

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Mirta Prusac**

6718/N

**UTJECAJ KEMIJSKOG SASTAVA VINA I ULTRAZVUKA**  
**NA INAKTIVACIJU KVASCA IZ RODA**  
***BRETTANOMYCES***

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Kemija i tehnologija 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 Nutricionizam

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ KEMIJSKOG SASTAVA VINA I ULTRAZVUKA NA INAKTIVACIJU KVASCA IZ RODA *BRETTANOMYCES*

*Mirta Prusac, 6718/N*

**Sažetak:** Kvasac iz roda *Brettanomyces* pripada među najznačajnije uzročnike kvarenja crnog vina. Ovaj kvasac ima sposobnost proizvodnje hlapivih fenola, 4-etilfenola i 4-etilgvajakola koji vinu daje prepoznatljivi "brett" miris što djeluje negativno na vino. U ovom radu ispitan je utjecaj različitog kemijskog sastava vina na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* primjenom ultrazvuka visoke snage u kombinaciji sa povišenom temperaturom (termosonifikacija). Tretman je proveden u šaržnom sustavu izotermalno u trajanju od 1, 2 i 3 minute uz prethodno zagrijavanje uzorka na 43 °C. Inaktivacija kvasca *B. bruxellensis* praćena je naciepljivanjem uzoraka vina na selektivne podloge gdje se pratio rast kolonija kvasca *B. bruxellensis*, a senzorske karakteristike vina određivane su pomoću Triangl testa. Utvrđeno je da je ultrazvuk visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom uzrokuje inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis*. Variranje pH vrijednosti vina nema utjecaja na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis*, dok dodatak šećera smanjuje inaktivaciju ovog kvasca.

**Ključne riječi:** *B. bruxellensis*, kvarenje vina, termosonifikacija, ultrazvuk visoke snage

**Rad sadrži:** 29 stranica, 6 slika, 9 tablica, 45 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Leo Gracin, doc.

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

**Datum obrane:** srpanj 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Nutrition science**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

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

### **THE INFLUENCE OF WINE CHEMICAL COMPOSITION AND ULTRASOUND ON THE INACTIVATION OF *BRETTANOMYCES* YEAST**

*Mirta Prusac 6718/N*

**Abstract:** *Brettanomyces* sp. yeast is considered a major spoilage yeast in red wine. It is harmful for wine because it produces volatile phenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol), compounds primarily responsible for Brett character in wine. In this study, influence of wine chemical composition and high power ultrasound in combination with high temperature (termosonification) on *B. bruxellensis* growth were examined. The treatment was conducted in a batch system for duration of 1, 2 and 3 minutes, while the samples were preheated at 43 °C. Inactivation of yeast *B. bruxellensis* was monitored by inoculation of wine samples on selective medium. Sensory characteristics of wine were determined using the Triangle test. Inactivation of *B. bruxellensis* growth was achieved using high power ultrasound in combination with high temperature (termosonification). The variation in the pH of wine has no effect on the inactivation of *B. bruxellensis*, while the addition of sugar reduces the inactivation of the yeast.

**Key words:** *B. bruxellensis*, wine spoilage, termosonification, high power ultrasound

**Thesis contains:** 29 pages, 6 figures, 9 tables, 45 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Leo Gracin, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD. Stela Križanović, Scientific Assistant

**Defence date:** july, 2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Povijest kvasca <i>B. bruxellensis</i> .....	2
2.2. Taksonomija.....	2
2.3. Glavne karakteristike.....	3
2.3. Metabolizam ugljika i anaeroban rast.....	4
2.4. Kvarenje vina uzrokovano kvascem <i>Brettanomyces spp</i> .....	5
2.4.1. Hlapivi fenoli.....	5
2.4.2. Ostale neželjene promjene u vinu.....	7
2.5. Metode sprječavanja rasta kvasca <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	7
2.5.1. Kemijske metode.....	8
2.5.2. Biološke metode.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.1.1. Mikroorganizam <i>B. bruxellensis</i> .....	11
3.1.2. Vino.....	11
3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga.....	11
3.1.4. Hranjive podloge.....	12
3.1.5. Otopine.....	13
3.1.6. Instrumenti.....	14
3.1.7. Laboratorijsko posuđe i pribor.....	14
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Čuvanje i održavanje kvasca <i>B. bruxellensis</i> .....	14
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.....	17
3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca <i>B. bruxellensis</i> .....	17
3.2.7. Senzorsko ocjenjivanje tretiranih vina prema Triangl testu.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
5. ZAKLJUČAK.....	24
6. LITERATURA.....	25



## 1.UVOD

Vino je finalni proizvod mnogih biotičkih i abiotičkih procesa uzrokovanih mikroorganizmima od kojih neki imaju povoljan, a drugi štetan utjecaj na kvalitetu vina te njegova organoleptička svojstva.

Kvasci iz roda *B. bruxellensis* imaju negativan utjecaj na sastav vina zbog sposobnosti proizvodnje određenih metabolita koji utječu na organoleptička svojstva vina. Ti kvasci su proizvođači hlapivih fenola koji nastaju iz fenolnih kiselina, prirodno prisutnih u grožđu. Na prvom mjestu važno je istaknuti nastanak 4-etilfenola koji pri višim koncentracijama vinu daje prepoznatljiv "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 ako su prisutni potrebni prekursori.

Suzbijanje rasta kvasca *B. bruxellensis* može se provoditi kemijskim, biološkim ili fizikalnim metodama. Od kemijskih metoda je najvažnija upotreba  $SO_2$ , a od bioloških je to upotreba antimikrobnog peptida dobivenog iz prirodnog proteina. Također se stražuje i upotreba različitih fizikalnih metoda u koje spada upotreba ultrazvuka visoke snage.

Cilj ovog rada je bio istražiti kako promjene u kemijskom sastavu vina (različiti pH te dodatak šećera) utječu na primjenu termosonifikacije (tretman ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom) na inaktivaciju kvasca iz roda *Brettanomyces*. Također se nastojalo utvrditi postoji li utjecaj termosonifikacije na organoleptičke promjene u vinu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Povijest kvasca *B. bruxellensis*

Kvasac *B. bruxellensis* prvi put se spominje 1904. godine kada je H. Claussen izolirao ovaj kvasac iz britanskih piva pri čemu je utvrdio kako je nakon završene fermentacije s kvascem *Saccharomyces*, započela druga sporija fermentacija koju je provodio *B. bruxellensis*. Ime je dobio od grčke riječi *brettano* (britansko) i *myces* (gljiva) (Licker i sur., 1999), a okusi koji nastaju zbog njegovog prisustva postali su karakteristični za određena britanska piva.

*B. bruxellensis* je postalo ime roda koji je izoliran iz belgijskih piva i tek se 40.-ih godina 20. stoljeća počeo povezivati s vinima (Oelfse i sur., 2008) nakon Custersove opsežne studije na tu temu. Kasnije, 50.-ih i 60.-ih godina 20. stoljeća identificiran je kao *Brettanomyces spp.* te je izoliran u Francuskoj, Italiji i Južnoj Africi.

Također, potvrđena je njegova prisutnost u zraku i na zidovima vinarije kao i na pumpama te drugoj opremi koju je teško čistiti (Peynaud, 1959; Van der Walt, 1984; Neva i sur., 1998; Fugelsang, 1998; Connel i sur., 2002).

Krajem 1970. godine, neke vrste roda *Brettanomyces* pronađene su i u octu te u vodi koja se koristila za pranje jabuka i u kanalima kojima se jabuke dovode (Davenport, 1976).

### 2.2. Taksonomija

Vrste roda *Brettanomyces*: *B. lambicus*, *B. bruxellensis intermedius*, *B. bruxellensis vini*, *B. bruxellensis schanerlii*, *B. bruxellensis claussemi* kao i *Mycotorolum intermedia* te mnoge druge reklasificirane su kao *B. bruxellensis*, a prijašnja imena danas se koriste kao sinonimi (Barnett i sur., 1999).

Rod *Dekkera* uključen je u taksonomiju 1964 godine kada se promatralo stvaranje askospora, a ime je dobio u čast Nellie Margarethe Stelling-Dekkere (Oelfse i sur., 2008). Danas 5 vrsta pripada rodu *Brettanomyces/ Dekkera*: *B. custersianus*, *B. naardensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* i *B. bruxellensis* (Smith, 1998a, 1998 b). Od svih navednih vrsta, vrsta *B. bruxellensis* je najviše povezana sa proizvodnjom vina (Egli i Henick-Kling, 2001), a od nedavno se spominje i *Dekkera anomalia* ali konvecionalne metode ne razlikuju te dvije vrste (Loureiro i Malfeito-Ferreira, 2006).



Znanstvena klasifikacija roda *Brettanomyces/Dekkera* prikazana je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Znanstvena klasifikacija roda *Brettanomyces/Dekkera*.

<i>Brettanomyces/Dekkera</i>	
Carstvo	Gljive ( <i>Fungi</i> )
Koljeno	<i>Ascomycota</i>
Podkoljeno	<i>Saccharomycotina</i>
Razred	<i>Saccharomycetes</i>
Red	<i>Saccharomycetales</i>
Obitelj	<i>Saccharomycetaceae</i>
Rod	<i>Brettanomyces</i>

### 2.3. Glavne karakteristike

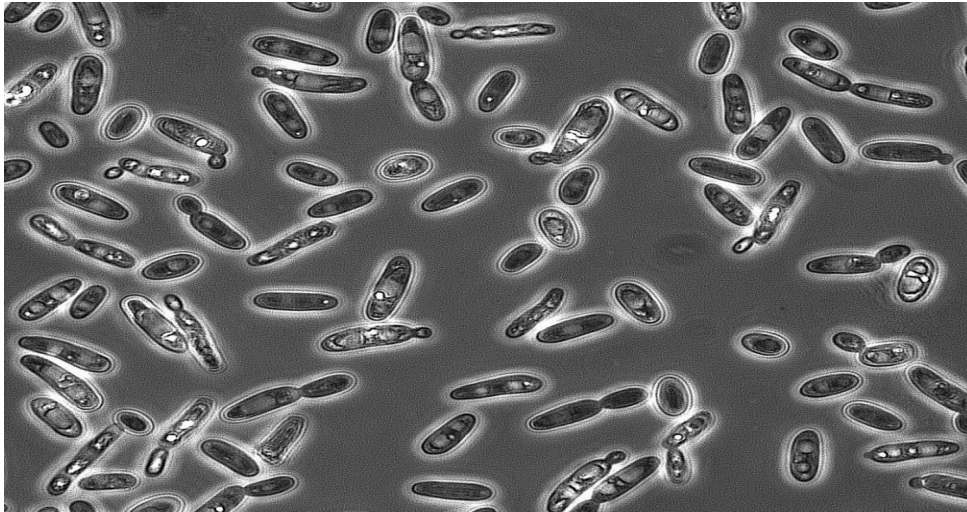
Kvasac iz roda *Brettanomyces* se prilagodio mnogim nepovoljnim uvjetima rasta poput visoke koncentracije etanola, niskom pH te rastu u okruženju siromašnom dušikom (primarno koristi amonijeve ione kao izvor dušika, ali može koristiti i nitratne što ga razlikuje od *S. cerevisiae*).

Također, prilikom alkoholne fermentacije pokazuje bolju sposobnost preživljavanja od drugih kvasaca koji ne pripadaju rodu *Saccharomyces*.

Kvasac *B. bruxellensis* može rasti tijekom starenja crnog vina u hrastovoj bačvi posebice kada je koncentracija SO<sub>2</sub> niska (<0,5 mg/L), pH visok (>3,8), a temperatura iznad 15 °C (Benito i sur., 2009). Optimalna temperatura za rast kvasca *B. bruxellensis* je 19-35 °C, dok je usporen rast na 37-42 °C, a nema sposobnosti rasta na temperaturama iznad 45 °C. Također, hrastove bačve sadrže mikropore kroz koje je omogućen ulazak O<sub>2</sub> što poboljšava rast kvasca roda *Brettanomyces*, dok je taj rast posebno izražen u starim bačvama zbog nemogućnosti sterilizacije istih (Louriero i sur., 2006). Stanice kvasca *Brettanomyces* su kuglastog, elipsoidnog, izduženog ili jajolikog oblika i poznate su po tome što formiraju pseudomicelije koji može biti septiran ili neseptiran (Larue i sur., 1991).

Razmnožavaju se bipolarnim pupanjem, a sadrže jednu do četiri askospore (Medawar, 2003). Zbog činjenice da je *B. bruxellensis* sporo rastući kvasac potrebno je više od tjedan dana kako bi

narasle kolonije koje je moguće izbrojati. 1945. godine Van der Walt je kolonije okarakterizirao kao sjajne i glatke te krem do svjetlo smeđe boje.



**Slika 1.** Kvasac snimljen fazno-kontrastnim mikroskopom, povećanje 1000 x (Fugelsang i Edwards, 2007)

### 2.3. Metabolizam ugljika i anaeroban rast

Analizom parametara rasta i metabolizma ugljika različitih izolata kvasca *Brettanomyces bruxellensis* dokazano je da ovaj kvasac proizvodi etanol u aerobnim uvjetima ako je prisutna dovoljna količina šećera u mediju, te da ima sposobnost rasta bez prisustva kisika. Uz etanol, može proizvoditi i octenu kiselinu te male količine glicerola (Rozpedowska i sur., 2011).

Većina sojeva može rasti na podlozi koja sadrži monosaharide (glukoze, fruktozu ili galaktozu) ili disaharide (maltozu, celubiozu) pri čemu pretvara šećer u manje molekule koje koristi kao izvor energije ili kao gradivne blokove za sintezu drugih molekula. Tako se npr. iz jedne molekule glukoze dobivaju dvije molekule piruvata koje kvasac, ovisno o uvjetima, koristi za fermentaciju ili respiraciju. S obzirom da je respiracija energetski povoljnija, većina kvasaca provode fermentaciju samo ako je respiracija onemogućena zbog npr. smanjene količine kisika. No, kod nekih kvasaca (*S.cerevisiae* i *B.bruxellensis*) piruvat se koristi u fermentaciji čak i kada je prisutna dovoljna količina kisika tj. oni imaju sposobnost fermentirati šećere u aerobnim

uvjetima i zbog toga spadaju u tzv. "Crab-tree" pozitivne kvasce (Prank i sur., 1996; Rozpedowska i sur., 2011).

Dostupnost kisika ovisi o raznim uvjetima, a kao glavni nedostatak rasta u anaerobnim uvjetima je nedostatak finalnog akceptora elektrona u respiratornom lancu.

Prema potrebi za kisikom tijekom kvasci se klasificiraju u 3 kategorije:

- (1) Obligatni aerobi-provode isključivo respiraciju
- (2) Fakultativni anaerobi-provode i respiraciju i fermentaciju
- (3) Obligatni anaerobi-provode isključivo fermentaciju (Merico i sur., 2007)

*S.cerevisiae* i *B. bruxellensis* su oboje fakultativni anaerobi (Rozpedowska i sur., 2011) i kod obje vrste kvascu nije nužan respiratorni lanac za preživljavanje. U potpuno aerobnim uvjetima, *B. bruxellensis* se razmnožava brže i povećana je proizvodnja octene kiseline, dok je proizvodnja etanola nešto niža. Smanjivanjem količine kisika tj. kada uvjeti postanu semi-aerobni smanjuje se količina nastale očetne kiseline. Rast kvasca može se potaknuti i dodatkom amonijevog sulfata, biotina te tiamina (Conterno i sur., 2006).

## **2.4. Kvarenje vina uzrokovano kvascem *Brettanomyces spp.***

Kvasac *B. bruxellensis* često uzrokuje kvarenje vina zbog različitih produkata koji imaju negativan utjecaj na kvalitetu vina. Miris vina zaraženog tim kvascem može se opisati kao medicinski, životinjski kao i miris po mišu ili dimu. Razlog tome je prisustvo kemijskih komponenti koje nastaju kao rezultat enzimske transformacije fenolnih kiselina koje su prisutne prilikom proizvodnje vina (Chatonnet i sur., 1992).

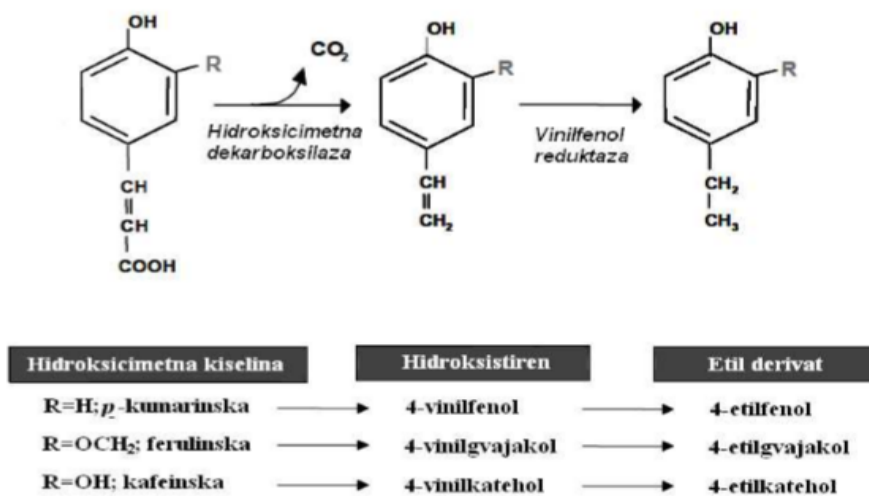
### **2.4.1. Hlapivi fenoli**

U proizvodnji vina naziv hlapivi fenoli odnosi se na skupinu spojeva koja se sastoji od 4-etilfenola, 4-etilgvajakola i 4-etilkatehola. Ovisno o njihovoj koncentraciji u vinu, hlapivi spojevi mogu imati prihvatljivi utjecaj pri niskim koncentracijama (npr. mladim vinima daju aromu starih) ili ih se može smatrati uzrokom kvarenja vina kada su prisutni u višim koncentracijama.

*B. bruxellensis* iz lizina i etanola sintetizira tetrahidropiridine (2-etiltetrapiridin, 2-acetiltetrahidropiridin i 2-acetilpirolin) koji su odgovorni za miris po mišu, dok je izovalerična kiselina odgovorna za aromu sira. "POF" (phenolic off-flavor) može se pojaviti u različitim crnim

vinima tijekom svih stadija proizvodnje, no pretežno se javlja prilikom zrenja vina (prije buteljiranja) pogotovo ako se vino čuva u starim bačvama. Od svih reakcija "POF-a" najzastupljenija je reakcija nastanka 4-vinilfenola i 4-etilfenola iz *p*-kumarinske kiseline. Od parametara koji utječu na reakciju najviše se promatraju fizikalno-kemijski parametri koji direktno utječu na količinu *p*-kumarinske kiseline prisutne u mediju prije konverzije ili količina već nastalog 4-etilfenola.

*P*-kumarinska kiselina, uz kafeinsku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu su hidroksicimetne kiseline koje su prisutne u grožđu. Tijekom maceracije dolazi do njihove ekstrakcije iz grožđa te se potom prenose u groždani sok. Povećanjem koncentracije etanola povećava se i ekstrakcija fenolnih spojeva. Nastanak fenolnih spojeva povezan je s postojanjem dva enzima od kojih je jedan cinaminska dekarboksilaza koja dekarboksilira *p*-kumarinsku, kafeinsku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu u hidroksistirene (4-vinilfenol, 4-vinilgvajakol i 4-vinilkatehol) koji se onda pomoću vinilfenol reduktaze prevode u odgovarajuće derivate etila (4-etilfenol, 4-etilgvajakol i 4-etilkatehol).



**Slika 2.** Nastajanje hlapivih fenola putem dekarboksilacije hidroksicimetnih kiselina (Oelofse i sur., 2008).

## 2.4.2 Ostale neželjene promjene u vinu

Uz nastanak hlapivih fenola, pod utjecajem kvasca iz roda *Brettanomyces* u vinu može doći i do nastanka octene kiseline koja predstavlja 90 % hlapljive kiselosti vina (Van der Walt i Van Kerken, 1958). Vino u kojem je prisutna povišena razina octene kiseline ima aromu octa i acetona.

Do nastanka octene kiseline dolazi u aerobnim uvjetima. Također novija istraživanja pokazuju da dostupnost kisika potiče rast kvasca roda *Brettanomyces* prilikom proizvodnje vina (jer omogućuje uvjete za rast i preživljavanje) pa tako i sintezu octene kiseline. Zbog toga je smanjivanje prisutnosti kisika tj. održavanje vina u anaerobnim uvjetima jedan od načina da proizvodnja octene kiseline bude mala (Aguilar-Uscanga, 1998) ili nikakva (Blondin i sur., 1982).

Kvasac *Brettanomyces* također ima sposobnost sinteze N-heterocikličkih spojeva, točnije 2-etiltetrahidropiridina (ETHP) i 2-acetiltetrahidropiridina (ATHP). Te molekule su odgovorne za tzv. "moussy off-flavor", tj. za neugodnu mišju aromu (Grbin i sur., 1996) koja se na nepcu osjeća kada je vino već progutano ili ispljunuto, a osjet se može zadržati duže od 10 minuta.

Potrebni prekursori za sintezu ovih tetrahidropiridina su aminokiseline L-lizin i L-ornitin koje su uobičajeno prisutne u moštu (Tucknot, 1977) te etanol (Hereztyn, 1986). Za redukciju ove neugodne pojave preporuča se izbjegavanje doticaja vina s kisikom.

Osim stvaranja nepoželjnih mirisa vina, kvasac *Brettanomyces* može imati nepoželjan utjecaj i na boju vina. To se događa zbog 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). Uz promjenu boje, kvasac *Brettanomyces* ima utjecaj i na povećanje mutnoće vina.

## 2.5. Metode sprječavanja rasta kvasca *Brettanomyces bruxellensis*

Količina hlapivih fenola nastalih u vinu direktno ovisi o udjelu hidroksicimetne kiseline, kontaminaciji, tj. prisutnosti populacije kvasca *B. bruxellensis* te o sposobnosti akumulacije

nastalih hlapivih spojeva. Najpogodnija metoda suzbijanja rasta kvasca *B. bruxellensis* je potpuna kontrola parametara koji utječu na njegov rast, obzirom da to ponekad nije moguće potrebno je koristiti različite metode za ograničavanje rasta, tj. inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis*.

### 2.5.1. Kemijske metode

Najčešća kemijska metoda za sprečavanje rasta neželjenih mikroorganizama u vinu je upotreba SO<sub>2</sub> koji je djelotvoran i prije i poslje fermentacije. SO<sub>2</sub> ima antioksidacijska i antimikrobna svojstva, a najdjelotvorniji je u uvjetima niskog pH (< 3,5), kada je njegova koncentracija veća od 30 mg/L pri temperaturi medija 10-15 °C. No, zbog nedovoljno provedenih studija postoje oprečna mišljenja te je potrebno provesti dodatna istraživanja. Posljednjih godina smanjena je upotreba SO<sub>2</sub> kao sredstva za suzbijanje rasta kvasca *Brettanomyces* jer je utvrđena povezanost prisutnosti SO<sub>2</sub> u vinu sa pseudo-alergijama i problemima u dišnom sustavu.

1961. godine predstavljen je polivinilpolipirolidon (PVPP) koji djeluje kao adsorbens u vinu i pivu (McMurrough i sur., 1995). PVPP 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. Obično se koristi u količinama 12-72 g/hL, a te količine smanjuju količine ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, hidrosicimetnih kiselina, procijanida, katehina te polifenolnih i proteinskih kompleksa.

Postoje još i mnoga druga kemijska sredstva koja se koriste u svrhu suzbijanja rasta kvasca *Brettanomyces*.

Neka od njih su: (1) ozon-efektivan je u suzbijanju mikroorganizama bez da interferira sa fenolima

(2) dimetildikarbonat (DMDC) - efektivnost ovisi o količini etanola (Malfeito-Ferreira i sur., 2004) te njegova uporaba nije dopuštena u svim zemljama

(3) slabe kiseline (benzojeva kiselina, fumarinska kiselina) - smanjuje se aktivnost enzima koji sudjeluju u nastanku hlapivih fenolnih spojeva te ne uništavaju mikroorganizme nego inhibiraju njihov rast.

### 2.5.2. Biološke metode

U novije vrijeme biološke metode se smatraju poželjnijom zamjenom za kemijske metode ( Santos i sur., 2011). Enrique i sur., 2008 su opisali alternativni pristup koji se temelji na primjeni antimikrobnog peptida dobivenog iz prirodnog proteina. Rezultati istraživanja su pokazali da LfcinB17-31 ili pepsin LF hidrolizat (oba dobivena iz laktoferina) inhibiraju rast kvasca *Brettanomyces* u laboratorijskim uvjetima ili u vinu.

Benito i sur., 2008 su predložili još jednu novu strategiju kako bi smanjili dostupnost prekursora 4-etilfenola u vinu. To su postigli formiranjem piroantocijana djelovanjem sojeva kvasca *S. cerevisiae* sa visokom hidroksicimetnom dekarboksilnom (HcD) aktivnosti. Ta aktivnost značajno povećava nastanak vinilfenolnih piroantocijana te smanjuje konačnu koncentraciju 4-etilfenola i 4-etilgvajakola u vinu. Uporabom ove metode, koncentracija 4-etilfenola umanjila se za 70 %.

Još jedna biološka metoda suzbijanja rasta kvasca *Brettanomyces* je upotreba deacetiliranog derivata hitina, hitozina. Osim što je efikasan u suzbijanju rasta kvasca *Brettanomyces* upotrebljava se i kao antimikrobno sredstvo u tretiranju mnogih patogenih mikroorganizama poput *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimorium*, *Staphylococcus aureus* te *Escheria coli*. U pojedinačnoj kulturi kvasca *S. cerevisiae* i *B. bruxellensis* hitozin je produžio lag fazu rasta, a brzina rasta je bila proporcionalna koncentraciji dodanog hitozina. U mješovitoj kulturi došlo je do zaustavljanja rasta *B. bruxellensis* i *B. anomalus* dok je *S. cerevisiae* normalno rastao. Utvrđeno je da bi se hitozin mogao koristiti u suzbijanju štetnih vrsti kvasaca tijekom fermentacije, ali je njegovu aktivnost potrebno dodatno istražiti.

### 2.5.3. Fizikalne metode

Najčešće upotrebljavane fizikalne metode za sprječavanje rasta kvasca *Brettanomyces* su separacija mikrobnih stanica od vina, čišćenje opreme za proizvodnju vina i sanitacija bačvi. U novije vrijeme tim metodama se pribrajaju i uporaba pulsirajućeg električnog polja, ultrazvuka visoke snage ili visokog hidrostatskog tlaka.

Kod filtracije je potrebno obratiti pažnju na poroznost membrane (Zuehlke i sur., 2013). Problem se javlja jer se stanice kvasca iz roda *Brettanomyces* mogu smanjiti pod određenim uvjetima (nakon izlaganja SO<sub>2</sub> ili ulaskom u vegetativno stanje). Zbog toga stanice mogu proći kroz pore

veličine 0,45  $\mu\text{m}$ , koja se do nedavno smatrala efektivom za uklanjanje kvasca iz roda *Brettanomyces*. Novija istraživanja pokazuju da je za uklanjanje kvasca *Brettanomyces* najbolje koristiti pore veličine 0,22  $\mu\text{m}$ . Negativna posljedica filtracije, kao i bistrenja, je mogući gubitak boje (Suarez i sur., 2007) te smanjenje spojeva nositelja arome, estera te fenolnih spojeva (Peri i sur., 1998, Moreno i Azpiliceuta, 2006).

Još jedna metoda koja se često koristi u prehrambenoj industriji je ultrazvuk čija je upotreba relativno sigurna, ekološki prihvatljiva te služi za kontrolu mikrobnog kvarenja soka od grožđa ili vina.

Ultrazvuk visoke snage karakterizira visoka frekvencija (20-100 kHz) te visoka snaga (10-1000 W/cm<sup>2</sup>). Prolaskom ultrazvučnih valova kroz tekućinu dolazi do formiranja te skupljanja i širenja mjehurića nakon čega oni pucaju. Taj proces nazivamo kavitacijom (Maisonhaute i sur., 2002). Pucanje mjehurića uzrokuje nastanak lokaliziranih područja visoke temperature i tlaka, čak 5 000 °C i 50 000 kPa (Rokhina i sur., 2009) te nastanak hidroksilnih radikala (Koda i sur., 2009). Upravo ta područja visoke energije mogu uzrokovati pucanje stijenke mikrobne stanice što povećava osjetljivost na hidroksilne radikale (McClements i sur., 1995).

Upotrebe ultrazvuka visoke snage u procesiranju hrane su razne, a uključuju otplinjavanje, ekstrakciju, inaktivaciju enzima, čišćenje organskih i anorganskih površina. Dok se ultrazvuk niske snage koristi kako bi se povećala mikrobna aktivnost u nekim sustavima, s druge strane kavitacija kod ultrazvuka visoke snage je povezana sa uništavanjem mikrobnih stanica (Pyasena i sur., 2003).

Glavni parametri koji utječu na inaktivaciju mikroorganizama ultrazvukom su vrijeme i amplituda ultrazvučnog tretmana te temperatura i hidrostatski tlak medija (Alvarez i sur., 2002).

Dakle, inaktivacija se povećava:

- (1) povećanjem vremena trajanja tretmana - vrijeme tretmana i rast kvasca imaju obrnuto proporcionalan odnos
- (2) povišenjem tlaka - povećava se broj mjehurića i jakost implozije (Whillock i Harvery, 1997)
- (3) povećanjem amplitude - dolazi do povećanja broja mjehurića ili povećanja volumena tekućine koja je sklona kavitaciji (Suslick, 1998)
- (4) povišenjem temperature- temperatura i ultrazvuk imaju sinergističko djelovanje.

Učinak ultrazvuka dodatno se pojačava kada se kombinira s drugim metodama dekontaminacije poput ekstremnog pH, upotrebe antibiotika ili kloriranja. Glavni nedostatak primjene ove metode su visoke temperature koje mogu dovesti do nepovoljnih utjecaja na profil arome i boje vina (Boulton i sur., 1996)



### 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 Sauvignon iz Slavonije, Hrvatska, proizvedeno 2016 godine.

##### 3.1.3. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u tablici 2.

**Tablica 2.** 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

**Tablica 3.** Ostale kemikalije

<b>NAZIV</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
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 4.** Sastav čvrste YPD podloge

<b>SASTOJCI</b>	<b>MASENA KONCENTRACIJA (g/L)</b>
agar	20
glukoza	20
pepton	20
kvašćev ekstrakt	10
destilirana voda	1000 mL

**Tablica 5.** Sastav tekuće YPD podloge

<b>SASTOJCI</b>	<b>MASENA KONCENTRACIJA (g/L)</b>
glukoza	20
pepton	20
kvašćev ekstrakt	10
destilirana voda	1000 mL

**Tablica 6** . Sastav čvrste selektivne *Brettanomyces* podloge

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

Priprema:

44,2 g *Brettanomyces* podloge se izvaže 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. Zagrijava se još 10 minuta te izlije 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
- Vaga, Sartorius, Njemačka
- Vorteks, Ika, Njemačka
- Autoklav, Sutjeska, Srbija
- pH metar, Inolab, Njemačka
- Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, USA
- Vodena kupelj, Ika, Njemačka

### 3.1.7. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Menzure, čaše, odmjerne tikvice
- Staklene bočice
- Stalak za epruvete
- Termometar
- Erlenmeyerove tikvice
- Staklene pipete (1 mL i 10 mL) i propipete
- Sterilni tipsevi za mikropipete
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Mikropipete 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL
- Stalak za Eppendorf epruvete
- Bunsenov plamenik
- Pinceta

## 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)**

Stanice kvasca *B. bruxellensis* izdvojene su centrifugiranjem iz podloge 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 određenim uzorcima vina (tablica 7) korigiran je pH dodatkom 10 M NaOH otopine i /ili je dodan šećer (glukoza).

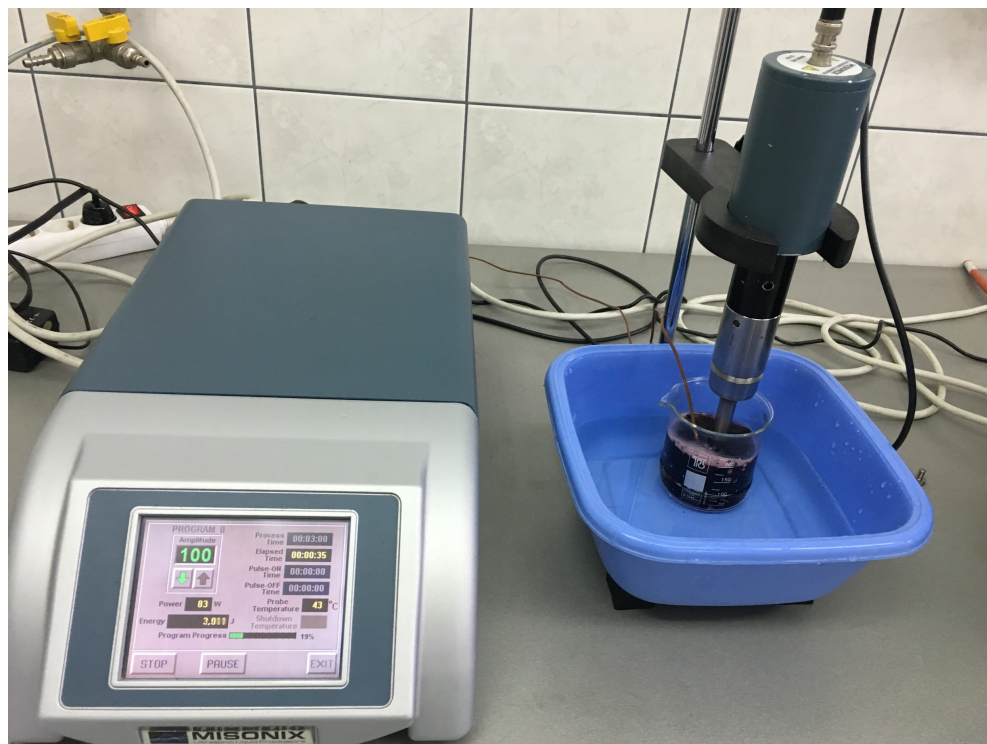
Početna koncentracija stanica u vinu određena je brojanjem poraslih kolonija na selektivnim *Brettanomyces* podlogama. Inokulacija vina je provedena 24 sata prije tretmana, a boce su inkubirane na 20 °C ± 2 °C. Prije uzimanja uzoraka suspenzija kvasca *B. bruxellensis* u vinu je dobro homogenizirala.

**Tablica 7.** 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	----	13
2	3,7	----	13
3	3,9	----	13
4	3,5	4	13
5	3,7	4	13
6	3,9	4	13

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

Uzorak inokuliranog crnog vina (200 mL) je uliven u staklenu čašu od 250 mL koja je služila kao komora u kojoj se provodio tretman. 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  $\mu$ m za sondu promjera 12,7 mm. Uzorci su prije tretmana zagrijani u vodenoj kupelji oko 2 minute do 43 °C, a ultrazvučni tretman se provodio 1,2 i 3 minute. Svi uzorci su rađeni u tri ponavljanja. Tijekom ultrazvučnog tretmana temperatura je održavana na 43 °C, a to se postizalo dodavanjem leda i vode.



**Slika 3.** Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, USA

### 3.2.5. Određivanje fizikalno-kemijskih karakteristika vina

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

### 3.2.6. Određivanje broja stanica kvasca *B. bruxellensis*

Broj stanica određivan je tijekom faze pripreme inokuluma te prije i nakon tretmana ultrazvukom visoke snage. Broj stanica određivan je naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja na čvrste YPD ili *Brettanomyces* podloge. Decimalna razrjeđenja su pripremljena u plastičnim kivetama na način da je volumen od 100  $\mu\text{L}$  kvašćeve suspenzije pomiješan s 900  $\mu\text{L}$  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. Nakon 7 – 10 dana inkubacije pri 24 °C izbrojane su izrasle kolonije. Porasle kolonije su brojane 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 naciepljenja. Na osnovu izbrojenih kolonija izračunat je broj stanica u mL podloge odnosno vina. Ukupni broj izražava se kao logaritam broja stanica (log CFU/mL).

**Formula za izračun broja stanica:**

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

**3.2.7. Senzorsko ocjenjivanje tretiranih vina prema Triangl testu**

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: 30 mL uzorka stavi se u prozirne staklene čaše za degustaciju vina (ISO 3591, 1977), kodirane troznamenkastim brojem, nakon čega se poklope 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 4.** Obrazac za triangl test

Statistička obrada triangl testova temelji se na upotrebi *Chi-square* ( $\chi^2$ ) 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 za ispitivanje utjecaja kemijskog sastava vina na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom) korišteno je crno vino sljedećih fizikalno-kemijskih karakteristika (tablica 8).

**Tablica 8.** Fizikalno-kemijski parametri crnog vina korištenog za pripremu varijacija u kemijskom sastavu vina

PARAMETAR	CRNO VINO
slobodni SO <sub>2</sub> (mg/L)	11
ukupni SO <sub>2</sub> (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

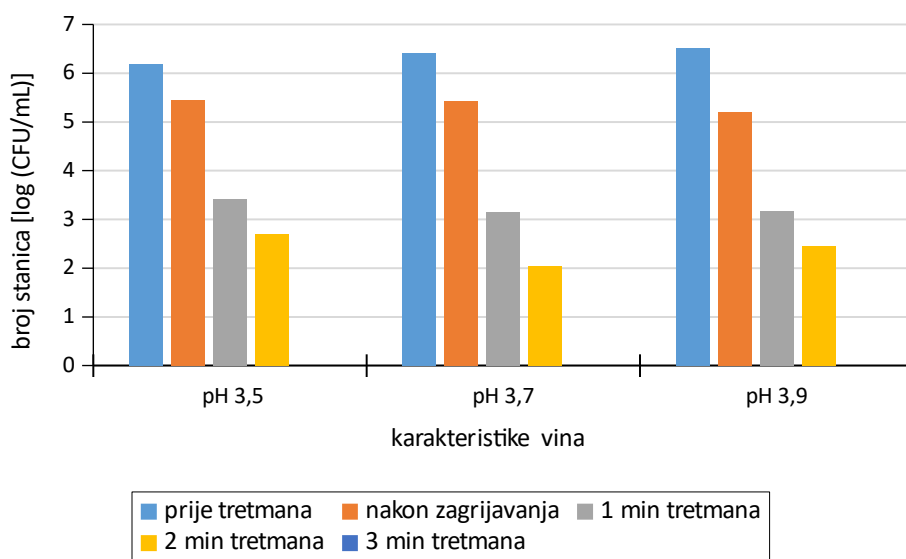
Kakvoća vina utvrđuje se na osnovi kemijskih analiza, mikrobioloških ispitivanja, ispitivanju ponašanja vina pri izlaganju zraku ili niskim i visokim temperaturama, organoleptičkih ispitivanja te odnosa pojedinih sastojaka u vinu bitnih za pojedino vino. Na temelju članka 56. stavka 1. Zakona o vinu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

- slobodni SO<sub>2</sub> <350 mg /L
- ukupni SO<sub>2</sub> <30 mg/L
- alkohol <15 %

- ukupna kiselost(g/L kao vinska kiselina) 4,5-14 g/L
- hlapiva kiselost( g/L kao očetna kiselina) < 1 g/L
- pH 3,0-3,8
- reducirajući šećeri (g/L) 4-9 g/L

Usporedbom dobivenih vrijednosti parametara sa dopuštenim propisanim vrijednostima vidljivo je da su sve vrijednosti u crnom vinu korištenom u ovom radu unutar granica tj. da je vino sigurno za stavljanje na tržište i konzumaciju ( "Narodne novine", br. 34/95).

U svrhu utvrđivanja utjecaja pH vina na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* primjenom termosonifikacije praćena je prisutnost kvasca *B. bruxellensis* prije i nakon tretmana (slika 5).

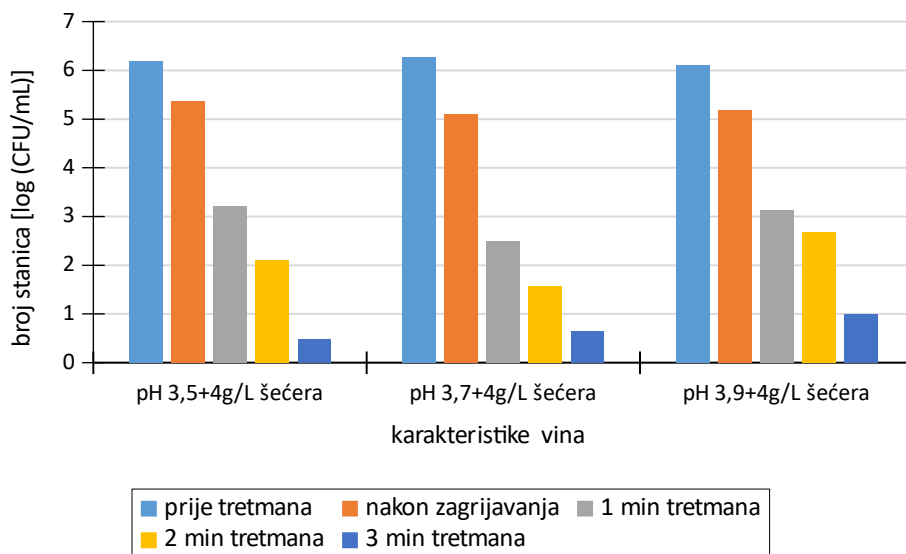


**Slika 5.** Prisutnost kvasca *B. bruxellensis* u vinu različitog pH prije i nakon tretmana termosonifikacijom

Početni broj stanica kvasca *B. bruxellensis* kreće se od 6,2 log CFU/mL do 6,5 log CFU/mL. Zagrijavanjem uzorka inokuliranog vina na temperaturu od 43 °C došlo je do smanjenja broja stanica kvasca *B. bruxellensis* za oko 1 log CFU/mL na 5,4 log CFU/mL kod pH vina 3,5 i 3,7 odnosno na 5,2 log CFU/mL kod pH vina 3,9. Nakon 1 minute tretmana termosonifikacijom broj stanica kvasca *B. bruxellensis* smanjio se za oko 2 log CFU/mL i iznosi 3,4 log CFU/mL kod pH vina 3,5 te 3,1 log CFU/mL kod pH vina 3,7 i 3,9. Daljnim produživanjem tretmana na 2 minute

uočen je daljni pad broja stanica kvasca za oko 1 log CFU/mL i iznosi od 2,1 log CFU/mL kod pH vina 3,7 do 2,7 log CFU/mL kod pH vina 3,5. Kod sve tri vrijednosti pH vina nakon 3 minute tretmana nije uočen rast kvasca *B. bruxellensis*. Iz dobivenih podataka vidljivo je i povećanje inhibicije rasta proporcionalno s vremenom provođenja tretmana te da se nakon 3 minute tretmanom termosonifikacijom (ultrazvukom visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom) potpuno inhibira rast kvasca *B. bruxellensis*. Dobiveni rezultati slažu se s istraživanjima za inaktivaciju kvasca *S. cerevisiae* u vinu koji su proveli Cacciola i sur., 2013. S druge strane, Luo i sur., 2012 zabilježili su značajnu inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* u vinu (oko 2.15 log CFU $^{-1}$ ) nakon 20 minuta tretmana ultrazvukom visoke snage na 23 – 25 °C ,no oni su u svom radu koristili ultrazvuk veće frekvencije (24 Hz).

Nadalje kako bi se utvrdilo da li prisutnost šećera može utjecati na inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* primjenom termosonifikacije praćena je prisutnost kvasca *B. bruxellensis* prije i nakon tretmana u uzorcima vina gdje je dodan šećer (glukoza) u koncentraciji od 4 g/L (slika 6).



**Slika 6.** Prisutnost kvasca *B. bruxellensis* u vinu različitog pH i uz dodatak 4 g/L šećera prije i nakon termosonifikacije

Početni broj stanica kvasca *B. bruxellensis* je podjednak u svim ispitivanim uzorcima i iznosi oko 6,2 log CFU/mL. Zagrijavanjem uzorka inokuliranog vina na temperaturu od 43 °C došlo je do smanjenja broja stanica kvasca *B. bruxellensis* za oko 1 log CFU/mL na 5,4 log CFU/mL kod pH

vina 3,5 i na 5,2 log CFU/mL kod pH vina 3,7 i 3,9. Nakon 1 minute tretmana termosonifikacijom broj stanica kvasca *B. bruxellensis* smanjio se za oko 2 log CFU/mL i iznosi 3,4 log CFU/mL kod pH vina 3,5 i 3,9 dok se kod pH vina 3,7 smanjio za 2,6 log CFU/mL i iznosi 2,5 log CFU/mL. Daljnim produživanjem tretmana na 2 minute uočen je daljni pad broja stanica kvasca za oko 1 log CFU/mL i iznosi od 1,6 log CFU/mL kod pH vina 3,7 do 2,7 log CFU/mL kod pH vina 3,9. Nakon 3 minute tretmana termosonifikacijom broj stanica kvasca *B. bruxellensis* smanjio se za oko 1,5 log CFU/mL i iznosio 0,5 log CFU/mL kod pH vina 3,5 do 1,0 kod pH vina 3,9. Značajniji utjecaj šećera na smanjenje inaktivacije stanica kvasca *B. bruxellensis* uočen je tek nakon 3 minute tretmana. Režek Jambrak i sur., 2017 su očili da inaktivacija mikroorganizama ovisi o više različitih parametara, poput sastava medija u kojem se nalaze mikroorganizmi, vrsti mikroorganizama kao i primjenjenoj amplitudi ultrazvuka te vremenu tretiranja.

Nadalje, kako bi se ispitao utjecaj termosonifikacije na senzorske karakteristike vina praćene su senzorske promjene vina pomoću triangl testa (tablica 9).

**Tablica 9.** Senzorske karakteristike tretiranih vina određene Triangl testom

TRIANGL	TOČAN ODGOVOR	POSTOTAK TOČNIH ODGOVORA ( %)
1- vino pH 3,5	A	50
2- vino pH 3,7	B	25
3- vino pH 3,9	C	33,3
4-vino pH 3,5 + 4 g/L šećera	B	46
5-vino pH 3,7 + 4 g/L šećera	C	38,5
6-vino pH 3,9 + 4 g/L šećera	B	23

Nadalje, kako bi se ispitao utjecaj termosonifikacije na senzorske karakteristike vina praćene su senzorske promjene vina (boja i miris) pomoću triangl testa (tablica 9). Tijekom senzorskog ocjenjivanja kandidati su od tri ponuđena uzorka trebali izabrati onaj koji se razlikuje od preostala dva. Najveći postotak točnih odgovora bio je kod vina čiji pH iznosi 3,5 sa i bez dodatka šećera. Najmanji broj točnih odgovora je kod vina sa pH 3,9 uz dodatak šećera. Manji broj točnih odgovora ukazuje da se razlika između tretiranih i ne tretiranih vina teže uočava.

## 5. ZAKLJUČAK

- Upotreba termosonifikacije (ultrazvuka visoke snage u kombinaciji s povišenom temperaturom) uzrokuje inaktivaciju stanica kvasca *B. bruxellensis*.
- Termosonifikacija u trajanju od 3 minute uzrokuje potpunu inaktivaciju stanica kvasca *B. bruxellensis* u vinima različitog pH.
- Variranje pH vrijednosti (3,5- 3,9) vina nema značajnijeg utjecaja na inaktivaciju stanica kvasca *B. bruxellensis*.
- Koncentracija šećera u vinu od 4 g/L smanjuje učinkovitost termosonifikacije na inaktivaciju stanica kvasca *B. bruxellensis*.
- Senzorski nije utvrđen negativan utjecaj termosonifikacije na senzorske karakteristike vina.

## 6. LITERATURA

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.

Álvarez I., Mañas P., Sala F. J., Condón S. (2002) Inactivation of *Salmonella enteritidis* by Ultrasonic Waves under Pressure at Different Water Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, In press.

Barentt J., Payne R., Yarrow D. (1990) *Yeast: Characteristics and Identification*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Benito S., Palomero F., Morata A., i sur. (2009) Factors affecting the hydroxyciamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making. *Journal of Food Science* **74**: M15-22.

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.

Blondin B., Gonde P., Ratomahenina R., i sur. (1984) A study of cyanide-insensitive respiration in the genus *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **28**: 637-44.

Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. (1996) *Principles and practices of winemaking*, Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, USA.

Cacciola V., Batllò I. F., Ferraretto P., Vincenzi S., Celotti E. (2013) Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *European Food Research and Technology* **236(2)**: 311-317.

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

Connel L., Stender H., Edwards G.C. (2002) Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based in peptide nucleic acid analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* **53**: 322-324.

Conterno L., Lucy Joseph C. M., Arvi T. J., Henick-Kling T., Bisson L. F. (2006) Genetic and Physiological Characterisation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Wines, *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 139-147.

Claussen N.H. (1904) On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. *Journal of the Institute of Brewing* **10**: 308-331.

Davenport R. (1976) Report of Long Ashton Research Station, Long Ashton. Microflora of Fruit Juice Products, vol.36

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.

Enrique M., Marcos J. F., Yuste M., Martinez M., Valles S., Manzanares P. (2008) Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology* **127**: 229-234.

Fugelsang K.C. (1998) *Brettanomyces*: Dr jekyll ou Mr: Hyde de vins? *Biofutur* **182**: 22-23.

Grbin P.R., Herderich M., Markides A., i sur. (2007) The role of lysine amino nitrogen in the biosynthesis of mousy off-flavor compounds by *Dekkera anomala*. *Journal od Agriculture and Food Chemistry* **55**: 10872-10879.

Heresztyn T. (1986a) Metabolism of phenolic compounds from hydroxycinamic acids by



*Brettanomyces* yeasts. *Archives of Microbiology* **146**: 96-98.

Koda S., Miyamoto M., Toma M., Matsuoka T., Maebayashi M. (2009) Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus* mutants by ultrasound at 500 kHz, *Ultrasonic Sonochemistry* **16**: 655-659.

Licker J. L., Acree T. E., Henick-Kling T. (1999) What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation in chemistry of wine flavour, 714. *ACS symposium series*, str. 96–115.

Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* **86**: 23-50.

Loureiro V., Malfeito-Ferreira M., (2006) *Dekkera/Brettanomyces* spp. *U*: Blackburn, Woodhead publishers, Cambridge, Food spoilage Microorganisms, str. 354-398.

Luo H., Schmid F., Grbin P. R., Jiranek V. (2012) Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry* **19 (3)**: 415-420.

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

Maisonhaute E., Prado C., White P.C., Compton R.G. (2002) Surface of acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: shear stress in ultrasonic cleaning. *Ultrasonic Sonochemistry* **9**: 297-303.

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.

McMurrough 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.

Merico A., Sulo P., Piskur J., Compagno C. (2007) Fermentativ lifestyle in yeasts belonging to the *saccharomyces* complex. The *FEBS Journal* **274(4)**: 976-989.

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

Neva M., Fernandez F. P., Romero J. I. L., Martinez J. J., Gomez M. A., Fidalgo M., (1998) Deteccion de *Dekkera/Brettanomyces* en instalaciones de vendemia mediante PCR. *Aliment Equipos Tecnologia* **8**:81-85.

Oelofse A., Pretorius I. S., du Toit M. (2008) Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal for Enology and Viticulture* **29 (2)**.

Peri C., Riva M., Decio P. (1988) Crossflow membrane filtration of wines: comparison of performance of ultrafiltration, microfiltration, and intermediate cut-off membranes. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**:162-168.

Peynaud E., Domercq S. (1956) *Brettanomyces* isolated from grape and wine. *Archives of Microbiology* **24**:266-270.

Režek Jambrak A., Šimunek M., Evačić S., Markov K., Smoljanić G., Frece J. (2017). Influence of high power ultrasound on selected moulds, yeasts and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple, cranberry and blueberry juice and nectar. *Ultrasonics*

Rokhina E.V., Piet L., Virkutyte J., (2009) Low-frequency ultrasound in biotechnology:state of the art, *Trends in Biotechnology* **27**:298-306.

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.

Santos A., Navascues E., Bravo E., Marquina D. (2011) Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*, *International Journal of Food Microbiology* **145**:147-154.

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., Calderón F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. *Food Chemistry* **102**:10-21.

Suslick K. S. (1988) Homogeneous sonochemistry. U: Ultrasound. Its chemical, physical, and biological effects, VCH Publishers, Inc. New York, str. 123-163.

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.

Zuehlke J. M., Petrova B., Edwards C. G. (2013) Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology* **4**:57-78.

Whillock G. O. H., Harvey B. F. (1997) Ultrasonically enhanced corrosion of 304L stainless steel I: The effect of temperature and hydrostatic pressure. *Ultrasonic Sonochemistry* **4**: 23-31

## 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