

Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju kvasca *Brettanomyces* u vinu

Stazić, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:824400>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ema Stažić

6636/PT

Utjecaj ultrazvuka na inaktivaciju kvasca iz
roda *Brettanomyces* u vinu
ZAVRŠNI RAD

Projekt: Novi enološki postupci kao alternativa sumpornom dioksidu u proizvodnji visokokvalitetnih vina

Mentor: Doc. dr. sc. Leo Gracin

Zagreb, 2017.

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA NA INAKTIVACIJU KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES* U VINU

Emma Stažić, 0058202376

Sažetak:

Od samih početaka proizvodnje vina prisutno je smanjenje kvalitete i kvarenje vina. U današnjem vinarstvu najznačajniji uzročnik kvarenja crnih vina je vrsta kvasca *Brettanomyces bruxellensis*. Ekonomska šteta koju prouzrokuje navedeni rod mjeri se u milijunima američkih dolara. *Brettanomyces spp.* razvija se vrlo sporo i teško je uočiti da je vino inficirano. *Brettanomyces* vrste mogu sintetizirati hlapive fenolne spojeve kao što su 4-etilfenol i 4-etilgvajakol koji vinu daje prepoznatljiviji "brett" miris što djeluje negativno na vino. U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visoke snage u kombinaciji sa povišenom temperaturom (termosonifikacija), a tretman je proveden u trajanju od 1,2 i 3 minute uz održavanje temperature od 43 °C. Učinak inaktivacije kvasca određen je praćenjem rasta kolonija kvasca *B. bruxellensis* na selektivnim podlogama. Senzorske promjene vina praćene su Triangl testom. Tretman ultrazvukom visoke snage u kombinaciji sa povišenom temperaturom uzrokuje djelomičnu inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* u vinu s 14 vol. % alkohola pri čemu ne utječe na senzorske karakteristike vina. Različiti pH u vinu s 14 vol % alkohola nema utjecaja na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* dok prisutnost šećera u vinu s 14 vol % alkohola utječe na smanjenje inaktivacije ovog kvasca kod pH 3,7 i 3,9.

Ključne riječi: kvasac *Brettanomyces bruxellensis*, termosonifikacija, kvarenje vina, inaktivacija kvasca

Rad sadrži: 31 stranicu, 9 slika, 8 tablica, 42 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Leo Gracin

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Stela Križanović, suradnik

Datum obrane: 19. rujna 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE INFLUENCE OF ULTRASOUND ON INACTIVATION OF *BRETTANOMYCES* YEAST IN WINE

Ema Stažić, 0058202376

Abstract:

In present-day enology the most significant cause of wine spoilage is *Brettanomyces bruxellensis* yeast. The economical damage caused by the above-mentioned yeast is valued in millions of US dollars. *Brettanomyces bruxellensis* yeast develops very slowly and there are no visible signs that the wine is infected. It can synthesize volatile phenolic compounds like 4-ethyl phenol and 4-ethyl guaiacol, which give wine recognizable "brett" flavor which has a negative on wine. In this work, the influence of high power ultrasound in combination with high temperature was examined. Ultrasound was applied in durations of 1,2 and 3 minutes while the samples were preheated at 43°C. Inactivation of yeast was monitored by inoculation of wine samples on a selective medium. Sensory characteristics of wine were determined using the Triangle test. High power ultrasound combined with high temperature (termosonification) caused partial inactivation of *B. bruxellensis* yeast in wine with 14 vol. % alcohol without affecting its sensory characteristics. Variation in the pH in wine has no effect on inactivation of *Brettanomyces* yeast. The addition of sugar in wine caused lower inactivation of *Brettanomyces* yeast at pH 3,7 and 3,9 of wine.

Key words: *Brettanomyces bruxellensis* yeast, , termosonification , wine spilage, yeast inactivation

Thesis contains: 31 page, 9 figures, 8 tables, 42 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Doc. dr. sc. Leo Gracin

Technical support and assistance: Dr. sc. Stela Križanović, assistant

Defence date: September 19th 2017

SADRŽAJ

SADRŽAJ	5
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Povijest i sistematika kvasca <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2
2.1.1. Parametri važni za rast kvasca <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2
2.1.2. Supstrati za rast kvasca roda <i>Brettanomyces</i>	3
2.2. Mogućnosti zaraze vina kvascem <i>B. bruxellensisom</i>	4
2.2.1. Najvažniji nepoželjni metaboliti kvasca <i>B. Bruxellensis</i> u vinu	5
2.2.2. Ostali nepoželjni metaboliti kvasca <i>B. Bruxellensis</i> u vinu.....	7
2.3. Sprječavanje rasta kvasca <i>B. Bruxellensis</i> u vinu	7
2.3.1. Upotreba SO ₂	8
2.3.2. Upotreba dimetildikarbonata i polivinilpolipirolidona	8
2.3.2. Upotreba alternativnih metoda	9
2.3.4. Upotreba ultrazvuka	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Mikroorganizam <i>B. bruxellensis</i>	12
3.1.2. Vino	12
3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga.....	12
3.1.4. Hranjive podloge	13
3.1.5. Otopine	14
3.1.6. Instrumenti	14
3.1.7. Laboratorijsko posuđe i pribor	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Čuvanje i održavanje kvasca <i>B. bruxellensis</i>	15
3.2.2. Uzgoj inokuluma.....	15
3.2.3. Priprema vina za tretman termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom).....	15
3.2.4. Tretman termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom)	16
3.2.5. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika vina	18
3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca <i>B. bruxellensis</i>	18
3.2.7. Senzorsko ocjenjivanje tretiranih vina prema Triangl testu.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

U današnje vrijeme poznat je veliki broj mikroorganizama, kako kvasaca tako i bakterija tako te plijesni koji svojom prisutnošću u vinu utječu na njegova organoleptička svojstva. Vino, kao proizvod koji se dobiva fermentacijom grožđa odnosno alkoholnim vrenjem pri čemu kvasac koristi šećer iz grožđa za pretvorbu u alkohol i ugljični dioksid, rezultira kompleksnim sastavom te različitim organoleptičkim svojstvima. Ovisno o karakteristikama grožđa kao sirovine, udjelu šećera u plodu, tlu na kojem je vinova loza rasla, klimatskim uvjetima, načinu obrade tla i uzgoja, kemijskim i fizikalnim parametrima procesa fermentacije te samom skladištenju proizvoda razlikovat će se i kemijski sastav proizvedenog vina a ovisno o tome i podložnost kvarenju.

Kvarenje vina očituje se u promjenama mirisa vina na plastiku, spaljeno, drugim riječima enolozi takav miris nazivaju "brett" mirisom. Kvasac koji uzrokuje "brett" miris pripada rodu *Brettanomyces* ili *Dekkera*. Kao i ostale vrste kvasaca, nalazi se u sklopu mikroflore bobice grožđa. Ova vrsta kvasca ima značajnu ulogu u kvarenju vina, posebice u promjeni organoleptičkih svojstava vina. Pojava kvasca *Brettanomyces* češće je zabilježena u crnim vinima čuvanim u drvenim bačvama a sam kvasac je prvi put identificiran i izoliran 1904. godine u britanskoj pivarskoj industriji, otkud mu potječe naziv.

Ovaj rad proveden je s ciljem inaktivacije kvasca *B. bruxellensis* ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom (termosonifikacija) te je pritom istraženo kako promjene u kemijskom sastavu vina kao što su različiti pH te prisutnost šećera utječu na uspješnost inaktivacije kvasca *B. bruxellensis* u crnom vinu s 14 vol. % etanola. Također su provedeni testove kojima je utvrđeno postoji li utjecaj termosonifikacije na senzorske karakteristike vina (triangl test).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Povijest i sistematika kvasca *Brettanomyces bruxellensis*

Kvasac *Brettanomyces bruxellensis*. je dobio ime od grčke riječi *brettano* (britansko) i *myces* (gljiva) (Licker i sur., 1999)

1964. godine Nellie Margarethe Stelling-Dekkere promatrala je stvaranje askospora pri čemu je u taksonomiju uključen i naziv *Dekkera* koji je sporogeni oblik *Brettanomyces*.

Danas rodu *Brettanomyces/Dekkera* pripada 5 vrsta: *B. custersianus*, *B. naardensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* i *B. bruxellensis* (Smith, 1998a, 1998 b) a vrsta koja se najviše povezuje sa proizvodnjom vina je *B. bruxellensis* (Egli i Henick-Kling, 2001). *B. bruxellensis* spada u rod *Brettanomyces*, obitelj *Saccharomycetaceae*, red *Saccharomycetales*, razred *Saccharomycetes*, podkoljeno *Saccharomycotina*, koljeno *Ascomycota* i carstvo *Fungi* (gljive) (Grba, 2010).

Brettanomyces bruxellensis jedan je od nekoliko članova kvasca roda *Brettanomyces* koje je 1904. godine prvi put klasificirao Niels Hjelte Claussen u pivovari Carlsberg. Claussen je istraživao *Brettanomyces bruxellensis* kao uzrok finog okusa engleskog piva te utvrdio kako je nakon završene fermentacije s kvascem *Saccharomyces* započela druga sporija fermentacija koju je provodio *B. bruxellensis*. Claussen je 17. svibnja 1904. prijavio kvasac pod američkim patentnim prijavnim brojem: US1904208464A za "proizvodnju piva i pića od slada". Patent je odobren 20. veljače 1906. *B. bruxellensis* se tek 40.-ih godina 20. stoljeća počeo povezivati s vinima (Oelfse i sur., 2008), a tijekom devedesetih godina nekoliko studija se usredotočilo na *B. bruxellensis* i njegovu proizvodnju hlapivih fenola nakon čega je ta vrsta opisana kao jedina uključena u proizvodnju 4-etilfenola i 4-etilgvajakola (Wedral i sur., 2010). Kvasac *B. Bruxellensis* može biti prisutan na zidovima vinarije i opremi koja se koristi u vinariji, a često se nalazi i na koži voća. Stanice tog kvasca su ovalnog ili elipsoidnog oblika a nakon nekoliko mjeseci inkubacije morfologija stanica postaje razgranata (Wedral i sur., 2010).

2.1.1. Parametri važni za rast kvasca *Brettanomyces bruxellensis*

Kvasac *B. bruxellensis* iznimno se uspješno prilagodio mnogim nepovoljnim uvjetima rasta te prilikom alkoholne fermentacije pokazuje bolju sposobnost preživljavanja od drugih kvasaca koji ne pripadaju rodu *Saccharomyces*. Dobro podnosi visoke koncentracije etanola, niski pH i

okolinu osiromašenu dušikom jer može koristiti amonijeve i nitratne ione kao izvor dušika. Dodatak amonijevog sulfata, biotina te tiamina potiče rast kvasca (Conterno i sur., 2006).

Kisik

Ovaj kvasac je fakultativni anaerob (Rozpedowska i sur., 2011) te mu nije nužan respiratorni lanac za preživljavanje, no u potpuno aerobnim uvjetima razmnožava se brže i povećana je proizvodnja octene kiseline, dok je proizvodnja etanola nešto niža. Ukoliko se količina kisika smanji tj. kada uvjeti postanu semiaerobni smanjuje se količina nastale octene kiseline (Ciani i Ferraro, 1997). Dobro raste u vinima koja se čuvaju u hrastovim bačvama jer sadrže mikropore kroz koje je omogućen ulazak kisika što poboljšava rast kvasca, dok je taj rast posebno izražen u starim bačvama zbog nemogućnosti provođenja potpune sterilizacije (Louriero i sur., 2006).

Temperatura

Za rast kvasca *B. bruxellensis* optimalna temperatura je između 19 i 35 °C, dok je usporen rast na 37-42 °C, a nema sposobnosti rasta na temperaturama iznad 45 °C. Također se smatra da niske temperature od 10 do 15 °C inhibiraju rast (Benito i sur., 2009).

pH

B. bruxellensis dobro podnosi niski pH i tek ispod pH 3,5 dolazi do inhibicije rasta.

Sumporni dioksid

Jedna od karakteristika *Brettanomyces* je izrazita otpornost na uobičajene koncentracije sumpornog dioksida koje se upotrebljavaju u vinarstvu. Količina sumpornog dioksida koja djelotvorno inhibira rast je 0,8 ppm.

Etanol

B. bruxellensis može podnijeti visoke koncentracije etanola od 10-14%.

Tlak

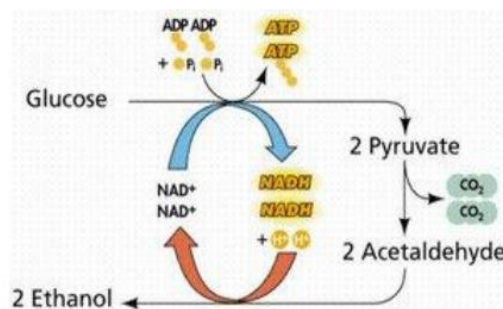
Povećani tlakovi su obično učinkoviti u inhibiranju aktivnosti kvasca no utvrđeno je da *B. bruxellensis* raste i u pjenušavim vinima i gaziranim pićima što dokazuje njegovu otpornost na visoke tlakove.

2.1.2. Supstrati za rast kvasca roda *Brettanomyces*

Poput većine kvasaca, mogućnost supstrata koje *Brettanomyces bruxellensis* može iskoristiti kao izvor šećera kreće se u širokom rasponu te tako većina izolata *Brettanomyces* može koristiti heksozne monosaharide kao što su glukoza, fruktoza ili galaktoza, a također i disaharide kao što su saharoza, maltoza, celubioza i trehaloza. Ostali šećeri kao što su

arabinoza (monosaharid), laktoza (disaharid) i rafinoza (trisaharid) ne podržavaju rast većine izolata kao ni šećerni alkoholi adonitol, glicerol i manitol. Kada se *Brettanomyces* nađe na podlozi koju može iskoristiti za rast, pretvara šećer u manje molekule koje koristi kao izvor energije ili kao gradivne blokove za sintezu drugih molekula. Kvasac će tako iskoristiti dvije molekule piruvata koje su nastale iz jedne molekule glukoze te će ih ovisno o uvjetima upotrijebiti za fermentaciju ili respiraciju. Analizom parametara rasta i metabolizma ugljika različitih izolata kvasca *Brettanomyces bruxellensis* dokazana je proizvodnja etanola u aerobnim uvjetima ako je prisutna dovoljna količina šećera u mediju, te sposobnost rasta bez prisustva kisika. *B. bruxellensis* kao i *S. cerevisiae* spada u "Crabtree" pozitivne kvasce te mogu provoditi fermentaciju u aerobnim uvjetima (Woolfit i sur., 2007). Ovisno o uvjetima i dostupnim prekursorima, uz etanol, može proizvoditi i octenu kiselinu pridonoseći hlapivoj kiselini vina, te male količine glicerola (Rozpedowska i sur., 2011). Kvasac *Brettanomyces* može rasti i tijekom starenja vina a čak i nakon punjenja u boce (Froudiere i Larue, 1998).

Alkoholna fermentacija



Slika 1. Alkoholna fermentacija (Anonymus, 2014)

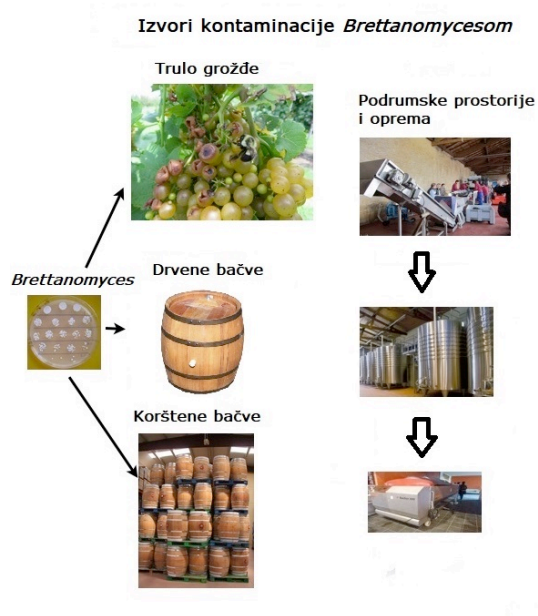
2.2. Mogućnosti zaraze vina kvascem *B. bruxellensis*

Rast *Brettanomyces* / *Dekkera* u vinu povezan je s različitim oblicima kvarenja a samo podrijetlo *Brettanomyces* u vinu može biti iz vinograda ili iz podruma i podrumskog suđa, posebno drvenih bačava. U vinogradu ovaj kvasac dolazi u sklopu prirodne mikroflore bobice, no u većim populacijama se pojavljuje na grožđu zaraženom truleži te tako zaraženim grožđem dolazi do veće kontaminacije podrumskih prostorija. Vino koje je zaraženo ovim kvascem karakterizira životinjski miris, miris po konjskom znoju, štali, miris po mišu, medicinski ili miris po dimu.

Također, prema različitim genetskim i fiziološkim karakteristikama različiti sojevi *B. bruxellensis* sa različitih zemljopisnih područja neće pokazivati isti potencijal kvarenja (Cocolin i sur., 2004).

Nekoć se smatralo da je glavni izvor zaraze neadekvatno održavana podrumaska oprema, a glavni prijenosnik vinska mušica. Međutim, prema novijoj literaturi, drvo bačava je najčešći izvor zaraze zbog svoje hrapave strukture i zaostalog šećera u njima.

S obzirom na sporu dinamiku razvoja u vinu i otpornost na uobičajene koncentracije SO₂, kontrola *Brettanomyces* je otežana u podrumu. Kad se jednom "uvuče" u podrum, vrlo ga se teško riješiti.



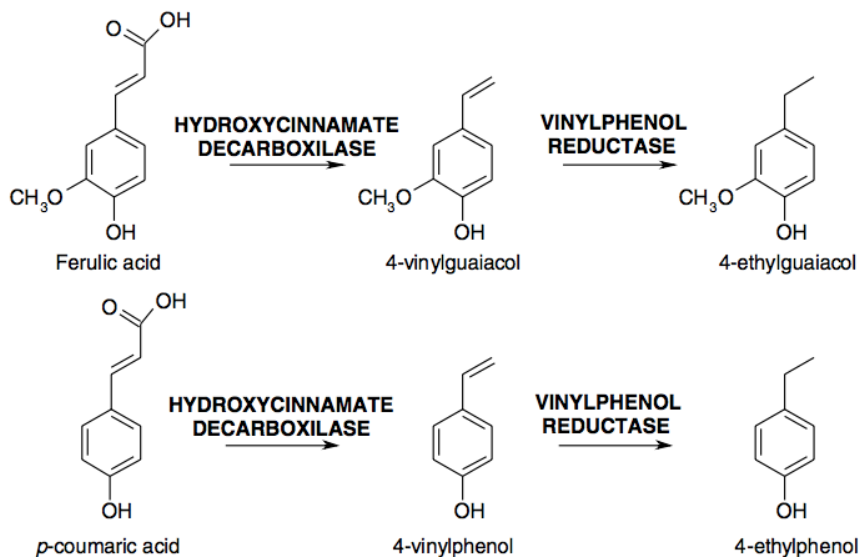
Slika 2. Izvori kontaminacije *Brettanomycesom* (Woolfit i sur., 2007)

2.2.1. Najvažniji nepoželjni metaboliti kvasca *B. Bruxellensis* u vinu

Jedni od glavnih nepoželjnih metabolita koji utječu na organoleptička svojstva vina su hlapivi fenoli koji nastaju iz fenolnih kiselina, prirodno prisutnih u grožđu. Na prvom mjestu važno je istaknuti nastanak 4-etilfenola koji pri višim koncentracijama vinu daje prepoznatljivi "brett" miris zbog kojeg vino gubi na svojoj kvaliteti te tako dolazi i do većih ekonomskih gubitaka. Uz 4-etilfenol, kvasac *B. bruxellensis* također može sintetizirati 4-etilgvajakol i 4-etilkatehol (Vigentini i sur., 2008). Pri vrlo niskim koncentracijama spomenutih fenolnih spojeva u vinu senzorske karakteristike koje se javljaju mogu biti čak i poželjne (Maga, 1978). No već

kod koncentracija od 425 µg/l senzorska svojstva vina su promijenjena (Chatonnet i sur., 1992).

Pri proizvodnji ovih fenolnih spojeva bitna su 2 enzima a to su hidroksicinamska dekarboksilaza i vinilfenol reduktaza (Heresztyn, 1986). Supstrati tih dvaju enzima su hidroksicinamne kiseline koje su prisutne u grožđu. U tu skupinu spadaju p-kumarinska kiselina, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Djelovanje hidroksicinamske dekarboksilaze i vinilfenol reduktaze može se predočiti na primjeru pretvorbe 4-etilfenola iz p-kumarinske kiseline. *Brettanomyces* najprije pomoću enzima hidroksicinamne dekarboksilaze provodi dekarboksilaciju p-kumarinske kiseline u 4-vinilfenol koji se dalje reducira u 4-etilfenol pomoću enzima vinilfenol reduktaze (Arvik i Henick-Kling, 2002). Nastajanje 4-etilgvajakola događa se na sličan način no prekursor je ferulinska kiselina koja se dekarboksilira pomoću hidroksicinamne dekarboksilaze u 4-vinilgvajakol na kojeg zatim djeluje vinilfenol reduktaza čime dolazi do redukcije 4-vinilgvajakola i nastanka 4-etilgvajakola (Suárez i sur., 2007). Ukoliko je prekursor sinapinska kiselina dekarboksilacijom će nastati 4-vinilkatehol koji će se kasnije reducirati u 4-etilkatehol. Te reakcije poznate su još i po nazivu "POF" odnosno phenolic off-flavor i mogu se pojaviti u različitim crnim vinima tijekom svih stadija proizvodnje.



Slika 3. Primjer dekarboksilacije p-kumarinske i ferulinske kiseline djelovanjem enzima hidroksicinamske dekarboksilaze i redukcije 4-vinilgvajakola i 4-vinilfenola djelovanjem vinilfenol reduktaze (Suárez i sur., 2007)

2.2.2. Ostali nepoželjni metaboliti kvasca *B. Bruxellensis* u vinu

Ovisno o uvjetima, pod utjecajem kvasca iz roda *Brettanomyces* osim nastanka hlapivih fenola u vinu može doći i do nastanka octene kiseline koja predstavlja 90 % hlapljive kiselosti vina (Van der Walt i Van Kerken, 1958). Vodeći se činjenicom da je *B. bruxellensis* fakultativni anaerob te saznanjem da se u potpuno aerobnim uvjetima brže razmnožava a time i povećava proizvodnja octene kiseline, jedan od načina održavanja proizvodnje octene kiseline na minimumu je smanjenje prisutnosti kisika odnosno održavanje vina u anaerobnim uvjetima (Aguilar-Uscanga, 1998). U protivnom vino u kojem je prisutna povišena razina octene kiseline imat će aromu octa i acetona.

Osim što je bitno za smanjenje proizvodnje octene kiseline u vinu, izbjegavanje doticaja s kisikom također je bitno za redukciju proizvodnje neugodnih mirisa tzv. "moussy off-flavor" odnosno neugodnu mišju aromu (Grbin i sur., 2000). Poznato je da su tri N-heterociklička spoja odgovorna za spomenutu mišju aromu a to su 2-acetil-tetrahidropiridin (ATHP), 2-etiltetrahidropiridin (ETHP) i 2-acetil-pirolin (APY) (Romano i sur., 2008). Metabolički putevi koji vode do N-heterocikličkih spojeva proučavani su u bakterijama mliječne kiseline (Costello i Henschke 2002). Sinteza 2-acetil-tetrahidropiridina i 2-acetil-pirolina počinje od etanola, fermentabilnog šećera (fruktoze ili glukoze) i aminokiseline (l-lizina i l-ornitina). Mišja aroma se na nepcu osjeća kada je vino već progutano ili ispljunuto, a osjet se može zadržati duže od 10 minuta.

Kvasac *Brettanomyces* može imati nepoželjan utjecaj i na povećanje mutnoće vina, kao i na boju vina što je posljedica hidrolize antocijana te otpuštanja glukoze i destabilizacije aglikona (Mansfield i sur., 2002). Hidrolizom glukoze dolazi do stvaranja oblika antocijana koji može biti konvertiran u bezbojnu pseudobazu što ima negativan utjecaj na boju vina (Mansfield i sur., 2002).

2.3. Sprječavanje rasta kvasca *B. Bruxellensis* u vinu

Pronalazak najučinkovitije metode suzbijanja rasta i kontrola kontaminacije uzrokovane neželjenim mikroorganizmima u vinu od velike su važnosti za proizvođače vina kako bi se što uspješnije smanjili gospodarski gubici.

2.3.1. Upotreba SO₂

Jedna od najvažnijih kemijskih metoda za sprječavanje rasta neželjenih mikroorganizama u vinu je upotreba sumporaste kiseline i SO₂. Sumporenje vina primjenjuje se još iz srednjeg vijeka a mehanizam sumporenja se sastoji u tome da sumporni dioksid dodan moštu ili vinu prelazi u sumporastu kiselinu koja se većim dijelom veže, a manjim dijelom ostaje slobodna te slobodni dio sumporaste kiseline djeluje kao antiseptik i antioksidans (Barata i sur., 2008). Sumporni dioksid kao antiseptik djeluje smrtno na sve uzročnike kvarenja vina uključujući i kvasac *B. bruxellensis* a kao antioksidans sprječava nepoželjne oksidacije. Mošt i vino se tim postupcima čuvaju od suvišnih oksidacija i mikrobnog kvarenja uz zadržavanje svježine i arome. Glavni oblici sumpora koji se najčešće koriste u vinarstvu su: plinoviti SO₂, 5% otopina sumporaste kiseline i kalijev bisulfit (Du Toit i sur., 2005). Sumporne trake više nisu u upotrebi radi nemogućnosti točnog doziranja u tank, mogućnosti pojave negativnog okusa te zbog jednostavnije upotrebe drugih sredstava. Sumporenje je najtočnije primjenom plinovitog SO₂ ako postoji na raspolaganju prikladan dozator. SO₂ je najdjelotvorniji kada je njegova koncentracija veća od 30 mg/L u uvjetima niskog pH (< 3,5) i pri temperaturi medija 10-15 °C. Primjenjuje se i sumporenje dodatkom 5% sumporaste kiseline pod uvjetom da se dodaje iz prethodno neotvorene boce s obzirom da se njezina koncentracija u kontaktu sa zrakom mijenja (Grba, 2010). Uz sumporenje vina javljaju se i negativne strane te metode. Zbog posljedica nepravilnog sumporenja bačava ili praznog prostora iznad vina može doći do pojave mirisa vina na sumporovodik odnosno na pokvarena jaja. Do spomenute pojave dolazi i ukoliko se grožđe neposredno prije berbe tretira sumpornim preparatima. Ne uklonimo li sumporovodik odmah iz vina on će se vezati s alkoholom i stvoriti spoj neugodna mirisa merkaptan, koji se vrlo teško uklanja iz vina. Posljednjih godina upotreba SO₂ kao sredstva za suzbijanje rasta kvasca *Brettanomyces* je smanjena jer je utvrđena povezanost prisutnosti SO₂ u vinu sa pseudo-alergijama i problemima u dišnom sustavu.

2.3.2. Upotreba dimetildikarbonata i polivinilpolipirolidona

U svrhe suzbijanja rasta kvasca *Brettanomyces* osim sumporenja vina koriste se i druga kemijska sredstva kao što su dimetildikarbonat (DMDC) koji inaktivira rast kvasca no unutar nekoliko sati nakon njegovog otapanja slijedi razgradnja na metanol i ugljični dioksid čime nastaju i male količine otrovnog metil-karbamata (Renouf i sur., 2008). Uporaba dimetildikarbonata nije dopuštena u svim zemljama.

Još jedno kemijsko sredstvo koje se može koristiti za suzbijanje rasta mikroorganizama je polivinilpolipirolidon (PVPP) a predstavljen je 1961. godine te djeluje kao adsorbens u vinu i pivu (McMurrough i sur., 1995). To je sintetički spoj s velikom molekulskom masom koji ima afinitet prema fenolima male molekulske mase (npr. p-kumarinska kiselina) i među njima dolazi do nastajanja vodikove veze. PVPP smanjuje količinu ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, hidroksicimetnih kiselina, procijanida, katehina te polifenolnih i proteinskih kompleksa a obično se dodaje u količinama 12-72 g/hL.

2.3.2. Upotreba alternativnih metoda

Ekonomska šteta uzrokovana vrstom *Brettanomyces* potiče vinarsku industriju u nastojanju optimizacije postojećih metoda te konstantnim istraživanjem novih pristupa ovom problemu. Stoga, kako bi se izbjegla metoda upotrebe SO₂ i nekih drugih kemijskih sredstava, suvremene tehnologije okrenule su se istraživanju alternativnih metoda obrade s ciljem sprječavanja rasta neželjenih kontaminanata (Lustrato i sur., 2010).

U posljednjem desetljeću u prehrambenoj industriji postupno se povećava upotreba električne energije kao metode obrade prehrambenih proizvoda a postupak inaktivacije bakterija i stanica kvasca pomoću pulsirajućeg električnog polja (pulsed electric field-PEF), osim što je uspješno korišten za očuvanje voćnih sokova, nedavno je proveden i u procesu proizvodnje vina (Puértolas i sur., 2009). Kada se mošt tretira pulsirajućim električnim poljem dodatak sumpornog dioksida možemo svesti na minimum ili čak u potpunosti izostaviti (Lustrato i sur., 2010).

U novijim istraživanjima kojima je cilj spriječiti rast kvasca vrste *Brettanomyces* koristila se električna struja niske jakosti (low electric current-LEC). Učinak inaktivacije kvasca upotrebom električne struje niske jakosti ima prednosti pred kemijskom metodom dodavanja SO₂ što ovu metodu čini dostojnom alternativom zamjenom za kemijsku metodu (Lustrato i sur., 2010).

Još jedan alternativni pristup sprječavanja rasta kontaminanata opisali su Enrique i sur., 2008. godine a sam pristup temelji se na primjeni antimikrobnog peptida dobivenog iz prirodnog proteina. Dobiveni rezultati istraživanja pokazali su da LfcinB17-31 ili pepsin LF hidrolizat (oba dobivena iz laktoferina) inhibiraju rast kvasca *Brettanomyces* u laboratorijskim uvjetima ili u vinu.

2.3.4. Upotreba ultrazvuka

Jedna od poželjnijih tehnika, općenito u procesiranju hrane, prema kojoj su u novije vrijeme usmjerena mnoga istraživanja je primjena ultrazvuka. Godine 1937. ultrazvučni valovi se prvi put primjenjuju kako bi izazvali termodinamičke promjene u fermentiranim i destiliranim alkoholnim pićima s ciljem imitiranja promjena koje bi se prirodno pojavile u piću (Bachmann i Willkins, 1937). Tijekom narednih desetljeća tretman ultrazvukom u vinima i alkoholnim pićima provodio se s ciljem postizanja bolje kvalitete proizvoda (García i sur., 2016). Općenito, ultrazvuk ima dvije glavne primjene u prehrambenoj industriji: pri niskim intenzitetima (niže od 1 W/cm^2) primjenjuje se u smislu analitike tj. karakterizacije različitih prehrambenih sustava kao što su otkrivanje stranih tijela, brzina protoka kapljevine u cijevima, određivanje visine nivoa kapljevine i sl. S druge strane, ultrazvuk visokog intenziteta omogućava razbijanje staničnih stijenki nepoželjnih stanica pa se koristi kod otplinjavanja tekućina, čišćenja, homogenizacije emulzija i raspršivanja agregatnih materijala a može se koristiti i za stimuliranje reakcija oksidacije, inhibiciju enzima, razaranje mikroorganizama, zvučno potpomognutu difuziju te ultrazvučno potpomognutu kristalizaciju. Ultrazvuk visokog intenziteta (HPU) spada u netermalne postupke obrade (McClements, 1995) a karakteriziraju ga visoke frekvencije iznad 16 kHz što je više od granice ljudskog sluha a frekvencije se mogu kretati i do 100 kHz dok se snaga kreće u intervalima od $10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$ (Jiranek i sur., 2008). Nasuprot djelovanja ultrazvuka niskog intenziteta, djelovanje ultrazvučne snage visokog intenziteta prolaskom ultrazvučnog vala popraćeno je stvaranjem visokog tlaka, smicanja i temperaturnog gradijenta unutar prehrambenog sistema te takvi uvjeti mogu značajno promijeniti strukturu materijala, a kao posljedica prolaska ultrazvučnog vala visokog intenziteta mogu se stvoriti neke kemijske reakcije (Awad i sur., 2012). Kada tijekom obrade materijala ultrazvukom visokog intenziteta zvučni val dođe do tekuće sredine, nastaju longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa sažimanja i ekspanzije (Herceg i sur., 2009). Ovo naizmjenično izmjenjivanje tlaka izaziva kavitacije pri čemu se formiraju mjehurići plina u materijalu (Patist i Bates, 2008). Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) i okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) (Dolatowski i sur. 2007).

Guerrero i sur. 2001. godine objavili su istraživanje utjecaja ultrazvuka na preživljavanje stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Nakon primjene amplitude valova u rasponu od 71 do $110 \mu\text{m}$ i frekvencije od 20 kHz došlo je do puknuća stanica *S. cerevisiae*.

Ultrazvuk je također bio primijenjen i kod hrastovih bačava kontaminiranih kvascem roda *Brettanomyces* nakon čega se pokazao učinkovitim pri dezinfekciji bačve (García i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam *B. bruxellensis*

Pri izradi završnog rada korišten je kvasac *B. bruxellensis* CBS 2499 (iz zbirke mikroorganizama Westerdijk Fungal Biodiversity Institute).

3.1.2. Vino

Pri izradi završnog rada korišteno je mlado crno vino Cabaret Sazuvignon iz Slavonije, Hrvatska, proizvedeno 2016 godine.

3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga

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

Ostale kemikalije koje su korištene u radu navedene su u tablici 2.

Tablica 2. Ostale kemikalije

NAZIV	PROIZVOĐAČ
NaCl p.a.	Fischer Chemical, EU

NaOH p.a.	Carlo Erba Reagens, EU
Etanol 96%	Gram-mol d.o.o., Hrvatska

3.1.4. Hranjive podloge

Tablica 3. Ostale kemikalije

SASTOJCI	MASENA KONCENTRACIJA (g/L)
agar	20
glukoza	20
pepton	20
kvaščev ekstrakt	10
destilirana voda	1000 mL

Tablica 4. Sastav tekuće YPD podloge

SASTOJCI	MASENA KONCENTRACIJA (g/L)
glukoza	20
pepton	20
kvaščev ekstrakt	10
destilirana voda	1000 mL

Tablica 5. Sastav čvrste selektivne *Brettanomyces* podloge

SASTOJCI	MASENA KONCENTRACIJA (gL ⁻¹)
dekstroza	10
pepton	5
kvaščev ekstrakt	3
sladni ekstrakt	3
kvaščeva dušična baza	3
kloramfenikol	0,1

bromkrezol zeleno	0,022
tiamin	0,02
kumarinska kiselina	0,1
cikloheksimid	0,01
agar	20
destilirana voda	1000 mL

Priprema:

44,2 g *Brettanomyces* podloge izvaže se u jednu litru destilirane vode, dobro promiješa i otopi zagrijavanjem uz povremeno mućkanje dok se potpuno ne otopi. Potom se doda 16 mL etanola i dobro promiješa. Slijedi zagrijavanje još 10 minuta te izlijevanje u sterilne Petrijeve zdjelice. Tako pripremljene ploče trebaju se čuvati na temperaturi 8 °C -15 °C.

3.1.5. Otopine

- 0,9 % fiziološka otopina

9 grama natrijevog klorida (NaCl) otopi se u 1000 mL destilirane vode

- 10 M NaOH

40 grama natrijevog hidroksida (NaOH) otopljenog u 100 mL destilirane vode

3.1.6. Instrumenti

- Sterilni mikrobiološki kabinet, Klima oprema, Hrvatska
- Centrifuga, Rotina 380 R, Hettich, Njemačka
- Vorteks, Ika, Njemačka
- Autoklav, Sutjeska, Srbija
- Vaga, Sartorius, Njemačka
- pH metar, Inolab, Njemačka
- Vodena kupelj, Ika, Njemačka
- Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, USA

3.1.7. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Plastične Petrijeve zdjelice
- Menzure, čaše, odmjerne tikvice

- Termometar
- Staklene bočice
- Stalak za epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- Staklene pipete (1 mL i 10 mL) i propipete
- Sterilni tipsevi za mikropipete
- Mikropipete 100 μ L i 1000 μ L
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL
- Stalak za Eppendorf epruvete
- Pinceta
- Bunsenov plamenik

3.2. Metode

3.2.1. Čuvanje i održavanje kvasca *B. bruxellensis*

Radna kultura kvasca *B. bruxellensis* čuvana je na kosom agaru (YPD) u hladnjaku na temperaturi +4 °C. Svakih 30 dana kvasac je precijepljen na svježe pripremljeni kosi agar. Nakon inkubacije na temperaturi od 24 °C tijekom 7 dana ponovo je čuvan u hladnjaku pri +4 °C. Trajna kultura čuvana je u 20 % glicerolu na -80 °C.

3.2.2. Uzgoj inokuluma

Uzgoj kvasca *B. bruxellensis* proveden je u nekoliko koraka. Najprije je kvasac *B. bruxellensis* rastao u Erlenmayerovoj tikvici s 50 mL tekuće YPD podloge u termostatu pri 28 °C. Zatim je YPD podloga s 4 % etanola inokulirana s 10 % tako uzgojene kvaščeve suspenzije. Nadalje je 10 % kvaščeve suspenzije iz YPD podloge s 4 % etanola preneseno u YPD podlogu s 8 % etanola. Nakon ulaska u stacionarnu fazu rasta 10 % kvaščeve suspenzije iz YPD podloge s 8 % etanola preneseno je u YPD podloge s 12 % etanola. Rast kvasca je praćen mjerenjem optičke gustoće na 600 nm te nacjepljivanjem na čvrste YPD podloge.

3.2.3. Priprema vina za tretman termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom)

Centrifugiranjem su iz podloge izdvojene stanice kvasca *B. bruxellensis* pri 4000 x g tijekom 10 minuta i inokulirane u crno vino kako bi se postigla početna koncentracija stanica od 6 log CFU/mL. Prije inokulacije vinu je korigiran volumni udio alkohola na 14 vol. % dodatkom

apsolutnog alkohola , a određenim uzorcima vina (tablica 7) korigiran je pH dodatkom 10 M NaOH otopine i/ili je dodan šećer (glukoza).

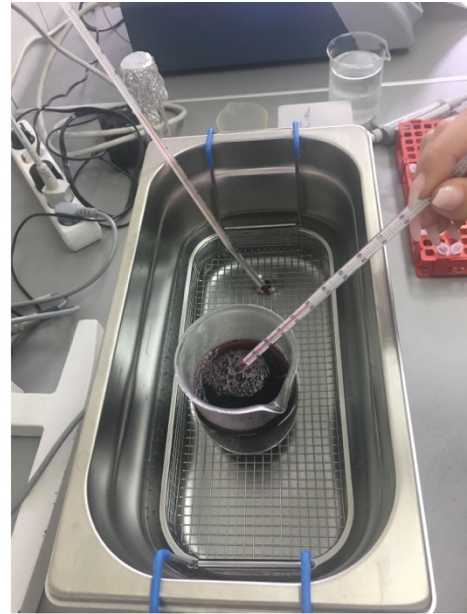
Početna koncentracija stanica u vinu određena je brojanjem poraslih kolonija na selektivnim *Brettanomyces* podlogama. Inokulacija vina je provedena 24 sata prije tretmana, a boce su inkubirane na 20 °C ± 2 °C. Prije uzimanja uzoraka suspenzija kvasca *B. bruxellensis* u vinu je dobro homogenizirana.

Tablica 6. Oznake ispitivanih uzoraka vina za tretman termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom)

VARIJANTA	pH	DODATAK ŠEĆERA (g/L)	ALKOHOL (%)
1	3,5	/	14
2	3,7	/	14
3	3,9	/	14
4	3,5	4	14
5	3,7	4	14
6	3,9	4	14

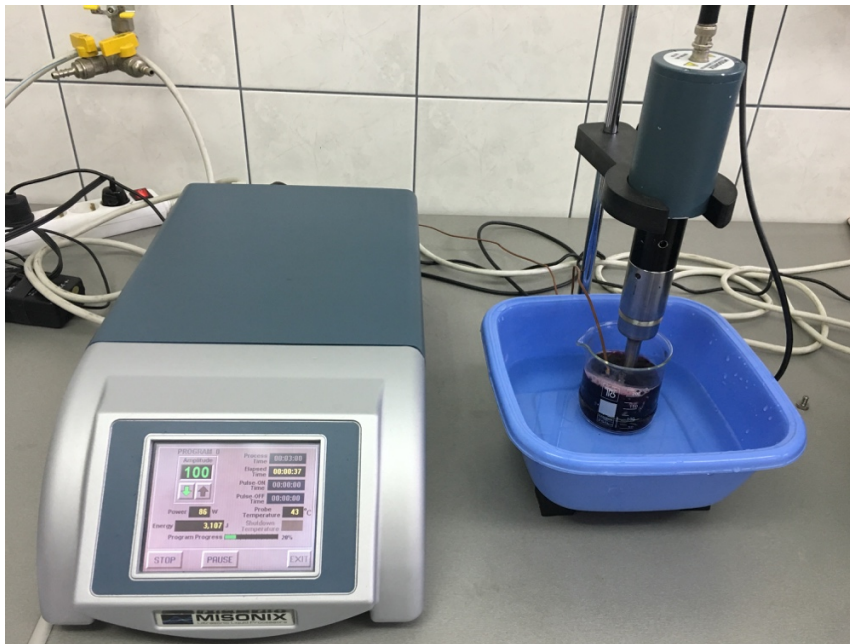
3.2.4. Tretman termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom)

Uzorak od 200 mL inokuliranog crnog vina uliven je u staklenu čašu od 250 mL koja je služila kao komora u kojoj se provodio tretman. Uzorci su prije tretmana zagrijani u vodenoj kupelji oko 2 minute do temperature 43 °C.



Slika 4. Vodena kupelj u kojoj se provodilo zagrijavanje

Za tretman je korišten ultrazvučni proces snage 600 W i 20 kHz. U uzorak je uronjena sonda (promjera=12,7 mm) i centrirana na sredinu čaše. Korištena je amplituda ultrazvučnog vala od 100 % što iznosi 120 μm za sondu promjera 12,7 mm, a sam tretman provodio se u trajanju od 1,2 i 3 minute. Tretman na svakom uzorku ponovljen je 3 puta. Tijekom ultrazvučnog tretmana temperatura je održavana na 43 °C, a to se postizalo konstantnom regulacijom temperature koju smo provodili dodavanjem leda i vode.



Slika 5. Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, USA

3.2.5. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika vina

Prije same inokulacije određeni su fizikalno-kemijski parametri vina kao što su pH, ukupna i hlapljiva kiselost, reducirajući šećeri te sadržaj alkohola pomoću FTIR spektroskopije (Bacchus II, Microdom). Određivanje ukupnog i slobodnog sumporovog dioksida je provedeno na uređaju za mjerenje sumporovog dioksida (LDS Sulphyser, Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska) titracijom otopinom jodi /jodata pri čemu se sumporov dioksid oksidira, a jod reducira, uz potenciometrijsko određivanje krajnje točke titracije pomoću LED indikatora.

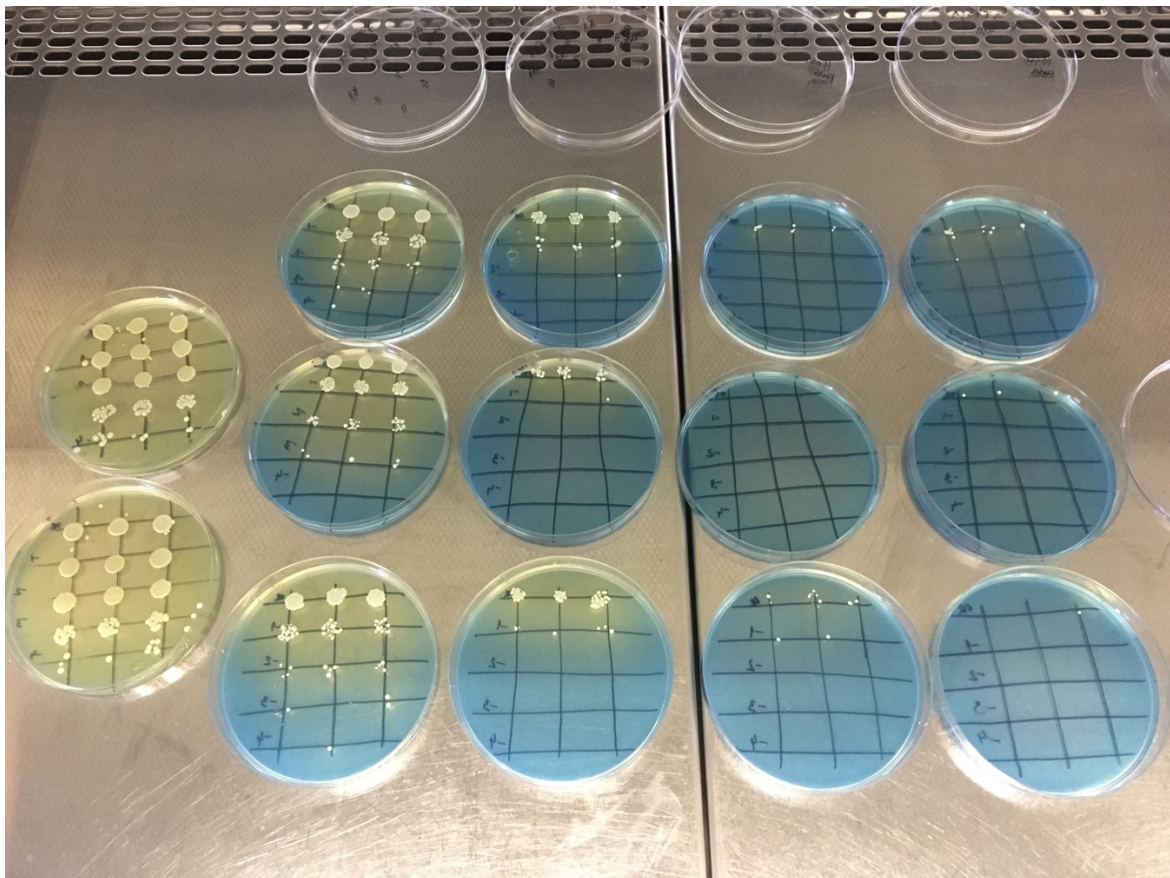
3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca *B. bruxellensis*

S ciljem praćenja uspješnosti inaktivacije kvasca *B. bruxellensis*, broj stanica određivan je tijekom faze pripreme inokuluma te prije i nakon tretmana ultrazvukom visoke snage. Rast kolonija kvasca određivan je naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja na čvrste YPD ili *Brettanomyces* podloge. Prije naciepljivanja na podloge pripremili smo decimalna razrjeđenja u plastičnim kivetama tako što smo volumen od 100 μL kvašćeve suspenzije pomiješali s 900 μL sterilne fiziološke otopine za prvo razrjeđenje. Volumen od 100 μL tako pripremljenog decimalnog razrjeđenja prenesen je u novu fiziološku otopinu volumena 900 μL kako bi se dobilo drugo decimalno razrjeđenje. Postupak je ponavljan do četvrtog razrjeđenja. Volumeni od 10 μL svakog decimalnog razrjeđenja su naciepljeni na krute YPD podloge odnosno

Brettanomyces podloge. Izrasle kolonije izbrojali smo nakon 7 – 10 dana inkubacije pri 24 °C u onom decimalnom razrjeđenju unutar kojeg je poraslo između 10 i 50 kolonija. Broj poraslih kolonija (engl. *Colony Forming Units*, CFU), predstavlja srednju vrijednost tri paralelna naciopljenja. Na osnovu izbrojenih kolonija izračunat je broj stanica u mL podloge odnosno vina a ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica (log CFU/mL).

Formula za izračun broja stanica

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



Slika 6. Primjer rasta kolonija kvasca pri pH 3,7 i 14 vol. % EtOH prije tretmana te nakon grijanja i nakon tretmana u trajanju 1,2 i 3 minute provedeno u 3 ponavljanja

3.2.7. Senzorsko ocjenjivanje tretiranih vina prema Triangl testu

Senzorsko ocjenjivanje vina, provedeno je na sobnoj temperaturi (20-22 °C) i u vremenskom periodu od 13 do 15 h. Uzorci vina prezentirani su senzoričarima na isti način: u prozirne staklene čaše za degustaciju vina (ISO 3591, 1977) napunjeno je 30 mL uzorka. Čaše sa uzorcima su kodirane troznamenkastim brojem te poklopljene plastičnom Petrijevom zdjelicom. Kandidati su dobili zadatak da od tri uzorka (od kojih su dva potpuno ista) izaberu onaj koji je različit od preostala dva.

TRIANGL TEST

Ime i prezime: _____

Datum: _____

Zadatak: Zaokružite uzorak koji se razlikuje od preostala dva i pokušajte opisno navesti razlike.

105	289	734	_____
263	869	562	_____
035	786	365	_____
415	602	974	_____
032	101	251	_____

Slika 7. Obrazac za triangl test

Statistička obrada testova temelji se na upotrebi *Chi-square* (χ^2) testa (Amerine i Roessler, 1983):

$$\chi^2 = \frac{(a - rb)^2}{r(a \times b)}$$

a - broj neispravnih odgovora u označavanju identičnih uzoraka

b - broj ispravnih odgovora u označavanju identičnih uzoraka

r - koeficijent vjerojatnosti prema b ($r = 2$, budući da je moguće izvršiti tri različita izbora od kojih je samo jedan ispravan).

Hipoteza se prihvaća u slučaju kad je $\chi^2 > 3,84$ ($p < 0,05$), odnosno između ocjenjivanih uzoraka postoji statistički značajna razlika.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za pripremu uzoraka namijenjenih za ispitivanje utjecaja ultrazvuka visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom (termosonifikacija) na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* korišteno je crno vino određenih fizikalno-kemijskih karakteristika koje su prikazane u tablici 7 uz korekciju volumnog udjela alkohola na 14 vol. %, pH i šećera.

Tablica 7. Fizikalno-kemijski parametri crnog vina korištenog u eksperimentalnom djelu rada

PARAMETAR	CRNO VINO
slobodni SO ₂ (mg/L)	11
ukupni SO ₂ (mg/L)	23
alkohol (%)	13
ukupna kiselost (g/L kao vinska)	6,4
hlapiva kiselost (g/L kao octena)	0,59
pH	3,4
reducirajući šećeri (g/L)	3,7
jabučna kiselina (g/L)	0,5
mliječna kiselina (g/L)	1,5

Budući se kakvoća vina utvrđuje na osnovi kemijskih analiza, mikrobioloških ispitivanja, ispitivanju ponašanja vina pri izlaganju zraku ili niskim i visokim temperaturama, organoleptičkih ispitivanja te odnosa pojedinih sastojaka u vinu bitnih za pojedino vino na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu ("Narodne novine", br. 34/95) dopuštene propisane vrijednosti iznose:

- slobodni SO₂ <350 mg /L
- ukupni SO₂ <30 mg/L
- alkohol <15 %
- ukupna kiselost (g/L kao vinska kiselina) 4,5-14 g/L
- hlapiva kiselost (g/L kao octena kiselina) < 1 g/L
- pH 3,0-3,8

- reducirajući šećeri (g/L) 4-9 g/L

Usporedbom analitičkih vrijednosti za vino korišteno u ovom istraživanju sa dopuštenim propisanim vrijednostima vidljivo je da su sve vrijednosti u korištenom crnom vinu unutar granica propisane Zakonom o vinu ("Narodne novine", br. 34/95).

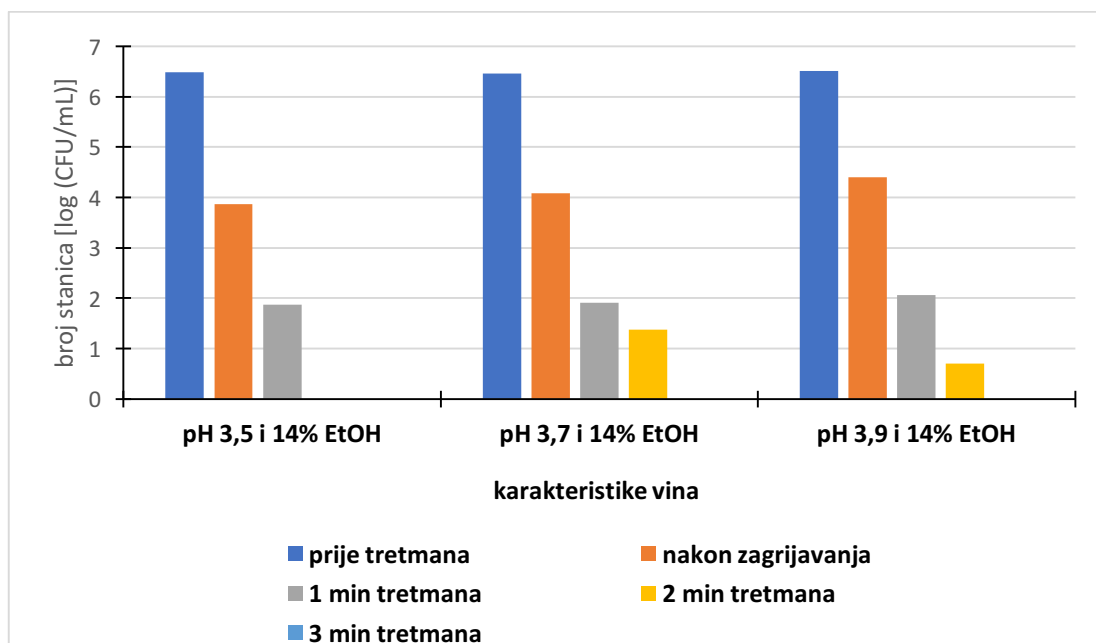
Kako bi ispitali utjecaj pH vrijednosti vina s 14 vol. % alkohola na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* primjenom termosonifikacije praćena je prisutnost kvasca *B. bruxellensis* prije i nakon tretmana.

U uzorcima vina s 14 vol. % alkohola prije provedenog tretmana termosonifikacijom početni broj stanica kvasca *B. bruxellensis* kreće se oko 6,5 log CFU/mL kod pH vrijednosti 3,5, 3,7 i 3,9. Nakon zagrijavanja uzorka inokuliranog vina u vodenoj kupelji do temperature 43°C, broj stanica kvasca smanjio se za oko 2,6 log CFU/mL te iznosi 3,9 log CFU/mL kod pH vina 3,5, kod pH vina 3,7 smanjio se za 2,4 log CFU/mL i iznosi 4,1 log CFU/mL, a kod pH vrijednosti 3,9 smanjio se za 2,1 log CFU/mL i iznosi 4,4 log CFU/mL.

Nakon provedenog tretmana termosonifikacije u trajanju od 1 minute kod sve tri pH vrijednosti vidljivo je smanjenje populacije za oko 2 log CFU/mL te kod pH 3,5 iznosi 1,9 log CFU/mL, kod pH 3,7 je 1,9 log CFU/mL a kod pH 3,9 je 2,1 log CFU/mL.

Produljenjem tretmana na 2 minute uočen je daljnji pad broja stanica kvasca te kod pH 3,5 nema porasta, dok je kod pH 3,7 broj stanica kvasca pao na 1,4 log CFU/mL a kod pH 3,9 na 0,7 log CFU/mL.

Nakon 3 minute tretiranja uzoraka termosonifikacijom uništena je cijela populacija kvasca *Brettanomyces bruxellensis* kod sve tri pH vrijednosti. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da provedenim tretmanom termosonifikacije odnosno upotrebom ultrazvuka u kombinaciji sa povišenom temperaturom uspješno inaktiviramo kvasac *Brettanomyces bruxellensis* proporcionalno s vremenom i da se rast kvasca u potpunosti inhibira nakon 3 minute tretmana.



Slika 8. Prikaz broja stanica kvasca *Brettanomyces bruxellensis* u vinu različitih pH vrijednosti poraslih na čvrstim podlogama prije i nakon tretmana termosonifikacije

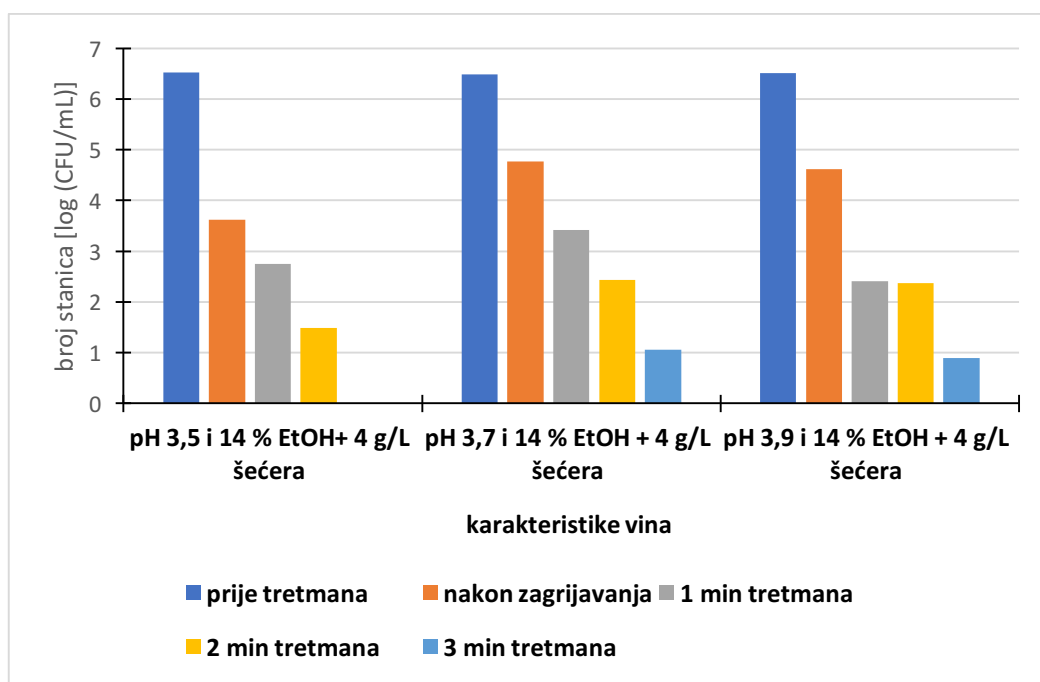
S ciljem ispitivanja utjecaja šećera na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* tretman termosonifikacije proveden je u vinu s 14 vol. % alkohola uz dodatak 4g šećera po litri uzorka vina a pad rasta broja stanica kvasca praćen je na isti način kao i kod prethodnih uzoraka koji nisu sadržavali šećer.

Prije tretmana početni broj stanica kvasca *B. bruxellensis* kretao se oko 6,5 log CFU/mL. Nakon zagrijavanja u vodenoj kupelji do željene temperature od 43°C kod pH 3,5 broj stanica se smanjio za 2,9 log CFU/mL te iznosi 3,6 log CFU/mL, kod pH 3,7 broj se smanjio za 1,7 log CFU/mL i vrijednost mu je 4,8 log CFU/mL, a kod pH 3,9 smanjio se za 1,9 log CFU/mL i iznosi 4,6 log CFU/mL.

Nakon 1 minute tretmana termosonifikacije broj stanica kvasca kod pH 3,5 pao je na 2,7 log CFU/mL i time se smanjio za 0,9 log CFU/mL, kod pH 3,7 smanjio se za 1,4 log CFU/mL i pao na vrijednost od 3,4 log CFU/mL, a kod pH 3,9 smanjio se za 2,2 log CFU/mL te iznosi 2,4 log CFU/mL.

Nakon 2 minute tretmana broj stanica nastavio je padati no u usporedbi sa uzorcima bez šećera taj pad je bio značajno manji te se broj stanica kod pH 3,5 i 3,7 smanjio za oko 1 log CFU/mL te je iznosio 1,5 log CFU/mL za pH 3,5 i 2,4 log CFU/mL za pH 3,7. Nakon 2 minute tretmana kod uzorka sa pH 3,9 pad rasta kvasca bio je minimalan i smanjio se za samo 0,04 log CFU/mL.

Nakon 3 minute tretmana kod pH 3,5 nije uočen rast a kod pH 3,7 i 3,9 broj stanica smanjio se za oko 1,5 log CFU/mL te iznosio 1 log CFU/mL za pH 3,7 i 0,9 log CFU/mL za pH 3,9.



Slika 9. Prikaz broja stanica kvasca *Brettanomyces bruxellensis* u vinu različitih pH vrijednosti uz dodatak šećera poraslih na čvrstim podlogama prije i nakon tretmana termosonifikacije

Usporedimo li rezultate ispitivanja tretmanom termosonifikacije kod uzoraka vina sa i bez šećera vidimo kako nam prisustvo šećera umanjuje učinak inaktivacije. .

Kako bi ispitali ima li tretman termosonifikacije utjecaja na senzorske karakteristike vina proveden je Triangl test. Budući da postotak odgovora nije veći od 75% može se zaključiti da nema utjecaja na senzorske karakteristike vina

Tablica 8. Rezultati provedenih Triangl testova

TRIANGL	TOČAN ODGOVOR	POSTOTAK TOČNIH ODGOVORA (%)
1- vino pH 3,5	A	38,5
2- vino pH 3,7	B	30,8
3- vino pH 3,9	C	46,2
4-vino pH 3,5 + 4 g/L šećera	B	23,1
5-vino pH 3,7 + 4 g/L šećera	C	38,5
6-vino pH 3,9 + 4 g/L šećera	B	46

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu iznesenih rezultata možemo ustvrditi:

- primjena ultrazvuka u kombinaciji sa povišenom temperaturom (termosonifikacija) kao metoda inaktivacije kvasca *Brettanomyces bruxellensis* uspješno je provedena u crnom vinu s 14 vol. % alkohola pri različitim pH vrijednostima bez dodatka šećera te pri pH vrijednosti 3,5 s dodatkom šećera te je u svim pokusima ustanovljeno logaritamsko smanjanje broja stanica.
- Nakon 3 minute tretmana termosonifikacijom postignuta je potpuna inaktivacija kvasca *Brettanomyces bruxellensis* u vinu s 14 vol. % alkohola pri svim ispitivanim pH vrijednostima i bez dodatka šećera
- Dodatak šećera od 4g/L smanjuje inaktivaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis*.
- Kod pH vrijednosti od 3,5 u vinu s 14% alkohola nije uočen utjecaj dodatka šećera na inaktivaciju kvasca *Brettanomyces bruxellensis*
- Primjenjeni tretman termosonifikacije nije utjecao na senzorske karakteristike vina.

6. LITERATURA

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., i Youssef, M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International* **48(2)**: 410-427.

Anonymus (2014) Alkoholna fermentacija,
<<http://www.slideserve.com/sidney/principi-biotehnolo-ke-proizvodnje-hrane>> Pristupljeno 7.rujna 2017

Arvik, T., i Henick-Kling, T. (2002) *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavor.

Aguilar-Uscanga M. G., Delia M. L., Strehaiano P. (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 157–162.

Bachman, J.A., i R.Wilkins. (1937) Method of treatment for fermented and distilled bevarages and the like. U.S. Pat. 2086891

Benito S., Palermo F., Morata A., Uthurry C., Suarez-Lepe J.A. (2009) Minimization of ethyphenol precursor in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeast. *International Journal of Food Microbiology* **132**: 145-152.

Barata, A., Pagliara, D., Piccinino, T., Tarantino, F., Ciardulli, W., Malfeito-Ferreira, M., i Loureiro, V. (2008) The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research* **8(7)**: 1097-1102.

Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., i Loureiro, V. (2008) Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* **121(2)**: 201-207.

Ciani, M., i Ferraro, L. (1997) Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **75(4)**: 489-495.

Conterno, L., Joseph, C. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., i Bisson, L. F. (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **57(2)**: 139-147.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., i Comi, G. (2004) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology* **70(3)**: 1347-1355.

Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., Pons M.(1992) The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **60**:165–178

Costello, P.J. i Henschke, P.A. (2002) Mousy off-flavour of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7079–7087.

Dolatowski, Z. J., Stadnik J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* **6 (3)**: 89-99.

Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., i Lonvaud-Funel, A. (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* **98(4)**: 862-871.

Egli C.M., Henick-Kling T. (2001) Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture* **52(3)**: 241-247.

Froudiere, I., i Larue, F. (1988). Condition de survie de *Brettanomyces (Dekkera)* dans le mou^
t de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **2**: 296–303.

Guerrero, S., Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M., (2001) Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2**: 31-39

García, J. F., Zhang, Q. A., i Feng, C. H. (2016) Ultrasound for accelerating the wine aging process from physicochemical point of view. *Applications of Ultrasound in the Beverage Industry* 89. 7

Grba S., (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji 663(075.8)

Grbin, P. R., i HENSCHKE, P. A. (2000) Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces yeasts*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **6(3)**: 255-262.

Heresztyn, T. (1986) Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology* **146(1)**: 96-98.

Herceg Z., Brnčić M., Jambrak Režek A., Rimac Brnčić S., Badanjak M., Sokolić I. (2009) Possibility of application high intensity ultrasound in milk industry. *Mljekarstvo* **59(1)**: 65-69.

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

Licker J. L., Acree T. E., Henick-Kling T. (1999) What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation in chemistry of wine flavour, 714. izd, Waterhouse A. L., Ebeler S. E., ur., *ACS Symposium Series* str. 96–115.

Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., i Ranalli, G. (2010) Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *Journal of Applied Microbiology* **109**: 594-604.

Maga J.A., (1978) Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **10**: 323–372

Mansfield A. K., Zoecklein B. W., Whiton R. S. (2002) Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture* **53**: 303–307.

McClements D.J., (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* **6**:293–299.

McMurrrough J., Madigan D., Donnelly D., Hurley J., Doyle A.M., Henningan G., McNulty N. (1996) Control of ferulic acid and 4-vinyl guacol in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **102**: 327-332.

Patist A, Bates D. 2008. Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9**:147–54

Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., i Álvarez, I. (2009) Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **130(1)**: 49-55.

Renouf, V., Strehaiano, P., i Lonvaud-Funel, A. (2008) Effectiveness of dimethydicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* **19(2)**: 208-216.

Romano, A., Perello, M. C., Revel, G. D., i Lonvaud-Funel, A. (2008) Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* **104(6)**: 1577-1585.

Rozpedowska E., Hellborg L., Ishchuk O. P., i sur. (2011) Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeast. *Nature Communications* **2**:302.

Smith M.T. (1998a) *Dekkera van der Walt*. U: The Yeasts, 4. izd., Kurtzman C.P., Fell J.W., ur., Elsevier, str. 174-177.

Smith M.T. (1998b) *Brettanomyces kufferath* and *van laer*. U: The Yeasts, 4. izd., Kurtzman C.P., Fell J.W., ur., Elsevier, str. 450-453.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., i Calderón, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry* **102(1)**: 10-21.

Van der Walt J. P., Van Kerken A. E. (1958) A taxonomical survey of the yeast causing turbidity in South African table wines. U: The wine yeast of the Cape, 1. izd., Leeuwenhoek A. **24**: 239-252.

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

Zakon o vinu (1996) Narodne novine 34/95 (NN 96/1996)

Woolfit, M., Rozpędowska, E., Piškur, J., i Wolfe, K. H. (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic cell* **6(4)**: 721-733.

Wedral, D., Shewfelt, R., i Frank, J. (2010) The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology* **43(10)**.

Izjava o izvornosti

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

ime i prezime studenta