

Utjecaj Saccharomyces i ne-Saccharomyces kvasaca na aromu vina Pošip

Jerečić, Margareta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:166570>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Margareta Jerečić

**UTJECAJ *SACCHAROMYCES* I
NE-*SACCHAROMYCES* KVASACA
NA AROMU VINA POŠIP**

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, te uz pomoć doc. dr. sc. Marine Tomašević.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na odabranoj temi i stručnim savjetima te na podršci koja je bila ključna za uspješno završavanje diplomskog studija.

Hvala doc. dr. sc. Marini Tomašević na pomoći i stručnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada, na vođenju kroz cijeli istraživački proces, pružanju dragocjenih smjernica te poticanju na kritičko razmišljanje. Vaša stručnost i predanost bili su izvor inspiracije, a Vaša podrška neprocjenjiva.

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

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ *SACCHAROMYCES* I *NE-SACCHAROMYCES* KVASACA NA AROMU VINA POŠIP

Margareta Jerečić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058214909

Sažetak: Aroma vina, kao jedan od glavnih parametara kvalitete, značajno ovisi o kvascima korištenim za provedbu alkoholne fermentacije, obzirom da se tijekom te faze sintetizira najveća količina spojeva arome. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca (*Torulaspota delbruecki*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*) na aromu vina Pošip, u usporedbi sa kontrolnim *Saccharomyces cerevisiae* kvascem. Vina su proizvedena sekvencijalnom fermentacijom navedenih ne-*Saccharomyces* kvasaca te kontrolni uzorak inokulacijom komercijalnog *Saccharomyces cerevisiae* kvasca. Analize vina provedene su po završetku fermentacije. Esteri, viši alkoholi i terpeni određeni su primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS). Rezultati su pokazali da su sekvencijalnom alkoholnom fermentacijom nastale više koncentracije nekih estera (izobutil-acetat, etil-heksanoat, heksil-acetat, etil-oktanoat, 2-fenil-acetat), zatim izobutanola te linalola, dok je primjena komercijalnog kvasca rezultirala višim koncentracijama izoamil-acetata, etil-dekanoata, etil-butirata i nekim višim alkoholima (izoamil-alkohol, *cis*-3-heks-3-en-1-ol, 1-heksanol, 2-feniletanol).

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbruecki*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, sekvencijalna fermentacija

Rad sadrži: 63 stranica, 17 slika, 143 literaturnih 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: doc. dr. sc. Marina Tomašević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu: (Napomena: članovi povjerenstva se predlažu u obrascu OB-US-13-01, a u diplomski rad unose tek nakon sjednice Odbora)

1. doc. dr. sc. Marina Tomašević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Klara Kraljić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Nikolina Čukelj Mustać (zamjenski član)

Datum obrane: 22. prosinca 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

THE INFLUENCE OF *SACCHAROMYCES* AND NON-*SACCHAROMYCES* YEASTS ON THE AROMA OF POŠIP WINE

Margareta Jerečić, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058214909

Abstract: Wine aroma, a key quality parameter, depends on yeasts used during alcoholic fermentation, synthesizing a significant amount of aroma compounds during this phase. This study aimed to determine the influence of non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*) on Pošip wine aroma, compared to the control *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Wines were produced through sequential fermentation using the mentioned non-*Saccharomyces* yeasts and the control sample through inoculation with commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Post-fermentation, wine analysis was conducted. Esters, higher alcohols, and terpenes were identified using gas chromatography with mass detection after solid-phase microextraction (SPME-GC/MS). Results indicated that sequential alcoholic fermentation led to higher concentrations of certain esters (*i*-butyl acetate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl octanoate, 2-phenyl-acetate), as well as *i*-butanol and linalool, while the application of commercial yeast resulted in higher concentrations of *i*-amyl acetate, ethyl decanoate, ethyl butyrate, and some higher alcohols (*i*-amyl alcohol, *cis*-3-hexen-1-ol, 1-hexanol, 2-phenyl ethanol).

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, sequential fermentation

Thesis contains: 63 pages, 17 figures, 143 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Karin Kovačević Ganić, PhD, Full professor

Technical support and assistance: *Marina Tomašević*, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Marina, Tomašević, PhD, Assistant professor (president)
2. Karin, Kovačević Ganić, PhD, Full professor (mentor)
3. Klara, Kraljić, PhD, Associate professor (member)
4. Nikolina, Čukelj Mustač, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: December 22th, 2023

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	2
2.1.1. Alkoholna fermentacija kao ključni proces u proizvodnji vina	2
2.1.2. Spontana i inducirana alkoholna fermentacija	3
2.1.3. Uloga kvasaca u procesu fermentacije	4
2.1.4. Različiti tipovi kvasaca i njihove karakteristike	4
2.2. AROMATSKI SPOJEVI U VINU.....	6
2.2.1. Utjecaj <i>Saccharomyces</i> i ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca na spojeve arome i senzorski profil vina	7
2.3. POŠIP.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Mošt	13
3.1.2. Kvasci i hrana za kvasce	13
3.1.2.1. Karakteristike kvasca <i>Zymaflore® VL3</i>	13
3.1.2.2. Karakteristike kvasca <i>Zymaflore® Alpha^{TD}</i>	14
3.1.2.3. Karakteristike kvasca <i>FrootZen ®</i>	14
3.1.2.4. Karakteristike kvasca <i>Zymaflore ® KHIO^{MP}</i>	14
3.1.2.5. Karakteristike hrane za kvasce <i>Thiazote® Range</i>	14
3.1.3. Kemikalije	15
3.1.4. Oprema i uređaji	15
3.2. METODE	16

3.2.1.	Metoda proizvodnje bijelog vina sorte Pošip	16
3.2.1.1.	<i>Priprema kvasaca i inokulacija mošta</i>	16
3.2.2.	Praćenje dinamike alkoholne fermentacije	16
3.2.2.1.	<i>Određivanje topljive suhe tvari areometrom (moštomjerom)</i>	16
3.2.2.2.	<i>Određivanje optičke gustoće (OD₆₀₀)</i>	17
3.2.3.	Određivanje arome vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)	17
3.2.4.	Obrada podataka	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1.	DINAMIKA ALKOHOLNE FERMENTACIJE	20
5.	ZAKLJUČCI	45
6.	LITERATURA	46

1. UVOD

Aromu vina čine hlapljivi spojevi, odnosno oni koji doprinose kompleksnosti i raznolikosti mirisnih karakteristika vina, te nehlapljivi spojevi, koji su odgovorni za okus vina. Na koncentraciju navedenih spojeva utječu brojni faktori, kao što su sorta grožđa i agroklimatski uvjeti, primijenjeni enološki postupci te uvjeti dozrijevanja i skladištenja vina. Od enoloških postupaka najznačajniji utjecaj na aromu vina ima alkoholna fermentacija, obzirom da se tijekom tog procesa sintetizira preko 50 % ukupnih spojeva arome vina. Pritom kvasci, koji provode taj proces, imaju ključnu ulogu u kvantitativnoj i kvalitativnoj proizvodnji tih aroma. Trenutno su na tržištu dostupni raznovrsni komercijalni sojevi s ciljem unaprjeđenja aromatskih svojstava vina. Najčešće korišteni kvasci su *Saccharomyces cerevisiae*, međutim zadnjih godina se sve više ističe važnost ne-*Saccharomyces* sojeva za povećanje kompleksnosti arome vina. Obzirom da je većina ne-*Saccharomyces* kvasaca osjetljiva na veći udio etanola, uvijek se provodi sekvencijalna i ko-inokulacija ovih kvasaca i *Saccharomyces* soja, koji onda provodi ovaj postupak do kraja. Osim što povećavaju kompleksnost arome, ne-*Saccharomyces* kvasci su zadnjih godina postali popularni i zbog sposobnosti smanjenja udjela alkohola, čime bi se mogle ublažiti negativne posljedice klimatskih promjena, odnosno prevelikog nakupljanja šećera u grožđu. Osim toga, cilj sekvencijalnih inokulacija je imitirati spontanu fermentaciju, a pri tom eliminirati nedostatke autohtonog kvasca, poput proizvodnje neželjenih mirisa i okusa te problemi sa otežanim i zaustavljenim fermentacijama.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na aromatski profil vina Pošip te identificirati sojeve koji će poboljšati njegov specifični aromatski sastav. Pritom će se provesti tri različite sekvencijalne fermentacije s ne-*Saccharomyces* sojevima (*Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*) i *Saccharomyces cerevisiae*. Njihov je profil arome bit će uspoređen s vinom koje je proizvedeno fermentacijom s čistom kulturom *S. cerevisiae*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

2.1.1. Alkoholna fermentacija kao ključni proces u proizvodnji vina

Fermentacija je oblik metabolizma koji oslobađa energiju, a u kojem su i supstrat i nusproizvod organski spojevi, a pritom ne zahtijeva sudjelovanje molekularnog kisika. Iako postoji mnogo fermentacijskih putova, u proizvodnji vina radi se o alkoholnoj fermentaciji (Jackson, 2020). U početnim fazama, kvasci rastu u aerobnim uvjetima, pri čemu koriste šećere iz mošta za povećanje svoje biomase sve dok praktički ne potroše sav otopljeni kisik. Tijekom ove faze ne proizvodi se etanol. Najveća pretvorba glukoze i fruktoze u etanol događa se u anaerobnim uvjetima. Alkoholna fermentacija, proces u kojem se etanol proizvodi fermentacijom šećera iz mošta (glukoze i fruktoze), rezultira kvalitativnim i kvantitativnim promjenama u kemijskom sastavu mošta. Glavne kvantitativne promjene najviše se odnose na fermentirajuće šećere, budući da oni praktički nestaju (Moreno i Peinado, 2012). Do kraja fermentacije, većina šećera je metabolizirana, što rezultira suhim vinom, dok su druge hranjive tvari značajno iscrpljene (Jackson, 2020). Pritom etanol, koji je praktički nepostojeći u moštu, postaje najzastupljeniji sastojak, nakon vode. Glicerol je treći najzastupljeniji sastojak. Nadalje, alkoholna fermentacija utječe i na koncentraciju kiselina, posebno njihovih soli koje su prvobitno prisutne u moštu, a rezultat su sinteze etanola i promjene dielektrične konstante vina. Promjena dielektrične konstante utječe na topljivost ionskih i polarnih spojeva što rezultira nižom koncentracijom soli u vinu nego u originalnom moštu. Još jedan učinak alkoholne fermentacije je povećanje koncentracije polifenolnih spojeva. Polifenolni spojevi prisutni u pokožici bobice grožđa nisu izrazito polarni i stoga se učinkovitije ekstrahiraju kada se poveća udio etanola u mediju (Moreno i Peinado, 2012).

Iako je etanol glavni krajnji produkt, metabolički nusprodukti koji nastaju metabolizmom kvasaca značajno doprinose osnovnim aromatskim svojstvima vina. Kvasac također može utjecati na razvoj sortnih aroma putem hidrolize nehlapljivih prekursora aroma, oslobađajući terpene, fenole, norizoprenoide i sortne tiole kao hlapljive, mirisne spojeve. Osim toga, promjenjivi fizikalno-kemijski uvjeti tijekom fermentacije postupno modificiraju i metabolizam kvasca. To se prvenstveno odnosi na različite faze rasta stanica kvasca, a koje su povezane sa dostupnim nutritivnim tvarima i staničnom energijom, odnosno sa tvarima koje se apsorbiraju i oslobađaju tijekom procesa fermentacije. Stoga se velik dio spojeva koji definiraju miris vina

može promatrati kao rezultat prilagodbe primarnog i sekundarnog metabolizma kvasca (Jackson, 2020).

2.1.2. Spontana i inducirana alkoholna fermentacija

Fermentacija vina se provodi spontanom načinom, djelovanjem autohtonih kvasaca ili inducirano, inokulacijom mošta/masulja komercijalnim kvascima (Böhmer i sur., 2020; Liu i sur., 2017). Tijekom godina bilo je mnogo rasprava o relativnim prednostima spontane u odnosu na induciranu alkoholnu fermentaciju (Jackson, 2020; Grando i sur., 1993; Cavazza i sur., 1989). Pritom se, kao glavna prednost, najčešće ističe kako spontana alkoholna fermentacija rezultira vinima s tipičnim senzorskim karakteristikama povezanim s „*terroir*om“ upravo zbog dominacije autohtonih mikroorganizama koji su aktivni tijekom vinifikacije. Međutim, kontrola ovog procesa je otežana zbog prisutnosti raznih sojeva kvasaca, koji različito dominiraju u pojedinim fazama fermentacije (Böhmer i sur., 2020; Xu i sur., 2019; Rementeria i sur., 2003). Upravo zbog toga postoji veliki rizik od pojavljivanja nepoželjnih mirisa i drugih negativnih senzorskih svojstava. Na primjer, aktivnost kvasaca *Kloeckera* i *Hanseniaspora* može povećati pojavu neproteinskih zamućenja (Jackson, 2020; Dizzy i Bisson, 2000). Osim toga, spontana alkoholna fermentacija često je povezana s većom koncentracijom hlapljive kiselosti i etil-acetata, uslijed veće oksidacije mošta, što rezultira negativnim senzorskim promjenama vina (Jackson, 2020; Salvadores i sur., 1993).

S druge strane, upotreba komercijalnih starter kultura u fermentaciji vina omogućuje iznimnu kontrolu procesa alkoholne fermentacije, bez potencijalnih neugodnih iznenađenja (Böhmer i sur., 2020; Comitini i sur., 2017). Nadalje, ovako proizvedena vina obično imaju standardizirane aromatske profile, tzv. „*bouquet*“ bez obzira na godinu berbe i lokaciju („*terroir*“) (Böhmer i sur., 2020; Capozzi i sur., 2015). Drugim riječima, korištenje komercijalnih sojeva vinarima osigurava brz početak alkoholne fermentacije, njen pravilan tijek i provedbu do kraja, odnosno do iscrpljenja šećera (smanjuje se mogućnost nepoželjne mikrobne aktivnosti, utjecaj "killer faktora" ili oksidacije mošta). Za vinarije velikih razmjera, gdje je dosljednost kvalitete važna, rizici spontane fermentacije nadmašuju potencijalne prednosti, zbog čega se ovaj postupak rjeđe i primjenjuje (Jackson, 2020). Međutim, trenutno je prihvaćeno da fermentacije koje koriste više od jednog soja kvasca mogu proizvesti vino više kvalitete i kompleksnosti s manje alkohola, uz osiguranu mikrobiološku kontrolu. Takve

fermentacijenazivaju se mješovite fermentacije (Carpena i sur., 2020b; Ciani i Comitini, 2015), a provode se kontroliranom inokulacijom različitih komercijalnih sojeva kvasaca.

2.1.3. Uloga kvasaca u procesu fermentacije

Kvasci su fakultativni mikroorganizmi, što znači da mogu preživjeti u aerobnim ili anaerobnim uvjetima (s ili bez kisika). U aerobnim uvjetima kvasci proizvode CO₂ i H₂O, a u anaerobnim uvjetima, proizvode etanol i CO₂ (Moreno i Peinado, 2012). U usporedbi s drugim mikroorganizmima, kvasci nisu osobito nutritivno zahtjevni. Međutim, njihov rast podržava postojanje osnovnih spojeva poput fermentabilnih šećera, aminokiselina, vitamina, minerala i također kisika (Maicas, 2020; Walker i Stewart, 2016). U prisutnosti kisika, kvasci koriste respiratorni put, koji im je energetski povoljniji od fermentacijskog puta. U mediju s visokom koncentracijom glukoze, poput mošta, kvasci će koristiti samo fermentacijski put, budući da je u tim uvjetima respiracija nemoguća, čak i u prisutnosti kisika. Međutim, prisutnost kisika u moštu potiče alkoholnu fermentaciju jer potiče sintezu masnih kiselina i sterola povećavajući propusnost staničnih membrana i time prijenos šećera. Steroli imaju važnu biološku ulogu u kvascima jer sudjeluju u sintezi membrane i izvor su određenih hormona. Na početku fermentacije, kvasci mogu koristiti svoje zalihe sterola, ali te zalihe se iscrpljuju ako fermentacija nastavi pod strogim anaerobnim uvjetima. Stoga je važan kratki kontakt s zrakom kako bi se osigurala sinteza sterola i time umnožavanje kvasaca te završetak alkoholne fermentacije. To može dovesti do udvostručenja populacije kvasca u moštu, čime se povećava brzina fermentacije i količina šećera pretvorenog u alkohol (Moreno i Peinado, 2012).

2.1.4. Različiti tipovi kvasaca i njihove karakteristike

Na metaboličkoj razini, kvasci se karakteriziraju sposobnošću fermentacije širokog spektra šećera, među kojima prevladavaju glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza, koje se nalaze u zreloom voću. Osim toga, kvasci podnose kisela okruženja s pH vrijednostima oko 3,5 ili čak niže. Prema tehnološkoj prikladnosti, kvasci se dijele dvije velike kategorije, a to su *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces*. Morfološki gledano, kvasci pokazuju visoku raznolikost, pri čemu su okrugli, elipsoidni i ovalni oblici najčešći (Maicas, 2020). Nadalje, klasična klasifikacija uključuje druge, složenije testove poput fermentacije šećera i asimilacije aminokiselina (Maicas, 2020; Walker i Stewart, 2016). Proizvodnja i tolerancija na etanol, organske kiseline i SO₂ također su važni alati za razlikovanje vrsta (Maicas, 2020).

Prema sposobnosti proizvodnje etanola kvasci se mogu klasificirati na nisku, umjerenu te visoku sposobnost proizvodnje. Općenito, etanol je toksičan za kvasce, a toksičnost mu se povećava s porastom koncentracije. Ovaj toksični učinak odražava se smanjenjem proporcije dušika koji se asimilira kod kvasaca u prisutnosti etanola. Sve vrste kvasca imaju granicu tolerancije na etanol. Kad se ta granica premaši, oni će umrijeti. Stoga je poželjno da kvasci odgovorni za fermentaciju imaju visoku toleranciju na etanol kako bi se osiguralo da se svi šećeri u moštu pretvore u etanol (Moreno i Peinado, 2012).

2.1.4.1. *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasci

Tijekom cijelog procesa fermentacije sudjeluje nekoliko vrsta kvasaca. Naime, vrsta kvasca koji sudjeluje varira o načinu provođenja alkoholne fermentacije (spontana ili inducirana) (Moreno i Peinado, 2012). *S. cerevisiae* je najviše proučavana vrsta i najčešće se koristi u fermentaciji vina zbog brzog rasta i jednostavne prilagodbe (Maicas, 2020). *S. cerevisiae* i ne-*Saccharomyces* kvasci pokazuju različito ponašanje u prisutnosti niske razine kisika. Konkretno, u anaerobnim uvjetima fermentacije, *S. cerevisiae* može brzo rasti (Hansen i sur., 2001; Ciani i sur., 2016), dok ne-*Saccharomyces* kvasci koji pripadaju rodovima *Hanseniaspora*, *Kloeckera* i *Torulaspota* slabo rastu u istim uvjetima (Ciani i sur., 2016; Visser i sur., 1990). *S. cerevisiae* podnosi koncentracije sumporovog dioksida (SO₂) koje većina ne-*Saccharomyces* kvasaca ne preživi (Maicas, 2020). Također, većina ne-*Saccharomyces* kvasaca ima nižu toleranciju na etanol u usporedbi sa *Saccharomyces* kvascima (Fugelsand i Edwards, 2007; Deak i Beuchat, 1996), što rezultira odumiranjem ovih kvasaca ubrzo nakon početka alkoholne fermentacije kada koncentracija etanola doseže 5 do 6 % (v/v) (Fugelsand i Edwards, 2007).

S. cerevisiae sojevi mogu metabolički međusobno djelovati, mijenjajući fermentacijske produkte kada se uzgajaju u mješovitoj kulturi. Spojevi proizvedeni od strane jednog soja mogu biti korišteni od strane drugih prisutnih kvasaca. Na taj način se mogu dogoditi interakcije kvasca i dijeljenje metabolita (Ciani i sur., 2016). Ova opservacija pruža objašnjenje zašto se modulacija okusa vina u mješovitoj kulturi ne može replicirati miješanjem vina zajedno, jer promjena nastaje iz kompleksnih interakcija, koje su još uvijek uglavnom nerazjašnjenje, između sojeva uključenih u mješovite starter kulture (Ciani i sur., 2016; King i sur., 2008; Howell i sur., 2006). Stupanj natjecanja svakog soja ovisi o brojnim abiotskim (pH, temperatura, etanol, osmotski tlak, dušik, molekularni sumpor-dioksid itd.) i biotskim faktorima (mikroorganizmi, "killer

faktori", sorta grožđa itd.), koji određuju sposobnost jednog soja da nadmaši drugi (Ciani i sur., 2016).

Kontrolirane fermentacije s više starter kultura karakteriziraju kompleksnu interakciju između *ne-Saccharomyces* i *Saccharomyces* sojeva (Ciani i sur., 2016; Ciani i Comitini, 2015; Ciani i sur., 2010) rezultirajući poboljšanjem kemijskog i senzorskog profila vina (Carpena i sur., 2020b; Zhang i sur., 2020; Canonico i sur., 2018). *Ne-Saccharomyces* kvasci potiču oslobađanje arome putem izlučivanja proteina, uglavnom enzima i sinteze novih sekundarnih metabolita te doprinose stabilnosti boje vina. Ovi kvasci se u vinifikaciji koriste kao dio mješovitih ili sekvencijalnih kultura u kombinaciji sa *S. cerevisiae* (Carpena i sur., 2020b; Van Wyk i sur., 2019; Belda i sur., 2017b; Blanco-Padilla i sur., 2014) . Odabrana strategija inokulacije može modulirati profil arome vina u slučaju mješovitih fermentacija. Ako se odabere istovremena inokulacija, *ne-Saccharomyces* kvasac i *S. cerevisiae* dodaju se zajedno, dok se u slučaju sekvencijalne inokulacije *ne-Saccharomyces* starter inokulira prije *S. cerevisiae* (Shi i sur., 2019; Maturano i sur., 2019; Carpena i sur., 2020b).

2.2. AROMATSKI SPOJEVI U VINU

Aroma vina jedna je od glavnih karakteristika koja definira razlike među velikim brojem proizvoda i stilova vina proizvedenih diljem svijeta. Aroma vina je osjetilna percepcija koja varira ovisno o osobi, kontekstu iskustva potrošača i kemijskom sastavu proizvoda (Capece i Romano, 2019). Utjecaj kvasaca na aromu vina uglavnom je određen nizom hlapljivih tvari (npr. viši alkoholi, kiseline, esteri, karbonili, tioli) koje se proizvode metaboliziranjem tvari prisutnih u grožđanom soku. Ove reakcije variraju ovisno o vrsti i sojevima kvasaca koji sudjeluju u fermentaciji (Capece i Romano, 2019; Garcia i sur., 2002; Henick-Kling i sur., 1998; Lema i sur., 1996). Međutim, najčešća klasifikacija aromu vina dijeli na tri glavne kategorije prema njihovom porijeklu: (i) sortna aroma (spojevi koji potječu direktno iz grožđa), (ii) fermentacijska aroma (spojevi koji proizlaze iz metabolizma kvasaca i bakterija tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije) i (iii) aroma starenja (spojevi koji nastaju kao rezultat fizikalno-kemijskih reakcija tijekom dozrijevanja i starenja u hrastovim bačvama i bocama) (Romano i sur., 2022). Sortna aroma ovisi o samoj sorti vinove loze, a količina spojeva prisutnih u grožđu je usko povezana s okolišnim i pedoklimatskim uvjetima. Spojevi koji su uključeni u sortnu aromu su uglavnom terpeni, norizoprenoidi i metoksipirazini (Romano i sur., 2022; Perestrelo i sur., 2020; Capece i Romano, 2019), a doprinose cvjetnom i voćnom karakteru, dok metoksipirazini

vegetativnoj noti (Moreno i Peinado, 2012). Najvažniji monoterpeni u grožđu su linalol, geraniol, nerol i citronelol, a nastaju iz prekursora mevalonata (Styger i sur., 2011; Iriti i Faoro, 2006). Spojevi koji izravno doprinose fermentacijskim aromama vina su viši alkoholi, hlapljive masne kiseline te na kraju, karbonilni i sumporni spojevi, a vrsta i količina sintetiziranih hlapljivih tvari ovisi o mnogim čimbenicima, poput temperaturnih uvjeta i koncentracije dušika u moštu (Romano i sur., 2022; Carpena i sur., 2020a). Viši alkoholi se formiraju iz aminokiselina kao i pripadajući esteri i hlapljive kiseline (Styger i sur., 2011; Ehrlich, 1904). Tako primjerice iz fenilanalina nastaje 2-fenil-acetat koji daje karakterističnu cvjetnu aromu te aromu po medu i ruži (Styger i sur., 2011; Lambrechts i Pretorius, 2000). Hlapljivi esteri čine jednu od najvažnijih skupina aromatskih spojeva i uvelike su odgovorni za voćne arome u vinu (Styger i sur., 2011; Lilly i sur., 2000). Sumporni spojevi koji sadrže tiolne skupine (merkaptani) općenito se povezuju s mirisnim nedostacima, ali mogu doprinostiti voćnim aromama poput grejpa, kivija i guave (sortni tioli) (Moreno i Peinado, 2012), dok karbonilni spojevi u određenim koncentracijama mogu doprinijeti vegetalnom, ali i voćnom karakteru (Capece i Romano, 2019). Nadalje, proces starenja se općenito sastoji od dvije faze: dozrijevanje (oksidativno starenje) i starenje u boci (reduktivno starenje). Oksidativno starenje obično se odvija u hrastovim bačvama, pri čemu hlapljivi spojevi ekstrahirani iz drva imaju važnu ulogu u formiranju finalnog aromatskog profila vina. Među njima su najznačajniji laktoni (povezani s notama kokosa) i vanilin (hrastove i vanilinske arome). Starenje u boci uglavnom je povezano s nakupljanjem reduktivnih spojeva poput tiola (2-furanmetantiola), kao i sulfida (dimetil sulfid) (Romano i sur., 2022; Carpena i sur., 2020a).

2.2.1. Utjecaj *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca na spojeve arome i senzorski profil vina

Iako je broj hlapljivih spojeva u vinu vrlo velik (nekoliko tisuća), smatra se da oko 70 različitih kemijskih spojeva doprinosi aromatskim svojstvima vina (Denat i sur., 2021; De La Fuente Blanco i sur., 2020). Kvantitativno, najbrojniji aromatski spojevi u vinu su nusproizvodi alkoholne fermentacije, posebno viši alkoholi, etilni i acetatni esteri, neki karbonilni spojevi i hlapljive masne kiseline (Denat i sur., 2021). Osim toga, značajna grupa aromatskih spojeva i prekursora aroma podložna je nizu sporih kemijskih reakcija poput kiselinske hidrolize, esterifikacije ili intramolekularnih pregradnji koje znatno utječu na finalni aromatski profil vina (Denat i sur., 2021; Winterhalter i Gök, 2013).

U kategoriji alifatskih masnih kiselina, osim dominantne hlapljive, tj. octene kiseline, glavni predstavnici su srednjelančane masne kiseline kapronska, kaprilna i dekanska kiselina. Osim toga, u grupi nezasićenih masnih kiselina treba spomenuti 9-decensku kiselinu koja posjeduje konzervirajuća svojstva i značajna je s aspekta arome kada se pretvori u etilni ester (Carpena i sur., 2020b; Schreier i Jennings, 1979). Kvasci su glavni proizvođači masnih kiselina koje su zapravo prekursori za sintezu etilnih estera (Carpena i sur., 2020b; Jeromel i sur., 2019; Padilla i sur., 2016). Poželjne koncentracije masnih kiselina su 200-700 mg/L, a u višim koncentracijama ih karakterizira užegla, ustajala i sirasta aroma (Carpena i sur., 2020b; Jeromel i sur., 2019; Padilla i sur., 2016; Schreier i Jennings, 1979). Među kvascima, *S. cerevisiae* je uglavnom sposoban sintetizirati veće koncentracije kapronske i kaprilne kiseline, ali i pentanske, dekanske i 3-metilmaslačne kiseline (Carpena i sur., 2020b; Jeromel i sur., 2019; Padilla i sur., 2016). Nadalje, *S. cerevisiae* sintetizira manje koncentracije viših alkohola i ima manje izvanstaničnih enzima koji su uključeni u hidrolizu strukturnih komponenti u usporedbi s drugim vrstama ne-*Saccharomyces* kvasaca. Međutim, ovaj kvasac sintetizira veće koncentracije estera i acetaldehida (Carpena i sur., 2020b; Capozzi i sur., 2015). Acetaldehid je važan aromatski spoj, a pripada skupini karbonilnih spojeva, te čini više od 90 % ukupnih aldehida u vinu (Styger i sur., 2011; Nykänen, 1986). Prekursor je za sintezu acetata, acetoina i etanola (Styger i sur., 2011; Lambrechts i Pretorius, 2000). Pri niskim koncentracijama doprinosi ugodnoj voćnoj aromi vina, ali pri većim koncentracijama ima oštar iritantni miris koji podsjeća na zelenu travu ili trule jabuke (Styger i sur., 2011; Liu i Pilone, 2000). Također, izuzetno je reaktivan i lako se veže za proteine ili pojedinačne aminokiseline što rezultira širokim rasponom spojeva koji različito doprinose senzorskim svojstvima vina (Styger i sur., 2011; Lachenmeier i Sohnius, 2008). Nadalje, važan aromatski spoj koji se formira iz acetaldehida je diacetil. Diacetil se uglavnom formira tijekom jabučno-mliječne fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline, ali i kvasci također mogu sintetizirati ovaj spoj tijekom alkoholne fermentacije. Međutim, većina diacetila dalje se metabolizira u acetoin i 2,3-butandiol (Styger i sur., 2011; Bartowsky i Henschke, 2004). Pri niskim koncentracijama (senzorski prag osjetljivosti iznosi 8 mg/L), diacetil doprinosi orašastoj i tostiranoj aromi vina, doki pri visokim koncentracijama ima karakterističnu aromu koja je povezana s mliječnim karakterom (Styger i sur., 2011; Bartowsky i Henschke, 2004; Romano i Suzzi, 1996). Volumni udio etanola također utječe na senzorske karakteristike, prvenstveno na voćne, cvjetne ili kisele arome vinu, ovisno o koncentraciji (Carpena i sur., 2020b; Styger i sur., 2011).

Ne-*Saccharomyces* kvasci su se uvijek smatrali kontaminantima u proizvodnji vina, stoga su se u prošlosti rutinski primjenjivali postupci za njihovo uklanjanje, poput pasterizacije mošta, dodavanja sulfita i dezinfekcije opreme i prostorija za obradu. Negativan stav prema ne-*Saccharomyces* kvascima se zadnjih desetljeća mijenja budući da imaju važnu ulogu u moduliranju senzorskih svojstava konačnog proizvoda. Brojna istraživanja proučavaju ponašanje nekih ne-*Saccharomyces* kvasaca tijekom alkoholne fermentacije, kao i njihov utjecaj na kemijska i senzorska svojstva, te sveukupnu kvalitetu vina (Maicas, 2020). U ranim fazama alkoholne fermentacije, ne-*Saccharomyces* kvasci hidroliziraju glikozidne veze nehlapljivih glikozida bez mirisa, što rezultira oslobađanjem aromatičnih komponenata poput terpenola, norizoprenoida i benzoinskih alkohola zbog β -glukozidazne aktivnosti (Romano i sur., 2022; Contreras i sur., 2015). Zbog tih prednosti, neki ne-*Saccharomyces* kvasci koji pripadaju vrstama *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Starmerella bacillaris* i *Pichia kluyveri* prepoznati su od strane vodećih proizvođača i njihove starter kulture su dostupne na tržištu (Romano i sur., 2022; Roudil i sur., 2020; Benito i sur., 2019), a već se i koriste na industrijskoj razini s ciljem poboljšanja aromatskog profila vina (Romano i sur., 2022; Carpena i sur., 2020b). Glavna razlika u načinu na koji kvasci proizvode aromatske spojeve tijekom fermentacije proizlazi iz proizvodnje enzima. Neki od tih enzima izlučuju se izvan stanične membrane kako bi razgradili kompleksne spojeve i polimere u svojoj okolini. To pruža energiju i hranjive tvari za kvasac, međutim, različiti kvasci proizvode različite količine ovih enzima. Neki od tih enzima izravno su odgovorni za razgradnju šećera u etanol i stoga će odrediti koliko brzo će se odvijati fermentacija (Borren i Tian, 2021; Romano i sur., 2019). Drugi enzimi kataliziraju stvaranje sortnih i fermentacijskih aromatskih spojeva u vinima. Zbog raznolikosti autohtonih ne-*Saccharomyces* kvasaca, tijekom spontane fermentacije proizvodi se mnogo širi spektar izvanstaničnih enzima nego prilikom inokulacije čistom kulturom *S. cerevisiae* (Borren i Tian, 2021; Jolly i sur., 2014). Stoga se može očekivati da će se u spontanoj fermentaciji stvarati širi spektar hlapljivih spojeva. Moderna tehnika sekvenciranja gena također je pokazala da neki ne-*Saccharomyces* kvasci kodiraju veću količinu izvanstaničnih enzima od *S. cerevisiae* (Borren i Tian, 2020; Lambrechts i Pretorius, 2000). Osim toga, ne-*Saccharomyces* kvasci su pokazali i druge karakteristike od enološkog značaja, kao što su antimikrobna aktivnost, bioprotektivno djelovanje i promjene u proizvodnji spojeva poput etanola, glicerola ili mliječne kiseline (Castrillo i Blanco, 2023; Zhang i sur., 2022; Agarbati i sur., 2020; Benito i sur., 2018a). Prethodno u tekstu su istaknuti

najznačajniji ne-*Saccharomyces* kvasci koji su već dostupni na tržištu kao starter kulture, a u nastavku su opisane najčešće korištene vrste koje su direktno vezane uz ovo istraživanje.

Pichia kluyveri je kvasac koji oslobađa prekursore arome iz mošta, s potencijalnim poboljšanjem arome i okusa vina. Mješovita fermentacija s *P. kluyveri* pokazuje povećanje koncentracije sortnih tiola, posebno 3-sulfanilheksil-acetata (3SHA), 2-feniletalacetata i etil oktanata u proizvedenim vinima (Romano i sur., 2022; Benito i sur., 2019; Jolly i sur., 2014). Tioli su skupina spojeva u kojima je kisik zamijenjen sumporom u hidroksilnoj skupini. Ova skupina spojeva vrlo je karakteristična za aromu vina, i uglavnom ovisi o metabolizmu kvasca. Najznačajniji tioli koji su identificirani u vinu su 3-sulfanilheksan-1-ol (3SH), 3-sulfanilheksilacetat (3SHA) i 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on (4MSP). Ovi spojevi, osim što su karakteristični, vrlo su zanimljivi za proučavanje jer imaju vrlo niski senzorski prag osjetljivosti, odnosno za 4MSP 3 ng/L, za 3SH 50-60 ng/L, a za 3SHA, svega 2-4 ng/L. Aroma S-3SH i S-3SHA oblika opisana je kao marakuja, dok je R-3SH oblik opisan kao grejp i R-3SHA kao božikovina (Tominaga i sur., 1996; Mina i Tsaltas, 2017). Osim utjecaja na tiole, utvrđen je porast ukupne koncentracije terpena djelovanjem kvasca *P. kluyveri*, što dodatno doprinosi povećanju sortnih karakteristika vina (Romano i sur., 2022; Benito i sur., 2019; Jolly i sur., 2014).

Posljednjih nekoliko godina se sve više ističe potencijal kvasca *Metschnikowia pulcherrima* u modulaciji senzorskog profila vina (Romano i sur., 2022; Varela i Borneman, 2017) zbog nekih enoloških karakteristika, kao što su: visoka aktivnost β -glukozidaze, sposobnost smanjenja hlapljive kiselosti i povećanje proizvodnje spojeva koji utječu na organoleptičku kvalitetu vina, poput srednjelančanih masnih kiselina, viših alkohola, estera (poglavito etil oktanata), terpena (Romano i sur., 2022; Ruiz i sur., 2018) i glicerola, kada se koristi u mješovitim fermentacijama. Ovaj kvasac karakterizira sinteza izvanstanične α -arabinofuranozidaze, koja utječe na oslobađanje poželjnih sortnih aroma, poput terpena i tiola. Osim toga, dokazano je kako *M. pulcherrima* oslobađa sortne tirole, poput 4MSP, u koncentracijama većim od onih koje proizvodi *S. cerevisiae* zbog aktivnosti cistationin- β -liaze (Romano i sur., 2022; Benito i sur., 2019). Također može utjecati na sintezu većih koncentracija metil butil-, metil propil- i feniletal estera (Romano i sur., 2022; Petruzzi i sur., 2017; Jolly i sur., 2014). Osim toga, ova vrsta može imati antagonistički učinak prema nekim kvascima, uključujući *S. cerevisiae*, što u konačnici rezultira odgodom fermentacije. Taj je učinak povezan s "killer faktorom" kao posljedicom proizvodnje pigmenta „*pulcherrimin*“ od strane *M.*

pulcherrima (Romano i sur., 2022; Petruzzi i sur., 2017). Ovaj kvasac je nedavno i predložen kao učinkoviti način smanjenja udjela etanola u vinu. Koristi se u mješovitim fermentacijama, u uvjetima sekvencijalne i istovremene inokulacije, postižući smanjenje etanola za otprilike 1,6 % (v/v) (Romano i sur., 2022; Canonico i sur., 2019; Benito i sur., 2019; Varela i Borneman, 2017).

Torulaspota delbrueckii je jedna od najviše proučavanih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina, jer je kvasac sa zanimljivim metaboličkim svojstvima i već dugi niz godina na tržištu postoji kao suhi aktivni kvasac (Romano i sur., 2022; Benito i sur., 2019). Doprinosi sveukupnoj kvaliteti vina jer obično proizvodi niske koncentracije octene kiseline, jednog od glavnih parametara kvalitete vina (Romano i sur., 2022; Bely i sur., 2008). Nadalje, fermentacija ovim kvascem rezultira i povećanjem koncentracije glicerola za 0,2 do 0,9 g/L (Romano i sur., 2022; González-Royo i sur., 2015; Medina-Trujillo i sur., 2017; Puertas i sur., 2017) kao i sintezom visokih koncentracija diacetila, etil laktata i etil-acetata u usporedbi s fermentacijom koju provodi samo kvasac *S. cerevisiae* (Romano i sur., 2022; Ivit i sur., 2020). Osim toga, u vinima dobivenim mješovitom fermentacijom (*T. delbrueckii* i *S. cerevisiae*), utvrđena je visoka koncentracija acetatnih estera, srednjelančanih masnih kiselina, sortnih tiola, te monoterpena α -terpineola i linalola. Nadalje, *T. delbrueckii* može proizvesti veće koncentracije voćnih estera i terpena te manje koncentracije viših alkohola kada se koristi u sekvencijalnim fermentacijama s kvascem *S. cerevisiae*, pri čemu se zadržava i sortni karakter vina (Romano i sur., 2022; Belda i sur., 2017a; Renault i sur., 2016; Azzolini i sur., 2015). Neki autori navode da je kvasac *T. delbrueckii* karakteriziran visokim koncentracijama izvanstaničnih enzima, poput β -glukozidaze, koji značajno utječu na senzorski profil vina, modulirajući koncentracije norizoprenoidea, terpenola i laktona kao rezultat hidrolize njihovih prekursora (Romano i sur., 2022; Petruzzi i sur., 2017; Renault i sur., 2015). Upotreba kvasca *T. delbrueckii* također može smanjiti konačnu koncentraciju etanola u vinima za otprilike 1 % (v/v) (Romano i sur., 2022; Benito i sur., 2019; Petruzzi i sur., 2017). Osim navedenog, ovaj kvasac proizvodi jantarnu kiselinu te posjeduje sposobnost otpuštanja manoproteina i polisaharida u vino, što povećava sveukupnu kvalitetu vina utjecajem na kompleksnost okusa (Romano i sur., 2022; Belda i sur., 2016). Korištenje *T. delbrueckii* je jednostavno u usporedbi s drugim ne-*Saccharomyces* kvascima zbog njegove relativno visoke fermentacijske moći i sposobnosti podnošenja koncentracije etanola čak do 9-10 % (v/v) (Romano i sur., 2022).

2.3. POŠIP

Pošip je autohtona sorta grožđa koja se najviše uzgaja na otoku Korčuli, s manjim nasadima na otocima Mljetu i Lastovu. Ova sorta bijelog grožđa ima iznimno dugu povijest i cijeni se kao jedna od najstarijih i najkvalitetnijih autohtonih sorti bijelog grožđa u Hrvatskoj. Već 1967. godine Pošip je dobio status zaštićenog i vrhunskog vina. Pošip je karakterističan po dobrim prinosima i visokoj kvaliteti vina kojeg opisuju izražene sortne karakteristike. Ima iznimnu sposobnost nakupljanja prirodnog šećera, pa se vjeruje da je u prošlosti, uz neke druge sorte, korišten i za proizvodnju desertnih vina poput Prošeka. Pravilnim odabirom vremena berbe može se postići idealna ravnoteža između prirodne slatkoće i svježine, koju održava umjereno povišena i stabilna kiselost. Vino proizvedeno od grožđa Pošip ima zlatno-svijetložutu boju i kristalnu bistroću, visok udio alkohola (12-13 %, v/v) i izražene sortne arome koje se ističu punoćom okusa. Umjereno povišena i stalna kiselost čini ovo vino svježim i pogodnim za duže čuvanje i arhiviranje. „*Bouquet*“ vina je kompleksan i elegantan, s notama suhih marelica, suhih smokvi, borove smole. U ustima je vino suho, toplo, sočno i puno okusa. Osvježavajuća kiselost doprinosi pikantnom, dugom završetku s nagovještajima tostiranih badema (Ivandija, 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mošt

U svrhu izrade diplomskog rada, korišten je mošt sorte Pošip. Grožđe je ubrano u fazi tehnološke zrelosti, tijekom berbe 2022. godine, u mjestu Smokvica, vinogorje Korčula. Nakon primarne prerade (ruljanje i muljanje) provedeno je prešanje te flotacija s ciljem bistrenja mošta. Nakon provedenog postupka bistrenja, mošt je sulfitiran i koncentracija ukupnog SO₂ je korigirana na 60 mg/L. Mošt je potom dopremljen u laboratorij, nakon čega je zamrznut na -20 °C do trenutka provođenja ekperimenta. Postupak odmrzavanja mošta proveden je kroz 24 h na sobnoj temperaturi.

3.1.2. Kvasci i hrana za kvasce

U cilju provođenja alkoholne fermentacije korišteni su komercijalno dostupni kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore® VL3, Laffort, Bordeaux Cedex, Francuska), *Torulaspora delbrueckii* (Zymaflore® Alpha^{TD}, Laffort, Bordeaux Cedex, Francuska) *Pichia kluyveri* (FrootZen®, Viniflora, Hoersholm, Danska), te *Metschnikowia pulcherrima* (Zymaflore® KHIO^{MP}, Laffort, Bordeaux Cedex, Francuska). Svaki proizvođač uz svoje proizvode predlaže i upute za korištenje, a uz kvasce je korištena i hrana za kvasce Thiazote® (Laffort, Bordeaux Cedex, Francuska).

3.1.2.1. Karakteristike kvasca Zymaflore® VL3

Zymaflore® VL3 je selekcionirani soj kvasca *S. cerevisiae* koji se koristi u proizvodnji bijelih elegantnih vina s potencijalnom koncentracijom alkohola i do 13 vol %. To je soj kojim se postiže visok sadržaj sortnih aroma tiolnog tipa koje se opisuju kao šimšir, brnistra, agrumi, marakuja te povećavaju osjet vina u ustima. Ovi kvasci najbrže fermentiraju pri 15 - 21 °C. Ima visoku potrebu za dušikom tijekom alkoholne fermentacije pa se preporuča u obliku hrane za kvasce dodati nutrijente kako bi kvasci sa sigurnošću mogli fermentaciju provesti do kraja. Stvaraju malu količinu hlapljivih kiselina i H₂S te mogu tolerirati alkohol do 14,5 % vol. (Laffort, 2023a)

3.1.2.2. Karakteristike kvasca *Zymaflore*® *Alpha*^{TD}

Prema uputama proizvođača, kada se koriste u sekvencijalnoj inokulaciji sa sojem *S. cerevisiae* ovi kvasci su prikladni za proizvodnju vina punog tijela. U kombinaciji sa *S. cerevisiae* stvara se složeni ekosustav mošta te se osigurava potpuno alkoholno vrenje. Ovi kvasci podnose do 10 vol % alkohola, imaju širok spektar tolerancije temperature fermentacije 12 – 26 °C. Ne posjeduju enzim cinamat dekarboksilazu koji je odgovoran za formiranje vinilfenola koji mogu prouzročiti negativne mirise u vinu. Karakterizira ih i niska proizvodnja hlapljivih kiselina, hlapljivih fenola i H₂S, a imaju dobru sposobnost oslobađanja sortnih aroma tiolnog tipa (grejp, tropsko voće) u kombinaciji sa *S. cerevisiae* (Laffort, 2023b).

3.1.2.3. Karakteristike kvasca *FrootZen* ®

Prema proizvođaču, ovaj kvasac se koristi u sekvencijalnoj inokulaciji, gdje se prvo inokulira *FrootZen*, a dva dana kasnije kada temperatura bude 18 – 19 °C, inokulira se drugi kvasac (obično *S. cerevisiae*), budući da *P. kluyveri* ne tolerira više od 4 do 5 vol %. Kvasac je posebno prikladan za bijela i i rosé vina. Njegovom upotrebom pojačavaju se voćne arome, budući da se koriste prirodno prisutni prekursori koje kvasci tijekom alkoholne fermentacije pretvaraju u hlapljive spojeve, npr. sorte trole (Chr Hansen, 2023).

3.1.2.4. Karakteristike kvasca *Zymaflore* ® *KHIO*^{MP}

Zymaflore ® *KHIO*^{MP} se koristi za proizvodnju bijelih i rosé vina. Sposoban je razmnožavati se pri niskim temperaturama. Ima veliku sposobnost konzumiranja otopljenog kisika pa tako štiti mošt od oksidacije, a i ograničava dominaciju potencijalno nepoželjnih autohotnih mikroorganizama. Kompatibilan je sa sojem *Saccharomyces cerevisiae* (Laffort, 2023c)

3.1.2.5. Karakteristike hrane za kvasce *Thiazote*® *Range*

Hrana za kvasce je jedna od najbitnijih elemenata za pravilan tok fermentacije, a čine je nutrijenti izolirani ih autoliziranih stanica kvasca. Kombinacija amonijevih soli i hidroklorat tiamina (vitamina B1) sadržanih u ovoj hrani omogućuje umnožavanje populacije kvasca, ubrzanje fermentacije te smanjenje udjela ketonske kiseline (uloga tiamina) koja može vezati SO₂. Može se koristiti na svim vrstama mošta. Hrana se dodaje u obliku sitnih granula odmah u mošt bez prethodne rehidracije, a preporučena doza je 10 – 50 g h/L (Laffort, 2023d).

3.1.3. Kemikalije

Za analitičke svrhe korištene su sljedeće kemikalije:

- Sumporna kiselina 1/3 (941) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Natrijev hidroksid 2N (908) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Sumporna kiselina 1/10 (932) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Natrijev klorid, čistoće > 99,5 % (Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska)
- *n*-amil alkohol, čistoće > 99 % (interni standard) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Jodid/jodat N/64 (921) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- 0,1 M NaOH (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska)

3.1.4. Oprema i uređaji

- Uređaj za određivanje slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida, Sulfilyser, (Laboratories Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Plinski kromatograf, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert* Mass Selective Detector (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Moštomjer po Baboou (T-20 °C) (MAR-TRADE d.o.o., Novi Marof, Hrvatska)
- Enzimatski kit (Megazyme, Wicklow, Irska)
- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g) (Metler Toledo, Columbus, SAD)
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971 (Pierce, Rockford, IL, SAD)
- UV/VIS spektrofotometar Specord 50 Plus (AnalytikJena, Jena, Njemačka)
- Stakleni vinifikatori od 5 L
- Laboratorijske čaše, staklene pipete, menzure od 100 mL
- Magnet za miješanje
- SPME vlakno, 100 μ m PDMS, 23 Ga (Supelco, Bellefonte, SAD)
- HSS bočice od 20 mL (Restek, Bellefonte, SAD)
- Silikonski čepovi za HSS bočice (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- Kolona za kromatografiju BP20 (50 m x 220 μ m x 0,25 μ m) (SGE Analytical Science, Victoria, Australija)

3.2. METODE

3.2.1. Metoda proizvodnje bijelog vina sorte Pošip

3.2.1.1. Priprema kvasaca i inokulacija mošta

Mošt je razdijeljen u osam vinifikatora (po dva vinifikatora za svaki odabrani kvasac), pri čemu je u svaki vinifikator dodano 3 L mošta. Za inokulaciju su korištene maksimalne preporučene doze kvasaca, odnosno za *S. cerevisiae* (varijanta Sc) je iznosila 30 g/L, za *T. delbrueckii* (varijanta Td) 30 g/L, *P. kluyveri* (varijanta Pk) 10 g/L te za *M. pulcherrima* (varijanta Mp) 5 g/L. Kvasci su najprije rehidratirani u 10 puta većem volumenu vode (osim *P. kluyveri* koja se nalazi u tekućem obliku), temperature 35-40 °C. Nakon 20 min, dodan je mošt u količini dodane vode, s ciljem prilagodbe kvasaca na niže temperature mošta. Prije same inokulacije rehidratiranih kvasaca vodilo se računa da razlika u temperaturi mošta u odnosu na temperaturu kvasaca i vode ne bude veća od 10 °C. U konačnici, pripremljeni kvasci su dodani u vinifikatore s moštom. Nakon inokulacije kvasaca, u mošt je dodana i hrana za kvasce u dozi 20 g/hL. U mošt su prvo inokulirani ne-*Saccharomyces* kvasci, a nakon 48h inokuliran je i *S.cerevisiae*.

Tijek alkoholne fermentacije se počeo pratiti 24 h nakon dodatka kvasaca u mošt, a pratili su se parametri temperature i koncentracije šećera. Koncentracija šećera je određena je korištenjem moštomjera po Baboo-u koji je baždaren na 20 °C. Pri kraju alkoholne fermentacije, kad je koncentracija šećera pala ispod 4 °Baboo, reducirajući šećeri su određeni primjenom enzimatskog kita (Megazyme, Wicklow, Irska). Po završetku alkoholne fermentacije je provedena korekcija slobodnog SO₂ na 30 mg/L, vino je pretočeno s taloga te je provedena stabilizacija vina pri 4 °C.

3.2.2. Praćenje dinamike alkoholne fermentacije

3.2.2.1. Određivanje topljive suhe tvari areometrom (moštomjerom)

Princip metode:

Metoda određivanja koncentracije šećera u moštu temelji se na činjenici da 90 – 94 % suhe tvari mošta čine ugljikohidrati te na principu Arhimedova zakona prema kojemu je sila uzgona funkcija gustoće tekućine. Zbog ovisnosti o sili uzgona dolazi do različitog uranjanja areometra u tekućinu (mošt), a na njemu se nalazi skala koja izražava količinu šećera u moštu. Skale koje susrećemo u vinarstvu su različite i ne daju količinu šećera u g/L već u stupnjevima koje se obično zovu po konstruktoru skale, npr. Klosterneuburger skala po Babo-u-°Ba (°Kl); Oechsle-ovi stupnjevi - °Oe.

Babo-ov moštomjer izražava sadržaj šećera u masenim postotcima (w/w) tj. stavlja u odnos masu otopljene tvari (šećera) sa masom otopine (mošta) x 100, prema jednadžbi

$$^{\circ}\text{Ba } (^{\circ}\text{Kl}) = \text{koliko grama šećera ima u 100 g mošta}$$

Najvažnije je napomenuti da gustoća mošta ovisi o njegovoj temperaturi. Svaki moštomjer je baždaren na određenoj temperaturi i u slučaju odstupanja od te temperature mora se izvršiti korekcija očitane vrijednosti. Iz tog razloga u sastav moštomjera ulazi i termometar. Za preračunavanja očitanih stupnjeva u masenu koncentraciju šećera u g/L koriste se Oechslove ili tablice Salleronove tablice iz kojih se direktno očita odgovarajuća vrijednost. Pomoću Salleronovih tablica procjenjuje se potencijalna koncentracija alkohola u budućem vinu iz očitane količine šećera (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2022).

Postupak određivanja:

U menzuru od 100 mL uliti mošt do vrha te uroniti moštomjer, očitati vrijednosti šećera i temperature.

3.2.2.2. *Određivanje optičke gustoće (OD₆₀₀)*

Princip metode:

Metoda se bazira na činjenici da se povećanjem kvašćeve biomase, odnosno povećanjem broja stanica kvasca, povećava i mutnoća samog mošta, što rezultira i višim očitanim vrijednostima OD₆₀₀. Mjerenje se provodi pomoću spektrofotometra, prema metodi opisanoj u istraživanju Agnolucci i sur. (2009).

Postupak određivanja:

Fermentirajući mošt prenijeti u kivetu od 4 mL te spektrofotometrom izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 640 nm, uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Područje linearosti spektrofotometra je između 0,2-1,0, te ukoliko je očitana vrijednost apsorbancije iznad tog područja, uzorak je nužno razrijediti i ponoviti mjerenje.

3.2.3. *Određivanje arome vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)*

Princip metode:

U kromatografsku kolonu se strujom inertnog plina (plina nosioca) uvodi određena količina ispitivane smjese. Sastojci smjese se u koloni razdjeljuju između adsorbensa (nepokretna faza)

i plina nosioca (pokretna faza). Po izlasku iz kolone, prisutnost odijeljenih sastojaka smjese u plinu nosiocu utvrđuje se u detektoru, uređaju koji u obliku kromatograma registrira količinu eluiranog sastojka kao funkciju vremena.

Postupak provedbe i uvjeti GC/MS analize

U tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka (vina), zatim mikropipetom dodati interni standard *n*-amil alkohol u koncentraciji od 20 mg/L te tikvicu nadopuniti uzorkom do oznake. Nakon toga otpipetirati 10 mL pripremljenog uzorka u HSS bočicu u koju je prethodno potrebno odvagati 2g NaCl i stavljen magnet. Bočicu zatvoriti te kroz čep unijeti SPME vlakno te provesti mikroekstrakciju na čvrstoj fazi pri 40 °C, kroz 30 min, uz konstantno miješanje magnetskom mješalicom. Nakon 30 min vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se vrši desorpcija kroz 5 minuta.

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

- temperatura injektora: 250 °C
- temperatura detektora: 250 °C
- temperaturni program (60 – 10 min) : 35 °C, 5 min → 60 °C, 4,4 °C/min → 65°C, 0,5 °C/min → 140 °C, 5 °C/min → 250 °C , 20 °C/min, 5 min
- plin nosioc: He
- protok plina nosioca: 1,9 mL/min (p=1, 045 bar)
- ukupni protok: 20,4 mL/min
- „splitless mode“ injektiranja

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva arome provodi se kompjuterskom obradom podataka dobivenih pomoću plinskog kromatografa s masenim spektrometrom, odnosno dobivenog kromatograma, u programu Enhanced Chemstation (Agilent Technologies). Identifikacija spojeva arome provodi se usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja već poznatih tvari iz smjese hlapljivih spojeva (interni standardi), odnosno retencijskih vremena. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvije paralele te je izračunata standardna devijacija za svaki detektirani spoj u vinu, a rezultati su izraženi u mg/L.

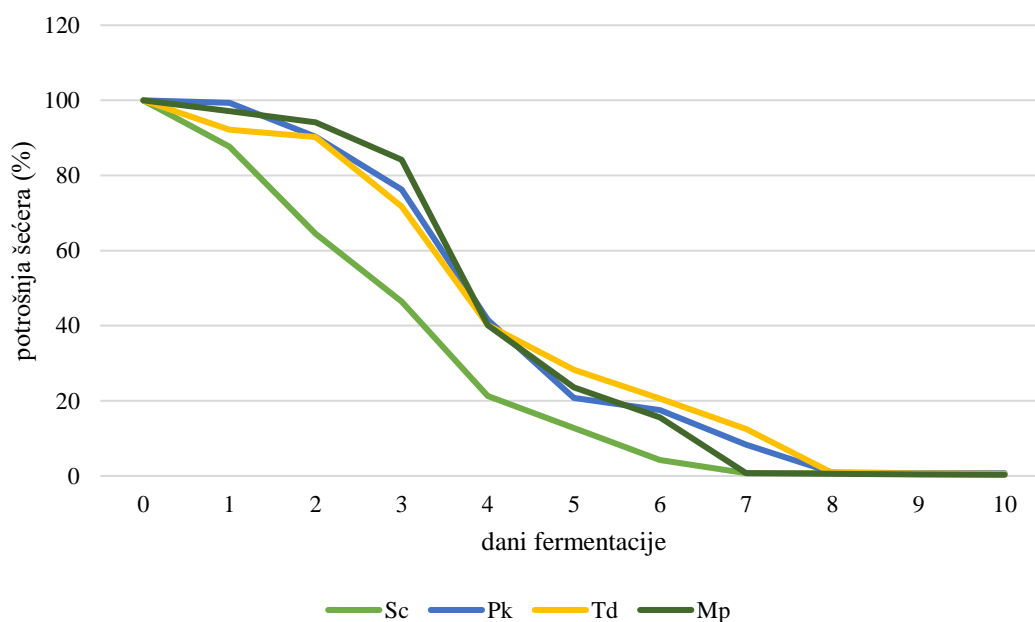
3.2.4. Obrada podataka

Za osnovnu obradu rezultata i prikaz dinamike alkoholne fermentacije korišten je program Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD). Nadalje, jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, engl. *One-way Analysis of Variance*) je provedena primjenom programa Statistica V.10 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD) s ciljem utvrđivanja značajnih razlika između srednjih vrijednosti spojeva arome. Tukey HSD test je proveden nakon što su utvrđene statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između uzoraka. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost četiri analitička mjerenja sa standardnom devijacijom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

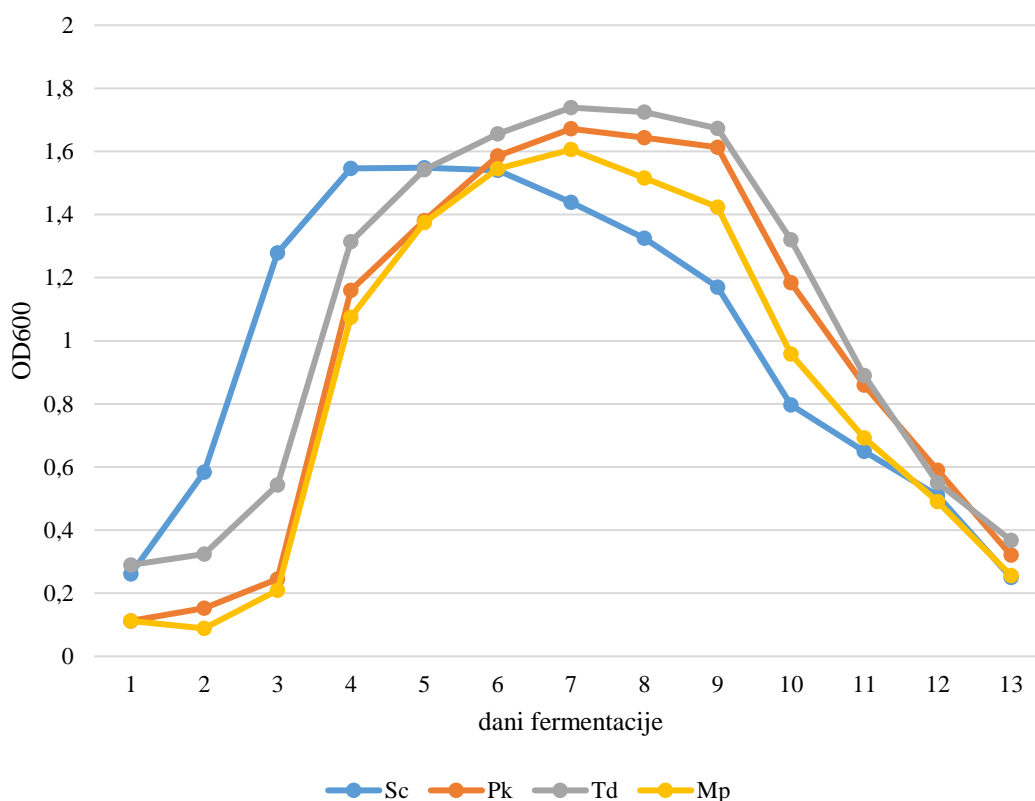
4.1. DINAMIKA ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Dinamika fermentacije prikazana je na slici 1 u obliku prosječne potrošnje šećera (%). Svi uzorci uspjeli su završiti alkoholnu fermentaciju do 10. dana. Kako se i očekivalo, uzorak sa *S. cerevisiae* počeo je najranije fermentirati i pokazao je veću brzinu fermentacije od vinifikacije uzoraka s ne-*Saccharomyces* kvascima. Fermentacijska sposobnost ne-*Saccharomyces* uzoraka varirala je među vrstama, pri čemu se varijanta s *T. delbrueckii* ističe po višoj stopi fermentacije u prva 4 dana za razliku od ostala dva uzoraka. Nakon spomenutog četverodnevno razdoblja, druga dva uzorka (*M. pulcherrima* i *P. kluyveri*) karakterizirala je veća brzina fermentacije u usporedbi s *T. delbureckii*, no s nižim brzinama u odnosu na *S. cerevisiae*. Ne-*Saccharomyces* uzorci vina pokazali su slabiju fermentativnu sposobnost, budući da nisu sposobni podnijeti visoke koncentracije etanola. Slaba ili sporija fermentativna aktivnost ne-*Saccharomyces* kvasaca potvrdila je potrebu dodavanja soja *S. cerevisiae* kako bi se uspješno dovršila fermentacija.



Slika 1. Prosječna potrošnja šećera (%) tijekom alkoholne fermentacije. SC- fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; PK- sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; TD- sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te MP- sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*.

Rezultati prosječnih vrijednosti optičke gustoće (OD_{600}) tijekom i nakon završetka alkoholne fermentacije prikazani su na slici 2. Razlike OD_{600} u početnim fazama alkoholne fermentacije rezultat su inokulacije tih kvasaca u različitim koncentracijama, pri čemu su varijante sa *S. cerevisiae* i *T. delbrueckii* inokulirane dozom 30 g/hL, dok su *P. kluyveri* i *M. pulcherrima* varijante inokulirane dozama 10 g/hL i 5 g/hL. Nadalje, uzorak fermentacije čistim kulturom, *S. cerevisiae* dosegnuo je maksimalnu populaciju četvrtog dana nakon inokulacije te počeo opadati nakon šestog dana. Međutim, populacija *S. cerevisiae* bila je konstantno niža nego u uzorcima sekvencijalnih fermentacija. Uzorak *T. delbrueckii* dosegnuo je najvišu koncentraciju populacije i to sedmog dana kao i ostali uzorci (*P. kluyveri*, *M. pulcherrima*). Uzorci *P. kluyveri* i *M. pulcherrima* pokazuju sličan trend rasta populacije stanica sve do sedmog dana fermentacije kada uzorak *M. pulcherrima* pokazuje brži pad populacije stanica do kraja fermentacije.



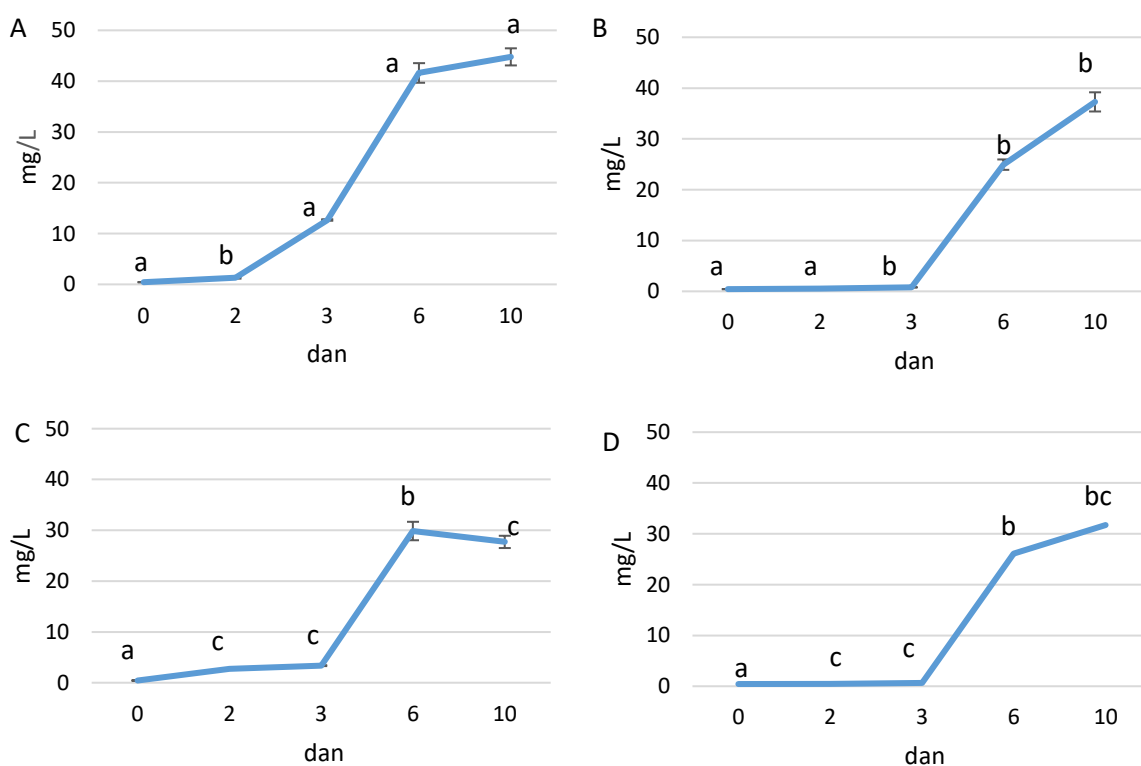
Slika 2. Prosječne vrijednosti optičke gustoće (OD_{600}) određene tijekom i po završetku alkoholne fermentacije. SC- fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; PK- sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; TD- sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te MP- sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*.

4.2. UTJECAJ KVASACA NA SINTEZU SPOJEVA AROME TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Slike 3-17 prikazuju koncentracije spojeva arome u moštu i vinu tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem različitih kombinacija komercijalnih kvasaca: čista *S. cerevisiae* kultura (varijanta Sc), sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae* (varijanta Pk), sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* (varijanta Td), sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae* (varijanta Mp). Koncentracije pojedinih spojeva određene su u moštu (dan 0), te u četiri točke tijekom odvijanja procesa alkoholne fermentacije (nakon 2, 3, 6 i 10 dana od trenutka inokulacije kvasaca).

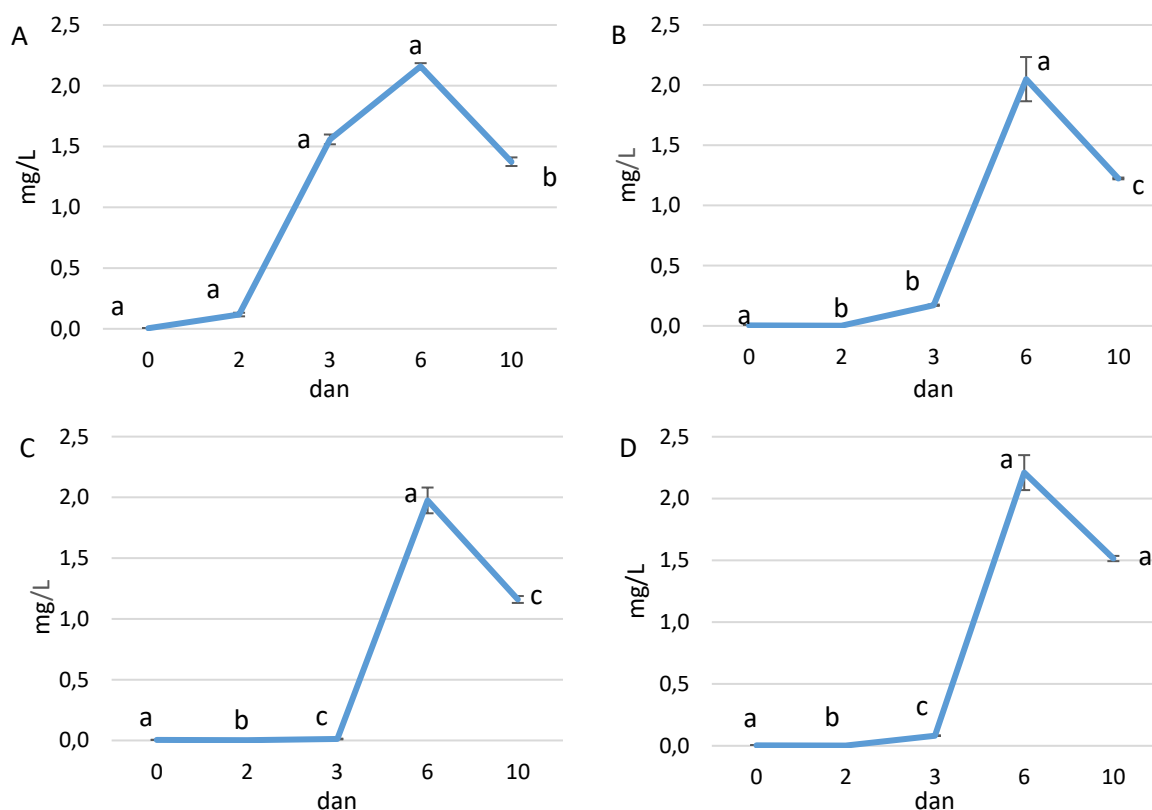
Na slici 3 prikazana je koncentracija etil-acetata u moštu i tijekom alkoholne fermentacije različitim kvascima. Kao što je i očekivano, koncentracija ovog spoja u moštu je zanemariva, povećava se sa stupnjem provedbe alkoholne fermentacije. Esteri se proizvode tijekom alkoholne fermentacije iz alkohola i acil-CoA pomoću enzima kvasca alkohol-aciltransferaze, što objašnjava zašto je njihova koncentracija u grožđu zanemariva (Ilc i sur., 2016). Različiti kvasci rezultirali su i različitim koncentracijama etil-acetata u pojedinim fazama alkoholne fermentacije. Tako je u prvoj točki analize (2. dan) značajno veća koncentracija ovog spoja utvrđena u varijanti Td, zatim u uzorku varijante Sc te u konačnici u varijantama Mp i Pk. Nadalje, veći porast koncentracije etil-acetata vidljiv je nakon 3 dana od početka fermentacije u slučaju fermentacije *S. cerevisiae* kvascem (varijanta Sc), dok je kod ostalih varijanti najznačajniji porast utvrđen u sljedećoj točki analize (nakon 6 dana od inokulacije). Varijanta Sc rezultirala je značajno većom koncentracijom etil-acetata u zadnje dvije točke analize (6. i 10. dan), dok je najniža koncentracija utvrđena u vinu fermentiranom sekvencijalnom fermentacijom *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* (varijanta Td). Porast koncentracije etil-acetata nakon 6 dana rezultat je dominacije soja *S. cerevisiae* u svim uzorcima, obzirom da je ovaj soj inokuliran nakon 48 h od inokulacije ne-*Saccharomyces* kvasaca. Od svih estera, etil-acetat najviše je istraživani. U nižim koncentracijama doprinosi kompleksnosti arome vina (Amerine i Roessler, 1983; Jackson, 2020), odnosno doprinosi cvjetnim i voćnim aromama vina (Belda i sur., 2017b; Carpena i sur., 2020b), dok je u višim indikator kiselo-octene nepoželjne arome (Amerine i Roessler, 1983; Jackson, 2020). Razvoj nepoželjnih, visokih koncentracija etil-acetata obično je povezan s kontaminacijom grožđa, mošta ili vina bakterijama octene kiseline (Jackson, 2020). Iako se etil-acetat značajnije sintetizira u prvoj fazi alkoholne fermentacije, koncentracija mu obično padne ispod senzorskog praga osjetljivosti do kraja ovog procesa (Jackson, 2020), a u analiziranim uzorcima njegove su koncentracije relativno niske, što znači

da doprinosi kompleksnosti tih vina. Smatra se da ne-*Saccharomyces* kvasci općenito proizvode znatno manje količine etil estera od *S. cerevisiae* (Padilla i sur., 2016; Rojas i sur., 2001; Rojas i sur., 2003). Belda i sur. (2017a) su u svom istraživanju koristili dva različita soja *S. cerevisiae* i dva soja *T. delbruecki* u sekvencijalnoj fermentaciji. Nakon 4 mjeseca skladištenja vina provedena je analiza hlapljivih spojeva, te je utvrđeno kako je fermentacija čistom kulturom kvasaca *S. cerevisiae* rezultirala nižom koncentracijom spomenutog estera kao i kod drugog istraživanja s Td u sekvencijalnoj fermentaciji sa Sc kada je analiza vina provedena 21 dan od završetka fermentacije (Belda i sur., 2014). Nadalje, isti trend koncentracije (slika 3), odnosno višu koncentraciju etil-acetata u kontrolnom uzorku sa *S. cerevisiae* u usporedbi s varijantama *T. delbrueckii* i *M. pulcherrima* utvrdili su i González-Royo i sur. (2015), istraživanjem utjecaja soja kvasaca na aromatske spojeve baznog vina Macabeo namijenjenog proizvodnji pjenušavih vina.



Slika 3. Koncentracije etil-acetata (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Koncentracije etil-heksanoata, estera koji pridonosi voćnoj aromi vina i karakterističnoj aromi zelene jabuke (Morata, 2022), tijekom alkoholne fermentacije prikazane su na slici 4. Kao što se može vidjeti, varijanta Sc je rezultirala najznačajnijim porastom koncentracije ovog spoja nakon 2. i 3. dana od inokulacije. S druge strane, varijante sekvencijalnih fermentacija pokazuju vrlo blagi porast koncentracije tijekom navedenog vremenskog perioda, što implicira da ne-*Saccharomyces* kvasci ne sintetiziraju značajne koncentracije ovog estera u prvim fazama fermentacije. U svim varijantama promatra se trend najveće koncentracije etil-heksanoata već šestog dana analize.



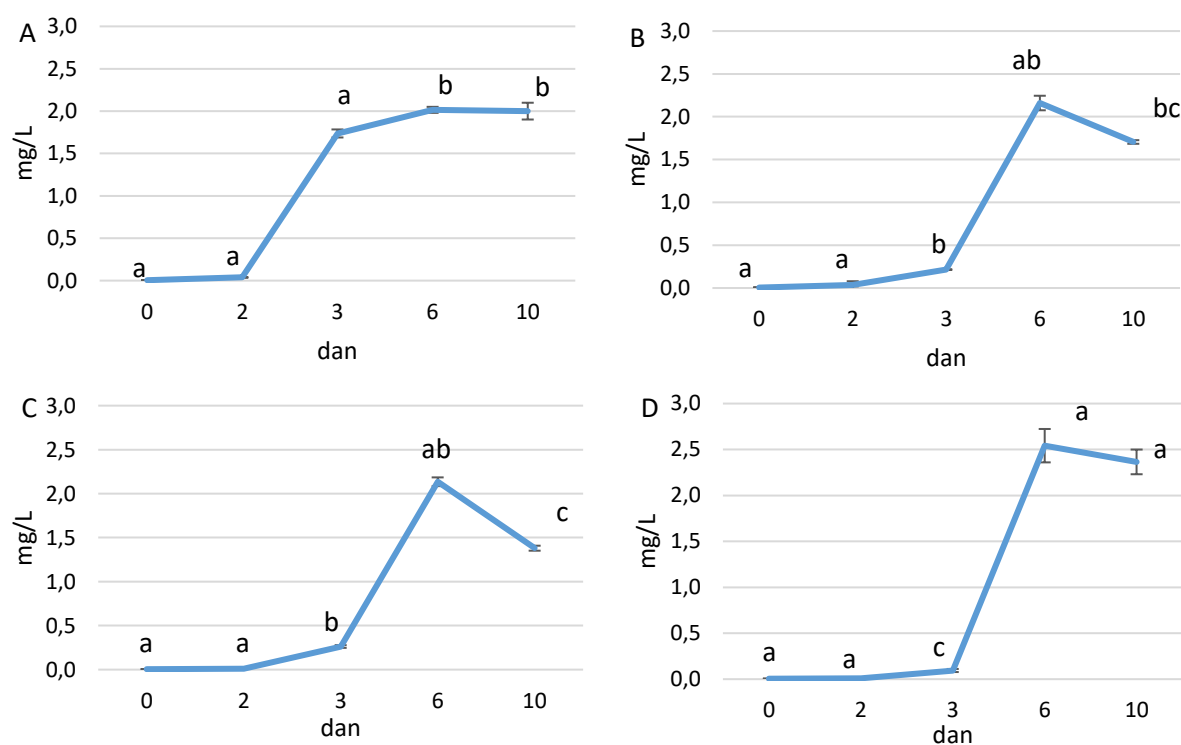
Slika 4. Koncentracije etil-heksanoata (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Inače, akumulacija estera rezultat je ravnoteže između reakcija sinteze i hidrolize, a koje su rezultat djelovanja raznih enzima. Ove enzimatske aktivnosti vrlo su niske tijekom fermentacije

mošta (González-Jiménez, 2020; Plata i sur., 2005; Plata i sur., 1998; Mauricio i sur., 1993). Krajem fermentacije, voćni esteri općenito premašuju svoje ravnotežne konstante (Jackson, 2020; Ramey i Ough, 1980). Kao rezultat toga, etil esteri počinju hidrolizirati natrag u alkohole i odgovarajuću kiselinu, no puno sporije za razliku od acetatnih estera (Komes i sur., 2007; Chisholm i sur., 1995). U okviru ovih zaključaka, koncentracija etil heksanoata 10. dan analize se smanjuje u svim uzorcima vina. Po završetku alkoholne fermentacije (10. dan) vidljivo je kako je varijanta Mp rezultirala najvišom koncentracijom etil-heksanoata, dok je najniža koncentracija utvrđena u varijanti Td. Trend sličan ovome utvrdili su i Dutraive i sur. (2019) u svom istraživanju gdje su uspoređivali utjecaj sekvencijalne fermentacije *M. pulcherrima* na kemijski sastav vina Rizling te zaključili kako proizvedena vina također karakterizira veća koncentracija etil-heksanoata. Nadalje, sekvencijalna fermentacija ovim kvascem tijekom proizvodnje vina Verdejo također je rezultirala višim koncentracijama navedenog spoja (Ruiz i sur., 2018). Varela i sur. (2016) opisuju različite aromatske profile vina sorti Chardonnay i Shiraz te, u oba slučaja, vina proizvedena sekvencijalnom fermentacijom Mp su karakterizirana višim koncentracijama etil-heksanoata, u usporedbi s kontrolnim uzorkom proizvedenim fermentacijom s čistom *S. cerevisiae* kulturom. Međutim, istraživanje odabranih ne-*Saccharomyces* kvasaca u kontroliranim multistarter fermentacijama sa *S. cerevisiae* koje su proveli Comitini i sur. (2011) pokazuje nešto drugačije rezultate. Navedeni autori su analizirali vina nakon završetka fermentacije koja je provedena s tri različita omjera inokuluma ne-*Saccharomyces/Saccharomyces* kvasaca (1:1, 100:1, 10 000:1) te su rezultati uspoređeni s vinom čiste kulture (Sc) također inokulirane u mošt s istim omjerima. Utvrdili su da u ko-inokulaciji *M. pulcherrima* sa *S. cerevisiae*, bez obzira na omjer inokuluma, fermentacija čistom kulturom *S. cerevisiae* dovodi do viših vrijednosti koncentracije etil-heksanoata. Kada se analiza radi s *T. delbrueckii* u slučaju omjera 1:1 varijanta Sc rezultira nižom koncentracijom spoja, dok u slučaju ostala dva omjera višom koncentracijom etil-heksanoata. Stoga pravilna prilagodba omjera inokuluma odabranih kultura koje nisu iz roda *Saccharomyces* u kombinaciji s kulturom *S. cerevisiae* čini se ključnom za optimizaciju željenih karakteristika vina (Comitini i sur., 2011; Nissen i sur., 2003). Također, koncentracija etil estera srednjelančanih masnih kiselina ovisi o koncentraciji prekursora masnih kiselina (Ilc i sur., 2016; Saerens i sur., 2008), pa to može dovesti do smanjenja koncentracije etil estera (Robinson i sur., 2014; Saerens i sur., 2008), čime se također može objasniti smanjenje koncentracije spoja 10. dana analize (slika 4). Prekursor za sintezu etil-heksanoata je kapronska kiselina (Ilc i sur., 2016). Iako je kapronska kiselina uglavnom produkt fermentacije, nezanemarive količine prisutne su i u grožđu. Biosinteza

kapronske kiseline u grožđu može stoga utjecati na koncentraciju etil-heksanoata u vinu (Ilc i sur., 2016; Verstrepen i sur., 2003).

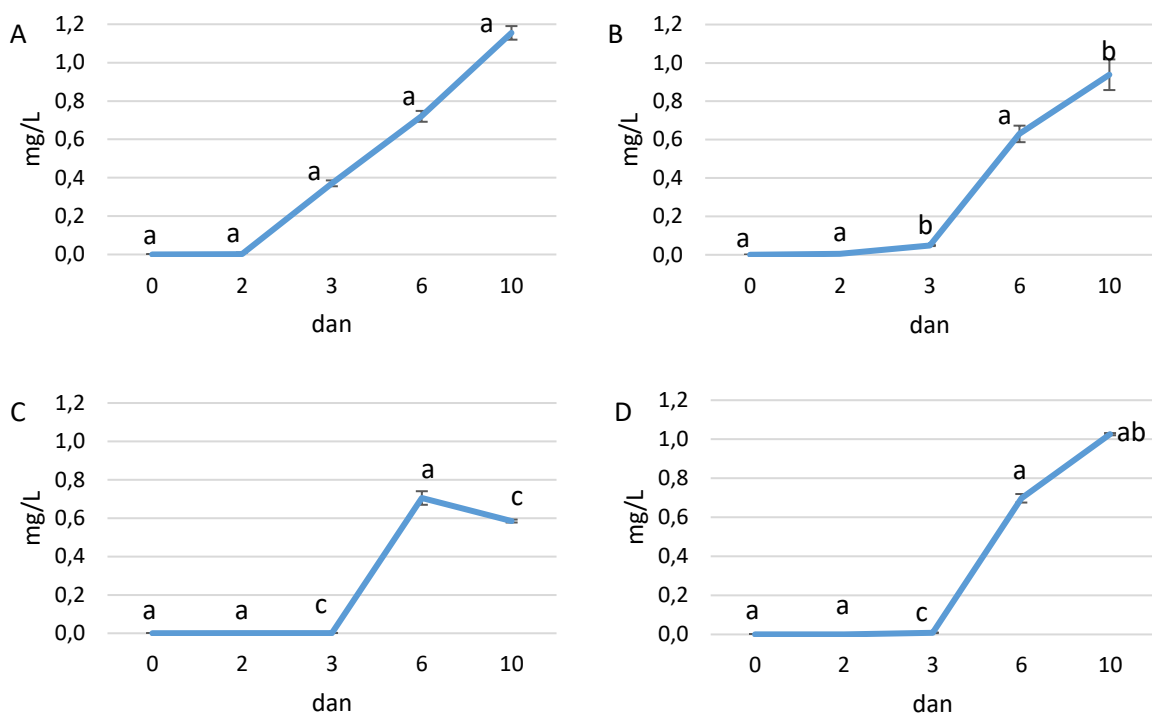
Sljedeća slika (slika 5) prikazuje koncentracije etil-oktanoata u analiziranim uzorcima i vidljivo je kako je najviša koncentracija ovog spoja utvrđena u varijanti Mp nakon 6 dana. Općenito, sve varijante dosežu najvišu vrijednost šesti dan analize. Nakon tog trenutka, koncentracija varijante Sc ostaje relativno stabilna tijekom preostalog dijela analize, do desetog dana, dok se kod ostalih uzoraka koncentracija smanjuje. Osim toga, u prvoj fazi alkoholne fermentacije (nakon 3 dana) utvrđeni su značajni trendovi u porastu koncentracije spojeva među varijantama Sc, Pk i Td, s najočitijim porastom u varijanti Sc. Kvasac *M. pulcherrima* doprinosi visokoj koncentraciji etil estera, posebno etil-oktanoata, no rezultati variraju ovisno o korištenim sojevima kvasca (Jolly i sur., 2003; Borren i Tian, 2020). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Dutraive i sur. (2019) koji su također potvrdili da je najviša koncentracija etil-oktanoata utvrđena u vinu proizvedenom sekvencijalnom inokulacijom Mp i Sc.



Slika 5. Koncentracije etil-oktanoata (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Suprotno prethodno spomenutom istraživanju, Benito i sur. (2015) su istraživali utjecaj sekvencijalne fermentacije na vino Rizling, ali su uz *M. pulcherrimu* u sekvencijalnoj fermentaciji sa *S. cerevisiae* koristili i *P. kluyveri* pa su došli do zaključka da uzorak proizveden s Pk karakterizira viša koncentracija etil-oktanoata, zatim slijedi uzorak proizveden s Mp, te u konačnici varijanta s čistom kulturom *S. cerevisiae*. García i sur. (2020) u istraživanju utjecaja ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasaca na smanjenje udjela alkohola u bijelom vinu španjolske sorte Malvar koristili su dva soja kvasca *M. pulcherrima* i u slučaju oba soja je čista kultura (varijanta Sc) rezultirala višom koncentracijom etil-oktanoata, što je suprotno rezultatima dobivenim u ovom i prethodno spomenutim istraživanjima. González-Royo i sur. (2015) su došli do sličnih zaključaka, odnosno utvrdili su višu koncentraciju etil-oktanoata u kontrolnim uzorcima čiste kulture *S. cerevisiae*, u usporedbi s *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* varijantom. Ovi, suprotni trendovi također su potvrđeni i u istraživanju Romani i sur. (2020) koji su analizirali vino sorte Sangiovese četiri mjeseca nakon skladištenja vina. Navedene razlike u trendovima su vjerojatno posljedica prisutnosti različitih koncentracija esteraza među različitim sojevima kvasaca koji kataliziraju sintezu ovog spoja, kao i u različitim udjelima aminokiselina kao prekursora (Borren i Tian, 2020; Rodríguez i sur., 2010).

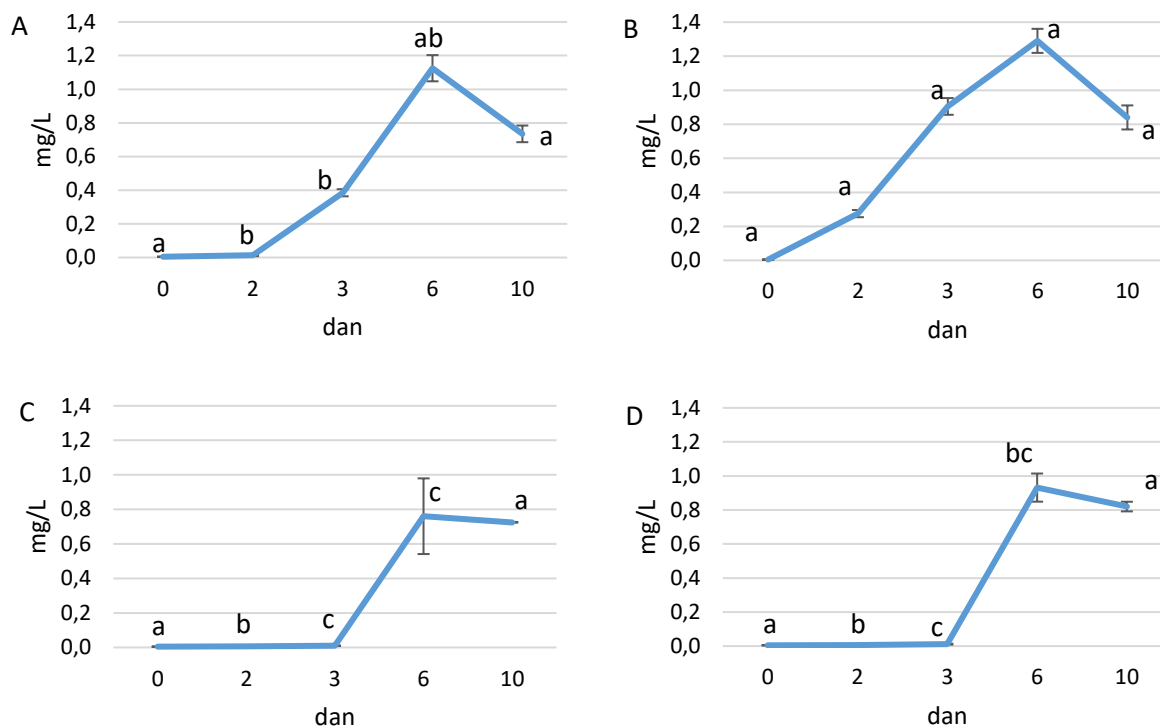
Na slici 6 prikazana je dinamika promjene koncentracije etil-dekanoata tijekom fermentacije. Prvi značajan porast koncentracije primijećen je u slučaju uzorka Sc nakon 3 dana, dok se brzi porast koncentracije kod ostalih uzoraka evidentira tek šestog dana analize. U svim uzorcima, osim varijante Td, najveća koncentracija ovog spoja utvrđena je desetog dana analize, prvenstveno kod varijante Sc, zatim u uzorcima Mp, Pk te na kraju Td jedino kojeg karakterizira pad koncentracije. Rezultati ovog istraživanja nisu usklađeni s rezultatima Sadoudi i sur. (2012) koji su promatrali interakcije između kvasaca analizom aromatskog profila vina Sauvignon blanc fermentiranog s čistom kulturom *S. cerevisiae* ili u ko-inokulaciji ovog kvasca sa *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii*, implicirajući da čista kultura *S. cerevisiae* proizvodi niže koncentracije etil-dekanoata nego u slučaju ko-inokulacije s *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii*. Nadalje, do sličnog zaključka došli su Dutraive i sur. (2019) analizirajući koncentraciju etil-dekanoata u uzorcima vina Rizling proizvedenog sekvencijalnim fermentacijama s Mp, Td i Pk pri čemu je nakon završetka fermentacije varijanta Mp rezultirala najvišom koncentracijom tog spoja. Suprotni trendovi, odnosno veća koncentracija ovog estera u bijelim vinima proizvedenim čistom kulturom *S. cerevisiae* utvrđeni su u drugim istraživanjima (Varela i sur., 2016; Comitini i sur., 2011).



Slika 6. Koncentracije etil-dekanoata ($\mu\text{g/L}$) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

2-feniletil-acetat, acetatni je ester prisutan u vinu koji značajno doprinosi aromatskom profilu vina sa izraženim notama meda, voća i cvjetnih tonova (Perestrelo i sur., 2020), s posebnim naglaskom na aromu ruže (Ruiz i sur., 2019). Slika 7 prikazuje promjenu koncentracije 2-feniletil-acetata tijekom procesa alkoholne fermentacije. Vidljivo je kako varijanta Pk rezultirala značajnim povećanjem koncentracije već 3. dan, dok se sličan efekt kod uzorka Sc također primjećuje nakon 3 dana. Varijante Mp i Td, s druge strane, pokazuju ovaj porast tek nakon 6 dana od početka alkoholne fermentacije, što implicira da ova dva kvasca sintetiziraju jako male koncentracije 2-feniletil-acetata. Važno je napomenuti da se kod svih varijanti nakon 10 dana koncentracija ovog spoja smanjila u odnosu na 6. dan analize, s najizraženijim smanjenjem koncentracije u varijantama Pk i Sc. Ipak, uzorak Pk karakterizira najviša koncentraciju 2-feniletil-acetata po završetku alkoholne fermentacije (10. dan). Istraživanje o prisutnosti različitih enzimatskih aktivnosti s enološkim utjecajem (Escribano i sur., 2017) utvrdilo je da svi proučavani sojevi *P. kluyveri* pokazuju esteraznu aktivnost, koja

katalizira formiranje estera. Najveći porast iznosio je 25 % za 2-feniletal-acetat kada je *S. cerevisiae* inokuliran 2 dana poslije *P. kluyveri* (Vicente i sur., 2021; Benito i sur., 2015) i 50 % (Vicente i sur., 2021; Dutraive i sur., 2019) za dužu sekvencijalnu fermentaciju, odnosno kada je *S. cerevisiae* inokuliran 4 dana poslije *P. kluyveri* (Vicente i sur., 2021).

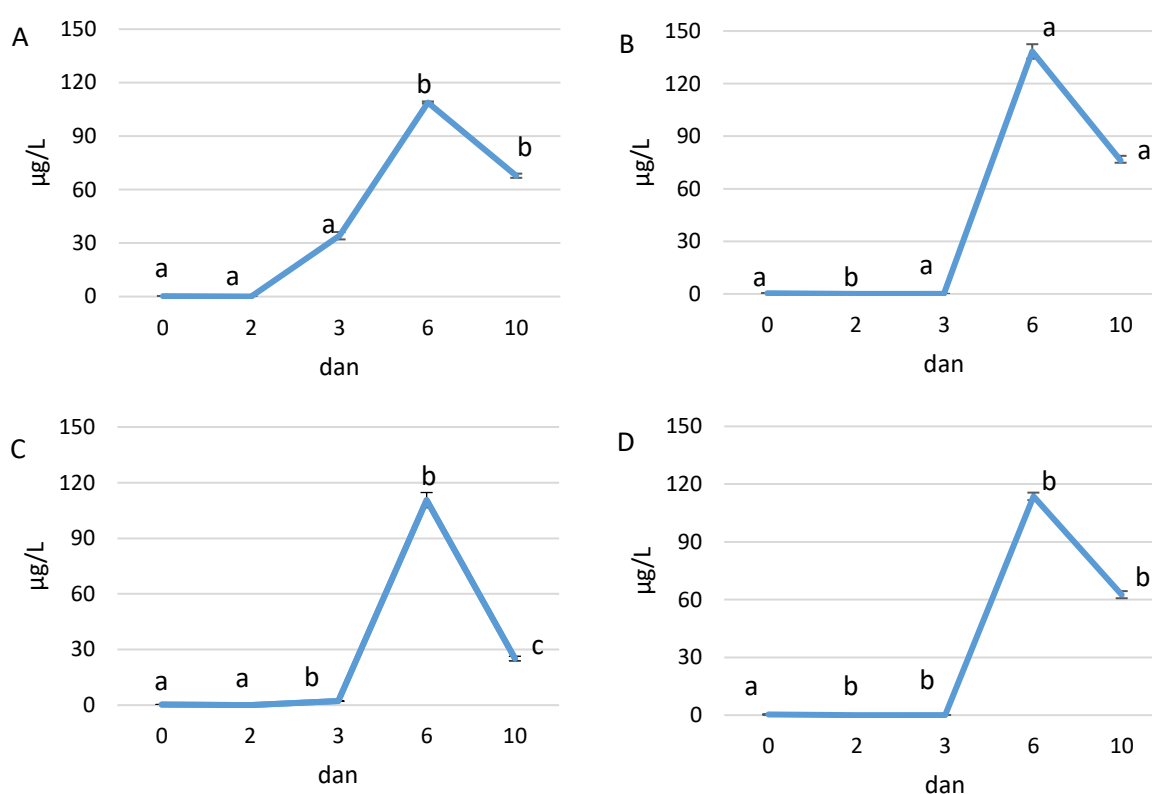


Slika 7. Koncentracije 2-feniletal-acetata (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Iz podataka prikazanih na slici 7 jasno se vidi da uzorak Pk karakterizira najviša konačna koncentracija navedenog spoja. Ovo potvrđuje ranije istraživanje Benito i sur. (2015) koje sugerira da *P. kluyveri* kvasac proizvodi višu koncentraciju 2-feniletal-acetata u sekvencijalnoj fermentaciji u usporedbi s fermentacijom sa čistom *S. cerevisiae* kulturom, dok su Sadoudi i sur. (2012) potvrdili da sekvencijalna fermentacija s *M. pulcherrima* rezultira višom koncentracijom u usporedbi s varijantom Sc, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. Osim toga, istraživanje sekvencijalnih fermentacija na vinima Rizling i Garnacha u oba slučaja pokazuje značajnu ulogu ne-*Saccharomyces* kvasaca u poboljšanju arome u usporedbi s fermentacijom sa čistom kulturom *S. cerevisiae*, gdje su autori zaključili da varijanta Pk

proizvodi višu koncentraciju 2-feniletil-acetata od kontrolnog uzorka i varijante Td (Oliveira i Ferreira, 2019). Također, acetati, koji su inicijalno proizvedeni enzimatski, polako se hidroliziraju nakon fermentacije dok se ne postigne ravnoteža s odgovarajućim kiselinama i alkoholima (Komes i sur., 2007; Chisholm i sur., 1995), što objašnjava smanjenje koncentracije ovog spoja po završetku fermentacije.

Na slici 8. prikazana je koncentracija izobutil-acetata. Ester izobutil-acetat doprinosi aromi banane i tropskog voća (Morata, 2022; Gobbi i sur., 2013). Koncentracija ovog spoja u moštu je zanemariva, a postupno se povećava kako proces alkoholne fermentacije napreduje.

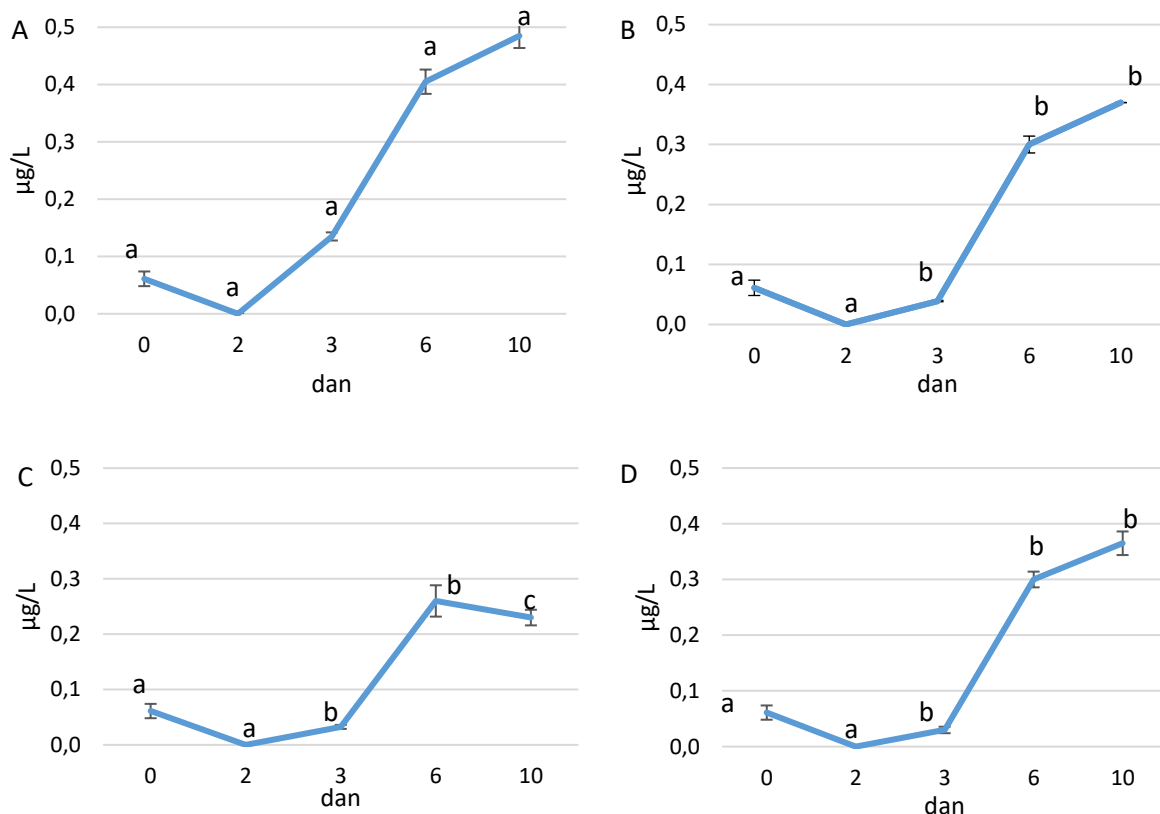


Slika 8. Koncentracije izobutil-acetata ($\mu\text{g/L}$) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Varijacije u uporabi različitih sojeva kvasaca manifestirale su se u obliku različitih koncentracija izobutil-acetata u različitim fazama alkoholne fermentacije. Na primjer, u drugoj

točki analize, koja se provodila nakon 3 dana, značajno veća koncentracija izobutil-acetata utvrđena je u varijanti Sc, zatim u varijanti Td, dok su varijante Pk i Mp pokazale zanemarive koncentracije. Najznačajniji porast koncentracije izobutil-acetata kod svih uzoraka vina uočen je u sljedećoj točki analize, nakon 6 dana od inokulacije, dok je 10. dan došlo do smanjenja koncentracije ovog spoja, također u svim varijantama. Po završetku alkoholne fermentacije varijanta Pk je karakterizirana najvišim koncentracijama ovog spoja kao i u uzorcima vina Garnacha i Rizling u usporedbi s Td i Sc. Uzorci vina Rizling i Garnacha korišteni su u dva neovisna sekvencijalna eksperimenta (Oliveira i Ferreira, 2019). Najniža koncentracija utvrđena je u vinu fermentiranom sekvencijalnom fermentacijom kvasaca *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* (varijanta Td). Ovi rezultati su u kontradikciji s prethodnim istraživanjima provedenim od strane González-Royo i sur. (2015) koji su analizu proveli 3 mjeseca nakon fermentacije. U njihovom istraživanju varijanta Mp rezultirala je najnižim koncentracijama ovog spoja, odnosno nižim od kontrole (varijanta Sc) i varijante Td, dok je u ovom istraživanju kontrolni uzorak karakteriziran višom koncentracijom od uzorka proizvedenim varijantama Mp i Td. Nadalje, u sekvencijalnoj fermentaciji *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* Zhang i sur. (2022) mjesec dana nakon fermentacije ispituju taj utjecaj na bijelo vino Petit Manseng te su utvrdili da je varijanta Td rezultirala višim koncentracijama izobutil-acetata od čiste kulture (varijanta Sc). Nepodudaranje rezultata pokazuju i Varela i sur. (2016) gdje varijanta s *M. pulcherrimom* proizvodi višu koncentraciju izobutil-acetata od čiste kulture, a proveli su analizu nakon što je šećer potpuno potrošen (<5 g/L), otprilike mjesec dana u oba slučaja uzoraka vina (Chardonnay i Shiraz). Razlog odstupanja može biti taj što izobutil-acetat polako hidrolizira u odgovarajuću kiselinu i alkohol, stoga voćna nota koju donosi taj ester blijedi odnosno koncentracija mu varira (Pérez-Prieto i sur., 2003; Jackson, 2020). Dodatni razlozi za nepodudaranja u rezultatima mogu proizići iz vremenskih razlika u provedbi analiza, budući da se u svim istraživanjima provode analize otprilike mjesec dana nakon završene fermentacije.

Na slici 9 prikazana je koncentracija etil-butirata, a prisutnost etil-butirata u vinu ovisi o uvjetima fermentacije, kao i o vrsti kvasca koja se koristi tijekom procesa fermentacije. Koncentracija spoja u moštu i kod svih varijanti u početnim točkama analize (2. i 3. dan) je gotovo zanemariva, a nakon toga slijedi sinteza većih koncentracija tog spoja. Na kraju analize (10. dan), varijanta Sc se ističe s najvišom koncentracijom spoja, a varijanta Td pokazala je najmanju koncentraciju.

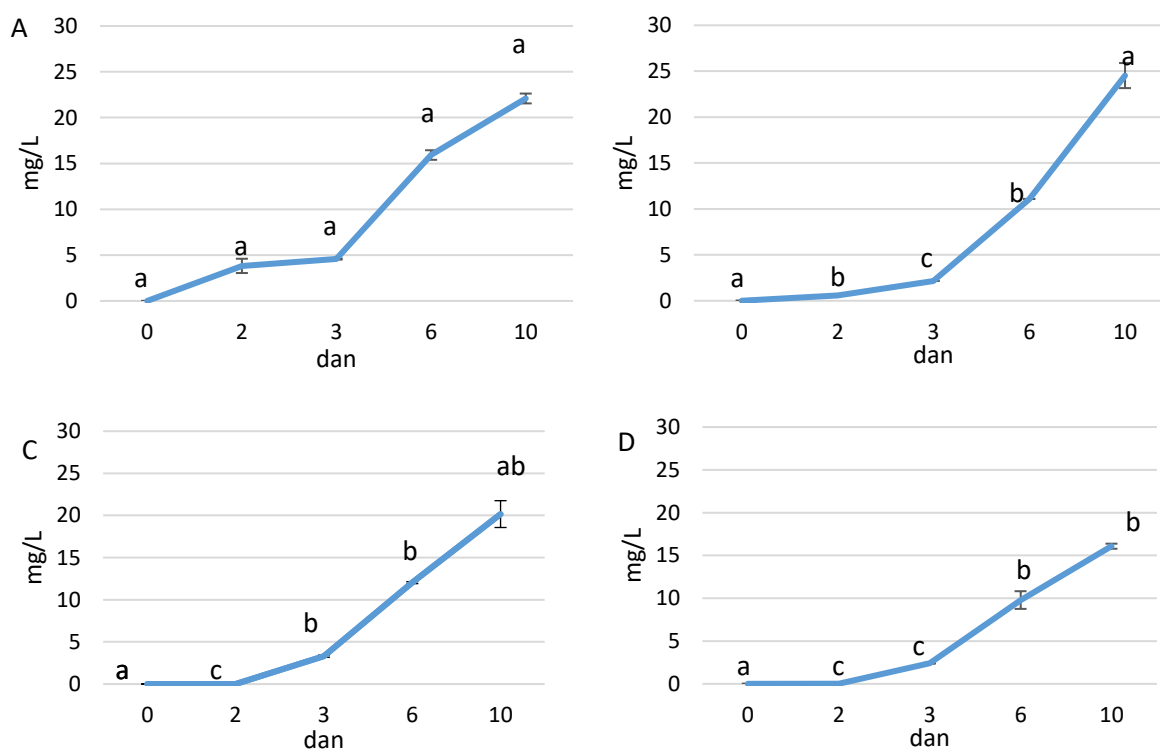


Slika 9. Koncentracije etil-butirata ($\mu\text{g/L}$) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Belda i sur. (2017a) te Zhang i sur. (2022) proveli su analize koncentracije etil-butirata nakon četiri, odnosno mjesec dana od završetka procesa fermentacije i utvrdili su da je koncentracija etil-butirata bila viša u uzorcima sekvencijalne fermentacije *T. delbrueckii/S. cerevisiae*, što je suprotno rezultatima u ovom istraživanju. Nasuprot tome, trendovi slični onima u ovom radu su potvrđeni u ranijim istraživanjima koja su proučavala utjecaj sekvencijalne fermentacije Td i Mp na aromu vina (Romani i sur., 2020; González-Royo i sur., 2015). Navedena istraživanja ukazuju da su uzorci proizvedeni s čistom kulturom *S. cerevisiae* karakterizirani višom koncentracijom etil-butirata u usporedbi s druga dva kvasca (sekvencijalna fermentacija). Nadalje, druga istraživanja koja su također istraživala utjecaj sekvencijalne fermentacije, ali sa kvascem *M. pulcherrima*, su također potvrdila prethodno istaknute trendove (García i sur., 2020; Ruiz i sur., 2018). U konačnici, u istraživanju utjecaja sekvencijalne fermentacije na kemijski sastav Rizlinga korišten je kvasac *P. kluyveri* te su rezultati pokazali da uzorak proizveden

fermentacijom s tim kvascem ima nižu koncentraciju etil-butilata u usporedbi s kontrolnim uzorkom (varijanta *S. cerevisiae*) (Dutraive i sur., 2019), što se podudara i s prikazanim podacima na slici 9.

Slika 10 prikazuje promjenu koncentracije izobutanola. Uz izoamil-alkohol, daje specifičnu aromu po viskiju te otapalu s percepcijom gorčine (Robinson i sur., 2014; Francis i Newton 2005). Kvasci proizvode većinu viših alkohola iz metabolizma šećera, stvarajući prekursore iz piruvata i acetil-CoA (Robinson i sur., 2014; Bell i Henschke 2005; Swiegers i sur., 2005; Crowell i sur., 1961). Alternativno, viši alkoholi se proizvode razgradnjom viška aminokiselina putem kvasaca (Robinson i sur., 2014; Bell i Henschke 2005; Swiegers i sur., 2005). Nastale kiseline dekarboksiliraju se u aldehide, koji se konačno reduciraju u više alkohole. Neki viši alkoholi nemaju moguće prekursore među aminokiselinama i formiraju se iz ketonskih kiselina (Regodón Mateos i sur., 2006; Henschek i Jiranek, 1993).

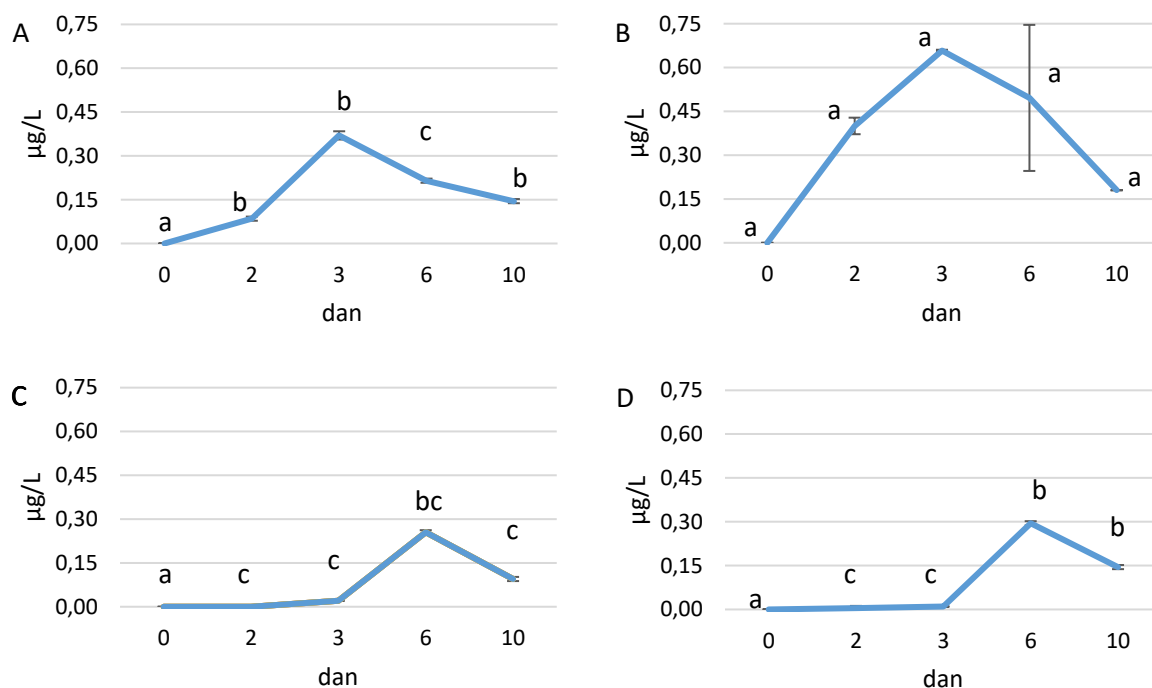


Slika 10. Koncentracije izobutanola (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Nadalje, kod prve točke analize (2. dan) najveća koncentracija ovog spoja utvrđena je u varijanti Sc, dok je kod ostalih porast koncentracije utvrđen nakon trećeg dana alkoholne fermentacije. Također varijanta Sc pokazuje najveći porast koncentracije, sve do 10 dana analize kada je u varijanti Pk utvrđena najviša koncentracija ovog spoja, zatim u varijanti Sc, te u konačnici Td i Mp. Slično navedenom trendu, više koncentracije izobutanola su utvrđene u kontrolnom (Sc) uzorku vina Tempranillo, u usporedbi s varijantom Td (Belda i sur., 2014). Ipak, druga relevantna istraživanja ukazuju na kontrastne rezultate. Prema radovima García i sur. (2020) te Romani i sur. (2020), uzorak bijelog vina Malvar, odnosno crnog Sangiovese s *M. pulcherrimom* karakteriziraju veće koncentracije izobutanola u usporedbi s kontrolnim uzorcima sa *S. cerevisiae*. S druge strane, u istraživanju utjecaja sekvencijalnih fermentacija na aromatski profil bijelog vina, sugerira se da sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii/S. cerevisiae* rezultira višom koncentracijom navedenog spoja od kontrolnog uzorka (Zhang i sur., 2022). Nadalje, analizom vina Chardonnay utvrđeno je kako je sekvencijalna fermentacija s *M. pulcherrima* rezultirala većom koncentracijom ovog spoja od kontrolnog uzorka (Sc) (Varela i sur., 2016), što bi značilo da sastav grožđa i mošta može značajno varirati ovisno o sorti grožđa, „terroiru“ i sezoni berbe. Ove promjene u sirovinama mogu utjecati na metabolizam kvasaca i konačni proizvod fermentacije. Prema Giucidi i sur. (1990) proizvodnja viših alkohola od strane kvasaca ovisi o njihovoj sposobnosti proizvodnje aminokiselina, što varira ovisno o rodu, vrsti i soju (Regodón Mateos i sur., 2006). Drugi faktori poput proizvodnje etanola, temperature fermentacije, pH-vrijednosti, aeracije te količine čvrstih tvari u moštu također utječu na proizvodnju viših alkohola od strane kvasaca (Regodón Mateos i sur., 2006; Llauro i sur., 2005; Zoecklein i sur., 1995; Henschek i Jiranek, 1993).

Heksil-acetat (slika 11) je spoj koji je povezan sa aromom crvenog voća (Forde i sur., 2011; Dennis i sur., 2012) vrlo često se spominje u kontekstu ugodne arome u crnim vinima (Dennis i sur., 2012). Iz rezultata prikazanih na slici 11 vidi se da heksil-acetat nije detektiran u početnom moštu, što je i očekivano obzirom da je proizvod fermentacije kvasaca. Tijekom analize, koncentracija heksil-acetata u uzorcima Td i Mp najviša je 6. dan, dok je u uzorcima Sc i Pk najviša 3. dan. Na kraju alkoholne fermentacije (10. dan analize), koncentracija heksil-acetata najviša je u uzorku Pk. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Escribano-Viana i sur. (2018) koji su analizirali utjecaj 10 enoloških kvasaca na kvalitetu vina Tempranillo. Provedena je sekvencijalna inokulacija sa *S. cerevisiae*, a među tih 10 ispitivanih sojeva bili su i *M. pulcherrima* i *T. delbrueckii*. Rezultati navedenog istraživanja pokazali su, kao i prema rezultatima u ovom radu, da je varijanta Sc rezultirala višom koncentracijom heksil-acetata, u

usporedbi sa sekvencijalnim fermentacijama Mp i Td. U sekvencijalnoj fermentaciji uz iste kvasce, Dutraive i sur. (2019) utvrdili su najnižu koncentraciju spojeva kod uzorka proizvedenog s *P. kluyveri* dok su najnižu koncentraciju utvrdili u kontrolnom uzorku što nije u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Nasuprot tome, kod istraživanja kvalitete vina Petit Manseng , varijanta Td je karakterizirana većom koncentracijom spoja u usporedbi s čistom kulturom (Zhang i sur., 2022).

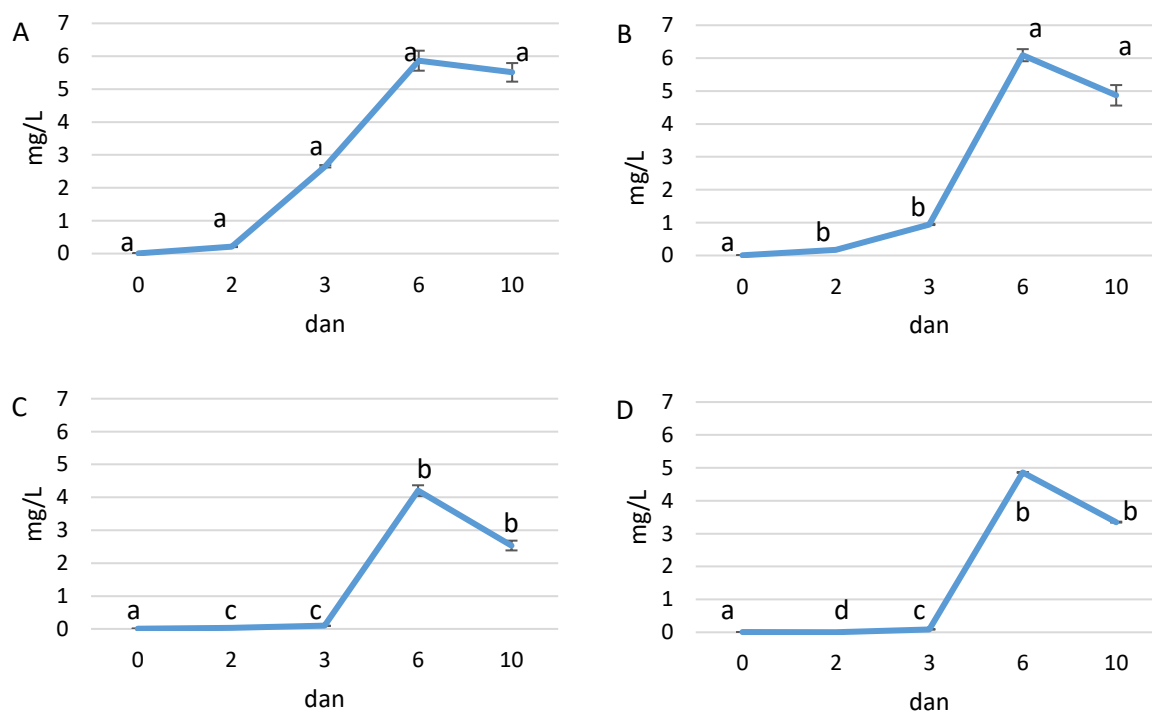


Slika 11. Koncentracije heksil-acetata ($\mu\text{g/L}$) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Dodatno, analiza kvalitete vina Vidal s pet ne-*Saccharomyces* kvasaca u ko-inokulaciji sa *S. cerevisiae* pokazuje da je varijanta Mp rezultirala višom koncentracijom spojeva u usporedbi s varijantama Pk i Sc (Ge i sur., 2021). Različiti rezultati mogu biti objašnjeni interakcijom između kvasaca koja može utjecati na aromu vina (Dutraive i sur., 2019; Sadoudi i sur., 2012; Fleet, 2003). Spoj *cis*-3-heksan-1-ol može djelovati kao prekursor heksil-acetata, no mehanizam kojim ga kvasac koristi za proizvodnju acetatnog estera nije u potpunosti ovisan o njegovoj koncentraciji. Moguće je da tijekom fermentacije dođe do spontane esterifikacije *cis*-3-heksan-1-ola, a ne esterifikacije posredovane kvascem. Sugerira se da su ograničavajući faktori u

proizvodnji heksil-acetata brzina difuzije prekursora u staničnu stijenku kvasca, aktivnost enzima aminotransferaze, ili kombinacija ova dva faktora. Kako koncentracija prekursora u moštu raste, više njega postaje dostupno za difuziju u staničnu stijenku kvasca (Dennis i sur., 2012). Različita aktivnost aminotransferaze za različite supstrate su zabilježene u *S. cerevisiae* (Dennis i sur., 2012; Malcorps i Dufour, 1992) i ne-*Saccharomyces* kvascima (Dennis i sur., 2012; Rojas i sur., 2001).

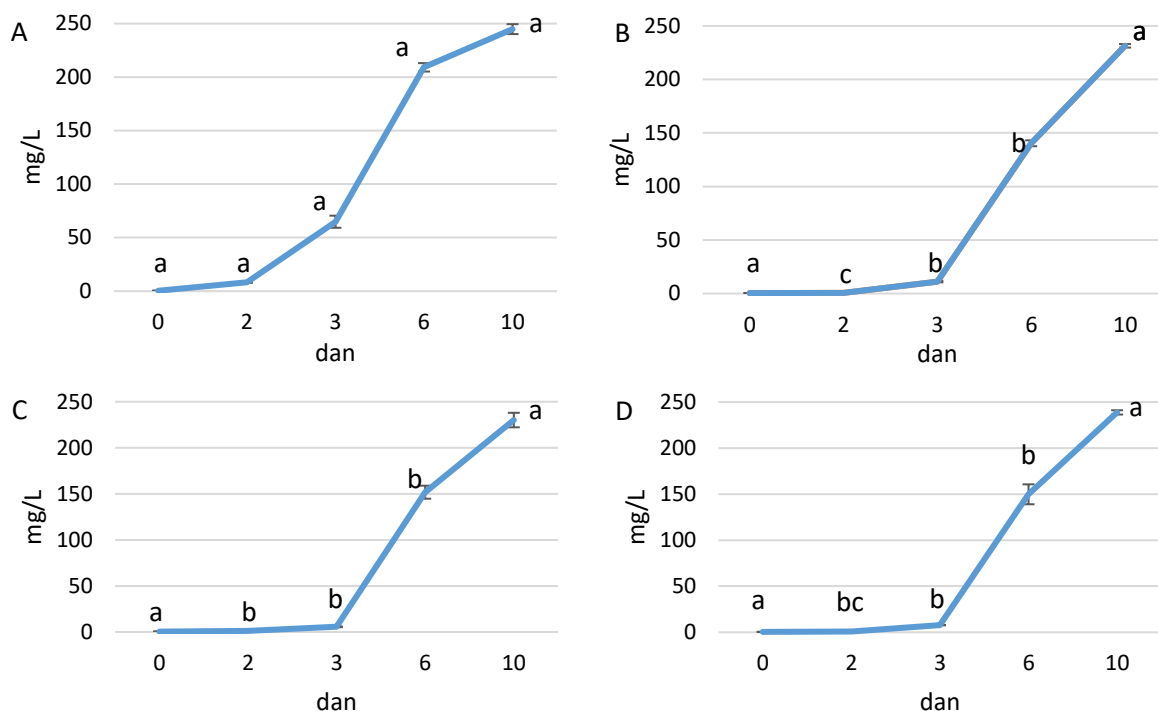
Slika 12 prikazuje promjenu koncentracije estera izoamil-acetata, spoja koji je odgovoran za aromu banane (Rojas, 2003). Fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom nakon 2 dana pokazuje najveću promjenu koncentracije u vidu rasta koncentracije spoja, te je prati varijanta Pk dok Mp i Td imaju zanemariv porast koncentracije.



Slika 12. Koncentracije izoamil-acetata (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Kao i kod izobutanola utvrđen je isti trend najveće koncentracije spoja utvrđene 6. dana analize sa najvećom u varijanti Pk, zatim u uzorku varijante Sc, Mp i Td, dok je u zadnjoj točki analize (10. dan) najviša koncentracija utvrđena u uzorku proizvedenom varijantom Sc. Također, analiza utjecaja sekvencijalnih fermentacija vina Garnacha i Rizling dokazuje isto, odnosno da uzorak Pk ima višu koncentraciju spoja od Td (Oliveira i Ferreira, 2019). Rezultati prikazani na slici 12 podudaraju se i s istraživanjem utjecaja sekvencijalne fermentacije na kemijski sastav vina Sangiovese (Romani i sur., 2020) u kojem je kontrolni uzorak karakteriziran višom koncentracijom ovog spoja od varijanti Td i Mp, dok druga istraživanja utjecaja sekvencijalnih fermentacija koja koriste iste kvasce dokazuju suprotno, bilo da se radi o provedbi analize odmah nakon fermentacije (Renault i sur., 2015) ili par mjeseci nakon završetka fermentacije (Belda i sur., 2017a; González-Royo i sur., 2015). Također, koncentracija prekursora ne određuje koncentraciju acetatnih estera. Ograničavajući faktor u proizvodnji acetatnih estera od strane *S. cerevisiae* je izražaj gena alkohol acetiltransferaze u kvasca (Ilc i sur., 2016; Verstrepen i sur., 2003), a tako je i u istraživanju meta-analize osnovnih aromatskih komponenti grožđa i vina dokazano da izoamil-acetat i heksil-acetat ne koreliraju s koncentracijama svojih prekursora (Ilc i sur., 2016).

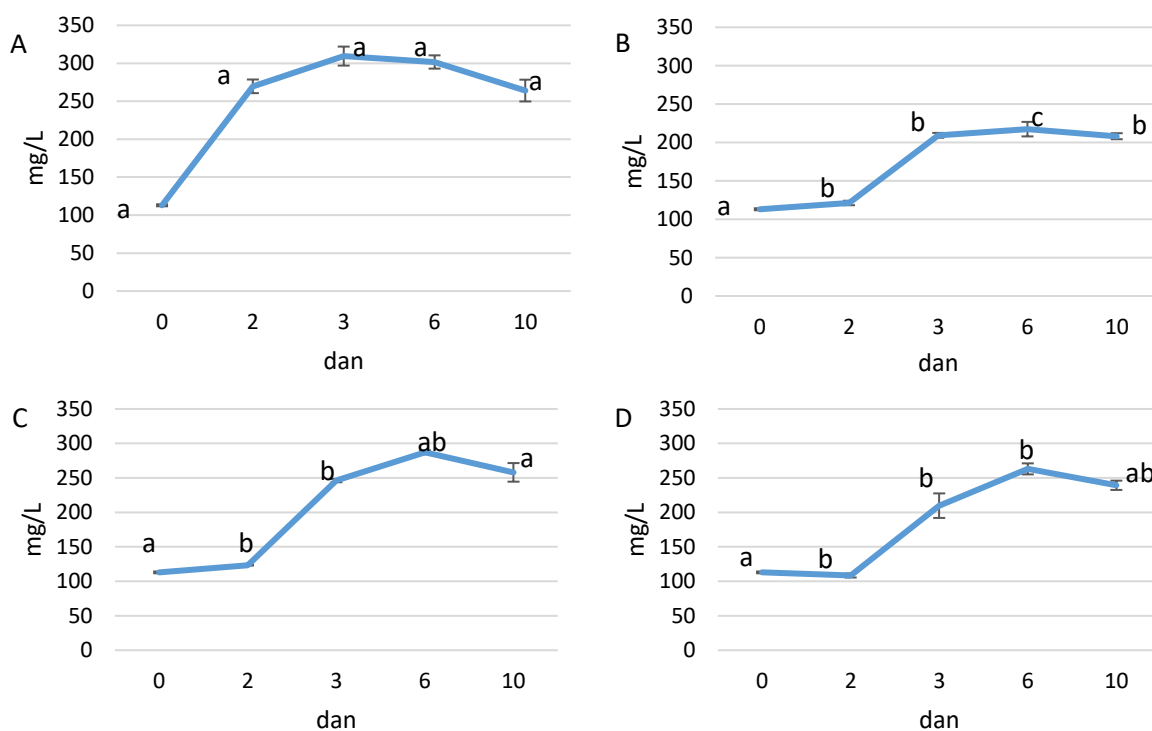
Koncentracija spoja izoamil-alkohola igra ključnu ulogu u složenosti kompozicije arome. U optimalnim koncentracijama, može doprinijeti pozitivnom učinku u vinu cvjetnim, mednim i voćnim aromama (Carpena i sur., 2020; Muñoz i sur., 2006). Prema slici 13 koncentracija spoja je dovoljno niska da pozitivno doprinosi aromi. Nadalje, značajne su promjene koncentracije spoja kod svih varijanti utvrđene 6. dan analize, a varijanta Sc pokazuje i značajniji rast koncentracije i 3. dan. Od 6. do 10. dana uzorci sekvencijalnih fermentacija pokazuju najveću promjenu u koncentraciji spoja dok je ipak kod uzorka fermentacije čistom *S. cerevisiae* kulturom 10. dan vrijednost koncentracije izoamil-alkohola najviša. Neka istraživanja potvrđuju da je koncentracija izoamil-alkohola najviša u kontrolnom uzorku fermentiranom sa *S. cerevisiae* nego u uzorku fermentiranim s *T. delbrueckii/S. cerevisiae* i to u uzorku crne sorte grožđa s provedbom analize po završetku fermentacije (Belda i sur., 2014) kao i kod ispitivanja bijelih uzoraka vina mjesec dana (Zhang i sur., 2022) ili s analizom četiri mjeseca nakon kraja fermentacije (Belda i sur., 2017).



Slika 13. Koncentracije izoamil-alkohola (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Unatoč tome, rezultati koncentracija izoamil-alkohola nisu dosljedni u sljedećim radovima. Na primjer, to je vidljivo u radu čiji je cilj bio prikazati utjecaj sekvencijalnih fermentacija četiri ne-*Saccharomyces* kvasaca na modulaciju arome vina i pronaći najbolje sojeve koji poboljšavaju senzorska svojstva Rizling vina. U slučaju varijanti Mp, Td, Pk utvrđeno je da će upravo te varijante proizvesti veću koncentraciju ovog spoja od kontrolnog uzorka s time da je *S. cerevisiae* inokuliran 2 dana poslije u slučaju Td i Mp, odnosno 4 dana u slučaju *P. kluyveri* (Dutraive i sur., 2019). Također, spomenute varijacije se javljaju i u istraživanjima koja koriste Mp i Td provedenom na baznom vinu za pjenušce kada je Sc inokuliran 24h nakon inokulacije ne-*Saccharomyces* kvasaca (González-Royo i sur., 2015) ili u slučaju vina Sangiovese 3 dana nakon (Romani i sur., 2020) gdje na kraju analize rezultati pokazuju da će upravo ne-*Saccharomyces* kvasci pokazati višu koncentraciju spoja od čiste kulture (Sc). Mnoga istraživanja (Dennis i sur., 2012; Kalua i Boss, 2010; Kalua i Boss, 2009; García i sur., 2003) su pokazala da se brojni C6 spojevi formiraju tokom ruljanja i muljanja grožđa, pretpostavlja se

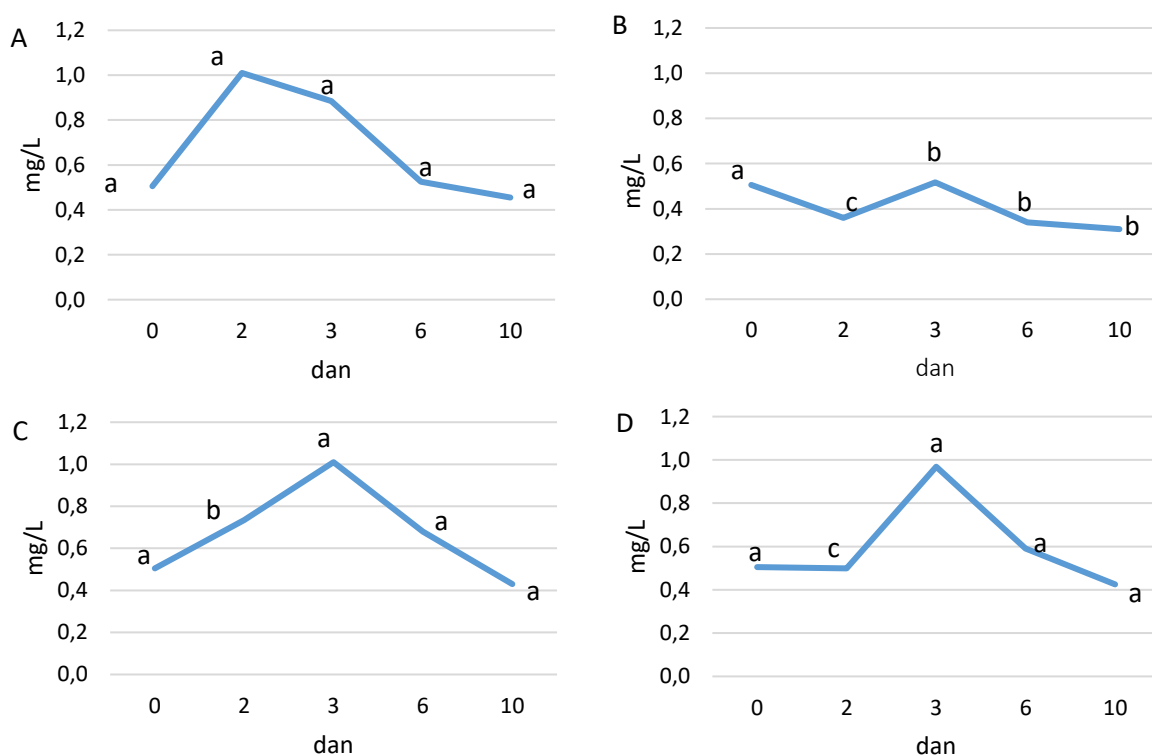
putem aktivnosti lipozigenaze na C18 masne kiseline (Dennis i sur., 2012; Podolyan i sur., 2010; Schwab i sur., 2008). Ti C6 spojevi, među kojima su i *cis*-3-heks-3-en-1-ol (slika 14) te heksan-1-ol (slika 15) pronađeni su u soku grožđa svih ispitivanih sorti u različitim koncentracijama prije same alkoholne fermentacije (Dennis i sur., 2012; Kalua i Boss, 2010; Kalua i Boss, 2009; García i sur., 2003; Nicollini i sur., 1996), što je u skladu i s navedenim rezultatima. Prisustvo ovih komponenti u niskim koncentracijama može značajno doprinijeti kompleksnosti i karakterističnosti nekih vina. Međutim, kada se koncentracija ovih komponenti poveća, pojavljuju se dvostruki nepoželjni učinci: i) neposredan učinak koji dovodi do pojave neželjenih zelenih aroma, te ii) posredan učinak koji može umanjiti poželjne voćne karakteristike kako u bijelim tako i u crnim vinima (Ruiz i sur., 2019), no prema rezultatima na slikama 14 i 15 koncentracije su dovoljno niske da doprinose pozitivnim karakteristikama uzoraka vina. Nadalje, u prvoj točki analize *cis*-3-heks-3-en-1-ola (slika 14) (2. dan) koncentracija spoja raste. Skok koncentracije je najočitiji kod fermentacije čistom kulturom *S. cerevisiae*.



Slika 14. Koncentracije *cis*-3-heks-3-en-1-ola (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Koncentracija *cis*-3-heks-3-en-1-ola značajno varira tijekom različitih vremenskih intervala analize, pri čemu je koncentracija viša u prvim danima analize nego po završetku alkoholne fermentacije. Konkretno, na primjeru posljednjeg dana analize, varijanta Sc pokazuje najvišu koncentraciju *cis*-3-heks-3-en-1-ola, a slijede je ostale varijante (Td, Mp, Pk) s nižim koncentracijama. González-Royo i sur. (2015) potvrđuju da će kontrolni uzorak bijelog vina Macabeo imati višu koncentraciju spoja nakon fermentacije nego varijante s *M. pulcherrimom* i *T. delbrueckii*.

Slika 15 prikazuje promjenu koncentracije heksan-1-ola. Kod svih varijanti uzoraka vidljiva je najmanja koncentracija spoja 10. dan analize i kod varijante Pk kao najmanje. Najznačajnija promjena se očituje nakon 2 dana kod varijante Sc jer je tada koncentracija najviša, a kod ostalih varijanti najviša koncentracija je nakon 3. dana alkoholne fermentacije.

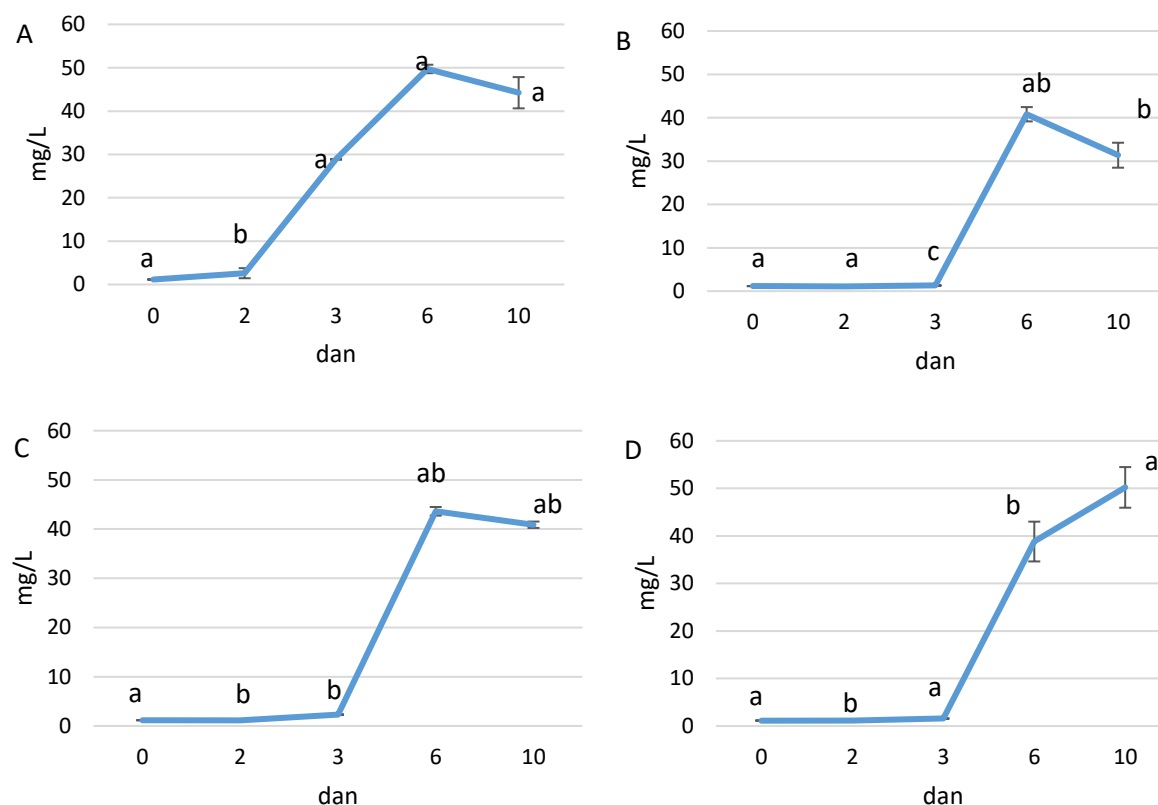


Slika 15. Koncentracije heksan-1-ola (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Isti trend, odnosno najnižu koncentraciju ovog spoja u vinu proizvedenom varijantom Pk utvrdili su i Dutraive i sur. (2019). Međutim, ispitivanjem utjecaja ko-inokulacije *M. pulcherrimom* sa *S. cerevisie* utvrđeno je kako je ta varijanta rezultirala najnižom koncentracijom u usporedbi s kontrolnim uzorkom i uzorkom s *P. kluyveri* (Ge i sur., 2021). Nadalje, dva neovisna istraživanja utjecaja *T. delbrueckii* na kvalitetu vina utvrdila su, slično rezultatima prikazanim na slici 15, da je varijanta Sc rezultirala višim koncentracijama heksan-1-ola od varijante Td (Belda i sur., 2017; Belda i sur., 2014). Također, u ispitivanju tri ne-*Saccharomyces* kvasca (među kojima je i *T. delbrueckii*) dokazuje se isti trend u usporedbi sa čistom kulturom (Sc) (Zhang i sur., 2022). Na temelju slike 15, primjećuje se kako koncentracija heksan-1-ola, kao i *cis*-3-heksan-1-ola (slika 14) pada tijekom alkoholne fermentacije. Ovaj pad koncentracije može se objasniti činjenicom da C6 alkoholi mogu biti potrošeni od strane kvasca tijekom fermentacije (Ilc i sur., 2016; Mauricio i sur., 1997).

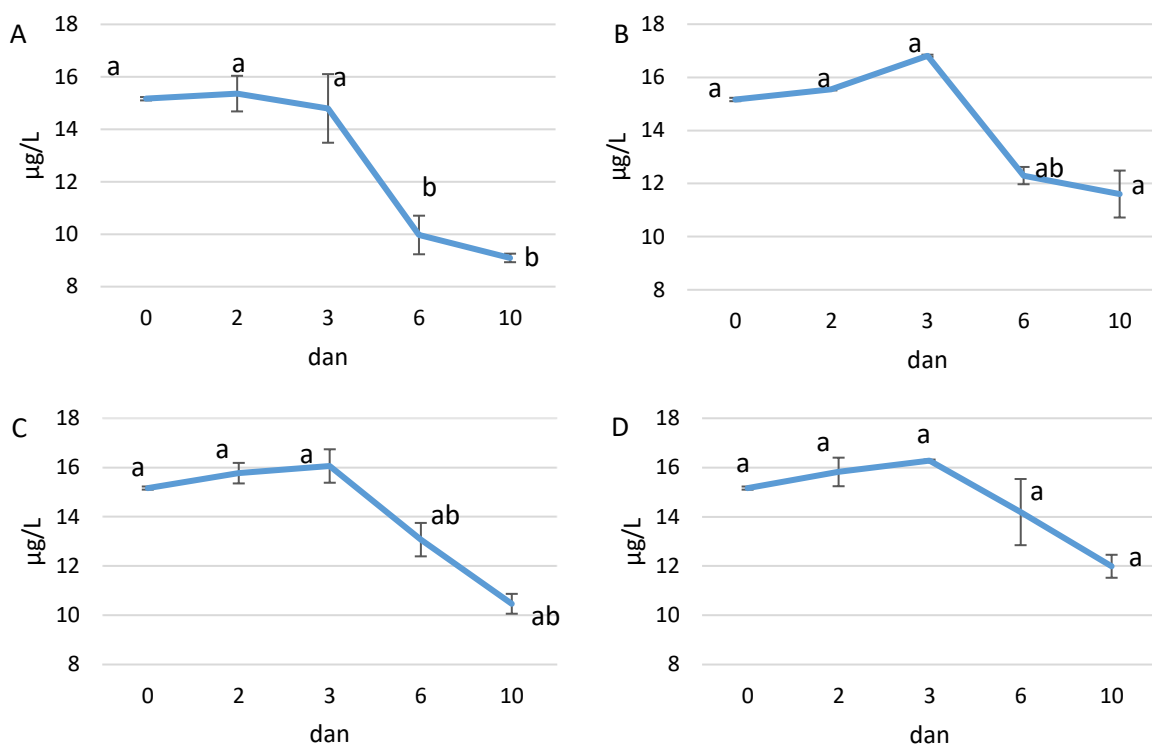
Spoj 2-feniletanol najvažniji je fenolni viši alkohol (Jackson, 2020) koji nastaje iz aromatskih aminokiselina, fenilalanina i tirozina (Robinson i sur., 2014; Rossouw i sur., 2009; Rossouw i sur., 2008). Koncentracija viših alkohola u vinu je općenito puno veća nego u grožđu, što sugerira da je doprinos kvasca veći (Ilc i sur., 2016). Fermentacija s čistom kulturom *S. cerevisiae* brzo pokazuje promjene u toku od 3 dana. Koncentracija spoja raste u svim uzorcima vina tijekom prvih 6 dana analize kada je najviša u uzorcima Sc, Td i Pk. Do 10. dana analize koncentracija se u tim varijantama smanjuje s najnižom u varijanti Pk, dok je kod uzorka Mp koncentracija 10. dana najviša. Slične rezultate, odnosno višu koncentraciju ovog spoja u varijanti Sc u usporedbi s varijantom Td, su dobili i Belda i sur. (2014) koji su istraživali utjecaj navedenih kvasaca na aromu vina Tempranillo. Suprotno tome, u istraživanju potencijala *T. delbrueckii* na opće poboljšanje nekoliko parametara vina, provedenom 4 mjeseca nakon završetka fermentacije, varijanta Td je karakterizirana višom koncentracijom ovog spoja od varijante Sc (Belda i sur., 2017a). Osim toga, kod analize vina proizvedenog sekvencijalnim fermentacijama s ne-*Saccharomyces* kvascima (Mp, Td, Pk), utvrđena je viša koncentracija 2-feniletanola u tim uzorcima u usporedbi s varijantom Sc, što je suprotno trendovima u ovom radu što se tiče uzoraka Td i Pk (Dutraive i sur., 2019). Razlike u rezultatima mogu biti posljedica različitih korištenih sojeva kvasaca te različitim terminu analize, odnosno vremenskom periodu od završetka alkoholne fermentacije. Također, da nepodudaranja u rezultatima mogu biti posljedica različitih sojeva kvasaca dokazuju i Escribano-Viana i sur. (2018). U jednom slučaju, kontrolni uzorak (*S. cerevisiae*) je pokazao veću koncentraciju spoja u usporedbi sa

sekvencijalnom fermentacijom s *M. pulcherrimom*, dok je u drugom slučaju to pokazao s *T. delbrueckii*.



Slika 16. Koncentracije 2-feniletanola (mg/L) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

U konačnici, slika 17 pokazuje varijaciju koncentracije linalola tijekom alkoholne fermentacije. Linalol pozitivno korelira s cvjetnim mirisom, gdje se ističu začinsko-limunski tonovi u vinu (Tufariello i suradnici, 2021; Baron i suradnici, 2017). Tri varijante (Pk, Td, Mp) karakterizira sličan trend promjene koncentracije linalola tijekom alkoholne fermentacije. Koncentracija ovog spoja raste između 2. i 3. dana analize, dosežući najvišu vrijednost koja je viša od početne koncentracije u moštu, osim kada se radi o varijanti Sc koju prati pad koncentracije 3. dan. Međutim, i koncentracija kod ostalih uzoraka počinje opadati 6. i 10. dana, pri čemu varijanta Sc ima najmanju koncentraciju 10. dana.



Slika 17. Koncentracije linalola ($\mu\text{g/L}$) tijekom alkoholne fermentacije mošta Pošip. A) fermentacija čistom *S. cerevisiae* kulturom; B) sekvencijalna fermentacija *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*; C) sekvencijalna fermentacija *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* te D) sekvencijalna fermentacija *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*. ANOVA za usporedbu rezultata; različita slova označavaju statističku razliku između svih analiziranih vina u istom vremenu analize (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

Istraživanjem interakcije između kvasaca na uzorku vina Sauvignon Blanc proizvedenog ko-inokulacijom, potvrđuje se isti uzorak promjene koncentracije linalola tijekom fermentacije vina. Najviša koncentracija linalola zabilježena je nakon završene fermentacije u uzorcima sa sekvencijalnom fermentacijom *M. pulcherrima/S. cerevisiae*, *T. delbrueckii/S. cerevisiae*, te u konačnici kod fermentacije čistom *S. cerevisiae* kulturom (Sadoudi i sur., 2012). Isti trend varijacije koncentracije linalola sa sva tri ne-*Saccharomyces* kvasaca potvrđen je u istraživanju Dutraive i sur. (2019). Također, Ge i sur. (2021) potvrđuju da će nakon fermentacije uzorak čiste kulture (varijanta Sc) pokazati najnižu koncentraciju linalola, pa će je pratiti varijanta *M. pulcherrima/S. cerevisiae* i *P. kluyveri/S. cerevisiae*. Među terpenima, linalol ima ulogu ulogu centralnog metaboličkog monoterpena u grožđu (Ilc i sur., 2016; Boachon i sur., 2015; Hofer i sur., 2014; Ginglinger i sur., 2013). Monoterpeni u grožđu su uglavnom glikozilirani, iako varijacija između uzoraka grožđa može biti visoka. Budući da samo slobodni spojevi mogu utjecati na aromu vina, ova varijabilnost je važna za sorte karakteristike. Glikozidi se mogu

hidrolizirati od strane kvasca tijekom fermentacije (enzimatski) ili mogu biti podvrgnuti kiselinskoj hidrolizi tijekom sazrijevanja vina. Dodatno, linalol ima posebno bogat oksidativni metabolizam te se većina linalola u grožđu oksidira u različite spojeve. Linalol oksigenaze stoga ne utječu samo na aromu vina stvaranjem novih spojeva, već i smanjenjem koncentracije linalola (Ilc i sur., 2016). U kontekstu ove rasprave, može se objasniti zašto dolazi do značajnog smanjenja koncentracije linalola tijekom alkoholne fermentacije.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti da se upotrebom ne-*Saccharomyces* kvasaca u sekvencijalnim fermentacijama sa *S. cerevisiae* može značajno obogatiti aromatski profil vina Pošip.
2. Fermentacija provedena uzorkom čiste kulture *S. cerevisiae* rezultira višim koncentracijama nekih estera (etil-acetat, izoamil-acetat, etil-butirat, etil-dekanoat) i viših alkohola (izoamil-alkohol, *cis*-3-heks-3-en-1-ol, heksan-1-ol).
3. Sekvencijalna fermentacija s *P. kluyveri* proizvodi više koncentracije izobutil-acetata, heksil-acetata, 2-fenil-acetata te izobutanola u usporedbi s ostalim varijantama.
4. Sekvencijalna fermentacija s *M. pulcherrimom* doprinosi višim koncentracijama etil-heksanoata, etil-oktanoata, 2-feniletanola te terpena linalola.
5. Iz analize rezultata može se zaključiti da varijanta *T. delbrueckii* (Td) najčešće pokazuje najmanji doprinos koncentraciji aromatičnih spojeva. Nakon Td, slijedi varijanta *P. kluyveri* (Pk), dok je varijanta *M. pulcherrima* (Mp) u dva slučaja rezultirala najmanjom koncentracijom spojeva (etil-butirat, izobutanol). *S. cerevisiae* (Sc) je često značajnija varijanta s najvišim koncentracijama, naglašavajući svoju prednost u proizvodnji aromatičnih spojeva u usporedbi s drugim varijantama kvasca.
6. Iako svaka varijanta kvasca doprinosi specifičnim karakteristikama vina, za optimalno poboljšanje fermentacijskog procesa i obogaćenje aromatskog profila vina Pošip, varijanta Td bi potencijalno bila najpovoljnija opcija. *T. delbrueckii* se ističe svojom prilagodljivošću i stvaranjem veće populacije stanica tijekom fermentacije, dok čista kultura (Sc) pokazuje najbolju fermentacijsku sposobnost. Stoga, njihova kombinacija može rezultirati vinom Pošip s obogaćenim aromatskim profilom i izraženim karakteristikama koje proizlaze iz oba kvasca. No, konačan izbor varijante kvasca ovisi o preferencijama vinara i željenom stilu vina, uzimajući u obzir arome, karakteristike i stil vina koji se želi postići u vinu Pošip.

6. LITERATURA

Agarbati A, Canonico L, Comitini F, Ciani M (2020) Improved *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Pure and Sequential Fermentation with *Torulaspora delbrueckii* for the Production of Verdicchio Wine with Reduced Sulfites. *Appl Sci* **10**, 6722. <https://doi.org/10.3390/app10196722>

Agnolucci M, Vigentini I, Capurso G, Merico A, Tirelli A, Compagno C, i sur. (2009) Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *Int J Food Microb* **130**, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.025>

Amerine MA, Roessler EB (1983) *Wines, Their Sensory Evaluation*. Freeman, New York

Azzolini M, Tosi E, Lorenzini M, Finato F, Zapparoli, G (2015) Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biot* **31**, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1774-1>

Baron M, Prusova B, Tomaskova L, Kumsta M, Sochor J (2017) Terpene Content of Wine from the Aromatic Grape Variety ‘Irsai Oliver’ (*Vitis vinifera* L.) Depends on Maceration Time. *Open Life Sci* **12**, 42–50. <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0005>

Bartowsky E, Henschke P (2004) The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microb* **96**, 235–252. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013>

Belda I, Navascués E, Marquina D, Santos A, Calderon F, Benito S (2014) Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Appl Microbiol Biot* **99**, 1911–1922. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6197-2>

Belda I, Navascués E, Marquina D, Santos A, Calderón F, Benito S (2016) Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* **33**, 329–338. <https://doi.org/10.1002/yea.3165>

Belda I, Ruiz J, Beisert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F, i sur. (2017a) Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential

fermentations. *Int J Food Microb* **257**, 183-191.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>

Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A, i sur. (2017b) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* **22**, 189. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>

Bell SJ, Henschke PA (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine R* **11**, 242-295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>

Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* **122**, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>

Benito S, Palomero F, Morata A, Calderón F, Suárez-Lepe JA (2009) A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *J Appl Microbiol* **106**, 1743–1751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04137.x>

Benito S, Hofmann T, Laier M, Lochbühler B, Schüttler A, Ebert K, i sur. (2015) Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur Food Res Technol* **241**, 707-717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>

Benito S (2018a) The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl Microbiol Biot* **102**, 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>

Benito S (2018b) The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl Microbiol Biot* **102**, 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>

Benito S (2019) The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Appl Microbiol Biot* **103**, 4291–4312. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09827-7>

Benito S, Ruiz J, Belda I, Kiene F, Beisert B, Navascués E, i sur. (2019) Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. U: Sibirny A (ured.) Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application, Springer, Cham, str. 75–89.

Blanco-Padilla A, Soto KM, Hernández Iturriaga M, Mendoza S (2014) Food antimicrobials nanocarriers. *Sci World J* **2014**, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/837215>

Boachon B, Junker RR, Miesch L, Bassard JE, Höfer R, Caillieaudeau R, i sur. (2015) CYP76C1 (Cytochrome P450)-mediated linalool metabolism and the formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers: a strategy for defense against floral antagonists. *Plant Cell* **27**, 2972–2990. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00399>

Borren E, Tian B (2020) The Important Contribution of Non-*Saccharomyces* Yeasts to the Aroma Complexity of Wine: A Review. *Foods* **10**, 13. <https://doi.org/10.3390/foods10010013>

Böhmer M, Smolák D, Ženišová K, Čaplová Z, Pangallo D, Puškárová A, i sur. (2020) Comparison of microbial diversity during two different wine fermentation processes. *FEMS Microbiol Lett* **367**, 2. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa150>

Canonico L, Comitini F, Ciani M (2018) *Torulaspora delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiol* **74**, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>

Canonico L, Comitini F, Ciani M (2019) *Metschnikowia pulcherrima* Selected Strain for Ethanol Reduction in Wine: Influence of Cell Immobilization and Aeration Condition. *Foods* **8**, 378. <https://doi.org/10.3390/foods8090378>

Capece A, Siesto G, Romaniello R, Lagreca VM, Pietrafesa R, Calabretti A, i sur. (2013) Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT- Food Sci Technol* **54**, 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.001>

Capece A, Romano P (2019) Yeast and Metabolic Impact on Wine Flavour. U: Romano P, Ciani M, Fleet GH (ured.) *Yeast in the Production of Wine*, Springer, New York, str. 44, 58.

Capozzi V, Garofalo C, Chiriatti MA, Grieco F, Spano G (2015) Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol Res* **181**, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>

Carpena M, Pereira AG, Prieto MA, Simal-Gandara J (2020a) Wine aging technology: Fundamental role of wood barrels. *Foods* **9**, 1160. <https://doi.org/10.3390/foods9091160>

Carpena M, Fraga-Corral M, Otero P, Nogueira RA, Garcia-Oliveira P, Prieto MA, i sur. (2020b) Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods* **10**, 51. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>

Castrillo D, Blanco P (2023) Characterization of Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeast Strains with Potential Use in Winemaking. *Front Biosci* **15**, 1. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1501001>

Cavazza A, Versini G, DallaSerra A, Romano F (1989) Characterization of six *Saccharomyces cerevisiae* strains on the basis of their volatile compounds production, as found in wines of different aroma profiles. *Yeast* **5**, 163–167.

Chisholm MG, Guiher LA, Zaczekiewicz SM (1995) Aroma characteristics of aged vidal blanc wine. *Am J Enol Viticult* **46**, 56-62. <https://doi.org/10.5344/ajev.1995.46.1.56>

Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* **10**, 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>

Ciani M, Comitini F (2015) Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science* **1**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>

Ciani M, Capece A, Comitini F, Canonico L, Siesto G, Romano P (2016) Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Front Microbiol* **7**, 1-4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Dutraive O, Benito S, i sur. (2019) Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation* **5**, 79. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030079>

Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, i sur. (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* **28**, 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>

Comitini F, Capece A, Ciani M, Romano P (2017) New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science* **13**, 44–9. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.005>

Contreras A, Curtin C, Varela C (2015) Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl Microbiol Biot* **99**, 1885–1895. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>

Crowell EA, Guymon JF, Ingraham JL (1961) Techniques for studying the mechanism of higher alcohol formation by yeasts. *Am J Enol Viticult* **12**, 111-116. <https://doi.org/10.5344/ajev.1961.12.3.111>.

De La Fuente Blanco A, Sáenz-Navajas MP, Ferreira V (2020) Wine aroma vectors and sensory attributed. U: Reynolds AG (ured.) *Managing wine quality*, 2 izd., Woodhead Publishing, Cambridge, str. 1–20.

Deak T, Beuchat LR (1996) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, New York.

Denat M, Pérez D, Heras JM, Querol A, Ferreira V (2021) The effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains carrying alcoholic fermentation on the fermentative and varietal aroma profiles

of young and aged Tempranillo wines. *Food Chem* **9**, 100116. <https://doi.org/10.1128/aem.03780-13>

Dennis EG, Keyzers RA, Kalua CM, Maffei SM, Nicholson EL, Boss PK (2012) Grape Contribution to Wine Aroma: Production of Hexyl Acetate, Octyl Acetate, and Benzyl Acetate during Yeast Fermentation Is Dependent upon Precursors in the Must. *J Agr Food Chem* **60**, 2638-2646. <https://doi.org/10.1021/jf2042517>

Dizzy M, Bisson LF (2000) Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *Am J Enol Viticult* **51**, 155-167. <https://doi.org/10.5344/ajev.2000.51.2.155>

Ehrlich F (1904) Uber das naturliche Isomere des Leucins. *Ber Dtsch Chem Ges* **37**, 1809–184. <https://doi.org/10.1002/cber.19040370295>

Escribano R, González-Arenzana L, Garijo P, Berlanas C, López-Alfaro I, López R, i sur. (2017) Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *J Food Sci Technol* **54**, 1555–1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>

Escribano-Viana R, González-Arenzana L, Portu J, Garijo P, López-Alfaro I, López R, i sur. (2018) Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeast. *Food Res Int* **112**, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>

Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**, 11–22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9)

Forde CG, Cox A, Williams ER, Boss PK (2011) Associations between the sensory attributes and volatile composition of Cabernet Sauvignon wines and the volatile composition of the grapes used for their production. *J Agr Food Chem* **59**, 2573–2583. <https://doi.org/10.1021/jf103584u>

Francis IL, Newton JL (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Aust J Grape Wine R* **11**, 114-126. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x>

Fugelsang KC, Edwards, CG (2007) Wine Microbiology Practical Application and Procedures, 2. izd., Springer, New York, str. 85.

García A, Carcel C, Dulau L, Samson A, Aguera E, Agosin E, i sur. (2002) Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J Food Sci* **67**, 1138–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09466.x>

García M, Esteve-Zarzoso B, Cabellos JM, Arroyo T (2020) Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine. *Fermentation* **6**, 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020060>

Ge Q, Guo C, Zhang J, Yan Y, Zhao D, Li C, i sur. (2021) Effects of Simultaneous Co-Fermentation of Five Indigenous Non-*Saccharomyces* Strains with *S. cerevisiae* on Vidal Icewine Aroma Quality. *Foods* **10**, 1452. <https://doi.org/10.3390/foods10071452>

Ginglinger JF, Boachon B, Höfer R, Paetz C, Köllner TG, Miesch L, i sur. (2013) Gene coexpression analysis reveals complex metabolism of the monoterpene alcohol linalool in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **25**, 4640–4657. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117382>

Giucidi P, Romano P, Zambonelli C (1990) A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* **36**, 62–5. <https://doi.org/10.1139/m90-012>

Gobbi M, Comitini F, D'Ignazi G, Ciani M (2013) Effects of nutrient supplementation on fermentation kinetics, H₂S evolution, and aroma profile in Verdicchio DOC wine production. *Eur Food Res Technol* **236**, 145-154. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1870-0>

González-Jiménez MC, Moreno-García J, García-Martínez T, Moreno JJ, Puig-Pujol A, Capdevilla F, i sur. (2020) Differential Analysis of Proteins Involved in Ester Metabolism in two *Saccharomyces cerevisiae* Strains during the Second Fermentation in Sparkling Wine Elaboration. *Microorganisms* **8**, 403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030403>

González-Royo E, Pascual O, Kontoudakis N, Esteruelas M, Esteve-Zarzoso B, Mas A, i sur. (2015) Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts

(*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur Food Res Technol* **240**, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>

Grando MS, Versini, G, Nicolini G, Mattivi F (1993) Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis* **32**, 43–50.

Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk P (1998) Selective effects of sulphur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol* **84**, 865–876. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00423.x>

Henschek PA, Jiranek V (1993) Yeast metabolism of nitrogen compounds. U: Fleet GH (ured.) Wine microbiology and biotechnology, Harwood Academic Publishers, Oxford, str. 77–163.

Hofer R, Boachon B, Renault H, Gavira C, Miesch L, Iglesias J, i sur. (2014) Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiol* **166**, 1149–1161. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244814>

Howell KS, Cazzolino D, Bartowsky EJ, Fleet GH, Henschke PA (2006) Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Res* **6**, 91-101. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00010.x>

Ilc T, Werck-Reichhart D, Navrot N (2016) Meta-Analysis of the Core Aroma Components of Grape and Wine Aroma. *Front Plant Sci* **7**, 1472. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01472>

Iriti M, Faoro F (2006) Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Med Hypotheses* **67**, 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.03.049>

Ivandija T (2008) Autohtone vinske sorte. *Glasnik zaštite bilja* **6**, str. 117-118.

Ivit NN, Longo R, Kemp B (2020) The Effect of Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces Non-cerevisiae* Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine. *Fermentation* **6**, 77. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030077>

Jackson RS (2020) Wine Science Principles and Applications, 5. izd., Academic Press, London, str. 494-497, 510-511.

Jeromel A, Jagatić Korenika AM, Tomaz I (2019) An Influence of Different Yeast Species on Wine Aroma Composition. U: Grumezescu AM, Holban AMBT-FB (ured.) Fermented Beverages, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 171–285.

Jolly N, Augustyn O, Pretorius I (2003) The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S Afr J Enol Vitic* **24**, 55–62. <https://doi.org/10.21548/24-2-2638>

Jolly NP, Varela C, Pretorius IS (2014) Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res* **14**, 215–237. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>

Kalua CM, Boss PK (2009) Evolution of volatile compounds during the development of Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). *J Agr Food Chem* **57**, 3818–3830. <https://doi.org/10.1021/jf803471n>

Kalua CM, Boss PK (2010) Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Aust J Grape Wine R* **16**, 337–348. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00096.x>

King ES, Swiegers JH, Travis B, Francis IL, Bastian SEP, Pretorius IS (2008) Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wines. *J Agr Food Chem* **56**, 10829–10837. <https://doi.org/10.1021/jf801695h>

Komes D, Ulrich D, Kovačević Ganić K, Lovrić T (2007) Study of phenolic and volatile composition of white wine during fermentation and a short time of storage. *Vitis* **46**, 77-84. <https://doi.org/10.5073/vitis.2007.46.77-84>

Lachenmeier D, Sohnius E-M (2008) The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. *Food Chem Toxicol* **46**, 2903–2911. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.034>

Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S Afr J Enol Vitic* **21**, 97–129. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo L (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am J Enol Viticult* **47**, 206–216. <https://doi.org/10.5344/ajev.1996.47.2.206>

Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microb* **66**, 744–753. <https://doi.org/10.1128/aem.66.2.744-753.2000>

Liu S-Q, Piloni G (2000) An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sci Tech* **35**, 49–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00341.x>

Liu Y, Rousseaux S, Tourdot-Maréchal R, Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt-Kopplin P, et al. (2017) Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Crit Rev Food Sci* **57**, 856–73. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>

Llaurado JM, Rozes N, Constanti M, Mas A (2005) Study of some *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking after preadaptation at low temperatures. *J Agric Food Chem* **53**, 1003–11. <https://doi.org/10.1021/jf049324n>

Maicas S (2020) The Role of Yeast in Fermentation Processes. *Microorganisms* **8**, 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>

Mauricio JC, Moreno JJ, Valero EM, Zea L, Medina M, Ortega JM (1993) Ester Formation and Specific Activities of in Vitro Alcohol Acetyl Transferase and Esterase by *Saccharomyces Cerevisiae* during Grape Must Fermentation. *J Agr Food Chem* **41**, 2086–2091. <https://doi.org/10.1021/jf00035a050>

Mauricio JC, Moreno J, Zea L, Ortega JM, Medina M (1997) The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Sci Food Agr* **75**, 155–160. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199710\)75:2%3C155::AID-JSFA853%3E3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199710)75:2%3C155::AID-JSFA853%3E3.0.CO;2-S)

Malcorps P, Dufour JP (1992) Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **210**, 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17507.x>

Maturano YP, Mestre MV, Kuchen B, Toro ME, Mercado LA, Vazquez F, i sur. (2019) Optimization of fermentation relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *Int J Food Microbiol* **289**, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.016>

Medina-Trujillo L, González-Royo E, Sieczkowski N, Heras J, Canals JM, Zamora F (2017) Effect of sequential inoculation (*Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine. *Eur Food Res Technol* **243**, 681–688. <http://dx.doi.org/10.1051/bioconf/20160702024>

Mendoza L, Farías ME (2010) Improvement of wine organoleptic characteristics by non-*Saccharomyces* yeasts. *Appl Microbiol* **2**, 908–919.

Mina M, Tsaltas D (2017) Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour. U: Morata A, Loira I (ured.) Yeast – Industrial Applications, Intech, Madrid, str. 123.

Morata A (2022) White wine technology, Academic Press, London, str. 123, 139.

Moreno J, Peinado R (2012) *Enological Chemistry*, (preveli Murray i Patten), Academic Press, Madrid, str.21, 27, 41-45, 159, 175-176.

Muñoz D, Peinado RA, Medina M, Moreno J (2006) Higher alcohols concentration and its relation with the biological aging evolution. *Eur Food Res Technol* **222**, 629–635. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0161-4>

Nicolini G, Versini G, Amadei E, Marchio M (1996) 3-Hexen-1-ol isomers in Muller-Thurgau wines: A “varietal” characteristic affected by must sulfiting time. *Vitis* **35**, 147–148. <https://doi.org/10.5073/vitis.1996.35.147-148>

Nissen P, Nielsen D, Arneborg N (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell-contact-mediated mechanism. *Yeast* **20**, 331-341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>

Nykänen L (1986) Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Viticult* **37**, 84–96. <https://doi.org/10.5344/ajev.1986.37.1.84>

Oliveira I, Ferreira V (2019) Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using non-*Saccharomyces* Yeasts in a Sequential Inoculation Approach. *Microorganisms* **7**, 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>

Padilla B, Gil JV, Manzanares P (2016) Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front Microbiol* **7**, 411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>

Perestrelo R, Silva C, Gonçalves C, Castillo M, Câmara JS (2020) An approach of the madeira wine chemistry. *Beverages* **6**, 12. <https://doi.org/10.3390/beverages6010012>

Petruzzi L, Capozzi V, Berbegal C, Corbo MR, Bevilacqua A, Spano G, i sur. (2017) Microbial Resources and Enological Significance: Opportunities and Benefits. *Front Microbiol* **8**, 995. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00995>

Pérez-Prieto LJ, de la Hera-Orts ML, López-Roca JM, Fernández-Fernández JI, Gómez-Plaza E (2003) Oak-matured wines: influence of the characteristics of the barrel on wine colour and sensory characteristics. *J Sci Food Agr* **83**, 1445–1450. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1551>

Plata MC, Mauricio JC, Millán C, Ortega JM (1998) In Vitro Specific Activity of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in Two Flor Yeast Strains during Biological Aging of Sherry Wines. *J Ferment Bioeng* **85**, 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80079-2](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80079-2)

Plata MC, Mauricio JC, Millán C, Ortega JM (2005) Influence of Glucose and Oxygen on the Production of Ethyl Acetate and Isoamyl Acetate by a *Saccharomyces Cerevisiae* Strain during Alcoholic Fermentation. *World J Microb Biot* **21**, 115–121. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2780-5>

Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C (2010) Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Funct Plant Biol* **8**, 767–784. <https://doi.org/10.1071/FP09271>

Puertas B, Jiménez MJ, Cantos-Villar E, Cantoral JM, Rodríguez ME (2017) Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. *J Appl Microbiol* **122**, 733–746. <https://doi.org/10.1111/jam.13375>

Ramey DD, Ough CS (1980) Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *J Agr Food Chem* **28**, 928–934. <https://doi.org/10.1021/jf60231a021>

Rapp A, Mandery H (1986) Wine Aroma. *Experientia* **42**, 873-884. <https://doi.org/doi:10.1007/BF01941764>

Regodón Mateos JA, Pérez-Nevado F, Ramírez Fernández M (2006) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme Microb Tech* **40**, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.048>

Rementería A, Rodríguez JA, Cadaval A, Amenabar R, Muguruza JR, Hernando FL, i sur. (2003) Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *Int J Food Microbiol* **86**, 201–7. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00289-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00289-7)

Renault P, Coulon J, de Revel G, Barbe JC, Bely M (2015) Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int J Food Microbiol* **207**, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>

Renault P, Coulon J, Moine V, Thibon C, Bely M (2016) Enhanced 3-Sulfanylhexas-1-ol Production in Sequential Mixed Fermentation with *Torulasporea delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Situation of Synergistic Interaction between Two Industrial Strains. *Front Microbiol* **7**, 293. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>

Robinson AL, Boss PK, Solomon PS, Trengove RD, Heymann H, Ebeler SE (2014) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am J Enol Viticult* **65**, 1-24. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>

Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC (2010) Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int J Food Microbiol* **138**, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.025>

Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int J Food Microb* **70**, 283–289. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00552-9)

Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P (2003) Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microb* **86**, 181-188. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00255-1)

Romani C, Lencioni L, Biondi Bartolini A, Ciani M, Mannazzu I, Domizio P (2020) Pilot Scale Fermentations of Sangiovese: An Overview on the Impact of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts. *Fermentation* **6**, 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030063>

Romano P, Suzzi G (1996) Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Appl Environ Microb* **62**, 309–315. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>

Romano P, Braschi G, Siesto G, Patrignani F, Lanciotti R (2022) Role of Yeasts on the Sensory Component of Wines. *Foods* **11**, 1921. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>

Rossouw D, Olivares-Hernandes R, Nielsen J, Bauer FF (2009) Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. *Appl Environ Microb* **75**, 6600–6612. <https://doi.org/10.1128/aem.01251-09>

Rossouw D, Næs T, Bauer FF (2008) Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* **9**, 530. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-530>

Roudil L, Russo P, Berbegal C, Albertin W, Spano G, Capozzi V (2020) Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* **11**, 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>

Ruiz J, Belda I, Beisert B, Navascués E, Marquina D, Calderón F, i sur. (2018) Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>

Ruiz J, Kiene F, Belda I, Fracassetti D, Marquina D, Navascués E, i sur. (2019) Effects on varietal aromas during wine making: A review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl Microbiol Biot* **103**, 7425–7450. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10008-9>

Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, i sur. (2012) Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol* **32**, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>

Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microb* **74**, 454–461. <https://doi.org/10.1128/aem.01616-07>

Salvadores M, Díaz ME, Cardell E (1993) Levaduras autoctonas aisladas en vinos de Tenerife y su influencia en las concentraciones de acetato de etilo y alcoholes superiores analizados por cromatografía de gases. *Microbiologia* **9**, 107-112.

Schreier P, Jennings WG (1979) Flavor composition of wines: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **12**, 59–111. <https://doi.org/10.1080/10408397909527273>

Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J* **54**, 712–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03446.x>

Shi WK, Wang J, Chen FS, Zhang XY (2019) Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Sci Technol* **116**, 108477. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108477>

Styger G, Prior B, Bauer FF (2011) Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biot* **38**, 1145-1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine R* **11**, 139-173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>

Tominaga T, Darriet P, Dubourdieu D (1996) Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis-geilweilerhof* **35**, 207-210. <https://doi.org/10.5073/vitis.1996.35.207-210>

Tufariello M, Frangasso M, Pico J, Panighel A, Castellarin SD, Flamini R, i sur. (2021) Influence of Non-*Saccharomyces* on Wine Chemistry: A Focus on Aroma-Related Compounds. *Molecules* **26**, 644. <https://doi.org/10.3390/molecules26030644>

Van Wyk N, Grossmann M, Wendland J, Von Wallbrunn C, Pretorius IS (2019) The Whiff of Wine Yeast Innovation: Strategies for Enhancing Aroma Production by Yeast during Wine Fermentation. *J Agric Food Chem* **67**, 13496–13505. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06191>

Varela C, Sengler F, Solomon M, Curtin C (2016) Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem* **209**, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>

Varela C, Borneman AR (2017) Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast* **34**, 111–128. <https://doi.org/10.1002/yea.3219>

Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Vanderhaegen BMP, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS, et al. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microb* **69**, 5228–5237. <https://doi.org/10.1128/aem.69.9.5228-5237.2003>

Vicente J, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S (2021) High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *Int J Mol Sci* **22**, 1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>

Visser W, Scheffers WA, Batenburg-Van Der Vegte WH, Van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microb* **56**, 3785–3792. <https://doi.org/10.1128/aem.56.12.3785-3792.1990>

Winterhalter P, Gök R (2013) TDN and β -damascenone: Two important carotenoid metabolites in wine. *ACS Sym Ser* **1134**, 125–137. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch011>

Walker GM, Stewart GG (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* **2**, 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

Xu W, Liu B, Wang C, Kong X (2019) Organic cultivation of grape affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. *Lwt-Food Sci Technol* **120**, 108894. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108894>

Zhang B, Xu D, Duan C, Yan G (2020) Synergistic effect enhances 2-phenylethyl acetate production in the mixed fermentation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* **90**, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.007>

Zhang B, Tang C, Yang D, Liu H, Xue J, Duan C (2022) Effects of three indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and their pairwise combinations in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* on volatile compounds of Petit Manseng wines. *Food Chem* **368**, 130807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130807>

Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS (1995) Wine analysis and production. The Chapman & Hall Enology Library, New York.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MARGARETA JEREČIĆ izjavljujem da je 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.



Vlastoručni potpis