

# Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom na inaktivaciju kvasaca *Brettanomyces bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae* i sadržaj polifenolnih spojeva u vinu

---

Mišković, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:731544>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018

Petra Mišković  
924/PI

**UTJECAJ TRETMANA VISOKIM  
HIDROSTATSKIM TLAKOM NA  
INAKTIVACIJU KVASACA  
*Brettanomyces bruxellensis* I  
*Saccharomyces cerevisiae* I SADRŽAJ  
POLIFENOLNIH SPOJEVA U  
VINU**

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 prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Stele Križanović.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina na pruženoj pomoći i korisnim savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem doc. dr. sc. Steli Križanović na nesebičnoj pomoći, stručnosti i prijateljstvu tijekom rada u laboratoriju bez koje ovog rada ne bi bilo.

Veliko hvala mojim roditeljima, obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i razgovorima u svim onim lijepim i manje lijepim trenucima.

Na kraju, hvala PBF porodici na najljepšim uspomjenama, dragim prijateljstvima i ljubavi.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Diplomski rad**  
**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### **UTJECAJ TRETMANA VISOKIM HIDROSTATSKIM TLAKOM NA INAKTIVACIJU KVASACA *Brettanomyces bruxellensis* I *Saccharomyces cerevisiae* I SADRŽAJ POLIFENOLNIH SPOJEVA U VINU**

*Petra Mišković 924/PI*

**Sažetak:** Zbog nepovoljnog utjecaja SO<sub>2</sub> na ljudsko zdravlje kao i pojave mikrobne rezistencije istražuju se nove ne toplinske tehnike poput visokog hidrostatskog tlaka (HHP) kao moguća alternativa u proizvodnji vina. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tretmana HHP na inaktivaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis* u crnom vinu i *Saccharomyces cerevisiae* u desertnom vinu te utjecaj provedenog tretmana na polifenolni sastav vina. Uzorci kontaminiranog vina tretirani su HHP tijekom 1, 3, 5, 15 i 25 minuta pri tlakovima od 100 i 200 MPa. Analize su provedene odmah nakon tretmana i tijekom skladištenja od 90 dana. Inaktivacija kvasaca praćena je nacjeppljivanjem uzoraka vina na selektivne čvrste podloge, dok su ukupni polifenoli i ukupni antocijani određivani spektrofotometrijskim metodama. Tretman pri 100 MPa tijekom 1-25 minuta nije imao utjecaja na promjenu brojnosti kvasaca *B. bruxellensis* odnosno *S. cerevisiae* u vinu dok je primjena tlaka od 200 MPa uz dulji tretman (15 i 25 minuta) uzrokovala kratkotrajnu (odmah nakon tretmana) inaktivaciju rasta kvasca *B. bruxellensis* i dugoročnu (tijekom skladištenja) inaktivaciju rasta kvasca *S. cerevisiae*. Primjenjeni tretmani nisu utjecali na promjenu polifenolnog sastava vina.

**Ključne riječi:** visoki hidrostatski tlak, kvasci, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, polifenolni spojevi

**Rad sadrži:** 53 stranice, 20 slika, 8 tablica, 104 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Stela Križanović

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Tomislav Bosiljkov
2. Prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić.
3. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
4. Doc.dr.sc. Natka Ćurko (zamjena)

Datum obrane: 19. srpanj, 2018

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Graduate Thesis**  
**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology

### **INFLUENCE OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE TREATMENT ON THE INACTIVATION OF *Brettanomyces bruxellensis* AND *Saccharomyces cerevisiae* YEASTS AND ON THE CONTENT OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WINE**

*Petra Mišković 924/PI*

**Abstract:** Since SO<sub>2</sub> has harmful effect on human health and microorganisms are becoming resistant to it, new nonthermal treatments such as high hydrostatic pressure (HHP) are being researched as possible alternatives in the wine industry. The aim of this work was to investigate the effect of HHP treatment on inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* yeast in red wine, on *Saccharomyces cerevisiae* yeast in sweet wine and on the content of phenolic compounds. Contaminated wine samples were treated with HHP for 1, 3, 5, 15 and 25 minutes with 100 and 200 MPa. The analyses were performed immediately after treatment and during storage of 90 days. Inactivation of yeast was monitored by inoculation of wine samples on the selective solid medium while the content of total phenolics and total anthocyanins were analysed by spectrophotometric methods. Influence of the treatment with 100 MPa for 1-25 minutes on *B. bruxellensis* population in red wine or *S. cerevisiae* population in sweet wine was not observed. Influence of longer treatments (15 and 25 minute) with 200 MPa on inactivation of *B. bruxellensis* yeast immediately after the treatment as well as on inactivation of *S. cerevisiae* yeast during storage period was observed. Applied treatments had no effect on the content of phenolics in wine.

**Keywords:** high hydrostatic pressure, yeasts, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, phenolic compounds

**Thesis contains:** 53 pages, 20 figures, 8 tables, 104 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Karin Kovačević Ganić, Full Professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Stela Križanović*

**Reviewers:**

1. PhD. Tomislav Bosiljkov, Assistant professor
2. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor
3. PhD. Jadranka Frece, Full professor
4. PhD. Natka Čurko, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 19th July, 2018

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....  | 2  |
| 2.1. VINO .....   | 2  |
| 2.1.1. Proizvodnja i potrošnja vina .....   | 2  |
| 2.1.2. Polifenolni spojevi u vinu .....   | 2  |
| 2.2. KVASCI UZROČNICI KVARENJA .....  | 4  |
| 2.2.1. Kvasac <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....   | 6  |
| 2.2.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 9  |
| 2.3. METODE ZA SPRJEČAVANJE RASTA NEPOŽELJNIH KVASACA .....                                     | 12 |
| 2.3.1. Sumporov dioksid (SO <sub>2</sub> ) .....  | 13 |
| 2.3.2. Dimetil – dikarbonat .....   | 14 |
| 2.3.3. Filtracija .....   | 14 |
| 2.3.4. Ozon .....   | 14 |
| 2.3.5. Pulsirajuće električno polje .....   | 15 |
| 2.3.6. Niskoelektrično pražnjenje .....   | 15 |
| 2.3.7. Ultrazvuk .....  | 15 |
| 2.3.8. Visoki hidrostatski tlak .....   | 16 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....  | 19 |
| 3.1. MATERIJALI .....   | 19 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi <i>Brettanomyces bruxellensis</i> i <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 20 |
| 3.1.2. Vino .....   | 20 |
| 3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga .....   | 20 |
| 3.1.4. Hranjive podloge .....   | 20 |
| 3.1.5. Instrumenti .....  | 23 |
| 3.1.6. Laboratorijsko posuđe i pribor .....   | 24 |
| 3.1.7. Kemikalije .....   | 24 |
| 3.2. METODE .....   | 25 |
| 3.2.1. Čuvanje i održavanje kvasca <i>B. bruxellensis</i> i <i>S. cerevisiae</i> .....          | 25 |
| 3.2.2. Uzgoj inokuluma .....  | 25 |
| 3.2.3. Priprema vina za tretman visokim hidrostatskim tlakom (HHP) .....                        | 25 |
| 3.2.4. Tretman visokim hidrostatskim tlakom (HHP) .....   | 26 |
| 3.2.5. Skladištenje uzoraka .....   | 27 |
| 3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca <i>B. bruxellensis</i> i <i>S. cerevisiae</i> .....     | 27 |
| 3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola .....                                       | 29 |
| 3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih antocijana .....                                       | 29 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 31 |



|   |    |
|---|----|
| 4.1. UTJECAJ TRETMANA HHP NA INAKTIVACIJU KVASCA <i>B. bruxellensis</i> U CRNOM VINU .....            | 31 |
| 4.2. UTJECAJ TRETMANA HHP NA INAKTIVACIJU KVASCA <i>S. cerevisiae</i> U DESERTNOM VINU .....          | 34 |
| 4.3. UTJECAJ TRETMANA HHP NA KONCENTRACIJU UKUPNIH POLIFENOLA I UKUPNIH ANTOCIJANA U CRNOM VINU ..... | 37 |
| 4.4. UTJECAJ TRETMANA HHP NA KONCENTRACIJU UKUPNIH POLIFENOLA U DESERTNOM VINU .....                  | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI .....  | 43 |
| 6. LITERATURA .....   | 44 |

# 1. UVOD

Tijekom fermentacije ili nakon završetka fermentacije u vinu mogu rasti neželjene vrste kvasaca. Nekontrolirani rast kvasaca u jednoj od navedenih faza vinifikacije može promijeniti kemijski sastav vina kao i senzorska svojstva vina poput boje, arome i mirisa vina. Ako dođe do velikih promjena, vino nije poželjno za konzumaciju. Prema tome, kontaminacija vina određenim vrstama kvasca predstavlja značajan problem tijekom procesa proizvodnje vina.

Jedan od glavnih uzročnika kvarenja crnih vina je kvasac *Brettanomyces bruxellensis* koji može značajno utjecati na senzorska svojstva vina, dok je u slučaju desertnih vina to kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Kvarenje uzrokovano ovim kvascima uzrokuje značajne ekonomske gubitke.

Postoje različiti načini sprječavanja rasta kvasaca uzročnika kvarenja vina, a najčešće se koristi sumporov dioksid (SO<sub>2</sub>). SO<sub>2</sub> ima široku upotrebu u proizvodnji vina kao antimikrobni agens, međutim posljednjih godina se nastoji smanjiti njegova količina u vinu zbog nepovoljnih utjecaja na zdravlje potrošača. Također, mnoge su vrste mikroorganizama razvile toleranciju na SO<sub>2</sub> što je dovelo do smanjenja antimikrobnih svojstava SO<sub>2</sub>. Upravo zbog navedenih razloga razvijaju se nove alternativne tehnike za suzbijanje rasta nepoželjnih kvasaca u vinu. Neke od tih tehnika su: pulsirajuće električno polje, niskoelektrično pražnjenje, ultrazvuk visokih snaga i visoki hidrostatski tlak.

Tehnika visokog hidrostatskog tlaka (HHP) je tehnika hladne pasterizacije prehrambenih proizvoda pri različitim tlakovima u točno određenom vremenu. U tehnici HHP raspodjela tlaka je jednolična i trenutna, ne dolazi do povećanja temperature tretiranog proizvoda te se uglavnom zadržavaju organoleptička i nutritivna svojstva proizvoda. Danas se na svjetskom tržištu mogu naći proizvodi koji su proizvedeni tehnikom HHP kao što su voće, povrće, voćni sokovi i druga pića.

Jedni od važnijih spojeva u vinu, iako prisutni u niskim koncentracijama, su polifenolni spojevi. Oni pridonose jedinstvenim senzorskim karakteristikama i kompleksnosti vina te zbog svojih antioksidacijskih svojstava pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka. Tijekom skladištenja/čuvanja vina polifenolni spojevi utječu na stabilnost i dozrijevanje vina.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj HHP na inaktivaciju kvasaca *B. bruxellensis* u crnom vinu i *S. cerevisiae* u desertnom vinu te utjecaj provedenog tretmana na polifenolni sastav vina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. VINO

#### 2.1.1. Proizvodnja i potrošnja vina

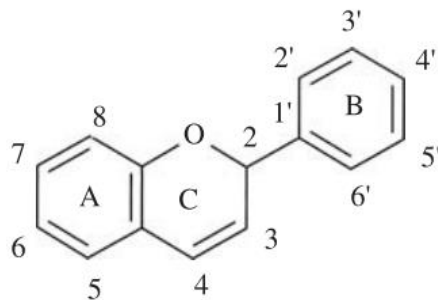
Još od samih početaka prerade voća grožđe je sirovina koja zauzima značajno mjesto u industrijskoj preradi voća. Davne 2002. godine svjetska prerada grožđa je iznosila 62 milijuna tona u usporedbi s 57 milijuna tona naranči, 50 milijuna tona banana i 43 milijuna tona jabuka. Procjenjuje se da su 2002. godine površine zasađene vinovom lozom zauzimale 7,9 milijuna hektara. Približno 66 % grožđa koristi se u proizvodnji vina, 18,7 % se konzumira kao svježe voće, a 7,7 % se koristi za proizvodnju groždica (OIV, 2005).

U Europi, gdje se nalazi 61% svjetske vinove loze, oko 77% koristi se za proizvodnju vina. Proizvodnja vina 1970-ih godina varirala je od 250 do 330 milijuna hektolitara godišnje, dok se sada taj broj kreće oko 270 milijuna hektolitara (Glänzel i Veugelers, 2006). Dok se 2015. godine svjetska proizvodnja vina procjenjuje na oko 275,7 milijuna hektolitara (Godoy i sur., 2017). Iako Španjolska posjeduje najviše površina zasađenih vinovom lozom, Francuska i Italija su vodeći proizvođači vina. Zajedno, Francuska i Italija proizvode oko 50 % ukupnog svjetskog vina, a opskrbljuju oko 60 % svjetskog tržišta vina (Glänzel i Veugelers, 2006).

#### 2.1.2. Polifenolni spojevi u vinu

Iako prisutni u malim koncentracijama, polifenoli su spojevi vina koji pridonose različitosti i jedinstvenim senzorskim karakteristikama različitih vina. Polifenoli predstavljaju veliku i kompleksnu skupinu spojeva koji imaju primarnu ulogu u karakterizaciji i kvaliteti crnog vina. Također su značajni i kod bijelih vina, ali su prisutni u puno manjim koncentracijama. Oni mogu utjecati na izgled, okus, osjet i miris te antimikrobna svojstva vina. polifenoli u vinu primarno potječu iz grožđa, no manje količine mogu biti ekstrahirane iz drvenih bačvi tijekom starenja vina. Također, u tragovima mogu biti proizvedeni metabolizmom kvasaca (Jackson, 2008).

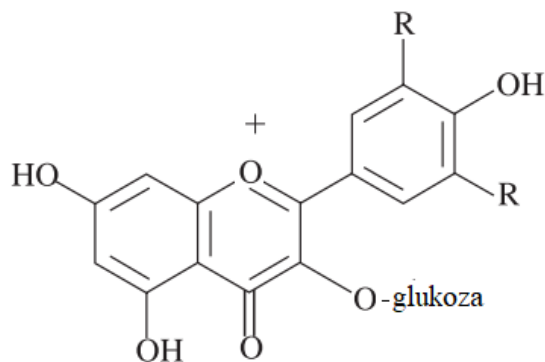
Većina polifenola iz vina pripadaju skupini flavonoida ili neflavonoida. Flavonoide karakterizira C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> kostur koji se sastoji od dva fenolna prstena spojena središnjim piranoznim prstenom (Slika 1).



Slika 1. Kostur molekule flavonoida (Jackson, 2008).

Najčešći flavonoidi u vinu su flavonoli, flavan-3-oli i antocijani. Flavonoidi karakteriziraju crna vina više nego bijela. U crnim vinima oni čine više od 85% ukupnih fenola ( $\geq 1000 \text{ mgL}^{-1}$ ), dok u bijelim vinima čine manje od 20 % ukupnih fenola ( $\leq 50 \text{ mgL}^{-1}$ ). Neflavonoide karakterizira  $C_6-C_3$  kostur te je njihova struktura jednostavnija (Slika 2), a njihovo podrijetlo u vinu je nešto drugačije. Vina koja ne stare u hrastovim bačvama sadrže primarno derivate hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline, dok vina koja stare u hrastovim bačvama sadrže najviše derivata hidroksicimetne kiseline odnosno primarno elaginsku kiselinu (Jackson, 2008).

Crvenu boju vinu daju antocijani prisutni u vinu. U vinu slobodni antocijani nisu stabilni, pa su potrebne reakcije polimerizacije kako bi se održala stabilnost boje vina.



Slika 2. Struktura molekule antocijana (Jackson, 2008).

U grožđu, odnosno vinu, antocijani su prisutni kao glikozidi, spojevi flavonoidnih komponenti i šećera, većinom glukoze. Glikozidna veza povećava kemijsku stabilnost antocijana i njihovu topivost (Jackson, 2008).

## 2.2. KVASCI UZROČNICI KVARENJA

Proizvodnja vina je složen biokemijski i mikrobiološki proces u kojem kvasci i bakterije značajno utječu na karakteristike vina kao što su miris, okus i boja vina. Mikrofloru u proizvodnji vina čine kvasci iz rodova *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulospora*, *Dekkera/Brettanomyces* i *Schizosaccharomyces*. Većina kvasaca ima pozitivan učinak na senzorske karakteristike vina, dok neki kvasci poput kvasca iz roda *Brettanomyces* uzrokuju kvarenje vina. *Brettanomyces bruxellensis* je jedan od glavnih uzročnika kvarenja crnih vina pri čemu je više od 25 % svjetske proizvodnje vina kontaminirano ovim kvascem (Wedral i sur., 2010).

Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (OIV) kao regulatorno tijelo koje djeluje u većini zemalja proizvođača vina, ne propisuje najvišu dopuštenu razinu mikrobne kontaminacije. Postoji uvjet da vino u boci treba biti bistro, odnosno da je količina mikroorganizama ispod  $10^4$ - $10^5$  CFUmL<sup>-1</sup> (u bijelim vinima) za mikroorganizme koji stvaraju prašnjavi talog ili ispod  $10^2$ - $10^3$  CFUmL<sup>-1</sup> za mikroorganizme koji stvaraju pahuljasti talog. Ipak zakonska granica za kvasce u vinu postoji u Norveškoj, a iznosi 10 stanica mL<sup>-1</sup> od ukupnih mikroorganizama prisutnih u vinu (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003).

Pretpostavljalo se da je prisutnost kvasaca neovisna o vrsti vina (bijelo, crno, rose, suho, slatko, itd.) (Deak i Reichart, 1986). Ipak, dokazano je da je potencijal rasta kvasaca puno veći u slatkim nego u suhim vinima. U suhim vinima do rasta kvasaca dolazi zbog aerobne asimilacije komponenti vina kao što su etanol, organske kiseline i glicerol te je ograničen količinom otopljenog kisika (Malfeito-Ferreira, 2001). Boja vina je također bitna jer je zapažanje suspendiranih stanica u crnom vinu puno teže nego u bijelom ili rose vinu. Dakle, razumljivo je da je broj stanica kvasca stroži za slatka nego za suha vina te da je znatno stroži za bijela nego za crna vina (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003).

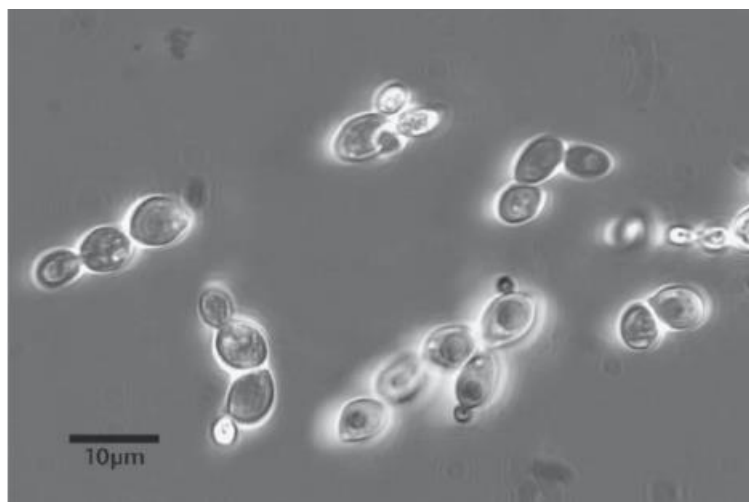
U tablici 1 navedeni su najčešći kvasci uzročnici kvarenja i karakteristike kontaminacije.

Tablica 1. Kvasci uzročnici kvarenja i karakteristike kontaminacije (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003).

| Vrsta kvasca                | Pojavljivanje                          | Karakteristike kontaminacije          |
|-----------------------------|--|---------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i>        | Suha vina u boci                       | stvaranje taloga ili zamućivanje vina |
|                             | Slatka vina u boci                     | refermentacija                        |
|                             | Pluteni čepovi                         | stvaranje biofilma                    |
| <i>S. ludwigii</i>          | Vina u boci                            | stvaranje taloga ili zamućivanje vina |
|                             | Pluteni čepovi                         | rast                                  |
| <i>K. apiculata</i>         | Sok od grožđa                          | proizvodnja etil-acetata              |
| <i>Z. bailii</i>            | Vina u boci                            | stvaranje taloga ili zamućivanje vina |
|                             | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |
| <i>Z. rouxii</i>            | Koncentrirani sok od grožđa            | rast                                  |
| <i>T. delbrueckii</i>       | sok od grožđa bez sulfita<br>Spremnici | rast                                  |
| <i>D. bruxellensis</i>      | Vina u boci, vina starila u bačvama    | proizvodnja 4-etilfenola              |
|                             | Pjenušava vina                         | zamućivanje vina                      |
| <i>P. membranifaciensis</i> | Vina u boci                            | stvaranje taloga                      |
|                             | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |
| <i>P. anomala</i>           | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |
| <i>L. elongispora</i>       | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |
| <i>Rhodotorula</i> spp.     | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |
| <i>Trichosporon</i> spp.    | Oprema za proizvodnju vina             | rast                                  |

### 2.2.1. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis*

Pojam *Brettanomyces* prvi je puta spomenut 1904. godine kako bi se opisao kvasac korišten u proizvodnji engleskog piva. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* je 1920. godine izoliran iz piva u Belgiji (Henschke i sur., 2007), a 1930. godine prvi puta je utvrđena njegova prisutnost u vinu (Krumbholz i Tauschanoff, 1933). Naziv roda *Brettanomyces* se odnosi na anamorfni oblik, dok se naziv *Dekkera* odnosi na telemorfni oblik (Van Der Walt, 1964). Trenutno, rod *Brettanomyces/Dekkera*, uključuje pet različitih vrsta: *B. custersianus*, *B. naardenesis*, *B. nanus*, *B. anomalus* i *B. bruxellensis* (Kurtzman i sur., 2011). Kvasac *B. bruxellensis* se razmnožava višelateralnim, a rijeđe bipolarnim pupanjem. Stanice kvasca *B. bruxellensis* su polimorfno-elipsoidno, šiljastog ili cilindričnog oblika te često stvaraju pseudomicelije. Njihova veličina varira od 2-7  $\mu\text{m}$ , a prilikom izlaganja nekom stresu mogu se smanjiti (Kurtzman i sur., 2011). Stanice kvasca snimljene fazno-kontrastnim mikroskopom prikazane su na slici 3.



Slika 3. Kvasac *B. bruxellensis* snimljen fazno-kontrastnim mikroskopom (Fugelsang i Edwards, 2007).

U aerobnim uvjetima kvasac *B. bruxellensis* proizvodi veće količine octene kiseline i etanola. Prisutnost kisika stimulira rast kvasca odnosno smanjuje inhibitorni učinak octene kiseline. Kvasac *B. bruxellensis* može rasti i u anaerobnim uvjetima pa se stoga može nazvati i fakultativno anaerobnim kvascem (Rozpędowska i sur, 2011). Godine 1940., dokazano je da kisik stimulira fermentaciju kvasca *Brettanomyces claussenii*, te je taj fenomen nazvan „negativni Pasteurov efekt“ (Custers, 1940). Kasnije su Scheffers i Wiken 1969. godine uveli koncept Custerovog efekta koji se definira kao inhibicija alkoholne fermentacije tijekom

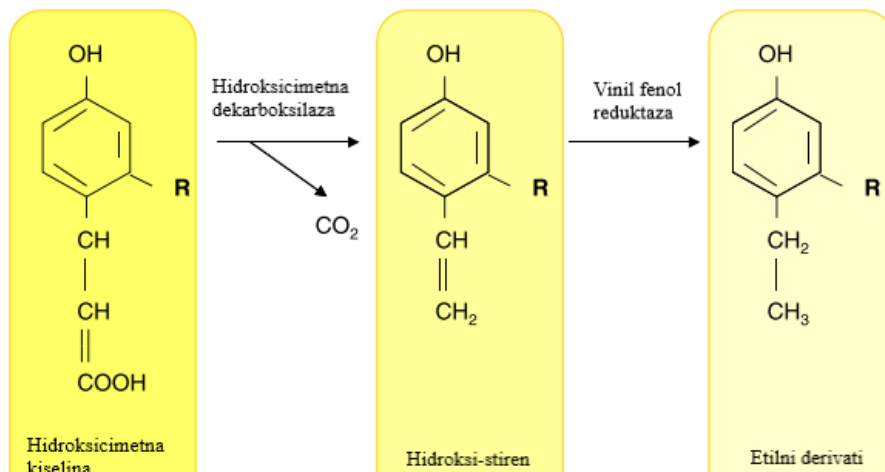
prijelaza u anaerobne uvjete, a koji se odnosi na sve vrste kvasca roda *Brettanomyces*. Zatim su Ciani i Ferraro (1997) utvrdili kako se nakon 7-8 sati bez kisika kvasac *B. bruxellensis* prilagodi na anaerobne uvjete pri čemu sporije raste i proizvodi manje etanola.

Ovaj se kvasac može pronaći na bobicama grožđa, u vinu, opremi za proizvodnju vina, pivu, mliječnim proizvodima, kiselom tijestu, maslinama (Curtin i sur., 2015) itd.

Kvasac *B. bruxellensis* u vinu postoji već u početnoj fazi vinifikacije, ali je obično prisutan u niskoj populaciji u odnosu na druge kvasce koji su odgovorni za alkoholnu fermentaciju. Tijekom jabučno-mliječne fermentacije moguće je povećanje brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* (Renouf i sur., 2006) te on može postati dominantan i ozbiljno narušiti senzorske karakteristike vina. Kvasac *B. bruxellensis* se prilagodio životu i rastu u vinu jer ga karakterizira otpornost na okolišni stres poput visoke koncentracije etanola (do 14,5-15%), niskog pH i kisika, niske koncentracije šećera (manje od 300 mgL<sup>-1</sup>) te fermentabilnog dušika (Curtin i sur., 2015).

Kvasac *B. bruxellensis* može proizvoditi 4-vinilfenol i 4-etilfenol iz *p*-kumarinske kiseline te 4-vinilgvajakol i 4-etilgvajakol iz ferulinske kiseline. U niskim koncentracijama navedeni spojevi mogu doprinijeti kompleksnosti vinske arome, no u koncentracijama višim od praga osjetljivosti imaju negativan utjecaj na senzorski profil vina. Ovi spojevi u visokim koncentracijama pridonose nepoželjnom okusu i životinjskom mirisu poput mirisa staje i konjskog znoja te životinjske kože (Chatonnet i sur., 1992). Sposobnost proizvodnje hlapivih fenola povezana je s aktivnošću dvaju enzima koji dekarboksiliraju hidroksicimetne kiseline (npr. ferulinsku i *p*-kumarinsku kiselinu) u vinil fenole koji se zatim reduciraju u etil fenole. Prvu reakciju katalizira enzim hidroksicimetna dekarboksilaza, a drugu redukcijsku reakciju katalizira vinilfenol reduktaza (slika 4) (Ciani i Comitini, 2014). Također, ovaj kvasac može proizvoditi i biogene amine (Caruso i sur., 2002).





Slika 4. Nastajanje hlapivih fenola dekarboksilacijom hidroksicimetnih kiselina (Ciani i Comitini, 2014).

Još jedna metabolička karakteristika ovog kvasca je esterazna aktivnost koja je ponekad od velikog značaja u proizvodnji fermentirane hrane i pića. Zahvaljujući hidrolitičkoj i sintetizirajućoj sposobnosti estaraze imaju važnu ulogu u modificiranju okusa hrane i pića (Ciani i Comitini, 2014).

Kvasac *B. bruxellensis* može ući u VBNC (*engl. viable but not cultured*) stanje, kada se ne može detektirati na krutoj podlozi ili ponovno uzgajati, no zadržava svoju metaboličku aktivnost (Ciani i Comitini, 2014). Ovaj kvasac može ući spomenuto stanje kada je stanica izložena stresu kao što je osmotski tlak, temperatura ili promjena koncentracije kisika (Agnolucci i sur., 2010).

Vina koja su kontaminirana kvascem *B. bruxellensis* obično imaju nepoželjnu boju. Dokazano je da ovaj kvasac ima glukozidaznu aktivnost (Fia i sur., 2005) odnosno sadrži enzim  $\beta$ -glukozidazu koja hidrolizira glikozide. Veliki dio ukupnih glikozida u grožđu sadrži antocijane koji su primarno odgovorni za crvenu boju grožđa (Somers i sur., 1988), odnosno vina. Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze dovodi do hidrolize glikozida te formiranja odgovarajućih antocijana koji zatim mogu biti prevedeni u bezbojne pseudobaze, što posljedično ima negativan utjecaj na boju vina (Mansfield i sur., 2002). Ovo je mogući razlog zašto vina kontaminirana kvascem *B. bruxellensis* mogu imati nepoželjnu boju (Suárez i sur., 2007).

U tablici 1. Uspoređena su fiziološka i genetička svojstva kvasaca *B. bruxellensis* i *S. cerevisiae*.

Tablica 1. Usporedba fizioloških i genetičkih svojstava kvasaca *B. bruxellensis* i *S. cerevisiae* (Blomqvist i Passoth, 2015).

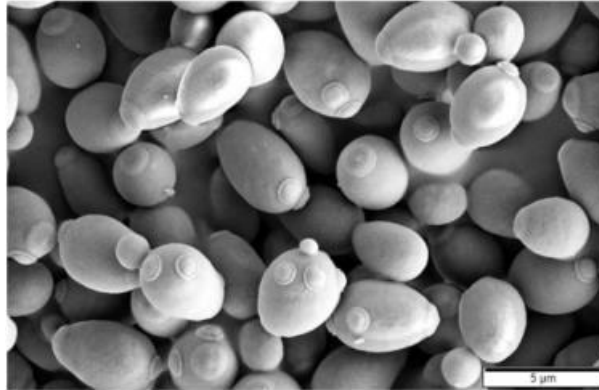
| SVOJSTVO                                    | <i>B. bruxellensis</i>              | <i>S. cerevisiae</i> |
|---|-------------------------------------|----------------------|
| Brzina rasta ( $\mu$ , h <sup>-1</sup> )    | 0,037 – 0,114                       | 0,25 – 0,38          |
| Prinos etanola (gg <sup>-1</sup> glukoze)   | 0,44 – 0,46                         | 0,40 – 0,44          |
| Prinos glicerola (gg <sup>-1</sup> glukoze) | 0,0 – 0,026                         | 0,015 – 0,47         |
| Asimilacija nitrata                         | Da                                  | Ne                   |
| Fermentacija celobioze                      | Da                                  | Ne                   |
| Fermentacija galaktoze                      | Ne                                  | Da                   |
| Anaerobni rast                              | Da (potreban dodatak aminokiselina) | Da                   |
| Tolerancija na etanol                       | 14%                                 | 14%                  |
| Crabtree – efekt                            | Da                                  | Da                   |
| Custerov – efekt                            | Da                                  | Ne                   |
| Umnažanje cijeloga genoma                   | Ne                                  | Da                   |
| Prisutnost respiratornog kompleksa 1        | Da                                  | Ne                   |
| AOX1  | Da                                  | Ne                   |
| Sinteza uracila                             | URA9                                | URA1                 |

### 2.2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U svakodnevnom govoru, sinonim za riječ kvasac u prehrambenoj industriji je upravo *Saccharomyces cerevisiae*, a radi se o vrsti kvasca koja je otkrivena u sladu 1837.godine. Zahvaljujući ovom kvascu proizvodilo se vino u Gruziji i fermentirana tijesta u starom Egiptu (Feldmann, 2012).

*S. cerevisiae* se obično opisuje kao fakultativno anaeroban kvasac, što znači da ima mogućnost rasta u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Iako se smatra fakultativno anaerobnim kvascem, *S. cerevisiae* ne može rasti u strogo anerobnim uvjetima jer je kisik potreban kao faktor rasta tijekom biosinteze membranske masne kiseline (npr. oleinske) i biosinteze sterola (npr. ergosterola). Tijekom anaerobnih uvjeta kvascu su za rast neophodne oleinska kiselina i ergosterol. Dakle, za efikasnu alkoholnu fermentaciju, potrebna je niska koncentracija kisika na početku fermentacije ili dodatak faktora rasta oleinske i ergosterola u medij koristeći komercijalne pripravke hranjivih tvari namjenjene rastu kvasca (Walker i Stewart, 2016).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* imaju karakterističan elipsoidni oblik, veličine 5-10  $\mu\text{m}$ . Mikroskopska slika kvasca prikazana je na slici 5. Razmnožava se pupanjem (Walker, 1998). Ovaj kvasac najbolje raste od 20-30  $^{\circ}\text{C}$  i pri pH vrijednosti od 4,5-6,5 (Walker i Stewart, 2016).



Slika 5. Mikroskopski prikaz kvasca *S. cerevisiae* (Das Murtey i Ramasamy, 2016).

Za stanice kvasca *S. cerevisiae* potreban je visoki aktivitet vode ( $a_w$ ) čija vrijednost treba iznositi minimalno 0,65. Voda je potrebna za provođenje fermentacije, a medij s visokim sadržajem šećera poput soka od grožđa, tj. mošta može izazvati osmotski stres (smanjena dostupnost vode) stanici jer djeluje nepovoljno na fiziologiju stanice. Stanice kvasca *S. cerevisiae* preživljavaju jer proizvode glicerol ili druge osmolite poput trehaloze koje štite staničnu membranu od sušenja. Ovi sastojci mogu nadomjestiti vodu potrebnu stanici, povratiti volumen stanice te ponovno aktivirati metabolizam kvasca (Walker i Stewart, 2016).

Kvasac *S. cerevisiae* može fermentirati glukozu, fruktozu, saharozu, maltozu i maltotriozu (Walker i Stewart, 2016). U prisutnosti šećera, zajedno s drugim esencijalnim nutrijentima poput aminokiselina, minerala i vitamina, *S. cerevisiae* će provoditi fermentativni metabolizam do etanola i ugljikovog dioksida (kao primarnih metabolita) dok stanice nastoje stvoriti energiju i regenerirati koenzim  $\text{NAD}^+$  u anaerobnim uvjetima. Kvasci će proizvesti brojne sekundarne metabolite (viši alkoholi, esteri, karbonilni spojevi i spojevi sa sumporom) koji imaju važnu ulogu u stvaranju arome vina (Walker i Stewart, 2016).

Tijekom fermentacije, period najveće potrošnje šećera i proizvodnje alkohola odgovara periodu log faze rasta kvasca te je izračunato da stanice kvasca u fazi rasta proizvode 33 puta brže etanol nego stanice koje nisu u fazi rasta (Walker i Stewart, 2016).

Tijekom procesa fermentacije dolazi do različitih tipova stresa, osmotskog stresa radi visoke koncentracije šećera, stresa zbog zakiseljavanja medija, visokog sadržaja sulfita, anaerobnih uvjeta, nedovoljnih izvora dušika, lipida i vitamina, visoke koncentracije etanola i

oscilacije temperature. Dobre vrste vinskih kvasaca trebaju biti rezistentne na kombinirani utjecaj svih navedenih faktora u svim glavnim fazama fermentacije vina i trebali bi imati nekoliko drugih važnih tehnoloških karakteristika. Za senzorska i organoleptička svojstva vina od iznimne je važnosti sastav brojnih sekundarnih fermentacijskih produkata poput glicerola, karboksilnih kiselina, aldehida, viših alkohola, estera, sulfida, itd. koji se formiraju tijekom degradacije šećera iz grožđa, aminokiselina, masnih kiselina, terpena i tiola što također ovisi o pojedinim vrstama korištenih kvasaca (Cordente i sur., 2012).

Kvasac *S. cerevisiae* tijekom proizvodnje vina iz mošta koristi glukozu i fruktozu kao izvor ugljika, a aminokiseline kao izvor dušika. Od prisutnih minerala u moštu većina je prikladna za kvasac *S. cerevisiae*, dok količina cinka (Zn) i magnezija (Mg) može biti ograničavajuća. Nadalje, ovaj kvasac koristi sve vitamine prisutne u moštu, no ako se dodaju hranjive tvari za rast kvasca one služe i kao dodatni izvor vitamina (Walker i Stewart, 2016). Ishod fermentacije ovisi o mnogo faktora, posebice o sastavu i kvaliteti vinskog mošta. U osnovi, mošt se sastoji od šećera (glukoze i fruktoze), organskih kiselina (vinske i jabučne), anorganskih kationa (kalij), spojeva s dušikom i lipida (fitosterola). Budući da prisutnost glukoze sprječava razgradnju fruktoze, u kasnijim fazama fermentacije sadržaj fruktoze može doseći značajne razine. U dugačkim periodima gladovanja i u prisutnosti visoke koncentracije etanola, vinski kvasci moraju fermentirati navedeni šećer. Sposobnost vinskih kvasaca da efikasno fermentiraju fruktozu je od kritične važnosti u održavanju visoke brzine fermentacije u naprednim fazama stvaranja alkohola (Eldarov i sur., 2016).

Budući da je ovaj kvasac uzročnik kvarenja neke hrane kao što su voćni sokovi, nastoji se ograničiti njegova prisutnost u prehrambenoj industriji (Patrignani i sur., 2009). Kvasac *S. cerevisiae* je uobičajeni mikroorganizam koji raste u mnogim voćnim sokovima poput soka od ananasa, grožđa, brusnice i naranče (Valverde i sur., 2010) ili u drugim pićima uključujući i vina (Ortuño i sur., 2012). Trajnost brojnih proizvoda koji sadrže šećer je često ograničena zbog prisutnosti ovog kvasca (Loureiro i Querol, 1999).

Kvasac *S. cerevisiae* ima važnu ulogu u alkoholnoj fermentaciji tijekom proizvodnje vina pri kojoj je on dominantna vrsta. Ostali kvasci koji ne spadaju u rod *Saccharomyces* obično su prisutni tijekom početne faze alkoholne fermentacije no kad se poveća koncentracija etanola preživljavaju samo kvasci roda *Saccharomyces* koji su otporniji na etanol te oni završavaju alkoholnu fermentaciju (Fleet, 1998). Usprkos tome, *S. cerevisiae* može biti i uzročnik kvarenja vina nakon alkoholne fermentacije ako kvasac nije uklonjen te ako su boca ili pluteni čep kontaminirani stanicama kvasca. *S. cerevisiae* je značajan uzročnik kvarenja vina jer je otporan

na visoke koncentracije etanola. Uzrokuje kvarenje desertnih vina i polusuhih vina, u kojima fermentabilni šećer može poticati njegov rast (Martorell i sur., 2005).

Tablica 2. Karakteristike kvasca *S. cerevisiae* važne u proizvodnji vina (Eldarov i sur., 2016).

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| FERMENTACIJSKE KARAKTERISTIKE | <p>Brz početak fermentacije</p> <p>Visoka efikasnost</p> <p>Visoka otpornost na etanol</p> <p>Visoka otpornost na osmozu</p> <p>Niska optimalna temperatura</p> <p>Umjerena proizvodnja biomase</p>   |
| UTJECAJ NA AROMU I OKUS VINA  | <p>Niska proizvodnja sulfida i tiola</p> <p>Niska proizvodnja hlapivih kiselina</p> <p>Niska proizvodnja viših alkohola</p> <p>Sposobnost oslobađanja glikozidnih veza</p> <p>Visoka proizvodnja glicerola</p> <p>Sposobnost autolize</p> <p>Umjerena esterazna aktivnost</p> |
| TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE     | <p>Genetska stabilnost</p> <p>Visoka otpornost na sulfite</p> <p>Slabo stvaranje pjene</p> <p>Sposobnost flokulacije</p> <p>Kompaktan talog</p> <p>Otpornost na sušenje</p> <p>Proteolitička aktivnost</p> <p>Niske potrebe za dušikom</p>                                    |
| OSTALA METABOLIČKA SVOJSTVA   | <p>Niska proizvodnja biogenih amina</p> <p>Niska proizvodnja etilkarbamata</p>  |

U tablici 2 navedene su karakteristike kvasca *S. cerevisiae* koje su važne u proizvodnji vina.

### 2.3. METODE ZA SPRJEČAVANJE RASTA NEPOŽELJNIH KVASACA

Kako bi se spriječilo mikrobno kvarenje tijekom proizvodnje vina, u vinariji je potrebno slijediti odgovarajuće higijenske protokole (Fugelsang i Edwards, 2007). Dobra proizvođačka praksa i standardni operativni postupci za vinarije uključuju pranje i sanitaciju tankova, linija, pumpi i ostale opreme između svakog korištenja (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2003). Martorell i suradnici (2007) ističu važnost pravilnog čišćenja i korištenja biocidnih agenasa zbog tolerancije nekih vrsta mikroorganizama na često korištene konzervanse. Higijenska praksa je također od iznimne važnosti jer smanjuje nastajanje biofilmova koje neki mikroorganizmi poput kvasca *B. bruxellensis* mogu stvarati (Joseph i sur., 2007).

Iako su navedeni protokoli jako važni, proizvođači vina moraju uravnotežiti uporabu antimikrobnih tehnika i održavanje specifičnih karakteristika i kvalitete vina. Dok uvjeti skladištenja vina poput temperature kao i pH, koncentracija kisika i etanola mogu ograničiti mikrobni rast, ipak korekcija bilo kojeg od spomenutih parametara može utjecati na senzorske karakteristike vina. Kako bi se smanjio neželjeni učinak na kvalitetu, također se koriste i razne tradicionalne i nove netoplinske antimikrobne tehnike kao što su pulsirajuće električno polje, niskoelektrično pražnjenje, ultrazvuk i visoki hidrostatski tlak (Zuehlke i sur., 2013).

### 2.3.1. Sumporov dioksid (SO<sub>2</sub>)

Sumporov dioksid ima široku upotrebu u prehrambenoj industriji kao antioksidant i antimikrobni agens (Ough, 1993). Često se dodaje u obliku kalij metabisulfita ili plinovitog SO<sub>2</sub> (Fugelsang i Edwards, 2007). U Hrvatskoj je dopuštena količina ukupnog SO<sub>2</sub> kod crnih vina 160 mgL<sup>-1</sup>, od toga slobodnog najviše do 30 mgL<sup>-1</sup>. U slučaju desertnih vina dopuštena količina ukupnog SO<sub>2</sub> je 260 mgL<sup>-1</sup>, od toga slobodnog najviše do 50 mgL<sup>-1</sup> (Pravilnik o proizvodnji vina, 2005). U novije vrijeme, Internacionalna organizacija loze i vina (OIV), kao i mnogi drugi, zagovaraju smanjenje uporabe SO<sub>2</sub> zbog neželjenog utjecaja na zdravlje ljudi koji su osjetljivi na sulfite te na astmatičare (Santos i sur., 2012). Također, korištenje isključivo SO<sub>2</sub> nije djelotvorno jer su mnoge vrste mikroorganizama razvile toleranciju na sumpor (Warth, 1985). Kvasci koji su rezistentni mogu proizvoditi acetaldehide, spojeve koji vežu SO<sub>2</sub> i samim time smanjuju njegova antimikrobna svojstva (Fugelsang i Edwards, 2007).

Kemijski i antimikrobni učinak SO<sub>2</sub> je povezan s prisutnošću pojedinih molekula i pH vrijednosti vina. U otopini, SO<sub>2</sub> može biti u vezanom ili slobodnom obliku. Vezani oblik SO<sub>2</sub> nastaje reakcijom sa spojevima koji sadrže karbonilnu skupinu, poput acetaldehida. Slobodni SO<sub>2</sub> postoji u različitim oblicima, a njihova je ravnoteža ovisna o pH. To su molekularni SO<sub>2</sub> (SO<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O), bisulfit (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) i sulfit (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (Zuehlke i sur., 2013).

### 2.3.2. Dimetil – dikarbonat

Poput sumporovog dioksida, dimetil-dikarbonat se dodaje u voćni sok, mošt ili vino kako bi inhibirao mikroorganizme uzročnike kvarenja (Costa i sur., 2008). U Europskoj Uniji maksimalna dozvoljena koncentracija dimetil-dikarbonata je  $200 \text{ mgL}^{-1}$  (Official Journal of the European Union, 2006). Dimetil-dikarbonat se najčešće dodaje u gotovo vino prije samog punjenja u boce, iako se može dodavati i u mošt (Renouf i sur., 2008). U vinarijama tijekom tretiranja vina dimetil-dikarbonatom se javljaju različiti izazovi kao što su cijena opreme za doziranje, odgovarajuća sigurnost i obuka radnika te zadržavanje konstantne brzine dodavanja (Boulton i sur., 1996). Antimikrobna aktivnost dimetil-dikarbonata je povezana s enzimskom inhibicijom. Metoksikarbonilacija imidazola, amina i tiola rezultira prekidom funkcije metaboličkih enzima glikolize, npr. alkohol-dehidrogenaze i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (Ough, 1993). Inhibitorni učinak koncentracije od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  dimetil-dikarbonata traje manje od 12 sati (Delfini i sur., 2002) jer se on brzo hidrolizira na vrlo male količine ugljikovog dioksida i metanola, koji također moraju biti ispod dopuštenih količina u vinu (Zuehlke i sur., 2013).

### 2.3.3. Filtracija

Filtracijska tehnika se koristi za stabilizaciju mnogih komercijalnih vina. S ciljem smanjenja posmeđivanja (Goodwin i Morris, 1991) i uklanjanja koloida koji uzrokuju mutnoću (Manninger i sur., 1998), obično se za uklanjanje kvasaca i bakterija iz vina koriste membrane specifične poroznosti (Fugelsang i Edwards, 2007). Ako vina prije punjenja u boce nisu filtrirana, postoji opasnost od kvarenja vina prouzročeno raznim mikroorganizmima (Rayess i sur., 2011). Odabir veličine pora membrana ovisi o sljedećim zahtjevima: propusnosti, ekonomičnosti i učinkovitosti uklanjanja mikroorganizama. Iako neki proizvođači vina koriste membrane veće poroznosti kako bi poboljšali protok, obično se preporučuju membrane s porama veličine  $0,45 \mu\text{m}$  (Fugelsang i Edwards, 2007).

### 2.3.4. Ozon

Ozon se u proizvodnji vina primarno koristi za čišćenje proizvodne opreme i površina, a ne za antimikrobno tretiranje mošta ili vina (Kim i sur., 2003). Ozon se proizvodi prolaskom plinovitog kisika kroz visokonaponsko električno polje (Green i sur., 1993). Kada je u vodenoj otopini, ozon ( $O_3$ ) se raspada na kisik ( $O_2$ ). Vrijeme poluživota može biti nekoliko minuta do nekoliko sati, ovisno o temperaturi, pH i čistoći vode (Khadre i sur., 2001). Antimikrobni učinak ozona je posljedica oksidacijskih reakcija s raznim sastojcima stanice te je dokazan na primjeru kvasaca, bakterija i virusa (Hampson, 2000). U vinarskoj industriji, ozon i ozonirana voda koriste se za čišćenje tankova i površine od nehrđajućeg čelika, hrastovih bačava i CIP (*engl. „clean in place“*) sustava za čišćenje (Hampson, 2000).

### 2.3.5. Pulsirajuće električno polje

Pulsirajuće električno polje je netoplinaska tehnika u razvoju koja se koristi za pasterizaciju i sterilizaciju homogenih tekućina (Santos i sur., 2012). Ova se tehnika temelji na proizvodnji jakih pulsirajućih električnih polja između dvije elektrode koje su u kontaktu s proizvodom (Garde-Cerdan i sur., 2007). Prilikom povećanja dielektričnog raspada citoplazmatske i jezgrine membrane dolazi do umiranja stanice i posljedično do lize stanice (Puertolas i sur., 2010). Iako se pulsirajuće električno polje smatra učinkovitim kod svih mikroorganizama, kvasci su ipak malo osjetljiviji od bakterija (Marselles-Fontanet i sur., 2009). Ova se tehnika istražuje kako bi se mogla koristiti kao sredstvo smanjenja mikrobne kontaminacije vina (Santos i sur., 2012). Nakon provedenih istraživanja tijekom tretiranja mošta i gotovog vina, uočena je njezina djelotvornost nakon završene alkoholne fermentacije (Marselles-Fontanet i sur., 2009).

### 2.3.6. Niskoelektrično pražnjenje

Za razliku od pulsirajućeg električnog polja, tretman niskoelektričnim pražnjenjem koristi konstantno električno pražnjenje niske snage kako bi se suzbio mikrobni rast (Palaniappan i sur., 1990). Tretman niskoelektričnim pražnjenjem traje nekoliko dana do nekoliko sati (Lustrato i sur., 2010). Do mikrobne inaktivacije dolazi zbog električnog raspada u membranskom lipidnom dvosloju (Lustrato i sur., 2003). Kako bi se spriječio rast mikroorganizama uzročnika kvarenja, ova se tehnika može koristiti tijekom alkoholne fermentacije ili kod gotovog vina (Lustrato i sur., 2006).

### 2.3.7. Ultrazvuk



Tehnike ultrazvukom visoke snage koriste se u posljednjem desetljeću za pasterizaciju, sterilizaciju i enzimsku inaktivaciju hrane (O'Donnel i sur., 2010). Sonda se uranja u tekućinu i koristi se za proizvodnju brzo pulsirajuće energije. Razlike tlakova uzrokuju kavitaciju s brzim stvaranjem i razaranjem mikroskopskih mjehurića. Zahvaljujući stvaranju kratke i lokalizirane regije tlaka i temperature koji mogu narasti do 5500 °C i 50 MPa dolazi do inaktivacije mikroorganizama i nekih enzima. Do njihove inaktivacije dolazi zbog topline i stresa, iako temperatura cijelog proizvoda nije promijenjena (Butz i Tauscher, 2002). U vinarskoj industriji, ultrazvučne tehnike se koriste za uklanjanje sloja tartarata iz bačava, a u novije vrijeme, za inaktivaciju mikroorganizama uzročnika kvarenja (Jiranek i sur., 2008).

### 2.3.8. Visoki hidrostatski tlak

Tretman visokim hidrostatskim tlakom (*engl. „high hydrostatic pressure“* ili HHP) je šaržna tehnika (Van Wyk i Silva, 2017) hladne pasterizacije koja se sastoji od izlaganja određenog prehrambenog proizvoda, zatvorenog u elastičnom i vodootpornom pakovanju, visokom hidrostatskom tlaku od 100 do 600 MPa tijekom nekoliko sekundi do nekoliko minuta (George i Rastogi, 2008). Ovaj tretman se može provoditi pri niskim temperaturama te čak i pri temperaturama hlađenja (Morata i sur., 2015).

Tehnika je dobila ime po Blaise-Pascalu, francuskom znanstveniku iz 17.stoljeća čiji je istraživački rad uključivao istraživanje utjecaja visokog tlaka na tekućine. Povijest tehnike HHP seže još u 19.stoljeće. Bert H. Hite je 1899.godine istraživao utjecaj visokog tlaka na proizvode poput mlijeka, mesa, voća i povrća. U usporedbi s današnjom, oprema koja se tada koristila bila je jako primitivna. Danas s naprednim tehnikama i novim materijalima može se proizvesti oprema velikog kapaciteta za tretiranje visokim hidrostatskim tlakom pri višim tlakovima od prvotnih (Hoover, 1993).

Osnovni dijelovi uređaja za tretiranje HHP su (Ježek i sur., 2015):

1. Spremnik za tretiranje
  - Čelični cilindar
  - Dva kompleta brtvi
  - Mjerne sonde (tlak, temperatura, razina tekućine itd.)
2. Sustav za generiranje i regulaciju tlaka
  - Pumpe
  - Intenzifikatori

- Ventili
  - Hidraulički i pneumatski sustav
3. Sustav za grijanje/hlađenje
  4. Kontrolna jedinica

Postupak obrade HHP sastoji se od punjenja namirnice u ambalažu, ubacivanja pakiranih namirnica u prihvatnu posudu, ubacivanja prihvatne posude u cilindar, punjenja cilindra tekućinom, tlačenja tekućine unutar cilindra, zadržavanja tlaka kroz određeni vremenski period, snižavanja tlaka na atmosferski te vađenja namirnice iz ambalaže (Ježek i sur., 2015).

Neke od prednosti ove tehnike su: jednolična i trenutna raspodjela tlaka neovisno o obliku i veličini tretiranog materijala, efektivnost pri sobnoj temperaturi i nižim temperaturama, eliminacija toplinskog oštećenja, eliminacija kemijskih konzervansa i aditiva, visok stupanj zadržavanja organoleptičkih i nutritivnih svojstava te ekološka prihvatljivost (Karlović S., interna skripta). S druge strane, jedan od glavnih nedostataka tehnike je visoka cijena uređaja (Van Wyk i Silva, 2017).

Postoje dva principa primjenjiva u tehnici HHP u prehrambenoj industriji. Prvi je Le Chatelierov princip, koji se odnosi na sve fizikalne procese i stanja koji kada nisu u stanju ravnoteže, reagiraju na način da nastoje smanjiti promjenu na najmanju moguću razinu (Bosiljkov i sur., 2010). Dakle, s povećanjem tlaka volumen se smanjuje i obrnuto. Drugi princip koji se primjenjuje u ovoj tehnici je izostatski princip koji kaže da se tlak trenutno i ujednačeno prenosi kroz uzorak u direktnom kontaktu s tlačnim medijem ili kroz uzorak koji je hermetički zatvoren u elastičnom pakovanju (Olsson, 1995). Tlak kojemu se izlaže određeni proizvod prenosi se izostatički i trenutno, bez obzira na oblik i veličinu proizvoda (Smelt, 1998) što predstavlja prednost ove tehnike nad tradicionalnim termalnim tehnikama pri tretiranju velikih i nepravilnih prehrambenih proizvoda (Kiera i sur., 2008).

Istraživanja o utjecaju tlaka na mikroorganizme postoje još od davne 1884. godine (Jay i sur., 2005). Tehnika HHP uglavnom može zamijeniti tradicionalne termalne tehnike za suzbijanje rasta mikroorganizama ili upotrebu kemijskih konzervansa (Rastogi i sur., 1994). Poznato je da HHP učinkovito inaktivira patogene mikroorganizme i mikroorganizme uzročnike kvarenja, pogotovo utječući na njihovu staničnu stijenku, promjene u morfologiji stanice i inhibiciju genetičkih mehanizama (Gänzle i Liu, 2015). Linton i Patterson (2000) su ustanovili utjecaj HHP na denaturaciju ključnih enzima i promjene na ribosomima. Međutim, HHP može subletalno uništiti dio mikrobne populacije, koji se kasnije potencijalno može i

oporaviti (Valdramidis i sur., 2015). U nekim slučajevima stanice mogu razviti i toleranciju na tlak (Hauben i sur., 1997). To je rizično za sigurnost i očuvanje trajnosti proizvoda, a pogotovo onih koji su spremni za konzumaciju. Potrebna su daljnja istraživanja u smjeru izdržljivosti mikroorganizama pri djelovanju visokog tlaka i oporavka nakon njegovog djelovanja (Valdramidis i Koutsomanis, 2016).

HHP djeluje samo na nekovalentne kemijske veze, stoga će nutrijenti, spojevi arome i boje prehrambenih proizvoda, koji se većinom sastoje od kovalentinih veza, velikim dijelom ostati sačuvani nakon tretmana (Cheftel, 1992). Budući da se tijekom proizvodnje vina nastoji očuvati kvaliteta vina, ova se tehnika zbog navedenih razloga smatra prikladnom za korištenje u vinarskoj industriji.

Danas su na svjetskom tržištu dostupni brojni proizvodi koji su proizvedeni tehnikom HHP kao što su razna pića, voćni sokovi, voće, povrće, djelomično obrađeni proizvodi te proizvodi od mesa i ribe (Buzrul, 2012).

Tretman visokim hidrostatskim tlakom već se koristi kao zamjena tradicionalnim tehnikama za sprječavanje rasta nepoželjnih mikroorganizama u vinu (Buzrul, 2012) što omogućava proizvodnju vina sa smanjenim sadržajem  $\text{SO}_2$ , budući da potrošači mogu biti netolerantni na spojeve koji sadrže  $\text{SO}_2$  (Vally i Misso, 2012). Postoje određena istraživanja u kojima se primjenom tlakova između 200 i 500 MPa tijekom 1 do 20 minuta uočila inaktivacija kvasaca i bakterija mliječne kiseline u vinima bez značajnog utjecaja na senzorske karakteristike vina (Buzrul, 2012). Ipak, tlakovi od 650 MPa tijekom 1 i 2 sata su značajno utjecali na fizikalne i senzorske karakteristike crnih vina, a najviše na smanjenje intenziteta boje i sadržaja ukupnih fenola. Što se senzorskih karakteristika tiče, visoki tlak je utjecao na smanjenje intenziteta kiselih i voćnih mirisa te povećanje gorkog okusa i okusa na alkohol (Tao i sur., 2012). Umjereni tlakovi od 425 do 500 MPa tijekom 5 minuta imali su dugoročni utjecaj na fizikalne karakteristike crvenih i bijelih vina (Santos i sur., 2013a), kao što su narančasto-crvena boja vina, smanjenje antioksidacijske aktivnosti te sadržaj ukupnih fenola (Santos i sur., 2015). Kada tretmanom HHP dođe do navedenih promjena u vinu, ono poprima karakteristike koje su karakteristične za vina koja su odležavala/starila (Santos i sur., 2013a). Dakle, postoji mogućnost korištenja tehnike HHP za proizvodnju crnih vina s kraćim vremenom odležavanja/starenja, a koja bi imala poželjne karakteristike odležanog odnosno vina koje je starilo. Jedan od potencijala ove tehnike za korištenje u vinarskoj industriji je ubrzano starenje vina zbog navedenih promjena u sastavu vina, a pogotovo za poboljšanje vina s niskim potencijalom za starenje (Tao i sur., 2014).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJALI**

### 3.1.1. Mikroorganizmi *Brettanomyces bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae*

Pri izradi ovog diplomskog rada korišteni su kvasci *Brettanomyces bruxellensis* CBS 2499 (iz zbirke mikroorganizama Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) i *Saccharomyces cerevisiae* DSMZ 70468 (izoliran iz slatkog vina u Mađarskoj) iz Njemačke zbirke mikroorganizama i staničnih kultura (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)).

### 3.1.2. Vino

Pri izradi ovog diplomskog rada korišteno je crno vino Cabernet Sauvignon sa smanjenim sadržajem SO<sub>2</sub>, proizvedeno 2017 godine i desertno vino sa 50 gL<sup>-1</sup> šećera te smanjenim sadržajem SO<sub>2</sub> proizvedeno 2017.

### 3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u tablici 3.

Tablica 3. Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga.

| NAZIV                     | PROIZVOĐAČ                |
|---------------------------|---------------------------|
| D(+)-glukoza, bezvoda     | Gram-mol d.o.o., Hrvatska |
| Pepton                    | Biolife, Italija          |
| Kvašćev ekstrakt          | Biolife, Italija          |
| Agar                      | Biolife, Italija          |
| Ortofosforna kiselina     | Kemika, Hrvatska          |
| <i>Brettanomyces</i> agar | Conda, Spain              |
| Etanol, HPLC čistoće      | JT Baker, EU              |

### 3.1.4. Hranjive podloge

Sastojci koji čine čvrstu YPD podlogu navedeni su u tablici 4, a oni koji čine tekuću YPD podlogu u tablici 5. Sastav čvrste selektivne *Brettanomyces* podloge za rast *B. bruxellensis* kvasca prisutnog u crnom vinu naveden je u tablici 6 dok je sastav čvrste selektivne WLN podloge s dodatkom kloramfenikola za rast kvasca *S. cerevisiae* prisutnog u desertnom vinu naveden u tablici 7.

Tablica 4. Sastav čvrste YPD (engl. *Yeast Peptone Dextrose*) podloge.

| SASTOJCI         | MASENA KONCENTRACIJA (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> ) |
|------------------|--|
| agar             | 20   |
| glukoza          | 20   |
| pepton           | 20   |
| kvaščev ekstrakt | 10   |
| destilirana voda | 1000 mL  |

Tablica 5. Sastav tekuće YPD podloge.

| SASTOJCI         | MASENA KONCENTRACIJA (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> ) |
|------------------|--|
| glukoza          | 20   |
| pepton           | 20   |
| kvaščev ekstrakt | 10   |
| destilirana voda | 1000 mL  |

Tablica 6. Sastav čvrste selektivne *Brettanomyces* podloge za rast *B. bruxellensis* kvasca prisutnog u crnom vinu.

| SASTOJCI              | MASENA KONCENTRACIJA<br>(gL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|---|
| dekstroza             | 10  |
| pepton                | 5   |
| kvašćev ekstrakt      | 3   |
| sladni ekstrakt       | 3   |
| kvašćeva dušična baza | 3   |
| kloramfenikol         | 0,1   |
| bromkrezol zeleno     | 0,022                                       |
| tiamin                | 0,02  |
| kumarinska kiselina   | 0,1   |
| cikloheksimid         | 0,01  |
| agar                  | 20  |
| destilirana voda      | 1000 mL                                     |

Čvrsta selektivna *Brettanomyces* podloga 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 7. Sastav čvrste selektivne WLN (engl. *Wallerstein Labs Nutrient Medium*) podloge s dodatkom kloramfenikola za rast kvasca *S. cerevisiae* prisutnog u desertnom vinu.

| SASTOJCI                | SADRŽAJ |
|-------------------------|---------|
| kvašćev ekstrakt        | 4 g     |
| tripton                 | 5 g     |
| glukoza                 | 50 g    |
| kalij dihidrogen fosfat | 0.55 g  |
| kalij klorid            | 0.425 g |
| kalcij klorid           | 0.125 g |
| magnezij sulfat         | 0.125 g |
| željezo klorid          | 2.5 mg  |
| mangan sulfat           | 2.5 mg  |
| bromkrezol zeleno       | 22 mg   |
| kloramfenikol           | 100 mg  |
| agar                    | 20 g    |
| destilirana voda        | 1000 mL |

Priprema čvrste selektivne WLN podloge započinje vaganjem 80 g WLN podloge u jednu litru destilirane vode te se dobivena otopina dobro promiješa i otopi zagrijavanjem uz povremeno mućkanje do potpunog otapanja. Slijedi sterilizacija podloge u autoklavu pri 121°C tijekom 10 minuta. Potom se podloga hladi na 50° C te se dodaje koncentrirana otopina kloramfenikola koja je prethodno pripremljena otapanjem kloramfenikola u apsolutnom etanolu kako bi se dobila koncentracija u podlozi od 100 mgL<sup>-1</sup>. Gotova podloga izlijeva se u sterilne Petrijeve zdjelice te se one čuvaju na temperaturi od 2 °C - 8 °C.

### 3.1.5. Instrumenti

- Sterilni mikrobiološki kabinet, Klima oprema, Hrvatska
- Centrifuga, Rotina 380 R, Hettich, Njemačka
- Vaga, Sartorius, Njemačka
- Vorteks, Ika, Njemačka
- Autoklav, Sutjeska, Srbija
- pH metar, Inolab, Njemačka



- Vodena kupelj, Ika, Njemačka
- Spektrofotometar Specord 50 Plus AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Uređaj koji radi na principu hidrostatskog tlaka, Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Exxes, UK
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex, Njemačka

### 3.1.6. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Menzure od 100 i 500 mL
- Čaše od 50 i 100 mL
- Odmjerne tikvice od 100, 150, 200 i 1000 mL
- Staklene bočice od 100 mL
- Boce od 2000 mL
- Epruvete od 10 i 25 mL
- Stalak za epruvete
- Falcon epruvete
- Stalak za Falcon epruvete
- Termometar
- Erlenmeyerove tikvice
- Staklene pipete (1, 5, 10 i 15 mL) i propipete
- Sterilni tipsevi za mikropipete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Mikropipete 100, 1000 i 5000  $\mu$ L
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL
- Stalak za Eppendorf epruvete
- Bunsenov plamenik
- Pinceta
- Kivete od 1 cm

### 3.1.7. Kemikalije

- 96%-tni etanol
- NaCl
- Folin-Ciocalteu reagens
- 20%-tni natrijev karbonat
- Galna kiselina u 12%-tnom etanolu
- 96%-tni etanol s 0,1 (v/v) HCl
- 2%-tna vodena otopina klorovodične kiseline
- 15%-tna otopina natrijevog hidrogensulfita

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Čuvanje i održavanje kvasca *B. bruxellensis* i *S.cerevisiae*

Radna kultura kvasca *B. bruxellensis*, odnosno kvasca *S. cerevisiae*, čuva se na kosom agaru (YPD) u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C. Svakih 30 dana kvasac se precijepljuje na svježe pripremljeni kosi agar. Zatim slijedi inkubacija pri temperaturi od 24 °C te ponovno čuvanje u hladnjaku pri +4 °C. Trajna kultura kvasca *B. bruxellensis* čuva se u 20 % glicerolu na -80 °C. Trajna kultura kvasca *S. cerevisiae* čuva se u 25 %-tnom glicerolu na -80 °C.

### 3.2.2. Uzgoj inokuluma

Uzgoj kvasca *B. bruxellensis*, odnosno kvasca *S. cerevisiae*, provodi se na način da kvasac najprije raste u Erlenmayerovoj tikvici u 50 mL tekuće YPD podloge u termostatu na temperaturi od 28 °C. Zatim se 10 % tako uzgojene kvašćeve suspenzije inokulira u tekuću YPD podlogu s 4 % etanola. Nadalje se 10 % kvašćeve suspenzije iz YPD podloge s 4 % etanola prenese u tekuću YPD podlogu s 8 % etanola. Kada je kvasac ušao u stacionarnu fazu rasta 10 % kvašćeve suspenzije iz YPD podloge s 8 % etanola prenese se u tekuću YPD podlogu s 12% etanola. Rast kvasca prati se mjerenjem optičke gustoće na 600 nm i nacjepljivanjem na YPD podloge.

### 3.2.3. Priprema vina za tretman visokim hidrostatskim tlakom (HHP)

Kvasac *B. bruxellensis*, odnosno *S. cerevisiae*, je uzgojen u 150 mL YPD podloge s 12 % etanola, i prenesen u Falcon epruvete te centrifugiran na  $4000 \text{ omin}^{-1}$  tijekom 10 minuta. Odcentrifugirana biomasa kvasca *B. bruxellensis* je zatim nacijepljena u crno, odnosno biomasa kvasca *S. cerevisiae* u desertno vino volumena 1500 mL. Nakon 24 sata vino inokulirano kvascem preliveno je u plastične bočice koje su prethodno sterilizirane 96%-tnim etanolom. Bočice su napunjene do vrha, te stavljene u plastične vrećice i podvrgnute vakuum zatvaranju.

### 3.2.4. Tretman visokim hidrostatskim tlakom (HHP)

Prethodno pripremljeni uzorci vina podvrgnuti su HHP tretmanima (tablica 8). Uređaj za tretman HHP prikazan je na slici 6.

Tablica 8. Odabrani uvjeti tretiranja HHP.

| tlak (MPa) | vrijeme (min) |   |   |    |    |
|------------|---------------|---|---|----|----|
| 100        | 1             | 3 | 5 | 15 | 25 |
| 200        | 1             | 3 | 5 | 15 | 25 |



Slika 6. Uređaj za tretman visokim hidrostatskim tlakom (HHP).

Bočice s uzorkom inokuliranog vina se stavljaju u cilindar uređaja za tretman HHP

napunjen propilen-glikolom i provodi se tretman pri odabranim parametrima. Nakon tretmana dio uzorka se odmah analizira, a ostatak uzorka (100 mL) se čuva tijekom 90 dana u staklenim bočicama.

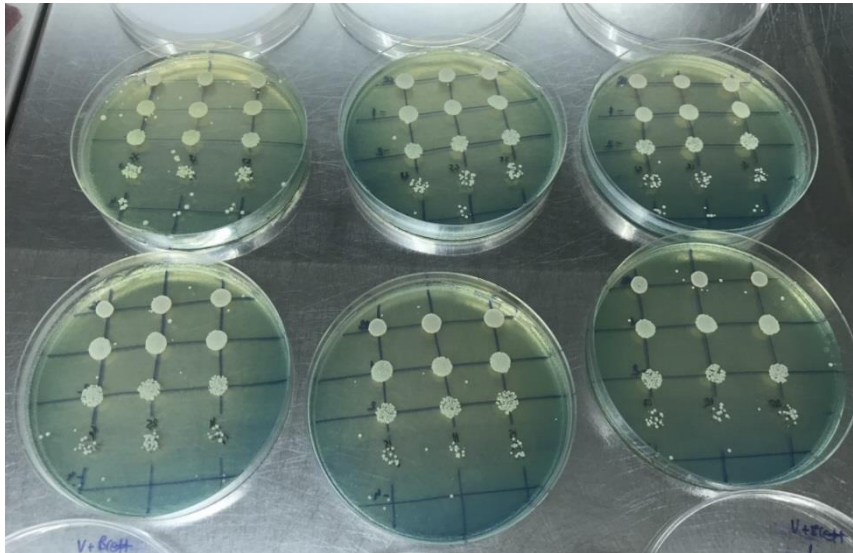
### 3.2.5. Skladištenje uzoraka

Tretirani i kontrolni uzorci inokuliranog vina se skladište u sterilnim staklenim bocama na  $20\pm 2$  °C tijekom 90 dana.

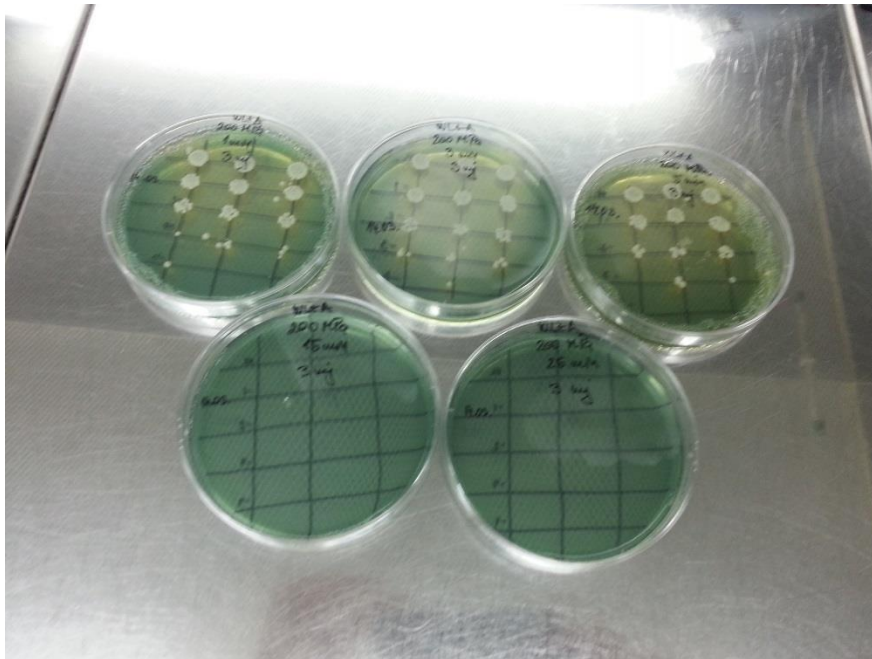
### 3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca *B. bruxellensis* i *S. cerevisiae*

Broj stanica kvasca određuje se tijekom faze pripreme inokuluma, prije tretmana visokim hidrostatskim tlakom, odmah nakon tretmana te tijekom skladištenja nakon 30, 60 i 90 dana. Broj stanica određen je nacjepljivanjem originalnog inokuliranog vina i decimalnih razrjeđenja na čvrste YPD, *Brettanomyces* i WLN podlogu s kloramfenikolom. Decimalna razrjeđenja pripremaju se su u plastičnim Eppendorf epruvetama od 1500 mL na način da se 100  $\mu$ L kvaščeve suspenzije pomiješano s 900  $\mu$ L sterilne fiziološke otopine za prvo razrjeđenje. Volumen od 100  $\mu$ L tako pripremljenog decimalnog razrjeđenja prenosi se u drugu Eppendorf epruvetu i pomiješan s 900  $\mu$ L sterilne fiziološke otopine te se na taj način dobije drugo decimalno razrjeđenje. Ovaj se postupak ponavlja do četvrtog razrjeđenja. Volumeni od 10  $\mu$ L originala i svakog decimalnog razrjeđenja nacjepljuju se na krute podloge u tri paralele. Nakon dva dana inkubacije pri 28 °C za *S. cerevisiae*, odnosno pet dana za *B. bruxellensis* prebroje se porasle kolonije. Izrasle kolonije se broje u onom decimalnom razrjeđenju unutar kojeg je poraslo između 10 i 50 kolonija.

Na slici 7 prikazane su kolonije kvasca *B. bruxellensis*, a na slici 8 kolonije kvasca *S. cerevisiae*.



Slika 7. Narasle kolonije kvasca *B. bruxellensis* na Brettanomyces podlozi.



Slika 8. Narasle kolonije kvasca *S. cerevisiae* na čvrstoj WLN podlozi s kloramfenikolom.

Srednja vrijednost tri naciijepljene paralele je konačan broj poraslih kolonija. Na osnovu izbrojenih kolonija izračunat je broj stanica u mililitru vina te je određen logaritam broja stanica ( $\log \text{CFU mL}^{-1}$ ).

Formula za izračun broja stanica:

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

### 3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih polifenola

Kako bi se odredila koncentracija ukupnih polifenola, crno vino se najprije razrijeđuje u omjeru 1:9, v:v, s destiliranom vodom. U tikvicu od 25 mL otpipetira se 0,25 mL razrijeđenog uzorka, 1,25 mL FC reagensa (razrijeđenog 1:2) i 15 mL vode. Nakon što se sve dobro promiješa, nakon 30 sekundi dodano se 3,75 mL 20%-tnog natrijevog karbonata. Tikvice se zatim nadopune do oznake s destiliranom vodom te ostave 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm.

Baždarna krivulja izrađuje se pripremom otopine galne kiseline u 12%-tnom etanolu sljedećih koncentracija: 50, 100, 200, 400, 600 i 800 mgL<sup>-1</sup>. Otpipetira se 1 mL otopine, doda se 5 mL FC reagensa i 60 mL vode. Sve se dobro promiješa i poslije 30 sekundi dodaje se 15 mL 20%-tnog natrijevog karbonata. Nadopuni se do oznake destiliranom vodom i ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtava se baždarna krivulja pri čemu se na apscisi nanese koncentracija galne kiseline (mgL<sup>-1</sup>), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm. Iz baždarne krivulje dobije se jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline u mgL<sup>-1</sup>.

### 3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih antocijana

Metoda se bazira na činjenici da se HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> ion veže na položaju 2' te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno paralelni uzorak tretira se destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka. Ta razlika pokazuje koncentraciju antocijana (Ribereau-Gayon et Stonestreet, 1965).

Kako bi se odredila koncentracija antocijana u čašu od 50 mL otpipetira se 1 mL vina, 1 mL 96%-tnog etanola s 0,1 (v/v) HCl i 20 mL 2%-tne vodene otopine HCl. Po 10 mL ove otopine se zatim otpipetira u dvije epruvete. U jednu epruvetu se zatim dodaje 4 mL vode, a u drugu 4 mL 15%-tne otopine natrij hidrosulfita. Nakon 15 minuta mjeri se apsorbancija u obje otopine na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Koncentracija antocijana u ispitivanom uzorku izračuna se prema formuli

$$Ac \text{ (mgL}^{-1}\text{)} = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

$A_c$  (mgL<sup>-1</sup>) – količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 – faktor preračunavanja

$D_1$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana voda

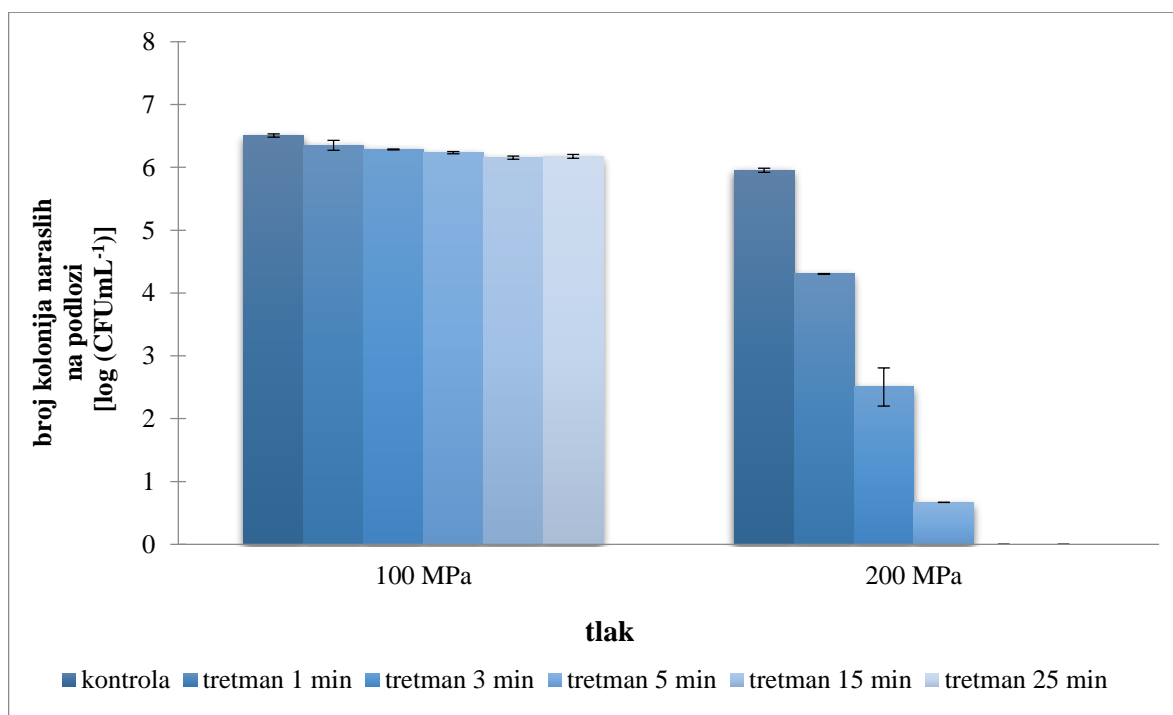
$D_2$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana 15%-tna otopine natrijevog hidrogensulfita

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati primjene tretmana HHP (100 i 200 MPa) kroz 1, 3, 5, 15, i 25 minuta na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* u crnom vinu, odnosno kvasca *S. cerevisiae* u desertnom vinu prikazani su na slikama 9-14. Dok su rezultati utjecaja provedenih tretmana na koncentraciju ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u crnom vinu te koncentraciju ukupnih polifenola u desertnom vinu prikazani na slikama 15-20.

### 4.1. UTJECAJ TRETMANA HHP NA INAKTIVACIJU KVASCA *B. bruxellensis* U CRNOM VINU

U svrhu utvrđivanja kratkotrajnog (odmah nakon tretmana) i dugoročnog utjecaja tretmana HHP na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* u crnom vinu, provedeni su tretmani HHP od 100 i 200 MPa u trajanju od 1, 3, 5, 15 i 25 minuta.



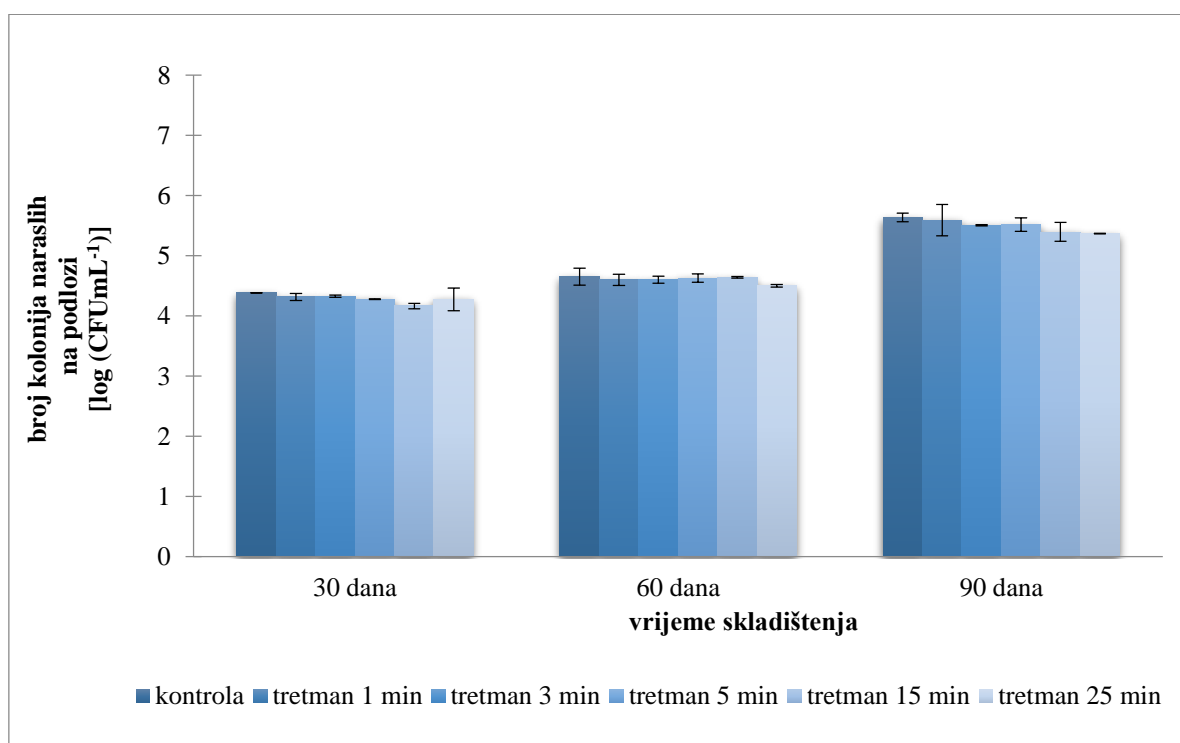
Slika 9. Brojnost populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u netretiranim i tretiranim uzorcima crnog vina odmah nakon tretmana HHP od 100 i 200 MPa.

Primjenom HHP od 100 MPa nije uočena značajna promjena u brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u crnom vinu prije (6 log CFU mL<sup>-1</sup>) i nakon provedenih



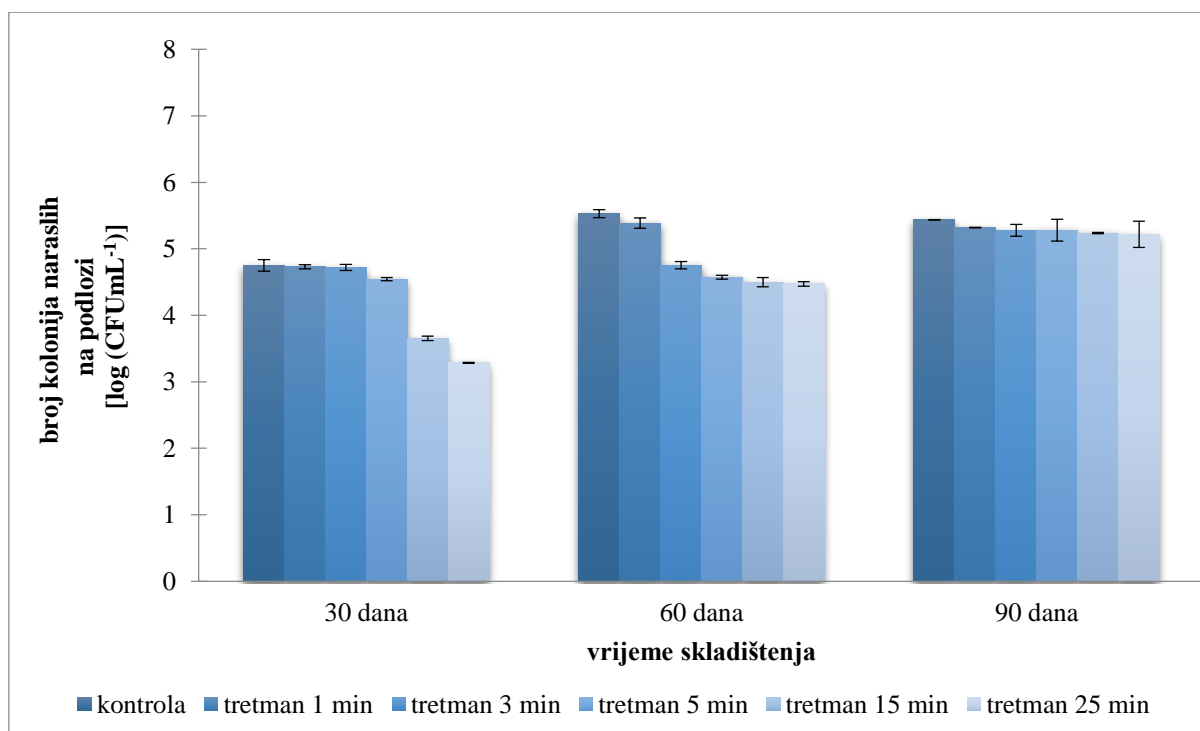
tretmana od 1 do 25 minuta (oko 6 log CFUmL<sup>-1</sup>), odnosno nije uočena značajna inaktivacija rasta stanica kvasca na čvrstoj podlozi. Primjena HHP od 200 MPa i dužih trajanja tretmana uočeno je smanjenje brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u crnom vinu, odnosno inaktivacija rasta stanica kvasca na čvrstoj podlozi. Nakon tretmana u trajanju od 1 minute na čvrstoj podlozi je bilo prisutno 4 log CFUmL<sup>-1</sup>, nakon tretmana 3 minute uočeno je 2 log CFUmL<sup>-1</sup> dok je nakon 5 minuta tretmana uočen rast stanica od oko 1 log CFUmL<sup>-1</sup>. Nakon tretmana HHP od 200 MPa u trajanju od 15 i 25 minuta uočena je potpuna inaktivacija rasta stanica kvasca na čvrstoj podlozi, tj. redukcija za 6 log (CFUmL<sup>-1</sup>) (slika 9).

Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjima Van Wyka i Silve (2016) koji su utvrdili da tretman kontaminiranog vina Cabernet Sauvignon-a s HHP od 200 MPa uzrokuje inaktivaciju rasta stanica kvasca *B. bruxellensis* na čvrstoj podlozi. Istodobno je spomenutim istraživanjem uočeno kako trajanje tretmana kao i primijenjeni visoki hidrostatski tlak ovisi o soju kvasca *B. bruxellensis*. Također Van Wyk i Silva (2017) su utvrdili da primjena tretmana visokog hidrostatskog tlaka od 200 MPa u vremenu od 60 sekundi na sedam različitih stolnih vina uzrokuje inaktivaciju rasta kvasca *B. bruxellensis* na čvrstim podlogama.



Slika 10. Brojnost populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u netretiranim i tretiranim (HHP od 100 MPa) uzorcima crnih vina nakon 30, 60 i 90 dana skladištenja.

Nadalje, kako bi se ispitaio dugoročni utjecaj primijenjenih tretmana na brojnost populacije kvasca *B. bruxellensis* u crnom vinu praćen je broj naraslih stanica kvasca nakon 30, 60 i 90 dana u netretiranim i tretiranim uzorcima vina. Nakon 30 dana skladištenja uzoraka crnih vina tretiranih HHP od 100 MPa nije uočena razlika u brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* između netretiranog i tretiranog uzorka te je iznosila oko 4 log CFUmL<sup>-1</sup>. Daljnjim skladištenjem (nakon 60 i 90 dana) uočen je porast brojnosti kvasca u svim uzorcima vina (tretiranim i netretiranim). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) brojnost populacije kvasca prisutna u netretiranom vinu i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala i iznosila je oko 5 log CFUmL<sup>-1</sup> (slika 10).



Slika 11. Brojnost populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u netretiranim i tretiranim (HHP od 200 MPa) uzorcima crnih vina nakon 30, 60 i 90 dana skladištenja.

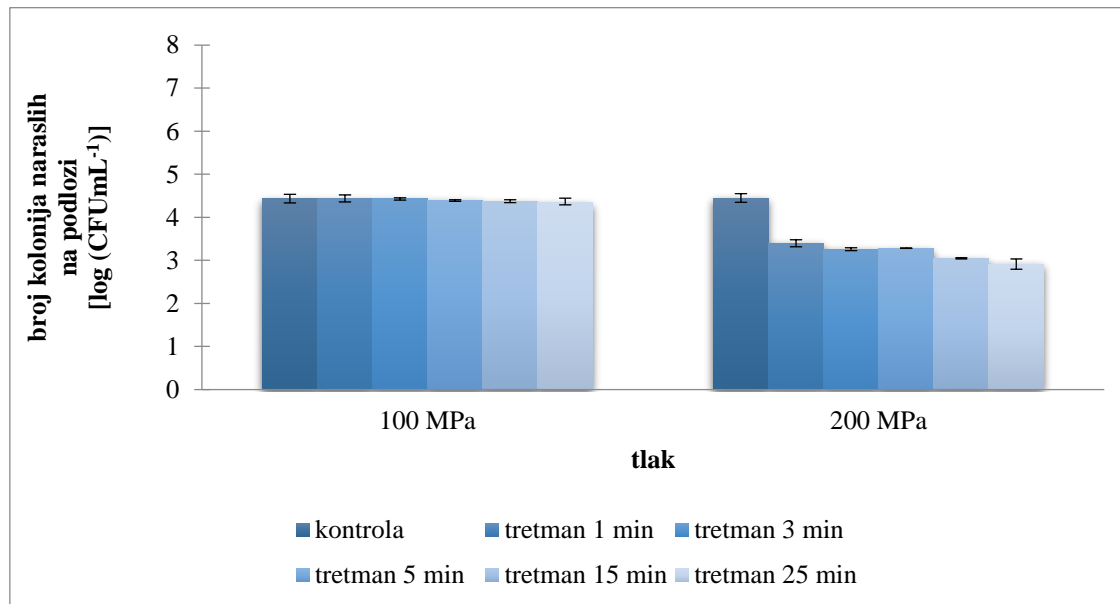
Nakon 30 dana skladištenja uzoraka vina tretiranih HHP od 200 MPa uočena je samo razlika u brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* između netretiranog uzorka (oko 4 log CFUmL<sup>-1</sup>) i uzorka tretiranih tijekom 15 i 25 minuta (oko 3 log CFUmL<sup>-1</sup>) odnosno u uzorcima kod kojih odmah nakon tretmana nije zabilježen rast stanica kvasca na podlozi. Daljnjim skladištenjem (nakon 60 i 90 dana) uočen je porast brojnosti kvasca u svim tretiranim uzorcima vina. Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) brojnost populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutna u netretiranom i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala iznosila je oko 5 log

CFUmL<sup>-1</sup> (slika 11).

U dosadašnjim istraživanjima utjecaja HHP na kvasac *B. bruxellensis* praćena je samo inaktivacija kvasca odmah nakon tretmana, tj. rast stanica kvasca *B. bruxellensis* na čvrstim podlogama ali nije praćen dugoročni utjecaj ove tehnike na prisutnost populacije kvasca *B. bruxellensis* u vinima. Dobiveni rezultati vjerojatno su posljedica sposobnosti stanice kvasca *B. bruxellensis* da tijekom stresnih uvjeta uđe u VBNC (*engl.* „*viable but not culturable*“) stanje koje karakterizira nemogućnost rasta stanica kvasca na krutoj podlozi. Dosadašnjim istraživanjem utvrđeno je da prestankom stresnih uvjeta stanica kvasca izlazi iz VBNC stanja te nastavlja svoj rast i razmnožavanje te metaboličku aktivnost (Agnolucci i sur., 2010).

#### 4.2. UTJECAJ TRETMANA HHP NA INAKTIVACIJU KVASCA *S. cerevisiae* U DESERTNOM VINU

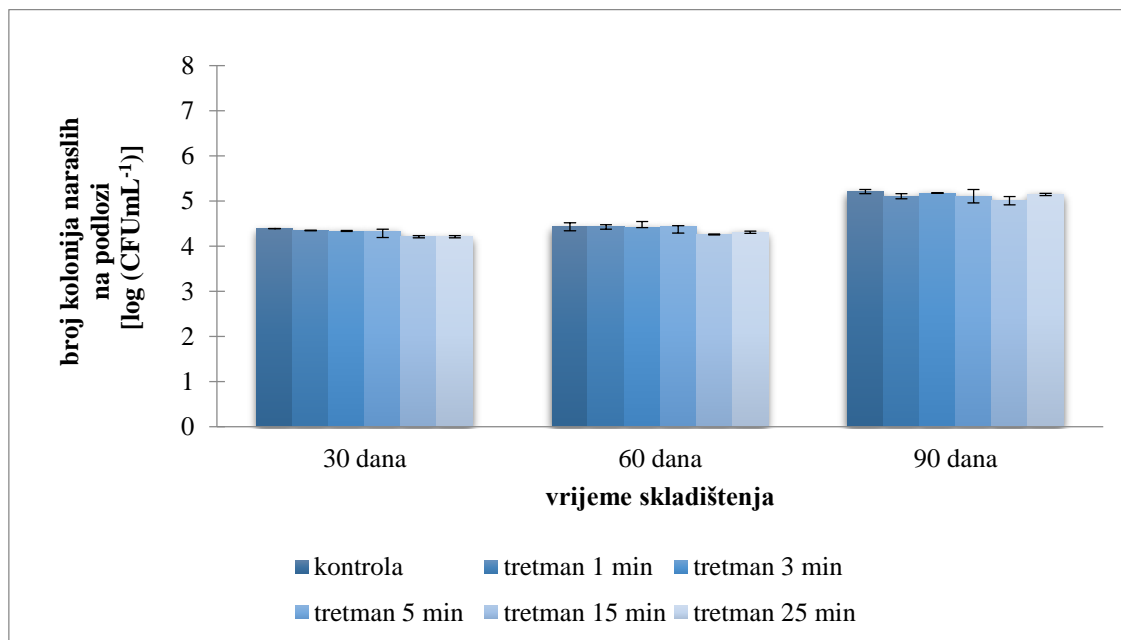
U svrhu utvrđivanja kratkotrajnog (odmah nakon tretmana) i dugoročnog utjecaja tretmana HHP na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* u desertnom vinu, provedeni su tretmani s hidrostatskim tlakom od 100 i 200 MPa u trajanju od 1, 3, 5, 15 i 25 minuta.



Slika 12. Brojnost populacije kvasca *S. cerevisiae* prisutne u netretiranim i tretiranim uzorcima desertnog vina odmah nakon tretmana HHP od 100 i 200 MPa.

Primjenom HHP od 100 MPa nije uočena promjena u brojnosti populacije kvasca *S.*

*cerevisiae* prisutne prije i nakon svih provedenih tretmana (1 do 25 minuta), odnosno nije uočena inaktivacija rasta stanica kvasca na čvrstoj podlozi pri čemu je brojnost populacije kvasca bila oko 4 log CFUmL<sup>-1</sup>. Primjenom HHP od 200 MPa uočeno je smanjenje brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae*, odnosno inaktivacija rasta stanica na čvrstoj podlozi u svim tretiranim uzorcima za 1 log CFUmL<sup>-1</sup> na oko 3 log CFUmL<sup>-1</sup>, ali nije uočen utjecaj trajanja tretmana na promjenu u brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae* narasle na čvrstoj podlozi (slika 12). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje je proveo Buzrul (2012), a u kojem se ispitivao utjecaj HHP na inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* u desertnom vinu. U spomenutom istraživanju je utvrđena potpuna inaktivacija kvasca pri tlakovima od 300-400 MPa tijekom različitih duljina tretmana (5, 10, 15 i 20 minuta).



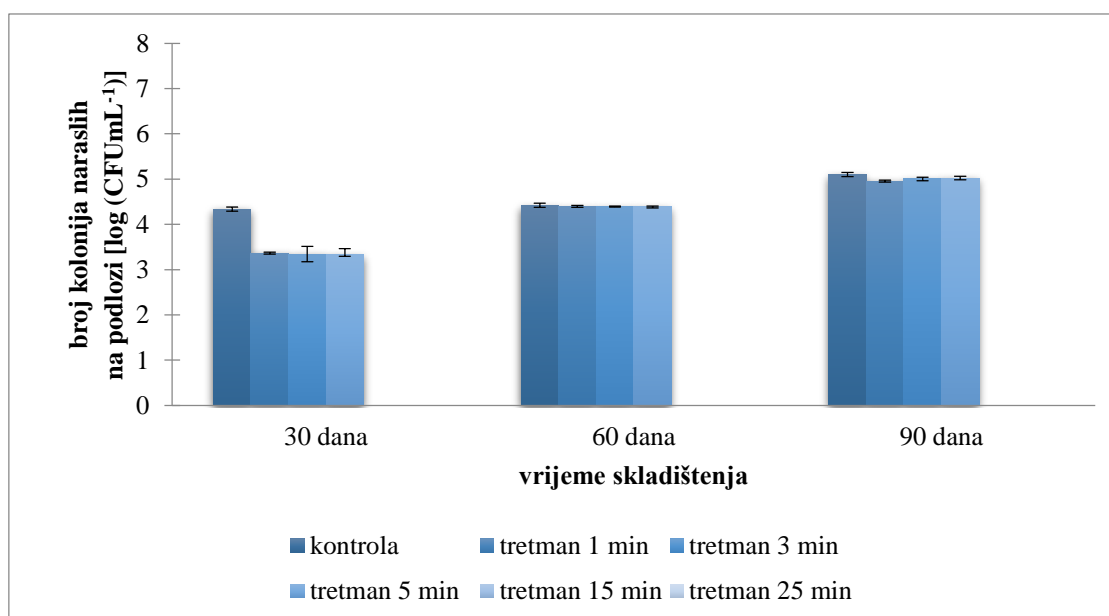
Slika 13. Brojnost populacije kvasca *S. cerevisiae* prisutne u netretiranim i tretiranim ( HHP od 100 MPa) uzorcima desertnog vina nakon 30, 60 i 90 dana skladištenja.

Kako bi se ispitao dugoročni utjecaj primijenjenih tretmana na brojnost populacije kvasca *S. cerevisiae* u desertnom vinu praćen je broj naraslih stanica kvasca nakon 30, 60 i 90 dana u netretiranim i tretiranim uzorcima vina.

Tijekom skladištenja uzoraka vina tretiranih HHP od 100 MPa nije uočena razlika u brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae* između netretiranog i svih tretiranih uzoraka vina nakon 30 i 60 dana skladištenja pri čemu je iznosila oko 4 log CFUmL<sup>-1</sup>. Daljnjim

skladištenjem (nakon 90 dana) uočen je blagi porast u brojnosti populacije kvasca u svim uzorcima (netretiranom i tretiranim vinima). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) brojnost populacije kvasca prisutne u netretiranom i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala i iznosila oko 5 log CFU $\text{mL}^{-1}$  (slika 13).

U istraživanju koji su proveli Marx i sur. (2011) djelovanjem HHP pri 100 MPa došlo je do smanjenja brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae* te je utvrđeno da na smanjenje brojnosti ne utječe samo HHP već i sastav medija u kojem se stanice kvasca nalaze. Ako se stanice nalaze u mediju koji sadrži visoki udio šećera (saharoze, glukoze) povećava se rezistencija kvasca na djelovanje HHP. Može se zaključiti da zbog vina koje je korišteno kao medij u ovom diplomskom radu, a koje je sadržavalo 50 gL $^{-1}$  šećera, nije uočeno djelovanje visokog hidrostatskog tlaka pri 100 MPa.



Slika 14. Brojnost populacije kvasca *S. cerevisiae* prisutne u netretiranim i tretiranim (HHP od 200 MPa) uzorcima desertnog vina nakon 30, 60 i 90 dana skladištenja.

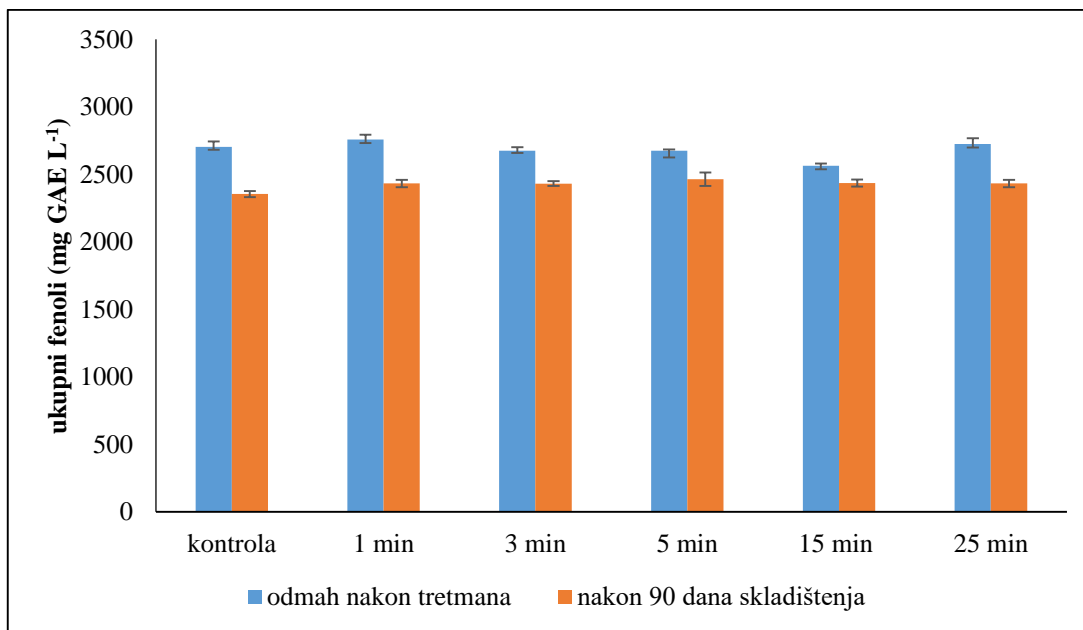
Nakon 30 dana skladištenja uzoraka vina tretiranih HHP od 200 MPa uočena je značajna razlika u brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae* između netretiranog i tretiranih uzoraka vina pri čemu je brojnost populacije u netretiranom uzorku vina iznosila oko 4 log CFU $\text{mL}^{-1}$  dok je kod uzoraka tretiranih 1, 3 i 5 minuta iznosila oko 3 log CFU $\text{mL}^{-1}$ . Nadalje u uzorcima vina tretiranim 15 i 25 minuta uočena je potpuna inaktivacija rasta stanica kvasca na čvrstoj podlozi (redukcija za 4 log CFU $\text{mL}^{-1}$ ). Daljnjim skladištenjem (nakon 60 i 90 dana) uočen je porast

brojnosti kvasca u uzorcima tretiranim 1, 3 i 5 minuta na  $4 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , a u uzorcima koji su tretirani 15 i 25 minuta i nadalje nije uočen rast stanica kvasca *S. cerevisiae*. Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) brojnost populacije kvasca prisutne u netretiranom i uzorcima tretiranim 1, 3 i 5 minuta nije se značajno razlikovala i iznosila oko  $5 \log \text{CFU mL}^{-1}$ , dok je kod uzoraka tretiranih 15 i 25 minuta uočena potpuna inaktivacija rasta stanica kvasca *S. cerevisiae* (slika 14).

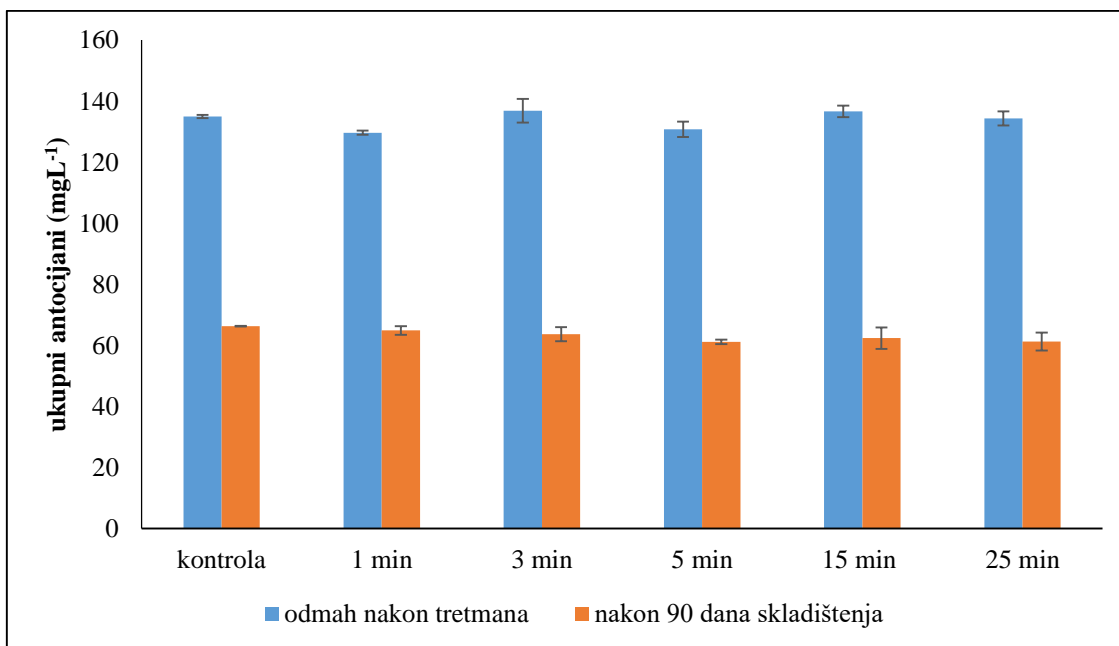
Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Marx i sur. (2011) kojim je utvrđeno da djelovanjem HHP dolazi do promjena u integritetu stanične membrane kvasca *S. cerevisiae*, tj. mijenjaju se membranski proteini i smanjuje membranski dvosloj što dovodi do promjena u stabilnosti i funkciji membrane poput permeabilnosti. Također, utvrđeno je da tretman HHP dovodi do promjena u vanjskom sloju stanične stjenke jer se denaturiraju manoproteini. Pucanjem stanične stjenke dolazi do izlaganja ostatka stanice okolišnim uvjetima bez mogućnosti oporavka stanice. Može se zaključiti da je u slučaju tretmana HHP pri 200 MPa došlo do naknadne inaktivacije rasta kvasca *S. cerevisiae* jer je došlo do djelomičnog oštećenje stanične stjenke i/ili stanične membrane pa stanica nije mogla preživjeti u uvjetima desernog vina poput osmotskog stresa, visokog udjela alkohola i niskog pH.

#### **4.3. UTJECAJ TRETMANA HHP NA KONCENTRACIJU UKUPNIH POLIFENOLA I UKUPNIH ANTOCIJANA U CRNOM VINU**

Kako bi se utvrdio kratkotrajni i dugoročni utjecaj tretmana HHP (100 i 200 MPa u trajanju od 1, 3, 5, 15 i 25 minuta) na koncentraciju ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u crnom vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana i nakon 90 dana skladištenja.



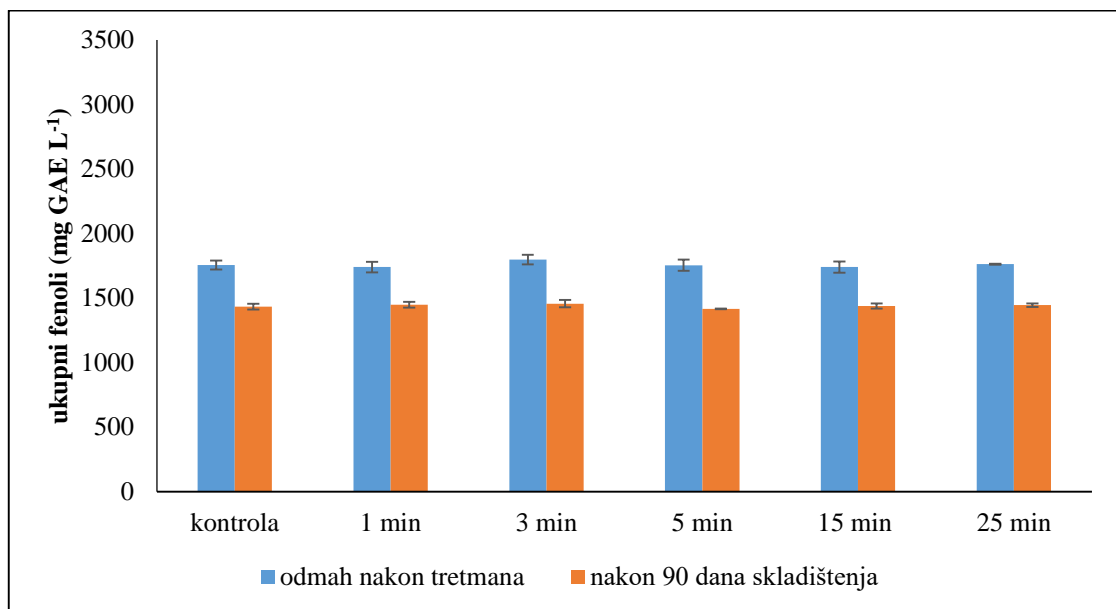
Slika 15. Sadržaj ukupnih polifenola u crnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 100 MPa i nakon 90 dana skladištenja.



Slika 16. Sadržaj ukupnih antocijana u crnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 100 MPa i nakon 90 dana skladištenja.

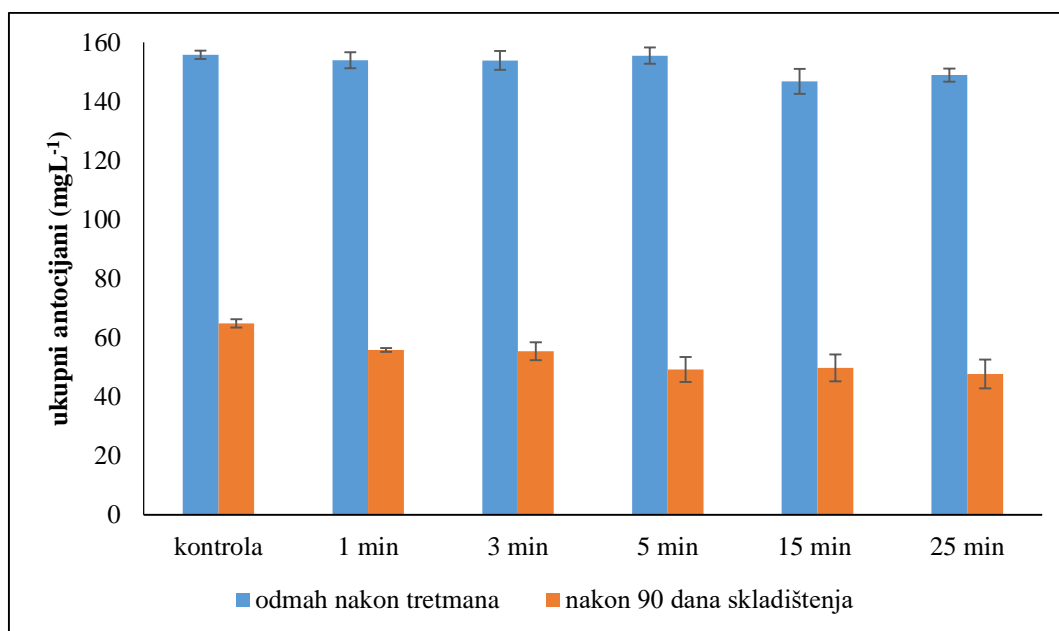
Praćenjem koncentracije ukupnih polifenola odmah nakon tretmana uočeno je da različito trajanje tretmana pri HHP od 100 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 2700 mg GAE L<sup>-1</sup>) (slika 15). Na kraju skladištenja (nakon 90

dana) koncentracija ukupnih polifenola u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (oko 2400 mg GAE L<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 15). Nadalje, praćenjem koncentracije ukupnih antocijana odmah nakon tretmana također je uočeno da različito trajanje tretmana pri HHP od 100 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 130 mgL<sup>-1</sup>) (slika 16). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) koncentracija ukupnih antocijana u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (oko 60 mgL<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 16).



Slika 17. Sadržaj ukupnih polifenola u crnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 200 MPa i nakon 90 dana skladištenja.





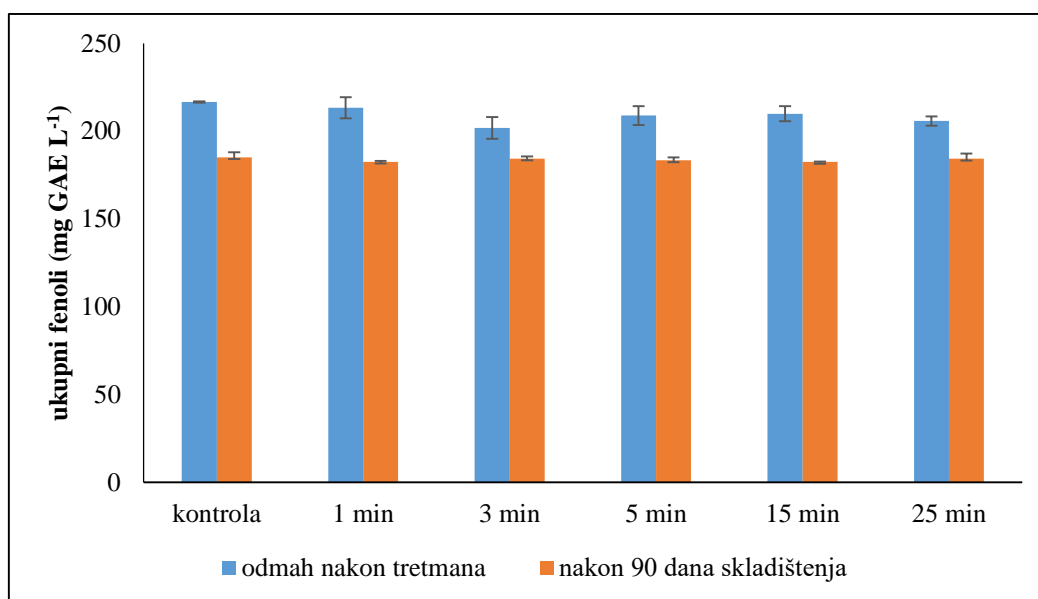
Slika 18. Sadržaj ukupnih antocijana u crnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 200 MPa i nakon 90 dana skladištenja.

Praćenjem koncentracije ukupnih polifenola odmah nakon tretmana uočeno je da različito trajanje tretmana pri visokom hidrostatskom tlaku od 200 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 1700 mg GAE L<sup>-1</sup>) (slika 17). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) koncentracija ukupnih polifenola u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (oko 1400 mg GAE L<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 17). Nadalje praćenjem koncentracije ukupnih antocijana odmah nakon tretmana također je uočeno da različito trajanje tretmana pri HHP od 200 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 150 mg L<sup>-1</sup>) (slika 18). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) koncentracija ukupnih antocijana u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (50 - 60 mg L<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 18).

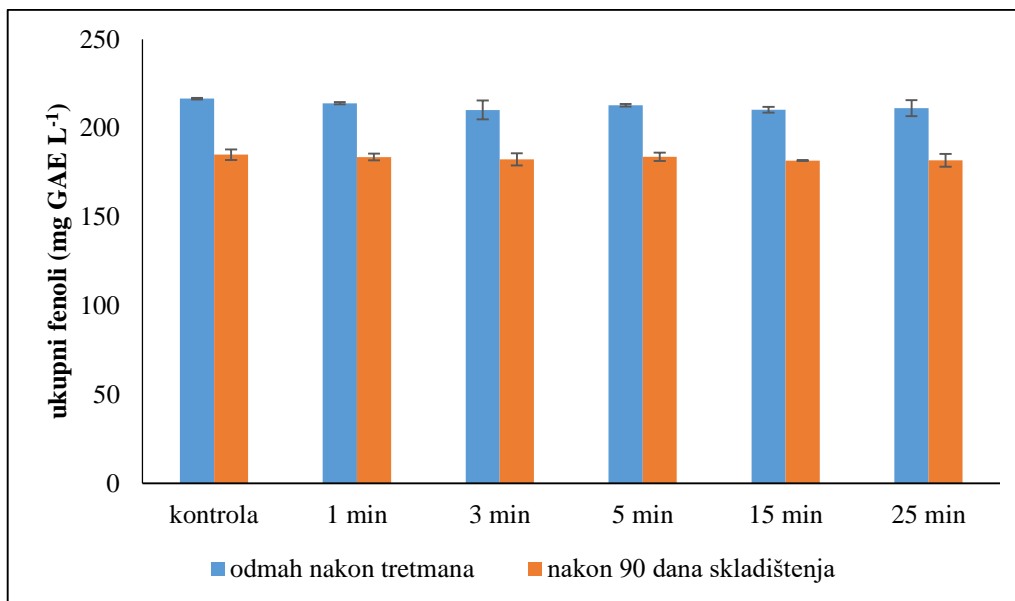
Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Santos i sur. (2013a) koji su utvrdili da odmah nakon provedenog tretmana HHP nema promjene u sadržaju ukupnih polifenola i antocijana u crnom vinu, no nakon skladištenja od 9 i 12 mjeseci dolazi do smanjenja njihovog sadržaja u netretiranim i tretiranim uzorcima vina. Može se zaključiti da tretman ne utječe na smanjenje sadržaja ukupnih polifenola i antocijana u crnim vinima, već je to posljedica raznih kemijskih i biokemijskih reakcija u vinu tijekom starenja.

#### 4.4. UTJECAJ TRETMANA HHP NA KONCENTRACIJU UKUPNIH POLIFENOLA U DESERTNOM VINU

Kako bi se utvrdio trenutni i dugoročni utjecaj tretmana HHP (100 i 200 MPa u trajanju od 1, 3, 5, 15 i 25 minuta) na koncentraciju ukupnih polifenola u desertnom vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana i nakon 90 dana skladištenja.



Slika 19. Sadržaj ukupnih polifenola u desertnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 100 MPa i nakon 90 dana skladištenja.



Slika 20. Sadržaj ukupnih fenola u desertnom vinu odmah nakon tretmana HHP od 200 MPa i nakon 90 dana skladištenja.

Praćenjem koncentracije ukupnih polifenola odmah nakon tretmana uočeno je da različito trajanje tretmana pri HHP od 100 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 200 mg GAE L<sup>-1</sup>) (slika 19). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) koncentracija ukupnih polifenola u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (oko 180 mg GAE L<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 19). Praćenjem koncentracije ukupnih polifenola odmah nakon tretmana uočeno je da različito trajanje tretmana pri HHP od 200 MPa nije utjecalo na promjenu koncentracije ukupnih polifenola u vinu (oko 210 mg GAE L<sup>-1</sup>) (slika 20). Na kraju skladištenja (nakon 90 dana) koncentracija ukupnih polifenola u netretiranim i tretiranim uzorcima vina nije se značajno razlikovala (oko 180 mg GAE L<sup>-1</sup>), ali je smanjena u odnosu na vrijednosti utvrđene odmah nakon tretmana (slika 20).

Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Santos i sur. (2013b) koji su utvrdili da odmah nakon provedenog tretmana HHP nema promjene u sadržaju ukupnih polifenola u bijelom vinu, no nakon skladištenja od 9 i 12 mjeseci dolazi do smanjenja njihovog sadržaja u netretiranim i tretiranim uzorcima. Može se zaključiti da tretman ne utječe na smanjenje sadržaja ukupnih polifenola u bijelim vinima, već je to posljedica raznih kemijskih i biokemijskih reakcija u vinu, npr. kemijska oksidacija polifenola tijekom skladištenja.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i prikazanih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 100 MPa u trajanju od 1 do 25 minuta nije utjecao na rast stanica kvasca *B. bruxellensis* na čvrstoj podlozi odnosno na kratkotrajnu (odmah nakon tretmana) ili dugoročnu promjenu u brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u crnom vinu.
2. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa u trajanju od 15 i 25 minuta je utjecao samo na kratkotrajni rast stanica kvasca *B. bruxellensis* na čvrstoj podlozi (rast kvasca odmah nakon provedenog tretmana) bez dugoročnog utjecaja na promjenu brojnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* prisutne u crnom vinu.
3. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 100 MPa u trajanju od 1 do 25 minuta nije utjecao na rast stanica kvasca *S. cerevisiae* na čvrstoj podlozi odnosno na kratkotrajnu (odmah nakon tretmana) ili dugoročnu promjenu u brojnosti populacije kvasca *S. cerevisiae* prisutne u desertnom vinu.
4. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa u trajanju od 15 i 25 minuta nije utjecao na kratkotrajni rast stanica kvasca *S. cerevisiae* na čvrstoj podlozi (rast kvasca odmah nakon provedenog tretmana), ali je imao dugoročni utjecaj na promjenu broja populacije kvasca *S. cerevisiae* prisutne u desertnom vinu, tj. na potpunu inaktivaciju rasta.
5. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 100 i 200 MPa u trajanju od 1 do 25 minuta nije utjecao na koncentraciju ukupnih polifenola i ukupnih antocijana u crnom vinu.
6. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 100 i 200 MPa u trajanju od 1 do 25 minuta nije utjecao na koncentraciju ukupnih polifenola u desertnom vinu.

## 6. LITERATURA

- Agnolucci, M., Cristani, C., Maggini, S., Rea, F., Cossu, A., Tirelli, A., Nuti, M. (2014) Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Ann. Microbiol.* **64**(2), 653–659.
- 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*. *Int. J. Food Microbiol.* **143**(1–2), 76–80.
- Blomqvist, J., Passoth, V. (2015) *Dekkera bruxellensis* – spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. *FEMS Yeast Res.* **15**(4), 1–9.
- Bosiljkov T., Tripalo B., Ježek D., Brnčić M., Karlović S. (2010) Princip rada i primjena visokih tlakova u prehrambenoj industriji, *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske*, (59) **11**, 539 – 544.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. (1996) Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall, NewYork.
- Butz, P., Tauscher, B. (2002) Emerging technologies: chemical aspects. *Food Res. Int.* **35**, 279–284.
- Buzrul, S. (2012) High hydrostatic pressure treatment of beer and wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **13**, 1-12.
- Caruso, M., Fiore, C., Contrusi, M., Salzano, G., Paparella A., Romano, P. (2002) Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microb. Biot.* **18**, 159–163.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., Pons, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agr.* **60**, 165–178.

Cheftel, J. C. (1992) Effects of HHP on food constituents. U: High pressure and biotechnology, (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., ured.) John Libbey & Co. Ltd., London, str. 195–209.

Ciani, M., Comitini, F. (2014) Brettanomyces. U: Encyclopedia of Food Microbiology, (Batt, C., A., Tortorello, M., ured.), Elsevier, London, str. 316–323.

Ciani, M., Ferraro, L. (1997) Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food Agr.* **75**, 489–495.

Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., and Pretorius, I. S. (2012) Flavor-active wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 601–618.

Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2008) Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* **25**, 422–27.

Curtin, C. D., Varela, C., Borneman, A. (2015) Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Aust. J. Grape Wine R.* **21**, 680–692.

Custers, M. T. J. (1940) Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. Doktorski rad. Sveučilište u Delftu, Delft.

Das Murtey, M., Ramasamy, P. (2016) Sample preparations for scanning electron microscopy-life sciences. U: Modern electron microscopy in physical and life sciences, (Janecek, M., Kral, R., ured.), InTech, Beč.

Deak, T., Reichart, O. (1986) Unacceptable levels of yeasts in bottled wine. U: Methods for the Mycological Examination of Food. (King, A., Pitt, J., Beuchat, L., Corry, J., ured.), Plenum Press, New York, str. 215–218.

- Delfini, C., Faia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., Ambro, S. (2002) Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J. Agricult. Food Chem.* **50**, 5605–11.
- Dickinson J. R., Schweizer, M. (2004) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*, 2. izd., Taylor and Francis Ltd., London.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., Lonvaud-Funel, A. (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 862–871.
- Eldarov, M. A., Kishkovskaia, S. A., Tanaschuk, T. N., Mardanov, A. V. (2016) Genomics and biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Biochemistry – Moscow.* **81(13)**, 1650–1668.
- Feldmann H. (2012) Yeast: Molecular and cell biology, 2. izd., Wiley-VCH Verlag, Amsterdam.
- Fia, G., Giovani, G., Rosi, I. (2005) Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 509-517.
- Fleet, G. H. (1998) The microbiology of alcoholic beverages. U: Microbiology of fermented food (Wood, B. J. B., ured.), Blackie Academy and Professional, New York, str. 217–262.
- Fugelsang, K., Edwards, C. G. (2007) Wine Microbiology: Practical applications and procedures, 2. izd., Springer Science, New York.
- Gänzle, M., Liu, Y. (2015) Mechanisms of pressure-mediated cell death and injury in *Escherichia coli*: from fundamentals to food applications. *Front. Microbiol.* **6**, 599.
- Garde-Cerdan, T., Arias-Gil, M., Marselles-Fontanet, A. R., Ancin-Azpilicueta, C., Martin-Belloso, O. (2007) Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control* **18**, 473–479.

- George, J. M., Rastogi, N. K. (2008) High pressure processing for food fermentation. U: Novel food fermentation technologies, (Ojha, K., Tiwari, B., ured.), Springer, Švicarska, str. 57-83.
- Glänzel, W., Veugelers, R. (2006) Science for wine: A bibliometric assessment of wine and grape research for wine-producing and consuming countries. *Am. J. Enol. Viticult.* **57**, 23–32.
- Godoy, L., Silva-Moreno, E., Mardones, W., Guzman, D., Cubillos, F. A., Ganga, A. (2017) Genomics perspectives on metabolism, survival strategies, and biotechnological applications of *Brettanomyces bruxellensis* LAMAP2480. *J. Mol. Microb. Biotech.* **27(3)**, 147–158.
- Goodwin, C. O., Morris, J. R. (1991) Effect of ultrafiltration on wine quality browning. *Am. J. Enol. Viticult.* **42**, 347–53.
- Green, A. K., Few, B. K., Serafini, J. C. (1993) A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *J. Dairy Sci.* **76**, 3617–3620.
- Gupta, R., Balasubramaniam, V. M. (2012) High-pressure processing of fluid foods. U: Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods, (Cullen, P. J., Tiwari, B. K., Valdramidis, V., ured.) Elsevier Inc., Amsterdam, str. 109-133.
- Hampson, B. (2000) Use of ozone for winery and environmental sanitation, <<https://www.practicalwinery.com/janfeb00/ozone.htm>>. Pristupljeno 15. lipnja 2018.
- Hauben, K. J., Bartlett, D. H., Soontjens, C. C., Cornelis, K., Wuytack, E. Y., Michiels, C. W. (1997) *Escherichia coli* mutants resistant to inactivation by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microb.* **63**, 945-950.
- Henschke, P., Curtin, C., Grbin, P. (2007) Molecular characterization of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Microbiol. Aust.* **28**, 76–78.
- Hoover, D. G. (1993) Pressure effects on biological systems. *Food Technol.* **47(6)**, 150–155.
- Jackson, R. S. (2008) Wine science. Principles and applications, 3. izd., Elsevier, Amsterdam.



Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005) *Modern food microbiology*, 7. izd., Springer, New York.

Ježek, D., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Karlović, S. (2015) *Obrada visokim hidrostatskim tlakom*, interna skripta PBF-a.

Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., Bates, D. (2008) High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1–6.

Joseph, C. M. L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L. F. (2007) Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Viticult.* **58**, 373–378.

Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. G. (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food. *J. Food Sci.* **66**, 1242–1252.

Kiera, M., Considine, A. L. K., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Sleator, R. D. (2008) High-pressure processing effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 1–9.

Kim, J. G., Yousef, A. E., Khadre, M. A. (2003) Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv. Food Res.* **45**, 167–218.

Krumbholz, G., Tauschanoff, W. (1933) *Mycotorula intermedia* n. sp., ein Beitrag zur Kenntnis der Gärungserreger im Wein. *Zentralbl. Bakter. Par.* **88**, 366–373.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011) *The yeasts: a taxonomic study*, 5. izd., Elsevier, Amsterdam.

Linton, M., Patterson, M. F. (2000) High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiol. Imm. H.* **47**, 175-182.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 23– 50.

Loureiro, V., Querol, A. (1999) The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci. Techn.* **10**, 356–365.

Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M. (2003) Controlling grape must fermentation in early wine-making phases: the role of electrochemical treatment. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1087–1095.

Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Ranalli, G. (2006) Scaling-up in industrial winemaking using low electric current as an alternative to sulfur dioxide addition. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 682–690.

Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A. (2010) Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 594–604.

Malfeito-Ferreira, M., Rodrigues, N., Loureiro, V. (2001) The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines. *Ital. Food Bev. Technol.* **24**, 34–38.

Manninger, K., Gergely, S., Bekassy-Molnar, E., Vatai, G. Y., Kallay, M. (1998) Pretreatment effect on the quality of white and red wines using cross-flow ceramic membrane filtration. *Acta Aliment. Hung.* **27**, 377–87.

Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., Whiton, R. S. (2002) Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Viticult.* **53**, 303-307.

Marselles-Fontanet, A. R., Puig, A., Olmos, P., Minguéz-Sanz, S., Martín-Belloso, O. (2009) Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* **130**, 159–165.

Martorell, P., Querol, A., Ferra, M. T. (2005) Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microb.* **71(11)**, 6823–6830.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M. T., Querol, A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 234–242.

Marx, G., Moody, A., Bermúdez-Aguirre, D. (2011) A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *Int. J. Food Microbiol.* **151(3)**, 327–337.

Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., Divol, B. (2014) Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces spp.* *Int. J. Food Microbiol.* **188**, 83–91.

Mok, C., Song, K. T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R. Chen, P. (2006) High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *J. Food Sci.* **71**, 265-269.

Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Sanz, P. D., Otero, L., Suárez-Lepe, J. A. (2015) Grape processing by high hydrostatic pressure: Effect on microbial populations, phenol extraction and wine quality. *Food Bioprocess Tech.* **8**, 277–286.

O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., Cullen, P. J. (2010) Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 358–367.

Official Journal of the European Union (2006) Commission Regulation **643**, Bruxelles.

OIV. (2005) The world viticultural situation in 2002, <<http://www.oiv.int/uk/statistiques/index.htm>> . Pristupljeno 1. lipnja 2018.

Olsson, S. (1995) Production equipment for commercial use. U: High pressure processing of foods, (Ledward, D. A., Johnston, D. E., Earnshaw, R. G., Hastings, A. P. M., ured.), Springer, Nottingham, str. 167-180.

Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., Benedito, J. (2012) Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *J. Supercrit. Fluid.* **63**, 8–15.

Ough, C. S. (1993) Sulfur dioxide and sulfites. U: Antimicrobials in Foods, (Davidson, P. M., Branen, A. L., ured.), Marcell Dekker Inc, New York, 137–190.

Palaniappan, S., Sastry, S. K., Richter, E. R. (1990) Effects of electricity on microorganisms: a review. *J. Food Process Pres.* **14**, 393–414.

Patrignani, F., Vannini, L., Leroy Sado Kamdem, S., Lanciotti, R., Guerzoni, M. E. (2009) Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 26–31.

Pravilnik o proizvodnji vina (2005) *Narodne novine* **2**, Zagreb

Puertolas, E., Lopez, N., Condon, S., Alvarez, I., Raso, J. (2010) Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 247–255.

Rastogi, N. K., Subramanian, R., Raghavarao, K. S. M. S. (1994) Application of high-pressure technology in food processing. *Indian Food Ind.* **13**(1), 30–34.

Rayess, Y. E., Albasi, C., Bacchin, P., Taillandier, P., Raynal, J. (2011) Cross-flow microfiltration applied to oenology. *J. Membrane Sci.* **382**, 1–19.

Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A. (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1208–1219.

Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. (2008) Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* **19**, 208–16.

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. *Nat. Commun.* **2**, 302.

Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2013a) Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chem.* **141**(3), 2558–2566.

Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2016) Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innov. Food Sci. Emerg.* **33**, 76–83.

Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2013b) Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for maillard reaction acceleration. *Innov. Food Sci. Emerg.* **20**, 51–58.

Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2015) High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chem.* **188**, 406–414.

Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1–12.

Scheffers, W. A., Wiken, T. O. (1969) The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *J. Microbiol.* **35**, 31–32.

Smelt, J. P. P. M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Tech.* **9**(4), 152–158.

Somers, T. C., Verette, E. (1988) Phenolic composition of natural wine types. U: Wine analysis. Modern methods of plant analysis, (Linskens, H., F., Jackson, J., F., ured.), Springer, Berlin, str. 219-257.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., Calderón, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* **102**, 10-21.

Tao, Y., García, J. F., Sun, D. W. (2014) Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **54**(6), 817–835.

Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., Jeliński, T. (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **16**, 409–416.

Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L. (2008) Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* **8**(7), 1053–1062.

Valdramidis, V. P., Koutsoumanis, K. P. (2016) Challenges and perspectives of advanced technologies in processing, distribution and storage for improving food safety. *Curr. Opin. Food Sci.* **12**, 63–69.

Valdramidis, V. P., Patterson, M. F., Linton, M. (2015) Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control* **47**, 353–358.

Vally, H., Misso, N. L. A. (2012) Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* **5**(1), 16–23.

Valverde, M. T., Marin-Iniesta, F., Calvo, L. (2010) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *J. Food Eng.* **98**, 421–428.

Van der Walt, J. P. (1964) *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. *J. Microbiol.* **30**, 273–280.

Van Wyk, S., Silva, F. V. M. (2016) High pressure inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Microbiol.* **63**, 199–204.

Van Wyk, S., Silva, F. V. M. (2017) High pressure processing inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in seven different table wines. *Food Control* **81**, 1–8.

Walker, G. M. (1998) Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons, Chichester.

Walker, G., Stewart, G. (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*. **2(4)**, 30.

Wang, M. S., Zeng, X. A., Brennan, C. S., Brennan, M. A., Han, Z. (2016) Effects of pulsed electric fields on the survival behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* suspended in single solutions of low concentration. *Int. J. Food Sci. Tech.* **51(1)**, 171–179.

Warth, A. D. (1985) Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Protect.* **48**, 564–569.

Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010) The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* **43(10)**, 1474–1479.

Zuehlke, J. M., Glawe, D. A., Edwards, C. G. (2015) Efficacy of dimethyl dicarbonate against yeasts associated with washington state grapes and wines. *J. Food Process. Pres.* **39(6)**, 1016–1026.

Zuehlke, J. M., Petrova, B., Edwards, C. G. (2013) Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu. Rev. Food Sci. Tech.* **4(1)**, 57–78.

# Izjava o izvornosti

Izjavljujem daje ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Mišković

Ime i prezime studenta