukozid bio je najzastupljeniji antocijan u svim tretmanima, s najnižom koncentracijom u tretmanu sekvencijalne fermentacije *Lt. x Sc.* Isti tretman bilježi i najniže koncentracije glukozidnog i alkiliranog petunidina što je u skladu s istraživanjem Escribano Viana i sur. (2019.), ali značajno najviše peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-acetilglukozida, što je u odnosu na tretman *Sc.*, u skladu s prethodnim istraživanjima (Escott i sur., 2018., Chen i sur., 2018.). Niži sadržaj ukupnih antocijana kod tretmana *Lt. x Sc.* može se povezati sa značajno nižom vrijednosti pH, a koji ima važnu ulogu u brzini reakcija polimerizacije i kopigmentacije polifenolnih spojeva (He i sur. 2012.).

Rezultati pojedinačnih antocijana obrađeni su i analizom glavnih komponenata (Grafikon 1.). Temeljem položaja tretmana u koordinatnom sustavu definiranog s prve dvije glavne komponente koje objašnjavaju preko 90 % ukupne varijabilnosti te korelacije sadržaja pojedinačnih i ukupnih antocijana te pH vrijednosti vina, vidljivo je kako vina spontane fermentacije odlikuje viši sadržaj većine antocijana i niži sadržaj malvidin-3-*O*-acetilglukozida u odnosu na vina oba tretmana. Specifičnost tretmana, *Lt. x Sc.* dodatno je visok sadržaj malvidin-3-*O*-acetilglukozida dok tretman *Sc.* ponajviše definira najviša pH vrijednost, te niži sadržaj svih antocijana osim malvidin-3-*O*-glukozida.

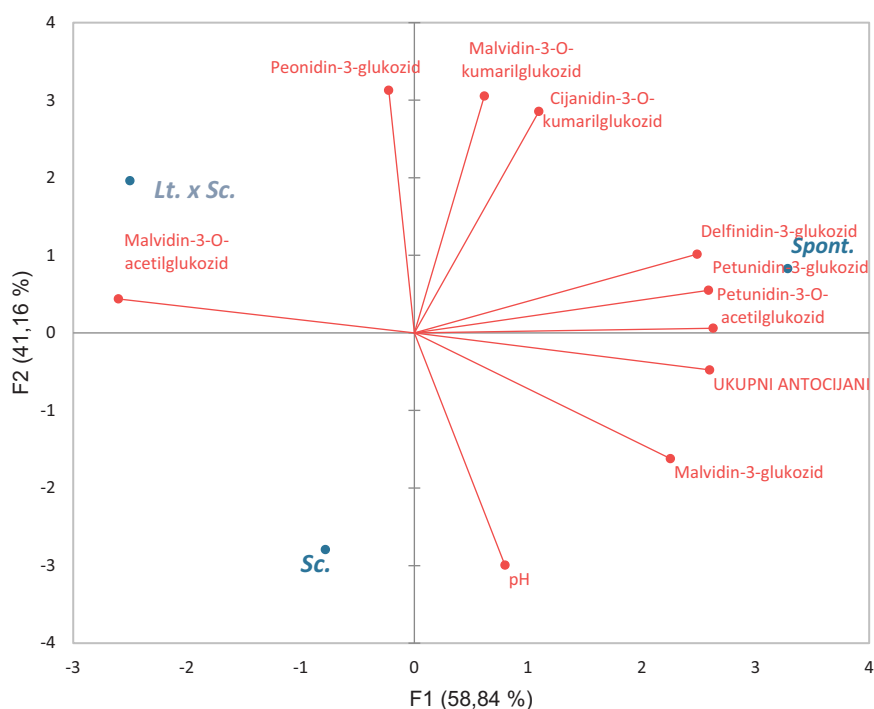
### Zaključak

Analizom rezultata fermentacijskog pokusa s tri različita tretmana, utvrđene su značajne razlike s obzirom na istraživane parametre. Vino 'Trnjak' iz tretmana sekvencijalne fermentacije s kvascima *L. thermotolerans x S. cerevisiae* imao je značajno najniži sadržaj pojedinačnih antocijana u usporedbi s ostalim tretmanima. Isti tretman značajno je utjecao na smanjenje pH vrijednosti što je jedan od glavnih učinaka primijenjene kombinacije kvasaca u sekvencijalnoj fermentaciji.

Tablica 1. Koncentracija pojedinačnih antocijana i pH vrijednost u vinu 'Trnjak' berbe 2021.

Spoj (mgL <sup>-1</sup> )	<i>Spont.</i>	<i>Lt. x Sc.</i>	<i>Sc.</i>
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	0,25 a	0,01 b	0,00 b
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	2,43 a	1,31 c	1,45 b
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,85 b	2,55 a	0,36 c
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	118,32 a	106,06 b	115,61 a
Petunidin-3- <i>O</i> -acetilglukozid	6,14 a	0,53 c	2,10 b
Malvidin-3- <i>O</i> -acetilglukozid	22,08 b	23,02 a	22,62 ab
Cijanidin-3- <i>O</i> -kumarilglukozid	0,19 a	0,16 a	0,05 b
Malvidin-3- <i>O</i> -kumarilglukozid	6,78 a	6,78 a	5,86 b
Σ	158,05 a	140,42 c	148,04 b
pH vrijednost	3,7 b	3,63 c	3,76 a

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost (n=3). Značajne razlike pri  $p \leq 0,05$  prikazane su različitim slovima (a,b,c) u istom redu. *Spont.*=spontana fermentacija; *Lt. x Sc.*= sekvencijalna fermentacija *L. thermotolerans* x *S. cerevisiae*; *Sc.*= *S. cerevisiae*



*Spont.*=spontana fermentacija; *Lt. x Sc.*= sekvencijalna fermentacija *L. thermotolerans* x *S. cerevisiae*;  
*Sc.*= *S. cerevisiae*

Grafikon 1. Analiza osnovnih komponenti (PCA)- pojedinačni antocijani i pH vrijednost u vinu 'Trnjak'

## Literatura

- Benito Á., Calderón F., Benito, S. (2019). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality 540 parameters. *Fermentation* 5, 1–18.
- Benito Á., Calderón F., Benito S. (2017). The Combined Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*—Effect on the Anthocyanin Wine Composition. *Molecules*, 22, 739.
- Benito Á., Calderón F., Palomero F., Benito S. (2015). Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an

- alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules*. 20:9510–9523.
- Chen K., Escott C., Loira I., del Fresno J.M., Morata A., Tesfaye W., Calderon F., Suárez-Lepe J.A., Han S., Benito S. (2018). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol* 69:51–63.
- Del Fresno J.M., Morata A., Loira I., Banuelos M.A. Escott C., Benito S., Chamorro C. G., Suarez-Lepe J.A. (2017). Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *Eur. Food Res. Technol.*, 243, 2175–2185.
- Echeverrigaray S., Scariot F. J., Menegotto M., Longaray Delamare A. P. (2020). Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity. *Int. J. Food Microbiol.* 314:108383.
- Escott C., Del Fresno J. M., Loira I., Morata A., Tesfaye W., González M. C. (2018). Formation of polymeric pigments in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-*Saccharomyces* yeasts. *Food Chemistry*. 239: 975-983
- Escribano-Viana R., Portu J., Garijo P., López R., Santamaría P., López-Alfaro I. (2019). Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces/Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of Tempranillo wines. *Front. Microbiol.* 10:773.
- He F., Liang, N., Mu L., Hong-Pan Q., Wang J., Reeves M. J., Duan C. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17(2): 1483-1519.
- Hranilovic A., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Jiranek V., Albertin W. (2017). The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS ONE*, 12(9), Article 0184652.
- Hranilovic A., Gambetta J. M., Schmidtke L., Boss P. K., Grbin P. R., Masneuf-Pomarede I. (2018). Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Scientific Reports*, 8(1).
- Kapsopoulou K., Mourtzini A., Anthoulas M., Nerantzis E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 735–739.
- Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2015). Zelena knjiga Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb.
- Maletić E., Karoglan Kontić J., Preiner D., Jeromel A., Patz C.D., Dietrich H. (2009). Anthocyanin profile and antioxidant capacity of some autochthonous Croatian red wines. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 7(1): 48-51.
- Mills D.A., Johannsen E.A., Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in Botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4884–4893
- Mirošević N., Turković Z. (2003). Ampelografski atlas. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, Hrvatska
- Morata A., Escott C., Loira I., Del Fresno J.M., González C., Suárez-Lepe J.A. (2019). Influence of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in the Formation of Pyranoanthocyanins and Polymeric Pigments during Red Wine Making. *Molecules*. 24(24):4490.
- Morata A., Gómez-Cordovés M. C. Calderón, F., Suárez, J. A. (2006). Effects of pH, temperature and SO<sub>2</sub> on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 123–129.

- Morata A., Gómez-Cordovés M. C., Colomo B., Suárez J. A. (2003). Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409.
- Morata A., González C., Suárez-Lepe J. A. (2007). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 144–152.
- Morata A., Loira I., Heras J. M., Callejo M. J., Tesfaye W., González C. (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chem.* 197, 686–691.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. (2006). *Handbook of Enology*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Sokolić I. (2006). *Veliki vinogradarsko-vinarski leksikon*. Vlastita naklada, Novi Vinodolski, Hrvatska.
- Suárez-Lepe J. A., Morata A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 39–50.
- Tomaz I., Maslov L. (2016). Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Different Matrices using Phenyl-Hexyl Stationary Phase, *Food Analytical Methods*, 19(2): 401-410.

## **Influence of yeasts on anthocyanin composition of Trnjak wine**

### **Abstract**

*Saccharomyces cerevisiae* is the most commonly used selected yeast in wine production while among non-*Saccharomyces* yeast *Lachancea thermotolerans* is getting more attention. It stands out for its ability to acidify musts with higher pH values, especially from warm wine-growing regions. During vinification, the formation of wine color and anthocyanin composition can be influenced by yeast, ie. the adsorption characteristics of the yeast cell wall. The stability, aroma and color of wine depends on the yeast strain used during the fermentation process. Metabolites produced by *S. cerevisiae* or non-*Saccharomyces* yeasts can react with anthocyanins and by formation of pyrananthocyanins can have influence on the color intensity and stability. The aim of this study was to compare the influence of sequential inoculation of commercial strains of *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* with treatments with *S. cerevisiae* alone and epiphytic yeasts on the anthocyanin composition of Trnjak wine. The results of the analyzes indicated significantly higher concentrations of anthocyanins in treatments with *S. cerevisiae* and epiphytic yeasts.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans*, non-*Saccharomyces* yeasts, anthocyanins, sequential fermentation