

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Isabela Pehar

7223/BT

**DETEKCIJA KVASACA IZ RODA *Brettanomyces* I NJIHOV
UTJECAJ U BIOTEHNOLOŠKOJ INDUSTRIJSKOJ
PROIZVODNJI ALKOHOLNIH PIĆA I BIOETANOLA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 1

Mentor: prof. dr. sc. Anita Slavica

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Detekcija kvasaca iz roda *Brettanomyces* i njihov utjecaj u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji alkoholnih pića i bioetanola

Isabela Pehar, 7223

Sažetak: Kvasci vrste *Brettanomyces bruxellensis* mogu se izolirati iz različitih staništa. Detekcija ove vrste kvasaca, njezin rast i druge fiziološke karakteristike slabo su okarakterizirane zbog nedostataka raspoloživih analitičkih i molekularnih metoda. Ova vrsta može koristiti određene monosaharide (i pentoze), di- i polisaharide i neke druge neobične supstrate. Prisutnost kisika utječe na regulaciju metabolizma različitih supstrata u stanicama ove vrste, koja pokazuje Crabtree-jev i Custer-ov učinak. Specifični krajnji proizvodi metabolizma *B. bruxellensis* su 4-etilfenol i 4-etilgvajakol, koji pri niskim koncentracijama doprinose kompleksnosti organoleptičkih svojstava vina i piva, dok visoke koncentracije ovih krajnjih proizvoda formiraju tzv. „brett“ aromu ovih alkoholnih pića i tako ih čine neprihvatljivima krajnjem potrošaču. Primjena različitih starter-kultura i tretiranje podloga u kojima rastu ovi kvasci električnom strujom niske jakosti mogu spriječiti kontaminacije i/ili smanjiti broj stanica kvasaca iz roda *Brettanomyces* u različitim biotehnološkim proizvodima. Eksperimentalni podaci ukazuju da je vrsta *Brettanomyces bruxellensis* robustan biokatalizator, koji zadržava svoju metaboličku aktivnost pri relativno visokim koncentracijama supstrata i proizvoda (etanola), zatim niskim pH vrijednostima i visokom osmotskom tlaku, pa je industrijska primjena ove vrste u proizvodnji bioetanola vrlo izgledna.

Ključne riječi: kvasci iz roda *Brettanomyces*, vrsta *Brettanomyces bruxellensis*, analitičke i molekularne metode, alkoholna pića, bioetanol

Rad sadrži: 30 stranica, 6 slika, 0 tablica, 73 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Anita Slavica

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Vesna Zechner-Krpan

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and
Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Detection of yeasts from genus *Brettanomyces* and their influence in
biotechnological industrial production of alcoholic beverages and bioethanol
Isabela Pehar, 7223

Abstract: Yeasts from species *Brettanomyces bruxellensis* can be isolated from different habitats. Detection of this species, its growth and other physiological characteristics have been poorly known due to absence of available analytical and molecular methods. The species can use specific monosaccharides (and pentoses), di- and polysaccharides as well as some unusual substrates. Presence of oxygen affects regulation of metabolism of different substrates in the cells and Crabtree and Custer effects have been detected in the yeast species. Specific end products manufactured by *B. bruxellensis* are 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol. These products at lower concentrations contribute to complexity of organoleptic properties of wine and beer, while the two products at higher concentrations form so called brett aroma of those alcoholic beverages and thus make them unacceptable to consumer. Implementation of different starter cultures and treatment of media in which the yeast species grows by low electric current can prevent contamination and/or reduce number of the yeast cells in different biotechnological products. Experimental data show that species *Brettanomyces bruxellensis* is robust biocatalyst which retains its metabolic activity under relatively high concentration of substrate and product (ethanol), low pH values, and high osmotic pressure. Therefore, application of the species in bioethanol production seems very promising.

Keywords: yeasts from genus *Brettanomyces*, species *Brettanomyces bruxellensis*, analytical and molecular methods, alcoholic beverages, bioethanol

Thesis contains: 30 pages, 6 figures, 0 tables, 73 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Anita Slavica, Full Professor

Technical support and assistance: Vesna Zechner-Krpan, Full Professor

Defence date:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kvasci iz roda <i>Brettanomyces</i> i „brett“ aroma	2
2.2. Neke najvažnije karakteristike kvasaca iz roda <i>Brettanomyces</i>	3
2.3. Kontaminacija mošta i vina kvascima iz roda <i>Brettanomyces</i>	5
2.4. Metode detekcije kvasaca iz roda <i>Brettanomyces</i> u moštu i vinu	6
2.5. Kvasci iz roda <i>Brettanomyces</i> u pivu	8
2.6. Primjena modernih tehnika u ocjenjivanju organoleptike vina	9
2.7. Primjena starter-kultura kao prevencije kontaminacije vina kvascima iz roda <i>Brettanomyces</i>	12
2.8. Tretiranje vina električnom strujom niske jakosti u cilju sprječavanja formiranja „brett“ arome	14
2.9. Crabtree-jev i Custer-ov učinak kod vrsta <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	16
2.10. Primjena vrste <i>Brettanomyces bruxellensis</i> u proizvodnji bioetanola	18
3. ZAKLJUČCI	2020
4. POPIS LITERATURE	301

UVOD

1. UVOD

Strategija bioindustrije Europske Unije predviđa: (i) korištenje različitih obnovljivih sirovina, (ii) primjenu robusnih biokatalizatora, koji zadržavaju svoju aktivnost pri uvjetima industrijske proizvodnje, zatim (iii) integraciju visoko učinkovitih kaskadnih bioprocasa u biorafineriju u kojoj se postiže 100%-tno iskorištenje odabrane sirovine, i (iv) proizvodnju više različitih inovativnih biorazgradljivih biokemikalija i drugih bioproizvoda kao i energije i usluga, koji su sasvim prihvatljivi krajnjem potrošaču. U ovom vrlo kompleksnom i brzorazvijajućem konceptu biotehnolozi imaju vrlo važnu ulogu i to u svim segmentima ovdje opisanog sustava. Ipak, primarna zadaća biotehnologa je odabir prikladne obnovljive sirovine; zatim izolacija i karakterizacija fizioloških karakteristika robusnog biokatalizatora ili združene kulture; laboratorijsko testiranje određenog bioprocasa, uvećanje mjerila laboratorijskog bioprocasa i inkorporacija razvijenog bioprocasa u biorafineriju i to u suradnji sa drugim stručnjacima.

Tradicionalno se tisućama godina kvasci koriste u proizvodnji različitih civilizacijskih proizvoda, a najprepoznatljivija je proizvodnja alkoholnih pića i etanola s pomoću različitih vrsta kvasaca. Kao što je to slučaj i kod bakterijskih vrsta, većina vrsta kvasaca još uvijek nije izolirana iz svojih staništa u kojima obitavaju i to u vrlo ekstremnim uvjetima, a koji bi se vrlo uspješno mogli preslikati u uvjete biotehnoške industrijske proizvodnje u biorafinerijama. Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* pripada grupi najbolje okarakteriziranih i industrijski primijenjenih vrsta, dok su druge vrste kvasaca manje okarakterizirane i poznate te posljedično nisu primijenjene u biotehnoškoj proizvodnji. Ovaj je trend potrebno promijeniti i izolirati, detektirati i okarakterizirati i druge potencijalne biokatalizatore. Kvascima se kao eukariotskim mikroorganizmima često daje prednost pred bakterijskim vrstama, jer se smatra da su otporniji na uvjete industrijske proizvodnje. Međutim, otpornost prema nepovoljnim uvjetima potrebno je uskladiti sa fiziološkim karakteristikama potencijalnog biokatalizatora prije optimiranja bioprocasa u laboratorijskom i uvećanom mjerilu.

Cilj ovog rada bio je selektirati relevantne literaturne podatke, organizirati ih, objediniti i interpretirati one podatke koji se odnose na kvasce iz roda *Bretanomyces* tj. vrstu *Bretanomyces bruxellensis*. Nekoliko glavnih grupa podataka bilo je potrebno ekstrahirati iz literature, kako slijedi: (1) iz kojih se staništa mogu izolirati vrste iz roda *Bretanomyces*, (2) kojim metodama se ove vrste mogu detektirati i identificirati, (3) koje su glavne mikrobiološke i druge fiziološke karakteristike ovih vrsta i (4) može li metabolički potencijal

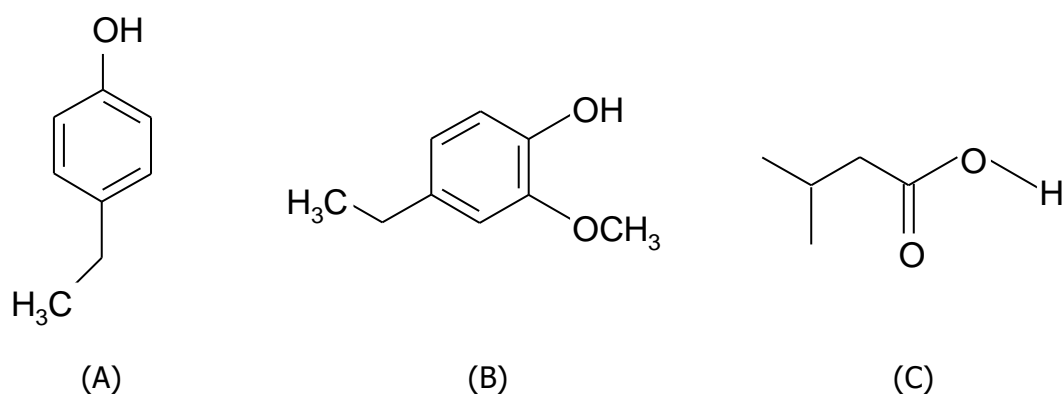
ovih vrsta nači primjenu u biotehnoškoj industrijskoj proizvodnji bioproizvoda i/ili biokemikalija, koje imaju dodanu vrijednost.

TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kvasci iz roda *Brettanomyces* i „brett“ aroma

Kvasci iz roda *Brettanomyces* (*Dekkera*) mogu se izolirati iz vina i mošta (Henick-Kling i sur., 2000). Ovi su kvasci dio mikroflore kombuče, tekile (Frank i sur., 2010), kefira i prerađenih maslina (Steensels i sur., 2015), a kontaminirani su i u proizvodnji bioetanolu (Passoth i sur., 2007). Njihov rast može se pratiti tijekom skladištenja vina u bocama, bačvama i spremnicima i to nakon završetka alkoholne fermentacije odnosno malolaktičke fermentacije (Henick-Kling i sur., 2000). Tijekom rasta ovi kvasci proizvode spojeve koji formiraju karakterističnu tzv. „brett“ aromu, koja se često opisuje kao miris seoskog dvorišta, spaljene plastike, vinila, kreozota te kao specifičan gorki ili metalni okus (Henick-Kling i sur., 2000). „Brett“ aroma potpuno je suprotna od percepcije određenih voćnih aroma, ali je bitno napomenuti da se prisutnost spojeva koji formiraju ovu aromu ali u relativno malim koncentracijama smatra pozitivnim doprinosom organoleptičkim svojstvima i kompleksnosti vina. Glavni spojevi koji su uzrok opisanih organoleptičkih svojstava tj. „brett“ arome su 4-etilfenol, 4-etilgvajakol (Slika 1.) i izovalerična kiselina (Henick-Kling i sur., 2000).



Slika 1. Kemijska struktura 4-etilfenola (A), 4-etilgvajakola (B) i izovalerične kiseline (C).

Ovi hlapljivi spojevi glavne su komponente vina koje formiraju aromu vina (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017). Veća koncentracija ovih spojeva smatra se i percipira negativnom

i ima snažan utjecaj na maskiranje prirodne arome i drugih karakteristika vina, a razlikuju se po porijeklu (Henick-Kling i sur., 2000). Spoj 4-etilfenol nastaje tijekom razmnožavanja kvasaca iz roda *Brettanomyces* (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017), a prisutnost ovog spoja može se koristiti kao indikator kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces*, što je uvriježena praksa u brojnim vinarijama. Međutim, treba imati na umu da se u određenim slučajevima formira „brett“ aroma iako nema 4-etilfenola ili je ovaj spoj nastao u iznimno niskim koncentracijama (Henick-Kling i sur., 2000).

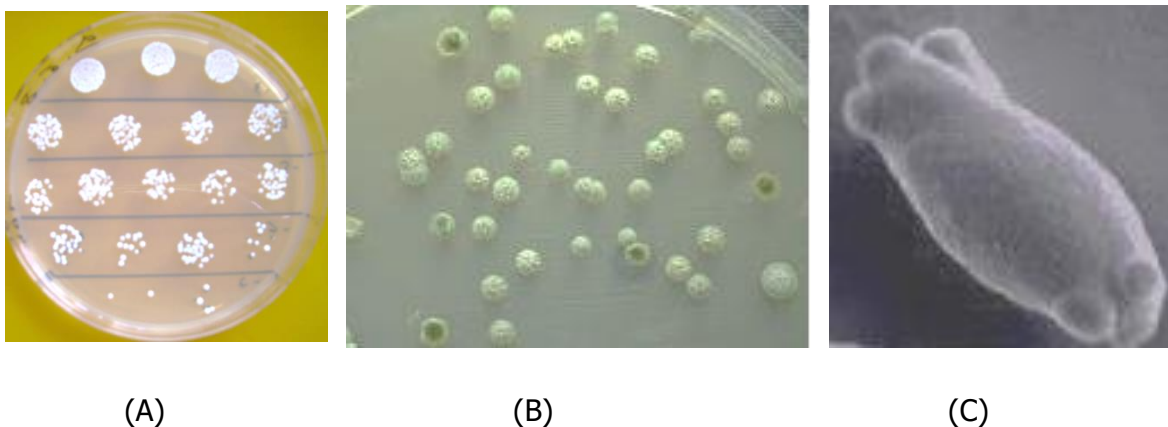
Kvasci iz roda *Brettanomyces* uobičajeno rastu izuzetno sporo i tako se sintetizira vrlo niska koncentracija biomase tj. nastaje vrlo mali broj stanica kvasaca iz čega proizlazi glavni problem - nemogućnost detekcije ovih kvasaca (Henick-Kling i sur., 2000). Ovi su kvasci vrlo otporni na stresne uvjete koji su uobičajeni tijekom alkoholne fermentacije, kao što su relativno niska pH vrijednost, povišena koncentracija etanola (Avramova i sur., 2018) te povećanje koncentracije SO₂ (Berbegal i sur., 2018). Upravo u opisanim uvjetima formira se karakteristična „brett“ aroma, što je veliki izazov u kreiranju prikladnih analitičkih metoda za detekciju prisutnosti ovih kvasaca i/ili proizvedenih karakterističnih spojeva (Henick-Kling i sur., 2000).

2.2. Neke najvažnije karakteristike kvasaca iz roda *Brettanomyces*

Van der Walt i van Kerken 1960. godine okarakterizirali su formiranje askospora kod kvasaca iz roda *Brettanomyces*, koji su prethodno bili okarakterizirani kao nesporogeni kvasci te su ovi autori zaključili da se radi o vrsti prilagodbe stanica kvasaca iz roda *Brettanomyces* uvjetima okoline (Henick-Kling i sur., 2000). Zbog toga 1964. godine Van der Walt uvodi sasvim novi naziv za ovaj rod kvasaca – *Dekkera*, kao i dvije nove vrste iz ovog roda kvasaca - *Dekkera bruxellensis* i *Dekkera intermedia* (Henick-Kling i sur., 2000). Od tada je provedeno nekoliko taksonomskih promjena roda *Dekkera* tj. *Brettanomyces*, koji za sada obuhvaća pet vrsta kvasaca i to: *Brettanomyces nanus*, *B. bruxellensis* (Slika 2.), *B. anomalus*, *B. custersianus* i *B. naardenensis*. Jedna od pet pobrojanih vrsta iz ovog roda - *Brettanomyces nanus*, preimenovana je u *Eniella nana* i to na temelju sekvence DNA (Boekhout i sur. 1994; Hoeben i Clark-Walker, 1986; Yamada i sur., 1995).

Kroz istraživanja grupe autora (Conterno i sur., 2006) uspoređene su genetičke i fiziološke karakteristike 35 različitih sojeva kvasaca vrste *Brettanomyces bruxelensis*. Podaci dobiveni uspoređivanjem fizioloških karakteristika ovih sojeva statistički su obrađeni pomoću

prilagođenih računalnih programa. Na temelju dobivenih rezultata formirane su različite skupine sojeva, koji su razvrstani na temelju nekoliko fizioloških karakteristika. Tako se sojevi vrste *Brettanomyces bruxelensis* mogu grupirati na temelju: (1) tolerancije sulfita, (2) sposobnosti rasta pri temperaturi od 37°C te (3) mogućnost metaboliziranja određenih supstrata, kao što su: etanol, maltoza, citrat i glicerol. Osim toga, sojevi kvasaca vrste *Brettanomyces bruxelensis* mogu se grupirati u tri skupine na temelju koncentracije spojeva koje mogu proizvesti tijekom rasta, a koji doprinose tzv. „brett“ aromi. Ovi spojevi su hlapljivi fenolni spojevi 4-etilfenol (4-EP) i 4-etilgvajakol (4-EG). Sojevi iz prve od tri skupine proizvode manje od 100 µg/L 4-EP i 4-EG, dok sojevi iz druge skupine proizvode oko 1000 µg/L 4-EP i 4-EG. Treća skupina sojeva vrste *Brettanomyces bruxelensis* proizvodi najveće koncentracije navedenih sastojaka vina i to više od 2000 µg/L 4-EP i 4-EG.



Slika 2. Porasle kolonije (A i B) i slika (elektronski mikroskop, C) kvasca *Brettanomyces bruxellensis* (prilagođeno iz Anonimus 1, 2018).

Identificiranje sojeva kvasca iz roda *Brettanomyces* tradicionalnim metodama mukotrpno je i dugotrajno (Van der Walt i Yarrow, 1984; Barnett i sur., 1990) te obično traje između tri i četiri tjedna, a rezultati koji se dobiju su nepouzdana (Mitrakul i sur., 1999). Kraće vrijeme i veće pouzdanost identificiranja ovih sojeva moguće je postići primjenom molekularnih metoda, posebice analizom DNA, kojima se eliminiraju varijacije uzrokovane fiziološkim statusom mikroorganizma (Dowhanick, 1995; Ness i sur., 1993). Takva je jedna

metoda utvrđivanje DNA otiska (engl. DNA fingerprint), jer se ovom metodom dobiva jedinstveni DNA profil mikroorganizma (Meaden, 1990).

2.3. Kontaminacija mošta i vina kvascima iz roda *Brettanomyces*

Kvasci iz roda *Brettanomyces* obično nisu sastavni dio mikroflore koja obitava na površini bobice grožđa, ali su izolirani iz mošta u vinarijama s područja Francuske (Krumbholz i Tauschanoff, 1933; Domercq, 1956), Italije (Florenzano, 1951; Trioli, 1996), Njemačke (Schanderl, 1950), Uzbekistana (Mavlani, 1968) i Novog Zelanda (Wright i Parle, 1974). Po broju stanica, kvasci iz roda *Brettanomyces* najčešće su manje zastupljeni u odnosu na preostale kvasce mikroflore bobice grožđa (Henick-Kling i sur., 2000). Ovi su kvasci detektirani samo u dvije od ukupno 80 istraživanih vrsta crnih francuskih vina, dok nisu detektirani ni u jednom od 38 uzoraka bijelih francuskih vina (Domercq, 1956). Poboljšanim metodama izolacije vrsta *Brettanomyces bruxellensis* uspješno je izolirana iz 33 od ukupno 124 testirana mošta (Henick-Kling i sur., 2000). Promjene u sastavu i organoleptici vina koje uzrokuje ova vrsta kvasaca obično se utvrđuje tijekom skladištenja proizvedenog vina u spremnicima i bačvama i to prije samog punjenja vina u boce (Henick-Kling i sur., 2000). S obzirom na nedostatak informacija o fiziološkim i drugim karakteristikama ovih kvasaca i nedostacima metoda za njihovu ranu detekciju, ključno je osmisliti i optimirati brze i pouzdane metode za njihovu identifikaciju.

Kunkee i Amerine (1970) opisali su važnost metoda za izolaciju kvasaca iz roda *Brettanomyces*, koje su ključne za svako istraživanje ovih kvasaca. Ovi su autori istaknuli i važnost pouzdanosti dobivenih rezultata i njihovu interpretaciju. Vrijeme inkubacije potrebno za rast većeg broja stanica dobro okarakteriziranih vrsta kvasaca, kao što su na primjer vrste iz roda *Saccharomyces*, znatno je kraće od vremena potrebnog za inkubaciju kvasaca iz roda *Brettanomyces*. U ovom drugom slučaju potrebna je inkubacija u trajanju od nekoliko tjedana kako bi stanice kvasaca iz roda *Brettanomyces* porasle i, nakon toga, kako bi se mogle izolirati i okarakterizirati (Van der Walt i Van Kerken, 1961). Tzv. divlji tipovi kvasaca kao i kvasci iz rodova *Kloeckera*, *Pichia* i *Candida*, koji rastu relativno brzo, prerastu stanice kvasca iz roda *Brettanomyces* i na taj način onemogućavaju izolaciju i karakterizaciju tzv. spororastućih kvasaca (Custer, 1940). Osim toga, pri takvim dugotrajnim uzgojima često dolazi do emerznog rasta plijesni, što dodatno otežava izolaciju kvasaca (Henick-Kling i sur.,

2000). Daljnja poteškoća pri detekciji kvasaca iz roda *Brettanomyces* su značajne varijacije u brojnosti ovih kvasaca i to u različitim bačvama iz kojih se izuzima uzorak. Tako npr. kod vina Cabernet Sauvignon utvrđeno je da osim o uzorkovanju rezultati identifikacije kvasaca ovise i o kupažiranju vina, koje u određenim slučajevima može dovesti do porasta broja kvasaca iz ovog roda i do deset puta (Henick-Kling i sur., 2000).

Kao najčešći izvor kontaminacije vina kvasacima iz roda *Brettanomyces* u znanstvenoj literaturi navodi se drvena bačva (Fugelsang, 1993). Osim toga, ovi kvasci mogu se izolirati iz soka određenih vrsta grožđa (Henick-Kling i sur., 2000), ali i s površine tijela vinskih mušica (Milheiro i sur., 2017).

Iako diljem Sjedinjenih Američkih Država brojne vinarije prema savjetu enologa nastoje eliminirati iz uporabe bačve kontaminirane kvascima iz roda *Brettanomyces* (Boulton i sur., 1996; Heimoff, 1996), istraživanja su potvrdila da kontaminacija bačvi ne mora nužno biti uzrok prisutnosti ovih kvasaca u moštu i vinu. Tijekom dvogodišnjeg istraživanja, koje je provedeno u jednoj vinariji u Kaliforniji (Frey i sur., 1996; Heimoff, 1996), utvrđeno je da se samo u kontejnerima od nehrđajućeg čelika ne zadržavaju stanice kvasaca iz roda *Brettanomyces*, dok se u drvenim bačvama stanice ovih kvasaca, bilo da je izvor kontaminacije vino ili bačva, zadržavaju kroz naznačeni vremenski period (Henick-Kling i sur., 2000).

2.4. Metode detekcije kvasaca iz roda *Brettanomyces* u moštu i vinu

Prisutnost, brojnost i fiziologija kvasaca iz roda *Brettanomyces* pripada u važnije probleme u modernoj proizvodnji vina (Henick-Kling i sur., 2000). Metabolizam koji se odvija u stanicama ovih kvasaca tijekom proizvodnje vina utječe na kvalitetu i sigurnost proizvodnje kvalitetnog proizvoda (Berbegal i sur., 2018). Kod određenih vina formiranje „brett“ arome može djelovati pozitivno, dok kod drugih vina proizvodnja minimalnih koncentracija odgovarajućih fenolnih spojeva dovodi do organoleptičke odbojnosti prema vinu (Henick-Kling i sur., 2000). Poznavanje fizioloških karakteristika kvasaca iz roda *Brettanomyces* nameće se kao ključni faktor pomoću kojeg se može uspješno balansirati sastav hlapljivih spojeva u vinu s ciljem dobivanja karakteristične arome vina te proizvodnje kvalitetnog vina kompleksne organoleptike (Henick-Kling i sur., 2000). Najnovija istraživanja fiziologije ovih kvasaca uzimaju u obzir i geografsko područje na kojem raste grožđe, odnosno geografsko

prijeklo vina kao jedan od važnih faktora koji utječe na genetsku varijabilnost kvasaca (Avramova i sur., 2018). Bez obzira na sve navedeno, vinari trebaju nove metode i tehnike kojima će se moći rano detektirati kvasci iz roda *Brettanomyces*. Optimiranje i primjena metoda detekcije kvasaca iz roda *Brettanomyces* za sada se čine važnijima od metoda za praćenje njihova rasta i karakterizaciju njihove metaboličke aktivnosti, iako njihov rast i metabolička aktivnost mogu prouzročiti značajne promjene u kemijskom sastavu tj. organoleptici vina (Henick-Kling i sur., 2000).

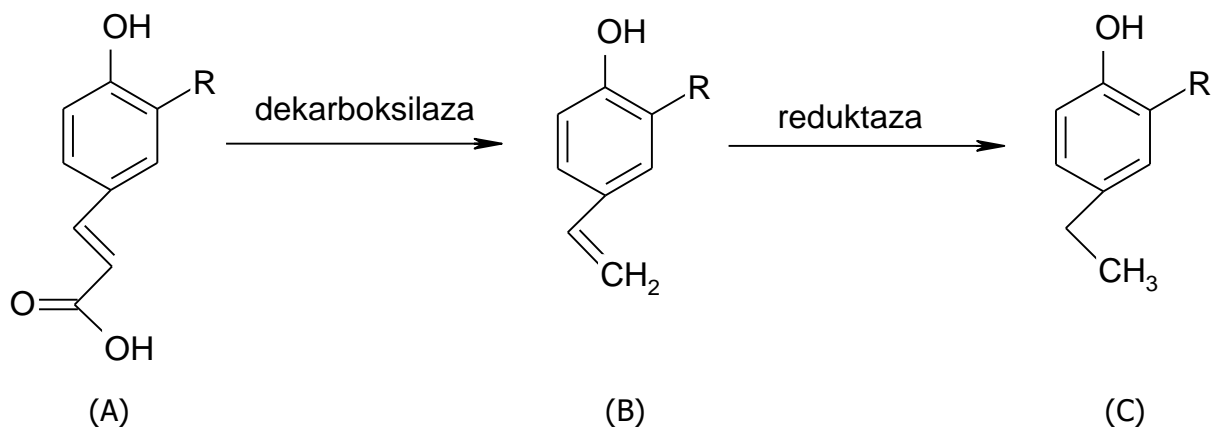
Dvije su glavne metode dokazivanja prisutnosti kvasaca iz roda *Brettanomyces* u vinu. Kromatografskom analizom moguće je odrediti različite proizvode metabolizma kvasca. Osim toga moguće je provesti i detekciju stanica koje su u fazi umnažanja mikrobiološkim metodama. Važno je istaknuti da se ove metode ne mogu provesti u vinarijama. Osim stručnjaka koji obavljaju ove analize, ove metode su vremenski zahtjevne (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017). Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) specifična je i brza metoda kojom se može odrediti prisutnost (Phister i Mills, 2003), ali ne i intenzitet kontaminacije tj. brojnost stanica kvasaca vrste *Brettanomyces bruxellensis* (Delaherche i sur., 2004). Ugnježdjena PCR (engl. *nested PCR*) metoda vrlo je učinkovita u dokazivanju prisutnosti kvasaca, a koristi se kada je koncentracija stanica tj. DNA relativno niska i kada se očekuje manja efikasnost umnažanja sekvence nego kod obične PCR metode, jer se pri povećanju broja ciklusa PCR-a dobiva prevelik broj krivo sparenih baza (Grabovac, 2009). Dvostrukom primjenom PCR-a moguće je umnožiti malu količinu DNA koja je na raspolaganju u uzorku, povećati osjetljivost i specifičnost metode (Renouf i sur., 2007). Direktna metoda koja se također može koristiti za dokazivanje prisutnosti određene vrste kvasaca iz roda *Brettanomyces* je denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza DNA sekvenci umnoženih PCR metodom (Cocolin i sur., 2001; Cocolin i sur., 2000; Mills i sur., 2002). Velika prednost takve direktne metode je činjenica da je nepotrebno izolirati soj kvasca, čime se izbjegavaju promjene koje nastaju uslijed uzgoja izoliranih sojeva i sojeva koji su dio prirodne mikroflore. To u konačnici uvelike mijenja rezultate o zastupljenosti i brojnosti vrsta kvasaca u određenim staništima (Hugenholtz i sur., 1998).

Razvijen je i niz postupaka za smanjenje koncentracije ili potpuno uklanjanje formiranih hlapljivih fenola iz vina kao i za reduciranje negativnih učinaka ovih spojeva na senzorska svojstva vina. Ovi postupci mogu se podijeliti u dvije grupe - (1) postupci koji se provode u cilju smanjenja udjela hlapljivih komponenti u prostoru iznad vina (engl. *headspace*) i to smanjenjem njihovih koeficijenata razdjeljenja u plinskoj fazi bez mijenjanja ukupnog udjela hlapljivih fenola u vinu (tehnike neoduzimanja) i (2) tretmani koji su usmjereni na uklanjanje 4-EP i 4-EG iz vina i kojima se umanjuje njihov udjel i koncentracija

iznad vina (tehnike oduzimanja) (Milheiro i sur., 2017). Izolacija i karakterizacija kvasaca *Brettanomyces* iz tri vrste vina Cabernet Sauvignon u kojima (a) nije detektirana „brett“ aroma, (b) ova aroma je bila relativno blaga i (c) „brett“ aroma je bila izuzetno izražena, (Licker i sur., 1998) provedena je pomoću nekoliko različitih molekularnih metoda te je identificiran kvasac *Brettanomyces bruxellensis* (Henick-Kling i sur., 2000).

2.5. Kvasci iz roda *Brettanomyces* u pivu

„Brett“ aroma se po prvi put spominje u opisu svojstava engleskih piva (Licker i sur. 1998), kod kojih ukoliko se želi postići karakteristična aroma koju imaju ta piva, treba dodati određenu količinu kvasaca iz roda *Brettanomyces*, a koja zavisi o karakteristikama regije u kojoj se proizvodi pivo, vremenu odležavanja piva te temperaturi pri kojoj se pivo čuva (Claussen, 1904). Inokulacijom manje koncentracije kvašćevih stanica može se proizvesti pivo standardnih engleskih karakteristika, dok dodatkom veće koncentracije stanica kvasaca iz roda *Brettanomyces* dobiva se tzv. vinski okus piva (Shimwell, 1947). Sva piva u kojima je inokulirano manje od kritične koncentracije ovih kvasaca imala su neprivlačne arome, bila su izrazito nepovoljnih organoleptičkih svojstava i mutna (Shimwell, 1938). Tijekom alkoholne fermentacije određenih piva, kao što su Trappist, Gueuze ili Lambic piva, inokulacijom ne tako standardnih pivskih kvasaca iz roda *Brettanomyces* postiže se jedinstvena kompleksnost arome piva te određena doza kiselosti (Bokulich i Bamforth, 2013; Schifferdecker i sur., 2014; Steensels i sur., 2015). Metaboliti ovih kvasaca 4-EP i 4-EG, koji su u vinima većinom nepoželjni (Granato i sur. 2014), smatraju se vrlo poželjnim i sudjeluju u formiranju dominantnih organoleptičkih svojstava nekih piva (Holt i sur., 2017). Količina ovih metabolita (4-EP i 4-EG) koje će kvasac proizvesti, određuje se posredno tako da se odredi koncentracija prekursora - hidrosicinamične kiseline (Slika 3.), koju kvasac može dalje metabolizirati (Steensels i sur., 2015).



Slika 3. Razgradnja hidrosicinamične kiseline (A) do hlapljivih fenola (B, hidroksistiren; C, etilni derivati; prilagođeno iz Steensels i sur., 2015).

Udjel inokuluma kvasaca iz roda *Brettanomyces* ovisi o koncentraciji fenola i acetatnih estera koji će se formirati tijekom alkoholne fermentacije (Holt i sur., 2017). Različiti metaboliti i preteče u pivu relativno lako se određuju HPLC metodama (Holt i sur., 2017). Pojedine vrste kvasaca iz roda *Brettanomyces* iskazuju esteraznu aktivnost, koja se smatra nepoželjnom, jer katalizira hidrolizu nastalih acetatnih estera koji su ključni za formiranje voćne arome piva (Steensels i sur., 2015; Verstrepen i sur., 2003).

Kvasci iz roda *Brettanomyces* mogu se zajedno s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* koristiti kao dio starter-kultura u proizvodnji piva i to zbog proizvodnje značajnih koncentracija 4-EG (Steensels i sur., 2015).

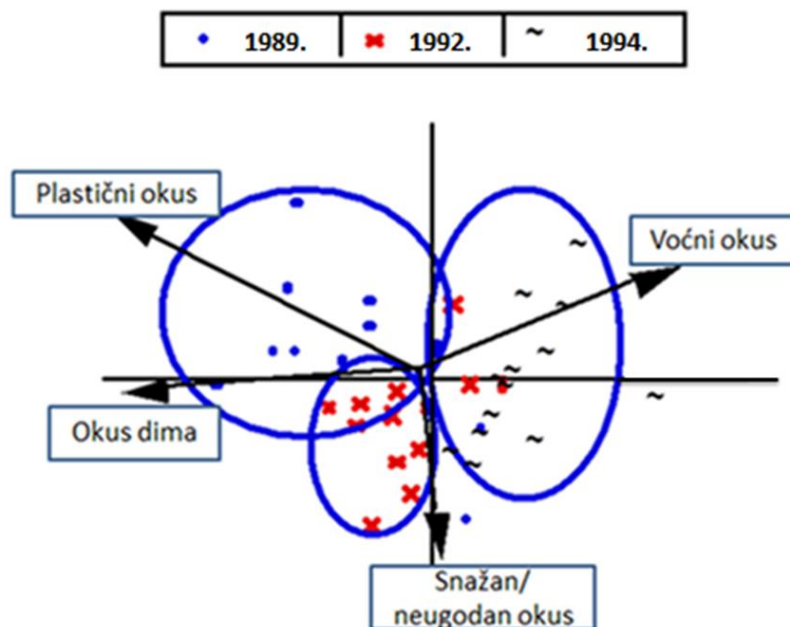
Bez obzira ne sve prednosti i nedostatke primjene kvasaca iz roda *Brettanomyces* pri proizvodnji piva, njegova primjena je još uvijek ograničena (Shimwell, 1947). Primjena ovih kvasaca poradi postizanja ciljanih karakteristika piva naprednija je u odnosu na njihovu primjenu u proizvodnji vina (Henick-Kling i sur., 2000).

2.6. Primjena modernih tehnika u ocjenjivanju organoleptike vina

Istraživanja organoleptike vina u čijem formiranju sudjeluju spojevi koje proizvode kvasci i koji značajno doprinose specifičnom okusu vina, provedena su s dvije skupine „brett“ vina (Henick-Kling i sur., 2000) te su formirane dvije skupine kušača za potrebe ovog istraživanja. Jedna skupina kušača bili su proizvođači vina iz New Yorka i profesionalni kušači iz New York Agricultural Experiment Station-a, dok su drugu skupinu činili pripadnici

internacionalne grupe enologa iz Švicarske, Francuske, Australije, Njemačke te SAD-a. Prva skupina testiranih vina obuhvaćala je četiri vrste Cabernet Sauvignon-a te dva Pinot Noir-a, a druga skupina četiri Cabernet Sauvignon-a. Sva su vina senzorski testirana i analizirana metodama spektromerije masa i plinske kromatografije. Rezultati dobiveni od obje skupine kušača statistički su obrađeni i opisani pomoću dvije opisnice - voćno i plastično.

Slika 4. jasno prikazuje različitosti vina Cabernet Sauvignon. Tako je najmlađe vino bilo okarakterizirano kao voćno, najstarije vino kao vino s okusom plastike, odnosno najmanje voćno, dok je vino srednje starosti bilo djelomično opisano kao voćno, a djelomično kao plastično.



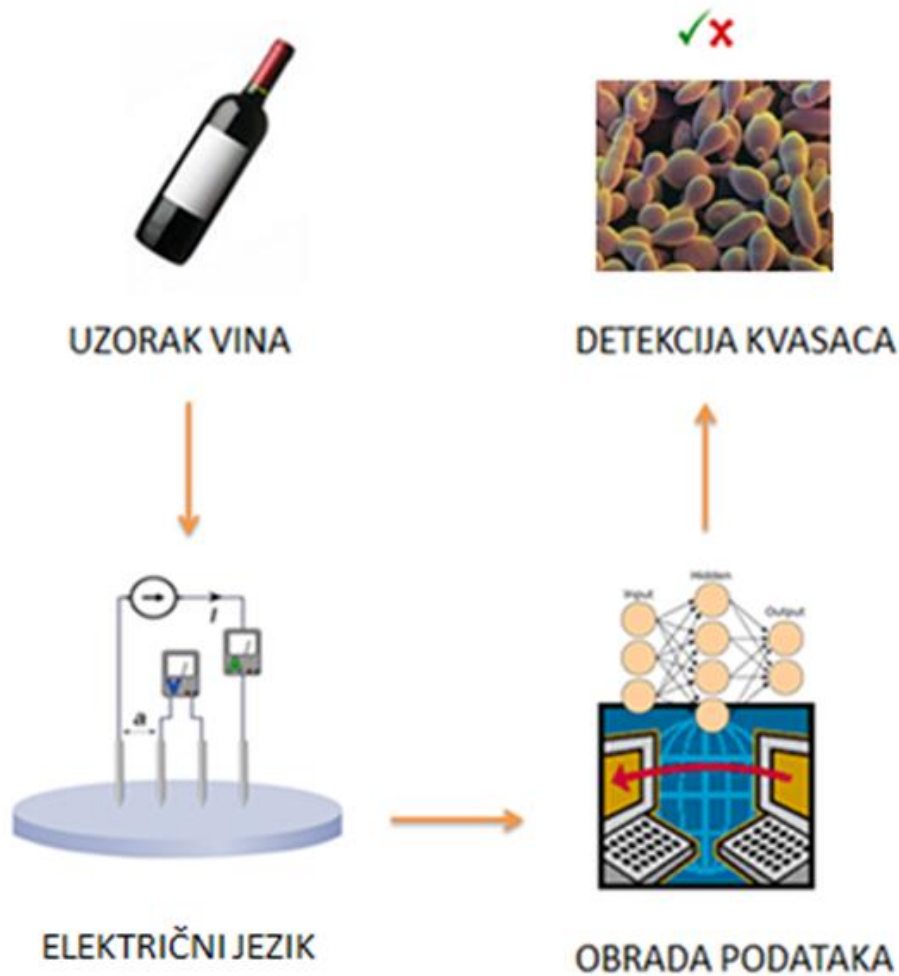
Slika 4. Različitosti organoleptike senzorski ocijenjenih vina *Cabernet Sauvignon* koji su proizvedeni 1989., 1992. i 1994. u istoj vinariji (prilagođeno iz Licker i sur., 1998).

Tri vrste vina Cabernet Sauvignon-a koja su testirana i rezultati senzorskih testiranja prikazani su na Slici 4., proizvedena su iz istog grožđa u istoj vinariji i to 1989. (najstarije vino), 1992. (vino srednje starosti) te 1994. (najmlađe vino). *A priori* senzorska karakterizacija vina i njihova klasifikacija kao „brett“ pokazala se kao dobra metoda predviđanja nepoželjne kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces*. Zapravo je

utvrđena linearna ovisnost koncentracije 4-EF i jačine organoleptičke percepcije „brett“ arome. Povećana koncentracija 4-EF određena je u starijim vinima i uzrokovala je pojačanu „brett“ aromu vina, odnosno karakterizaciju takvih vina kao vina s plastičnim okusom. Cjelokupno istraživanje dovelo je do zaključka da se tijekom ocjenjivanja i prikupljanja mišljenja kušača vina mogu dobiti pouzdane informacije o prisutnosti i koncentraciji kvasaca iz roda *Brettanomyces* u moštu i/ili vinu. Identifikacijom kemijske baze „brett“ arome i daljnjom analizom uzoraka vina može se rano detektirati prisutnost odgovornih kvasaca u vinu (Licker i sur., 1998).

Razvijena je metoda kojom se mogu zaobići testiranja koja uključuju velik broj sudionika i profesionalaca s ciljem detekcije „brett“ arome u vinima. Takva metoda je primjena električnog jezika. Električni jezik (ET) bilježi cikličke voltametrijske signale koje prikuplja pomoću sustava od šest elektroda, zatim pomoćne Pt i Ag/AgCl referentne elektrode (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017). Prikupljeni podaci obrađuju se i pomoću umjetnih neuronskih mreža formira se model. Ovim modelom se predviđa, a nakon validacije ET sustava pomoću standarda, i određuje koncentracija fenola u vinu (Slika 5.).

Prednost ET sustava je da se analiza uzorka vina može napraviti u vinariji, što nije slučaj s do sada korištenim analitičkim metodama (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017). Cijeli ET sustav karakterizira visoka osjetljivost, selektivnost, relativno široko linearno područje kvantifikacije fenolnih spojeva te niski troškovi primjene ovog sustava. Najvažnija karakteristika ET-a je da ovaj sustav može detektirati vrlo niske koncentracije ključnih metabolita i preteča (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017). Nedostatak ET sustava je utjecaj različitih sastojaka vina na rad elektroda, interferencije određenih spojeva koje mogu ometati detekciju ciljanih spojeva u vinu te rast mikroorganizama na elektrodama ovog sustava, koji može uvelike utjecati na rezultate analize vina (Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017).



Slika 5. Shematski prikaz principa rada električnog jezika (prilagođeno iz Gonzalez Calabuig i Del Valle, 2017).

2.7. Primjena starter-kultura kao prevencije kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces*

Iako je aroma koju u nekim vinima formiraju kvasci iz roda *Brettanomyces* vrlo privlačna i prihvatljiva, u drugim vinima je ova aroma neprivlačna i nastoji se izbjeći. Stoga vinari pokušavaju što ranije detektirati i potvrditi prisutnost kvasaca iz roda *Brettanomyces* (Henick-Kling i sur., 2000). Nakon detekcije moguće je odvojiti kontaminirana od

nekontaminiranih vina te kontaminirana vina zasebno prikladno tretirati (Henick-Kling i sur., 2000). Brojnim metodama molekularne biologije mogu se identificirati različite vrste kvasaca (Egli i sur. 1998). Međutim, nedostaju primjenjive metode kojima bi se mogle detektirati određene nepoželjne vrste kvasaca u vinima, kao što su vrste iz roda *Brettanomyces* (Henick-Kling i sur., 2000). Zbog toga se istražuje primjena drugih metoda i postupaka u cilju proizvodnje ispravnih i prihvatljivih vina. Tako se zadnjih godina istražuje primjena starter-kultura u cilju prevencije kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces* (Berbegal i sur., 2017). Istraživan je utjecaj starter-kultura koje sadrže bakterije, koje provode malolaktičku fermentaciju, kao i bakterije iz porodice *Lactobacillales* na sastav populacije kvasaca u vinima tj. utjecaj ovih specifičnih starter-kultura na kritično razdoblje alkoholne fermentacije, kada bi moglo doći do kontaminacije nepoželjnim kvascima (Berbegal i sur., 2017). Dodatkom starter-kultura nakon završetka alkoholne fermentacije, a prije početka malolaktičke fermentacije osigurava se mikrobna kompeticija između kvasaca i bakterija. U suprotnom ova kompeticija ne bi postojala, jer u ovoj fazi proizvodnje vina bakterije u vinu nisu prisutne u dovoljnom broju (Berbegal i sur., 2017). Oštećene bobice grožđa mogu biti izvor kontaminacije kvascima iz roda *Brettanomyces*, jer se na njima nalaze velike količine različitih mikroorganizama. Mnogo je vjerojatnije da se ovi kvasci prenose putem kontaminiranog vina i tako kontaminiraju bačve, spremnike i opremu u vinariji (Henick-Kling i sur., 2000). Nepoznato ostaje pri kojoj koncentraciji nutrijenata, kojem rasponu pH vrijednosti, temperaturi i koncentraciji alkohola u vinu rastu kvasci iz roda *Brettanomyces*.

Istražene karakteristike kvasaca iz roda *Brettanomyces* su: (1) osjetljivost na SO₂, (2) nekompetentnost s kvascem koji je odgovoran za fermentaciju šećera u alkohol - *Saccharomyces cerevisiae*, (3) mogućnost uklanjanja filterima (s veličinama pora 1,0 μm ili manje) te (4) mogućnost smanjenja broja stanica kvasaca iz roda *Brettanomyces* korištenjem različitih organskih spojeva poput dimetil karbonata (Henick-Kling i sur., 2000). Osim toga, kvasci iz roda *Brettanomyces* su vrlo osjetljivi na povišenu koncentraciju šećera, ali i vrlo otporni na povišene količine alkohola (do 14,5% v/v) (Dias i sur., 2003; Renouf i sur., 2006; Loureiro i sur., 2006).

Prvo pravilo sprječavanja kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces* svakako je održavanje higijenskih uvjeta u vinskih podrumima kao i održavanje opreme, bačvi i spremnika u kojima se nalazi vino (Henick-Kling i sur., 2000). Ukoliko se u bačvama i spremnicima čuvaju vina kontaminirana kvascima iz roda *Brettanomyces*, onda ih je potrebno odvojiti od nekontaminiranih vina i sumporenjem ili dodatkom drugih kemijskih spojeva pokušati smanjiti broj stanice nepoželjnih kvasaca (Henick-Kling i sur., 2000). S obzirom da kvasci iz roda *Brettanomyces* mogu rasti već u moštu, potrebno je što ranije

umanjiti mogućnosti njihovog rasta, npr. sumporenjem (20-50 mg/L) ili uklanjanjem oštećenih bobica grožđa. Optimalni uvjeti alkoholne fermentacije šećera u vinu osigurat će dominaciju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* nad kvascima iz roda *Brettanomyces* (Henick-Kling i sur., 2000). Rizik kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces* nastavlja se i nakon što završi alkoholna fermentacija, stoga je potrebno što prije potaknuti malolaktičnu fermentaciju i to najčešće dodatkom starter-kulture. Nakon završetka malolaktične fermentacije potrebno je provesti sumporenje vina prikladnom količinom sumpora i tako spriječiti kontaminaciju kvascima iz roda *Brettanomyces* (Henick-Kling i sur., 2000). Obzirom da nije lako postići dovoljnu količinu slobodnog SO₂, koji sprječava kontaminaciju vina nepoželjnim mikroorganizmima, provjerava se prisutnost kvasaca u vinu ili se prati aroma vina (Chatonnet i sur., 1993). Korištenje plinovitog sumpora za dezinfekciju bačvi ne mora nužno biti korisno i uspješno s obzirom da bakterije i kvasci mogu rasti i preživljavati u porama drveta bačvi (Scott i Swaffield, 1995).

Povezanost 4-EP i prisutnosti kvasaca iz roda *Brettanomyces* nije uvijek primjenjiva jer se pokazalo da u nekim vinima prisutnost spomenutih kvasaca nije bila popraćena prisustvom 4-EP i obrnuto. Najveći nedostatak povezanosti 4-EP i kvasaca iz roda *Brettanomyces* svakako je činjenica da, ukoliko odredimo da u vinu ima 4-EP, to je vino najčešće već kontaminirano ovim kvascima, odnosno, već tada se vino može okarakterizirati kao vino s „brett“ aromom (Henick-Kling i sur., 2000.).

2.8. Tretiranje vina električnom strujom niske jakosti u cilju sprječavanja formiranja „brett“ arome

Iako Kling i suradnici (2000) sumporenje smatraju kao prikladnu metodu zaštite vina od kontaminacije kvascima iz roda *Brettanomyces*, Svjetska zdravstvena organizacija potiče redukciju korištenja sumpora. Naime, sumporse smatra nekancerogenin i nemutagenim za čovjeka (Romano i Suzzi, 1993), ali, zbog kumulativnog efekta s obzirom da se vrlo često koristi u prehrambenoj industriji i nalazi se i u atmosferi (Lustrato i sur., 2010), može djelovati nepovoljno na zdravlje ljudi. Čovjek je tako direktno izložen relativno visokim koncentracijama sumpora. Postoji nekoliko metoda kojima je moguće spriječiti kvarenje vina zbog kontaminacije kvascima iz roda *Brettanomyces*, a to uključuje održavanje higijene prostora u kojem se proizvodi vino, sumporenje vina te dozrijevanje vina pri niskim temperaturama. Primjena sumpora i niskih temperatura ne preporuča se tijekom dozrijevanja

vina, jer utječu i mijenjaju tijelo vina i njegova organoleptička svojstva (Aguilar Uscanga i sur., 2003). Sterilizacija bačvi vodenom parom ne preporuča se zbog mogućih oštećenja drveta bačvi, a filtracijom vina mogu se ukloniti ključni sastojci vine čija prisutnost sudjeluje u formiranju arome i tijela vina. Stoga je ključno koristiti efikasne i specifične metode za prevenciju kontaminacije vina kvascima iz roda *Brettanomyces* i ekonomskih gubitaka u njegovoj proizvodnji (Barbosa-Canovas i sur., 2001; Devlieghere i sur., 2004).

Zadnjih nekoliko desetljeća raste zanimanje za alternativne metode prevencije kontaminacije vina, a jedna od takvih metoda je primjena električnog polja u cilju inaktivacije stanica kvasaca (Vega-Mercado i sur., 1997; Knorr i Heinz, 2002). Inaktivacija bakterijskih i kvašćevih stanica u vinu može se postići primjenom pulsirajućeg električnog polja (eng. Pulsed Electric Field, PFF), koje se inače primjenjuje u prehrambenoj industriji, a u novije vrijeme i u proizvodnji vina (Heinz i sur., 2003). Provedena istraživanja pokazala su da tretiranje vina pulsirajućim električnim poljem može značajno reducirati ili potpuno eliminirati potrebu za sumporenjem vina i to bez posljedica na konačnu kvalitetu vina (Garde-Cerdán i sur., 2007; Garde-Cerdán i sur., 2008; Lustrato i sur., 2003; Lustrato i sur., 2006).

Istraživanje koje su proveli Lustrato i sur. (2003, 2006) ističe primjenu električne struje niske jakosti (eng. Low Electric Current technology, LEC) kao još jednu moguću alternativnu metodu tretiranja vina (Ranalli i sur., 2000, 2002). Lustrato i sur. (2003, 2006) istraživali su sprječavanje kontaminacije talijanskog vina Montepulciano d'Abruzzo točno određenim sojem kvasca *Brettanomyces bruxellensis*. Nakon tretiranja ovog vina električnom strujom niske jakosti, kemijskim, biokemijskim i mikrobiološkim testovima utvrđeno je da je testirano vino sadržavalo znatno manji broj živih stanica ovog soja. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima sumporenja vina. Kao indikator broja živih stanica kvasca u vinu koristila se koncentracija adenozin trifosfata (ATP), koji je bio direktan pokazatelj aktivnosti ovih stanica odnosno indirektan pokazatelj učinkovitosti primijenjene metode za redukciju broja živih stanica - kontaminanata u vinu (Ranalli i sur. 2002). Koncentracija ATP-a praćena je u crnom vinu Montepulciano d'Abruzzo koje je tretirano sa: (1) SO₂, (2) električnom strujom niske jakosti od 200 mA i (3) kombinacijom električne struje niske jakosti i SO₂. Najviša koncentracija ATP-a određena je u kontrolnom uzorku vina, koje nije tretirano nijednom pobrojenom metodom. Nešto manja koncentracija ATP-a određena je u uzorcima koji su tretirani sa SO₂. Najniža koncentracija ATP-a je analitički utvrđena u uzorku vina koji je tretiran električnom strujom niske jakosti (200 mA) kao i u uzorku koji je tretiran kombinacijom dviju metoda - električnom strujom niske jakosti i sa SO₂ (Lustrato i sur., 2010).

Utvrđeno je da električna struja niske jakosti djeluje na membranu stanica sojeva *Brettanomyces bruxellensis*, a može uzrokovati i razaranje strukture citoplazmatske membrane kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Lustrato i sur., 2010). Ukoliko se proizvodnja hlapljivih fenola (4-EF i 4-EG) i hlapljivih kiselina s pomoću stanica kvasca odredi kao kriterij uspješnosti primjene određene metode za sprječavanje kontaminacije vina nepoželjnim vrstama kvasaca, slični rezultati su dobiveni za sumporenje vina i primjenu električne struje niske jakosti (Gerós i sur. 2000; Fugelsan and Zoecklein 2003). Ovaj rezultat jasno pokazuje da je primjena električne struje niske jakosti jedna od poželjnijih alternativnih metoda za tretiranje crnih vina (Lustrato i sur., 2010). Koncentracija hlapljivih etilnih derivata, npr. 4-EP i 4-EG, u vinu najčešće je ispod praga organoleptičke percepcije (Chatonnet, 1992), što otežava ranu detekciju nepoželjnih kvasca u vinu. I zbog ovog je primjena električne struje niske jakosti poželjna metoda za tretiranje crnih vina u cilju sprječavanja kontaminacije sojem kvasca *Brettanomyces bruxellensis*.

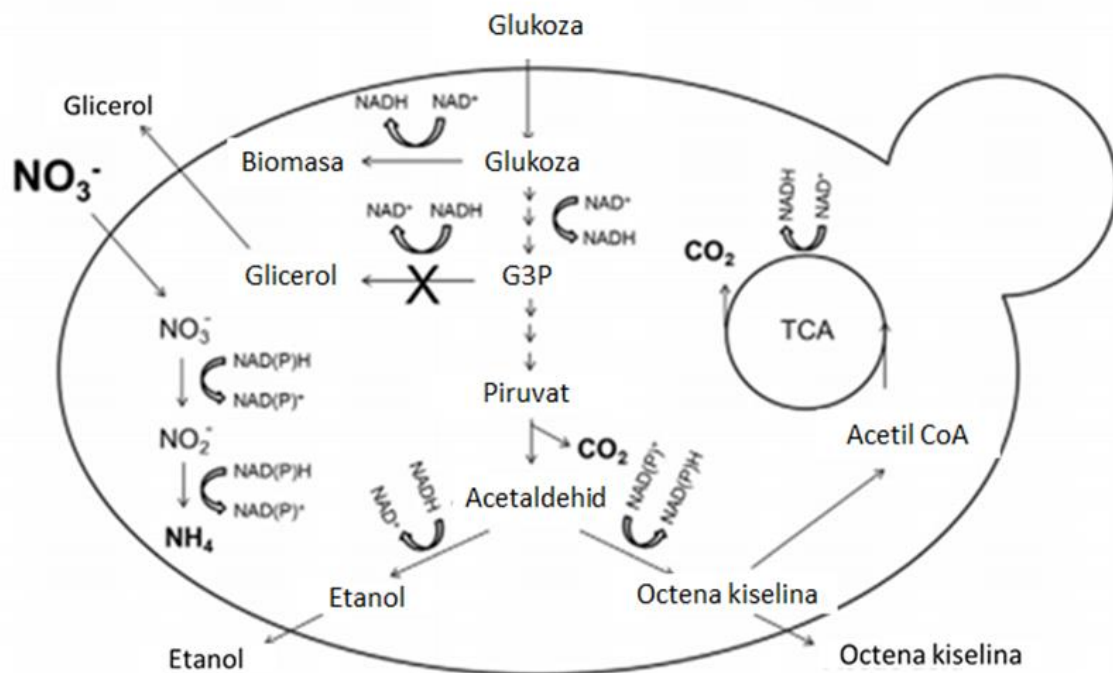
Iako je eksperimentalno utvrđen učinak električne struje niske jakosti na stanice kvasaca, nije pojašnjeno zašto u tretiranim vinima dolazi do značajnog smanjenja koncentracije nekih drugih spojeva kao što su histamin, heksilamin i heptilamin (Lustrato i sur., 2010). Ovaj učinak je izuzetno pozitivan s obzirom da je histamin jedan od najopasnijih sastojaka po zdravlje čovjeka, koji je izoliran iz prehrambenih proizvoda (D'Andrea i sur., 2004). Obuhvatnije istraživanje koje bi uzelo u obzir više vrsta vina, različitih sojeva *Brettanomyces bruxellensis* kao i raznolikije uvjete njihova rasta i preživljavanja u vinima dalo bi bolji uvid u učinkovitost ove obećavajuće metode (Lustrato i sur., 2010).

2.9. Crabtree-jev i Custer-ov učinak kod vrsta *Brettanomyces bruxellensis*

Neki sojevi kvasca *Brettanomyces bruxellensis* kao i neki sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pokazuju Crabtree-jev efekt ili učinak (Kurtzman i sur., 1998). Dakle, ovi sojevi proizvode etanol ukoliko je koncentracija izvora ugljika i energije relativno visoka i to pri (aerobnim) mikroaerofilnim uvjetima. *Brettanomyces bruxellensis* raste na puno širem spektru supstrata - izvora ugljika, ali na njima raste puno sporije i pri znatno nižim koncentracijama izvora ugljika od kvasca *S. cerevisiae* (Silva i sur., 2004; Conterno i sur., 2006). Opisane fiziološke karakteristike ovih dviju vrsta kvasaca uzrok su izmjenične brojčane dominacije kvasaca u pojedinim fazama alkoholne fermentacije. Početak alkoholne

fermentacije karakteriziraju visoka koncentracija izvora ugljika (ugljikohidrata) i niska koncentracija etanola. Ovi uvjeti pogodni su za rast kvasca *S. cerevisiae*. Nakon toga slijedi faza s nepovoljnim uvjetima za rast brojčano dominantnoga *S. cerevisiae*, pa započinje rast i veća aktivnost kvasca *Brettanomyces bruxelensis* (Renouf i sur., 2006). Ovdje su kao potencijalni izvori ugljika okarakterizirani: etanol, različiti monosaharidi, različiti disaharidi, octena kiselina, jabučna kiselina i glicerol kao i biotin, kao vrlo važan vitamin i faktor rasta (Wijsman i sur., 1984.; Dias i sur., 2003; Conterno i sur., 2006). Divol i Smith (2017) u svom istraživanju ističu neka odstupanja njihovih eksperimentalno dobivenih rezultata od rezultata brojnih prethodno provedenih istraživanja potrošnje supstrata na kojima uspješno može rasti kvasac *Brettanomyces bruxellensis*. Naime, ova dva istraživača uzela su u obzir i genetičke i fenotipske razlike među različitim sojevima kvasca *Brettanomyces bruxellensis*, ali i različite uvjete uzgoja ovih sojeva, koji su provedeni pri anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima. Ovi su istraživači koristili hranjive podloge koje su po svom sastavu bile vrlo slične sastavu vina i to je bila glavna razlika između ovog istraživanja i prethodno provedenih istraživanja, koja su provedena u hranjivim podlogama koje su po svom sastavu bile bitno drugačije od sastava vina. Divol i Smith (2017) zaključili su da nema velike razlike u potrošnji supstrata kada se kvasac *Brettanomyces bruxellensis* uzgaja u anaerobnim i mikroaerofilnim uvjetima. Osim glavnog izvora ugljika, ovi su kvasci mogli koristiti i druge izvore ugljika (npr. jabučnu kiselinu). Tijekom korištenja drugih izvora ugljika ovi kvasci znatno sporije rastu.

Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* fakultativni je anaerob koji preferira fermentaciju pred aerobnom respiracijom. Custer-ov efekt (učinak) poznat je kao inhibicija alkoholne fermentacije u uvjetima kada u podlozi nema otopljenog kisika (anaerobni uvjeti). Primjeri Custer-ovog efekta opisani su kod kvasaca iz roda *Brettanomyces* koji fermentiraju glukozu u etanol i octenu kiselinu pri (aerobnim) mikroaerofilnim uvjetima. Ukoliko se (aerobni) mikroaerofilni uvjeti promjene i kvasac počne rasti u anaerobnim uvjetima, fermentacija glukoze se pri novonastalim uvjetima zaustavlja. Istraživanja su pokazala da se ovaj učinak može zaobići ukoliko se u suspenziju dovodi kisik ili se dodaju akceptori H^+ iona, kao što su npr. acetoin (koji se reducira do 2,3-butandiola) ili neki alifatski karbonil. Dodatak nitrata može također izazvati sličan učinak na alkoholnu fermentaciju. U prisutnosti nitrata pri aerobnim uvjetima proizvodi se octena kiselina, a ne etanol, a slično se događa i pri anaerobnim uvjetima, kako je to prikazano na Slici 6. Ovakva regulacija metabolizma smatra se posljedicom korištenja koenzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata [NAD(P)H] kao donora elektrona nitrat reduktazi i nitrit reduktazi, ili pak konkuriranja ovih enzima s alkohol-dehidrogenazom za koenzim NADH pri aerobnim uvjetima (Steensels i sur., 2015).



Slika 6. Razgradnja glukoze u stanici kvasca *Brettanomyces bruxellensis* pri različitim uvjetima uzgoja (prilagođeno iz Steensels i sur., 2015.).

2.10. Primjena vrste *Brettanomyces bruxellensis* u proizvodnji bioetanola

Inovativni bioprocesi proizvodnje bioetanola podrazumijevaju vrlo stresne uvjete za bilo koji odabrani biokatalizator – mikroorganizam, koji bi trebao katalizirati konverziju početnog supstrata do etanola (Blomqvist, 2011). Ipak, smatra se da bioprocesi ove vrste nisu toliko stresni za kvasac *Brettanomyces bruxellensis*, čije stanice razvijaju otpornost i preživljavaju u vrlo stresnim uvjetima kao što su (1) visoki osmotski tlak, (2) visoke koncentracije etanola i (3) niske pH vrijednosti okoline u kojima ovaj kvasac zadržava svoju metaboličku aktivnost. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* često se izolira iz biorafinerija u kojima se proizvodi bioetanol (Beckner i sur., 2011; Liberal i sur., 2007; Passoth i sur., 2007), a njegova je metabolička aktivnost neometana u prisutstvu bakterija mliječne kiseline, koje su vrlo česti radni mikroorganizmi u proizvodnji bioetanola s obzirom da neke vrste ovih

bakterija mogu koristiti pentoze – izvore ugljika koji se dobivaju iz polimernih supstrata/sirovina i to tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina. Većina kvasaca ne može koristiti pentoze kao izvore ugljika i energije (Passoth i sur., 2007).

Stresni uvjeti industrijskih bioprocasa kao što su nizak pH ili limitacija kisikom ne utječu na metaboličku aktivnost kvasca *Brettanomyces bruxellensis* te osiguravaju relativno niske prinose etanola od 0,44 g etanola po g utrošene glukoze. To ukazuje da primjena ove vrste kvasca u proizvodnji bioetanola ne bi polučila industrijski prihvatljive rezultate ukoliko se radi o šaržnim postupcima. Međutim, primjena vrste *Brettanomyces bruxellensis* u proizvodnju bioetanola kontinuiranim postupkom svakako je konkurentna i bolja od standardnih kontinuiranih postupaka koji se provode s pomoću vrste *S. cerevisiae* (Galafassi i sur., 2011).

Iako se *Brettanomyces bruxellensis* još uvijek smatra kontaminantom i nepoželjnim dijelom mješovitih kultura u proizvodnji bioetanola, novija istraživanja jasno pokazuju da upravo ova vrsta kvasca kao čista kultura je izvanredan izbor za proizvodnju etanola iz škrobnih sirovina (Passoth i sur., 2007). Osim toga, sukcesivna primjena dviju vrsta kvasaca - *S. cerevisiae* i *Brettanomyces bruxellensis* i to pri relativno visokom koncentracijama etanola mogla bi biti uspješna združena kultura u visoko učinkovitim proizvodnim procesima (Steensels i sur., 2015). Posebno važne karakteristike vrste *Brettanomyces bruxellensis*, koje Steensels i suradnici (2015) ističu kao ključne za ove procese su djelomična asimilacija izvora dušika te mogućnost korištenja oligosaharida (dekstrina) i nekih pentozna (Galafassi i sur., 2011) kao i celobioze. Ovaj zanimljiv spektar supstrata širi broj i vrste sirovina koje se mogu koristiti u proizvodnji bioetanola. Samo ograničen broj istraživanja bavi se primjenom ovog kvasca u proizvodnji bioetanola. 2008. godine prihvaćen je patent kojim se štiti ciljana primjena mješovite kulture kvasca iz roda *Brettanomyces* i bakterije mliječne kiseline u proizvodnji bioetanola (Steensels i sur. 2015). Daljnja istraživanja genoma vrste *Brettanomyces bruxellensis* i razumijevanje regulacije metaboličkih puteva u stanicama ove vrste doprinijet će primjeni ovog kvasca kao radnog mikroorganizma u proizvodnji bioetanola (Galafassi i sur., 2011).

ZAKLJUČCI

3. ZAKLJUČCI

Na temelju pretraživanja relevantnih literaturnih podataka i njihova organiziranja, objedinjavanja i interpretacije, koji su provedeni u ovom radu, može se zaključiti slijedeće:

1. Kvasci vrste *Bretanomyces bruxellensis* mogu se izolirati iz različitih staništa, kao što su površina tijela vinske mušice, površina bobica grožđa, mošt, vino, tekila, kefir, itd. Detekcija ove vrste kvasaca, njezin rast i druge fiziološke karakteristike slabo su okarakterizirane, poznate i posljedično primijenjene u biotehnološkoj proizvodnji, uglavnom zbog nedostataka raspoloživih analitičkih i molekularnih metoda.
2. Do danas je okarakterizirano korištenje industrijski interesantnih supstrata, na primjer nekih monosaharida (i pentoza), zatim di- i polisaharida i drugih neobičnih supstrata s pomoću vrste *Bretanomyces bruxellensis*. Prisutnost kisika utječe na regulaciju metabolizma različitih supstrata u stanicama ove vrste, a proizvodnja različitih krajnjih proizvoda metabolizma može se pospješiti promjenom koncentracije otopljenog kisika kao i određenih spojeva u podlozi u kojoj raste ova vrsta kvasaca, koja pokazuje Crabtree-jev i Custer-ov učinak.
3. Specifični krajnji proizvodi metabolizma sojeva vrste *Bretanomyces bruxellensis*, kao što su 4-etilfenol i 4-etilgvajakol, pri niskim koncentracijama doprinose kompleksnosti organoleptičkih svojstava alkoholnih pića, prvenstveno vina i piva. Visoke koncentracije ovih krajnjih proizvoda mogu formirati tzv. „brett“ aromu alkoholnih pića i tako ih učiniti sasvim neprihvatljivima krajnjem potrošaču.
4. Nekoliko metoda za sprečavanje kontaminacije i/ili za redukciju broja stanica kvasaca iz roda *Bretanomyces* u različitim biotehnološkim proizvodima smatra se učinkovitim, kao što su primjena različitih starter-kultura i tretiranje podloga u kojima rastu ovi kvasci električnom strujom niske jakosti.
5. Eksperimentalni podaci ukazuju da je vrsta *Bretanomyces bruxellensis* robustan biokatalizator, koji zadržava svoju metaboličku aktivnost pri relativno visokim koncentracijama supstrata i proizvoda (etanola), zatim niskim pH vrijednostima i visokom osmotskom tlaku, pa je industrijska primjena ove vrste u proizvodnji bioetanola vrlo izgledna.

POPIS LITERATURE

4. POPIS LITERATURE

1. Aguilar Uscanga M. G., Delia M. I., Strehaiano P. (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 157 – 162.
2. Anonymus 1 (2018) Wikipedia
<https://en.wikipedia.org/wiki/Brettanomyces_brucei> Pristupljeno 12.travnja 2018.
3. Avramova M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Schacherer J., Spano G., Capozzi V., Blaiotta G., Salin F., Dols-Lafargue M., Grbin P., Curtin C., Albertin W., Masneuf-Pomarede I. (2018) *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports* **8**: 1 - 13.
4. Barbosa-Canovas G. V., Gongora-Nieto M. M., Swanson B. G. (2001) Pulsed electric power in food preservation, < <https://www.ifis.org> > Pristupljeno 15.ožujka 2018.
5. Beckner M., Ivey M. L., Phister T. G. (2011) Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology* **53**: 387 - 394.
6. Berbegal C., Spano G., Fragasso M., Grieco F., Russo P., Capozzi V. (2018) Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 569 - 576.
7. Blomqvist J. (2011) *Dekkera bruxellensis* – a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. Doktorski rad, Swedish University of Agricultural Sciences.
8. Boekhout T., Kurtzman C. P., O'Donnell K., Smith M. T. (1994) Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26s ribosomal DNA nucleotide sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 781 - 786.

9. Bokulich N. A., Bamforth C. W. (2013) The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**: 157 - 172.
10. Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J. N., Lavigne V. (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**: 191 - 202.
11. Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J. N., Pons M. (1992) The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60**: 165 – 178.
12. Claussen N. H. (1904) On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned english stock beers. *Journal of The Institute of Brewing* **10**: 308 - 331.
13. Cocolin L., Bisson L. F., Mills D. A. (2000) Direct procling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 81 - 87.
14. Conterno L., Joseph L., Arvik T. J., Henick-Kling T., Bisson L. F. (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 139 - 147.
15. Custers M. T. J. (1940) Onderzoekingen over het gistgeslacht Brettanomyces. Doktorski rad, Delft University.
16. D'Andrea G., Terrazzino S., Leon A., Fortin D., Perini F., Granella F., Bussone G. (2004) Elevated levels of circulating trace amine in primary headaches. *Neurology* **62**: 1701 – 1705.
17. Delaherche A., Claisse O., Lonvaud- Funel A. (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and „ropy“ *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 910 - 915.
18. Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J. (2004) Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* **21**: 703 – 714.

19. Dias L., Dias S., Sancho T., Stender H., Querol A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2003) Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* **20**: 567 – 574.
20. Smith B. D., Divol B. (2017) The carbon consumption pattern of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* in synthetic wine-like medium. *Food Microbiology* **73**: 39 -48.
21. Dowhanick T. M. (1995) Advances in yeast and contaminant determination: the future of the so called „rapid“ methods. *Cerevisia - Belgian Journal of Brewing and Biotechnology* **20**: 40 - 50.
22. Egli C. M., Edinger W. D., Mittrakul C. M., Henick-Kling T. (1998) Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* **85**: 779 – 789.
23. Florenzano G. (1951) Diffusione e significato enologico dei lieviti *Brettanomyces*. *Atti dell'Accademia Italiana della Vite e del Vino* **3**: 236 – 249.
24. Frank J., Shewfelt R., Wedral D. (2010) The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT- Food Science and Technology* **43**: 1474 - 1479.
25. Fugelsan K., Zoecklein B. W. (2003) Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **54**: 294 – 300.
26. Galafassi S., Merico A., Pizza F., Hellborg L., Molinari F., Piškur J., Compagno C. (2011) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**: 1079 - 1088.
27. Garde-Cerdán T., Marsellés-Fontanet A. R., Arias-Gil M., Martín Belloso O., Ancín-Azpilicueta C. (2007) Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds

through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry* **103**: 771 - 777.

28. Garde-Cerdán T., Marsellés-Fontanet A. R., Arias-Gil M., Ancín Azpilicueta C., Martín-Belloso O. (2008) Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9**: 469 - 476.
29. Gerós H., Azevedo M. M., Cássio F. (2000) Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technology and Biotechnology* **38**: 59 – 62.
30. González-Calabuig A., del Valle M. (2018) Voltammetric electronic tongue to identify Brett character in wines. On-site quantification of its ethylphenol metabolites. *Talanta* **1**:70 - 74.
31. Grahovac B. (2009) Molekularne metode u patologiji, https://www.medri.uniri.hr/files/NASTAVA/PATOLOGIJA/NASTAVNO_GRADIVO/Molekularne_metode_u_patologiji.pdf > Pristupljeno 12.siječnja 2018
32. Granato T. M., Romano D., Vigentini I., Foschino R. C. Mont D., Mamone G., Ferranti P., Nitride C., Iametti S., Bonomi F., Molinari F. (2014) New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. *Annals of Microbiology* **65**: 321 – 329.
33. Heinz A., Lober S., Georgi A., Wrase J., Hermann D., Rey E. R., Wellek S., Mann K. (2003) Reward craving and withdrawal relief craving: assessment of different motivational pathways to alcohol intake. *Alcohol and Alcoholism* **38**: 35 – 39.
34. Henick-Kling T., Egli C., Licker J., Mitrakul C., Acree T. E. (2000) *Brettanomyces* in wine. In: Fifth Int. Symp. Cool Climate Vitic. Oenol. Winetitles, Melbourne, str. 1-7.
35. Hoeben P., Clark-Walker G. D. (1986) An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Eniella* genera. *Current genetics* **10**: 371 - 379.

36. Holt S., Mukherjee V., Lievens B., Verstrepen J. K., Thevelein M. J. (2017) Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology* **72**: 55 - 66.
37. Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765 - 4774.
38. Knorr D., Heinz V., Ulmer H. M., Gänzle M. G., Vogel R. F. (2002) Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology* **93**: 326 – 335.
39. Krumbholz G., Tauschanoff W. (1933) *Mycotorula intermedia* n. sp., ein Beitrag zur kenntnis der Gärungserreger im Wein. Zentralblatt für Bakteriologie **88**: 366 – 373.
40. Kunkee R. E., Amerine M. A. (1970) Yeasts in wine-making. In: The yeasts (Eds Rose, A. H. and Harrison, J. S.) str. 5-71. New York, Academic Press.
41. Kurtzman C. P., Robnett C. J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 331 – 371.
42. Liberal de Souza A., Basílio A., Resende do Monte A., Brasileiro B., da Silva-Filho E., de Moraes J., Simões D., de Moraes M. (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 538 – 547.
43. Licker J. L., Acree T. E., Henick-Kling T. (1998) What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? *Chemistry of Wine Flavor* **714**: 96 - 117.
44. Loureiro V., Barata A., Nobre A., Correia P., Malfeito-Ferreira M. (2006) Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 133 - 138.

45. Lustrato G., Alfano G., Belli C., Grazia L., Iorizzo M., Maiuro L., Massarella F., Zanardini E., Ranalli G. (2003) Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 1087 – 1095.
46. Lustrato G., Vigentini I., De Leonardis A., Alfano G., Tirelli A., Foschino R., Ranalli G. (2006) Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology* **109**: 594 - 604.
47. Mavlani M. I. , Gulyamova N. (1968) Characteristics of asporogenic yeast like organisms. *Uzbekskii Biologicheskii Zhurnal* **12**: 16 - 19.
48. Meaden P. (1990) DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. *Journal of Institute of Brewing* **96**: 195 - 200.
49. Milheiro J., Filipe-Ribeiro L., Vilela A., Cosme F., Nunes F. M. (2017) 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatechol in red wines: microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **19**: 1 - 25.
50. Mills D. A., Johannsen E. A., Cocolin L. (2002) Yeast diversity and persistence in Botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4884 - 4893.
51. Mitrakul C. M., Henick-Kling T., Egli M. (1999) Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology* **16**: 3 - 14.
52. Ness F., Lavallée F., Dubourdieu D., Aigle M., Dulau L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of The Science of Food and Agriculture* **62**: 89 - 94.
53. Passoth V., Blomqvist J., Schnurer J. (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Applied Environmental Microbiology* **73**: 4354 – 4356.

54. Peynaud E., Domercq S. (1956) Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv Für Mikrobiologie* **24**: 266 – 280.
55. Phister T. G., Mills D. A. (2003) Real- time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7430 - 7434.
56. Ranalli G., Lorizzo M., Grazia L. (2000) Effects of low electric current on media and on grape juice. In: *The Rising Power of Yeasts in Science and Industry* ed. van Dijken, J.P. and Sheffers, A. str. 369–370. Delft, The Netherlands: Delft University Press.
57. Ranalli G., Lorizzo M., Lustrato G., Grazia L. (2002) Effects of low electric treatment on yeast microflora. *Journal of Applied Microbiology* **93**: 877 – 883.
58. 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. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1208 - 1219.
59. Renouf V., Lonvaud-Funel A., Coulon J. (2007) The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *Journal international des sciences de la vigne et du vin* **41**: 161 - 173.
60. Romano P., Suzzi G. (1993) Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. str. 373–393. Chur: Harwood Academic Publishers.
61. Schifferdecker A. J., Dasho S., Ishchuk O. P. (2014) The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* **31**: 323 - 332.
62. Scott J. A., Swaffield C. H. (1995) Existence and development of natural microbial populations in wooden storage vats used for alcoholic cider maturation. *Journal of the Institute of Brewing* **53**: 117 - 120.

63. Shimwell J. L. (1938) Some facts and fallacies in brewing bacteriology. *Journal of The Institute of Brewing* **44**: 571 - 572.
64. Shimwell J. L. (1947) A study of ropiness in beer. *Journal of The Institute of Brewing* **53**: 208 - 294.
65. Silva P., Cardoso H., Geros H. (2004.) Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera spp.* *American Journal of Enology and Viticulture* **55**: 65 – 72.
66. Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinck G., Verachtert H., Verstrepen J. K. (2015) *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **206**: 24 - 38.
67. Van der Walt J. P., Van Kerken A. E. (1961) Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **27**: 81 - 90.
68. Walt J. P., van der Yarrow D. (1984) The genus *Arxiozyma* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*). *South African Journal of Botany* **3**: 340 - 342.
69. Vega-Mercado H., Martin-Belloso O., Qin B. L., Chang F. J., Gongora-Nicto M. M., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G. (1997) Non-thermal food preservation. Pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology* **81**: 151 - 157.
70. Verstrepen K. J., Van Laere S. D., Vanderhaegen B. M., Derdelinckx G., Dufour J. P., Pretorius I. S., Winderickx J., Thevelein J. M., Delvaux F. R. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 5228 - 5237.
71. Wijsman M. R., Van Dijken J. P., Van Kleeff B. H., Scheffers W. A. (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius*

upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 183 - 192.

72. Wright J., Parle J. (1974) *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **17**: 273 – 278.

73. Yamada Y., Matsuda M., Mikata K. (1995) The phylogenetic relationships of *Eeniella nana* Smith, Batenburg-van der Vegte et Scheffers based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Candidaceae). *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 456 – 460.

Izjava o izvornosti

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



Isabela Pehar