



## PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Odabrani biotehnoški čimbenici koji utječu na alkoholnu fermentaciju pri proizvodnji vina

## *Selected biotechnological factors affecting alcoholic fermentation in winemaking*

Vlatka Petravić-Tominac<sup>1</sup>, Sven Mujadžić<sup>2</sup>, Vesna Zechner-Krpan<sup>1\*</sup>, Hrvoje August<sup>3</sup>, Darko Velić<sup>4</sup>,

Natalija Velić<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Xellia d.o.o (Xellia Ltd), Slavonska avenija 24/6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Ireks Aroma d.o.o., Radnička c. 37, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

\* Corresponding author:

Tel. +385 1 46 05 142; Fax. +385 1 48 36 424; e-mail: [vzkrpan@pbf.hr](mailto:vzkrpan@pbf.hr)

### Sažetak

Odstupanja od normalnog tijeka fermentacije predstavljaju veliki problem u proizvodnji vina. Važno je poznavati čimbenike koji utječu na tijek fermentacije kako bi se izbjeglo usporavanje i/ili zastoj fermentacije te spriječilo ekonomske gubitke. Brojna istraživanja pokazala su da odstupanja od normalnog tijeka fermentacije mogu imati više uzroka. U ovom radu su ukratko objašnjeni najvažniji čimbenici koji utječu na tijek fermentacije u proizvodnji vina, a mogu se grupirati u tri skupine - nedostatak nutrijenata, prisutnost spojeva koji inhibiraju alkoholnu fermentaciju te utjecaj enoloških postupaka. Pored zasebnih učinaka pojedinih čimbenika, moguće je i smanjenje brzine fermentacije zbog njihovog sinergističkog djelovanja, što fermentacijske probleme čini još složenijima.

**Cljučne riječi:** proizvodnja vina, fermentacija, usporena fermentacija, zastoj fermentacije

### Abstract

Deviations from the normal course of fermentation have been a major problem in wine production. It is important to know the factors affecting the fermentation in order to avoid sluggish or stuck fermentation and prevent economic losses. Numerous studies have shown that deviations from the normal course of fermentation can have multiple causes. This paper gives a brief overview of the most important factors affecting the wine fermentation, that can be further grouped into three categories, namely – the absence or lack of nutrients, the presence of compounds that inhibit the alcoholic fermentation and the impact of oenological practices. In addition to individual effects of certain factors, the fermentation speed can decrease because of the synergistic action of various factors, which makes fermentation problems even more complex.

**Keywords:** winemaking, fermentation, sluggish fermentation, stuck fermentation

### Uvod

Istraživanja problema koji se zbivaju pri proizvodnji vina započeo je Louis Pasteur u drugoj polovici 19. stoljeća (Barnett, 2000). Istraživanja uzroka problema tijekom fermentacije intenzivno su nastavljena i u novije vrijeme, pri čemu su različiti čimbenici prepoznati kao odgovorni, kao što su velika početna koncentracija šećera, nedostatak dušika, nedostatak vitamina (posebice tiamina), nedostatak kisika, pretjerano bi-strenje mošta, anaerobni uvjeti, velike koncentracije etanola, inhibicija stanica kvasca nusproduktima fermentacije (posebice masnim kiselinama i octenom kiselinom), pH-vrijednost,

killer-toksini i pesticidi (Alexandre i Charpentier, 1998; Bisson i Butzke, 2000; Malherbe i sur., 2007). Osim zasebnih učinaka svakog od navedenih čimbenika koji uzrokuju smanjenje brzine fermentacije, moguće je i njihovo sinergističko djelovanje, što čini fermentacijske probleme još složenijima. S obzirom na sve navedeno, iznimno je teško točno predvidjeti probleme koji se mogu pojaviti tijekom fermentacije i utvrditi njihove uzročnike (Alexandre i Charpentier, 1998; Malherbe i sur., 2007).

Utjecaji navedenih čimbenika na fermentaciju su mnogobrojni te uključuju sniženje pH-vrijednosti, inhibiciju aktivnosti ključnih enzima i promjene u staničnoj membrani kvasca.



To nadalje može inducirati promjene metabolizma stanica kvasca zbog čega dolazi do smanjenja proizvodnje biomase kvasca, vijabilnosti stanica i brzine fermentacije. Kako bi simulirali realne uvjete, mnoga istraživanja provedena su korištenjem sintetskih podloga ili podloga koji oponašaju sastav mošta, međutim u takvim podlogama se kvasac može ponašati drugačije nego u realnim uvjetima (Alexandre i Charpentier, 1998).

Vijabilnost kvasca je postotak živih stanica u ukupnom broju stanica kvasca, a vitalnost označava fiziološko stanje kvašćevih stanica tj. njihovu sposobnost provođenja potpune fermentacije. Tijek alkoholne fermentacije i karakteristike vina ovise o broju živih stanica kvasca i njihovoj vitalnosti. Zadovoljavajuća vijabilnost i vitalnost kvasca potrebne su za provođenje fermentacije do suhog vina. Također je važno da odabrani soj kvasca može fermentirati pri kombinaciji uvjeta koji vladaju tijekom fermentacije (Iland i sur., 2007). Značaj kvasca za tijek fermentacije opisan je u literaturi (Bisson, 1999; Bisson i Butzke, 2000; Boulton, 1996; Fugelsang i Edwards, 2007; Krieger-Weber, 2009) i nije predmet interesa ovog rada.

Unatoč značajnim poboljšanjima u praćenju i kontroli fermentacije, usporavanje (eng. sluggish fermentation) i zastoj fermentacije (eng. stuck fermentation) ostaju velik izazov za vinsku industriju širom svijeta (Malherbe i sur., 2007). Pri proizvodnji vina važno je postići potpunu alkoholnu fermentaciju uz malu koncentraciju neprevrelih šećera, što smanjuje mogućnost kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima, prvenstveno bakterijama octene i mliječne kiseline. One mogu metabolizirati neprevreli šećer te povećati koncentraciju hlapljivih kiselina i nastajanje nepoželjnih estera uz mogućnost nastajanja diacetila (Alexandre i Charpentier, 1998).

Bisson (1999) je definirala nepotpunu fermentaciju (eng. incomplete fermentation) ili zastoj fermentacije kao one slučajeve u kojima je na kraju prisutna veća koncentracija zaostalog šećera od željene. Usporene fermentacije su one tijekom kojih kvasac sporo troši šećer. Važno je istražiti uzroke nepravilnih fermentacija u industrijskim vinskim podrumima, jer one mogu dovesti do ekonomskih gubitaka. Kinetika fermentacije može se pratiti određivanjem koncentracije utrošenog šećera, određivanjem nastalog CO<sub>2</sub> ili mjerenjem gustoće (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a).

Temperatura ima utjecaja ne samo na brzinu fermentacije koju provode kvasci iz roda *Saccharomyces*, nego i na ravnotežu između kvasaca iz roda *Saccharomyces* i divljih kvasaca. U proizvodnji crnih vina (20 – 30 °C) dominantan je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, djelomično i zbog veće temperature fermentacije. Pri manjim temperaturama, poput onih koje se primjenjuju pri proizvodnji bijelih vina, divlji kvasci se mogu umnožiti do puno većih koncentracija (Fugelsang i Edwards, 2007).

U ovom radu opisan je utjecaj sastava mošta i fermentacijskih uvjeta na tijek alkoholne fermentacije pri proizvodnji vina. Objasnjeno je kako na tijek fermentacije utječu nedostatak hranjivih tvari (dušika, kisika, sterola, minerala, vitamina), prisutnost spojeva koji inhibiraju fermentaciju (etanol, organske kiseline) te utjecaj sumporenja i ostalih postupaka koji se provode u tehnologiji vina. Rad se temelji na razmatranju kemijskih i biokemijskih čimbenika, dok utjecaj mikroflora prisutne u moštu, kao i agrokemijskih čimbenika nije detaljnije razrađen u ovom radu, jer se radi o preopsežnim temama.

## 1. Nedostatak hranjivih tvari

### 1.1. Nedostatak asimilacijskog dušika

Umjesto izraza asimilacijski dušik, koji je uobičajen među vinarima, inače se u biotehnologiji koristi naziv asimilabilni dušik, što znači onaj kojeg kvasac može asimilirati. Asimilacijski dušik (eng. yeast assimilable nitrogen, YAN) koji kvasac može koristiti u svom metabolizmu tijekom fermentacije predstavlja zbroj koncentracija dušika prisutnog u primarnim aminokiselinama i amonijevim ionima prisutnima u moštu. Pored ovih izvora, dušik je u moštu prisutan i u sastavu drugih spojeva koje kvasac ne može asimilirati. Koncentracija asimilacijskog dušika može biti varijabilna, a uobičajeno se koristi kao pokazatelj nutritivnog statusa mošta (Butzke, 2010; Waterhouse i sur., 2016).

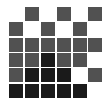
Zbog nedovoljne koncentracije asimilacijskog dušika može doći do usporavanja ili zastoja fermentacije (Lagunas i sur., 1982; Salmon, 1989; Alexandre i Charpentier, 1998; Butzke, 2010). Na potrebu kvasca za dušikom utječe prisutnost zraka, ali i početna koncentracija glukoze. Mala početna koncentracija odgovarajućih izvora dušika limitira rast biomase kvasca, što dovodi do usporavanja katabolizma šećera. Ako kvasac tijekom fermentacije potroši ove izvore dušika iz hranjive podloge, u njegovoj stanici dolazi do zastoja sinteze proteina i drastičnog pada transporta šećera.

Koncentracije asimilacijskog dušika od 120 do 140 mg/L omogućavaju potpunu fermentaciju do suhog vina (Alexandre i Charpentier, 1998; Malherbe i sur., 2007; Butzke, 2010), dok su najveće brzine fermentacije mošta zabilježene pri 500 mg N/L (Butzke, 2010). Pri proizvodnji bijelih vina će 250 - 300 mg dušika/L omogućiti normalnu brzinu fermentacije i izražen voćni karakter vina. Za crna vina je dostupno manje podataka, ali se općenito smatra kako je za postizanje odgovarajuće kvalitete gotovog vina potrebno osigurati slične koncentracije asimilacijskog dušika kao i pri proizvodnji bijelih vina. Pri tome, prisutnost čvrstih dijelova grozda koji polako otpuštaju aminokiseline i druge nutrijente tijekom proizvodnje crnih vina predstavlja prednost u odnosu na proizvodnju bijelih vina.

### 1.2. Nedostatak kisika

Metabolizam kvasca ovisi o koncentraciji otopljenog kisika na početku fermentacije. Otopljeni kisik se tijekom fermentacije brzo troši djelovanjem kvasca i oksidaza (enzima koji su prirodno prisutni u moštu). Nedostatak kisika tijekom fermentacije mošta dovodi do kvalitativnih i kvantitativnih promjena u sastavu lipida stanica kvasca. U staničnoj membrani uslijed nedostatka kisika dolazi do inhibicije biosinteze lipida te se smanjuje koncentracija ergosterola i nezasićenih masnih kiselina. Zbog toga se smanjuju brzina glikolize i brzina rasta stanica kvasca, usporava rast biomase i opada vijabilnost kvasca, što dovodi do usporavanja fermentacije. Promjena u sastavu lipida stanične membrane dovodi do oslabljene otpornosti stanica kvasca na etanol (Alexandre i Charpentier, 1998; Ribéreau-Gayon i sur., 2006a; Krieger-Weber, 2009).

Aeracijom ili mikrooksigenacijom mošta tijekom fermentacije poboljšavaju se rast i vijabilnost kvasca, jer je u aerobnim uvjetima stanična membrana kvasca bogatija nezasićenim masnim kiselinama i ergosterolom, koje kvasac u takvim uvjetima može sintetizirati. Ergosterol i nezasićene masne ki-



seline inače se u literaturi nazivaju i faktorima preživljavanja (eng. „survival factors“), što dovoljno govori o njihovoj važnosti (Boulton i sur., 1996; Ribéreau-Gayon, 2006b; Malherbe i sur., 2007).

Nedostatak kisika također utječe na nastajanje toksičnih masnih kiselina, tj. oktanske (kaprilne) kiseline i dekanske (kaprinske) kiseline, a koncentracije ovih kiselina smanjuju se tijekom aeracije mošta. Proizvođači vina često aeriraju mošt kako bi spriječili štetne učinke nedostatka kisika. Tako tolerancija stanica kvasca prema etanolu i njihova vijabilnost rastu zbog odgovarajućeg sastava lipida u staničnoj membrani kvasca i pada koncentracije toksičnih masnih kiselina (Alexandre i Charpentier, 1998).

Kritična koncentracija otopljenog kisika za kvasac *S. cerevisiae* iznosi 0,6 mg/L (Marić i Šantek, 2009). Kisik je pri optimalnim uvjetima za provođenje fermentacije slabo topljiv te je stoga njegova koncentracija u moštu relativno mala, a dodatno je smanjuju oksidaze koje troše većinu otopljenog kisika. SO<sub>2</sub> inhibira oksidaze koje su prirodno prisutne u moštu, posebice polifenol-oksidaze. Ukoliko oksidaze nisu već inhibirane, aeracija neće biti učinkovita (Boulton i sur., 1996; Alexandre i Charpentier, 1998).

### 1.3. Nedostatak minerala

Neki od minerala potrebnih za optimalan rast kvasca i fermentaciju neophodni su u milimolarnim koncentracijama (npr. magnezij). Drugi su potrebni u mikromolarnim koncentracijama (npr. kalcij) dok su neki toksični za kvasac već u mikromolarnim koncentracijama (teški metali) (Birch i sur., 2003). Prema nekim autorima, mošt uglavnom kvalitativno i kvantitativno pokriva potrebe kvasca za mineralima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a), dok drugi navode cink i magnezij kao potencijalno litimirajuće (Malherbe i sur., 2007; Walker i Stewart, 2016).

Koncentracija cinka u grožđu može varirati ovisno o bioraspoloživosti cinkovih iona u tlu vinograda, kao i o primjeni gnojiva i fungicida tijekom uzgoja grožđa. Stoga su moguće suboptimalne koncentracije cinka u moštu, što negativno utječe na fermentacijsku učinkovitost kvasaca. Soj kvasca je također čimbenik o kojem ovisi optimalna koncentracija cinka (De Nicola i sur., 2009).

Magnezij je kvascima potreban za mnoge metaboličke i fiziološke funkcije. On stabilizira nukleinske kiseline, proteine, polisaharide i lipide, a također ima ključnu ulogu u kontroli metabolizma, rastu i staničnoj proliferaciji. Nema dostupnih istraživanja koja bi odredila ulogu iona Mg<sup>2+</sup> tijekom alkoholne fermentacije u proizvodnji vina, ali je poznata njegova važnost tijekom fermentacije melase ili glukoze (u minimalnoj ili kompleksnoj podlozi). Zbog toga se može pretpostaviti da magnezij ima važnu ulogu i u fermentaciji mošta. Postoji izravna veza između dostupnosti magnezija i kinetike fermentacije. Limitacija magnezijem odgovorna je za smanjenu brzinu rasta kvasca i smanjenu fermentacijsku aktivnost. Dodatak magnezija u fermentacijsku podlogu omogućava poboljšanje proizvodnje etanola, što se može objasniti činjenicom da magnezij stabilizira strukturu membrane stanica. Nažalost, malo je podataka o koncentraciji iona Mg<sup>2+</sup> u moštu. U moštu dobivenom iz bijelog grožđa, određene su koncentracije iona Mg<sup>2+</sup> od 10 - 140 mg L<sup>-1</sup>. Neki autori navode da je optimalna koncentracija iona Mg<sup>2+</sup> za vijabilnost kvasca (5 mg L<sup>-1</sup>) manja od koncentracije koja je inače prirodno prisutna tijekom vinifikacije

(Alexandre i Charpentier, 1998), dok drugi govore o mogućem nedostatku magnezija (Walker i Stewart, 2016).

Primijećeno je da transport Mn<sup>2+</sup> u stanicu ovisi o unutarstaničnoj koncentraciji Mg<sup>2+</sup> te da toksičnost mangana ovisi o omjeru iona mangana i magnezija u stanici kvasca. Isto tako visoka koncentracija mangana negativno utječe na ulazak magnezija u stanicu, što može dovesti do deficita magnezija u kvascu (Blackwell i sur., 1997; Blackwell i sur., 1998; Malherbe i sur., 2007). Također se pokazalo kako je međusobni omjer koncentracija iona Mg<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup> u moštu izuzetno važan za fermentaciju i za organoleptički profil vina (Birch i sur., 2003). Može se pretpostaviti da međusobna neravnoteža koncentracija različitih anorganskih iona, slično kao u navedenim primjerima, može dovesti do promjene fizioloških svojstava stanica vinskog kvasca i posljedično do problema pri fermentaciji.

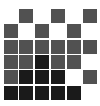
Funkcija svih minerala pri fermentaciji mošta nije još dovoljno poznata te je vrlo malo istraživanja provedeno upravo u moštu, dok je veći dio podataka dostupan na temelju eksperimenata provedenih u drugim hranjivim podlogama (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a; De Nicola i sur., 2009). Pored koncentracija pojedinih minerala u moštu valjalo bi istražiti i utjecaj njihovih međusobnih odnosa na fiziološka svojstva pojedinih enološki zanimljivih sojeva kvasca. Pritom treba uzeti u obzir da se u suvremenom vinarstvu koriste komercijalne starter-kulture kvasca roda *Saccharomyces*, ali u novije vrijeme i kvasaca drugih rodova koji su tijekom selekcije pokazali poželjna enološka svojstva.

### 1.4. Nedostatak vitamina

Smatra se kako su u nekim slučajevima usporene fermentacije povezane s nedostatkom vitamina, ali je malo istraživanja koja potkrepljuju navedenu tezu (Ough i sur., 1989; Alexandre i Charpentier, 1998). Mošt sadrži faktore rasta, uključujući i vitamine, ali tijekom alkoholne fermentacije dolazi do promjene njihove koncentracije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Ovo u slučaju nedovoljne početne koncentracije vitamina u moštu može dovesti do potrebe za njihovim naknadnim dodavanjem tijekom fermentacije.

Dostupna istraživanja fokusirala su se uglavnom na koncentracije tiamina (vitamin B<sub>1</sub>), koje se u moštu kreću u rasponu 150 - 750 µg L<sup>-1</sup>. Iako kvasac *S. cerevisiae* može sintetizirati tiamin, nedostatak ovog vitamina može dovesti do usporene fermentacije (Ough i sur., 1989). Kvasci mogu utrošiti 600 - 800 µg/L tiamina, što je više od koncentracija prisutnih u moštu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Do smanjenja koncentracije tiamina u moštu može doći jer ga divlji kvasci brzo asimiliraju i mogu ga potrošiti u roku od nekoliko sati. Ukoliko se odgađa inokulacija mošta selekcioniranim sojevima kvasca *S. cerevisiae*, tada može doći do negativnog utjecaja populacije divljih kvasaca na fermentacijsku aktivnost. Koncentracija tiamina može se smanjiti i zbog sumporenja. Djelovanjem bisulfitnih iona dolazi do cijepanja tiamina, što može izazvati poteškoće u fermentaciji, pogotovo kada je SO<sub>2</sub> prisutan u velikim koncentracijama (Alexandre i Charpentier, 1998; Fugelsang i Edwards, 2007). Dodatkom 0,5 mg tiamina po litri mošta može se postići porast žive aktivne populacije stanica za 30 % te istovremeno ubrzati fermentaciju. Međutim, ovakvi rezultati se dobivaju u laboratorijskim uvjetima, ali u praksi nije uvijek tako. Koncentracija tiamina prisutna u grožđu može, ali i ne mora biti limitirajući faktor za kinetiku fermentacije, što





ovisi o grožđu i o drugim čimbenicima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a).

Koncentracije ostalih vitamina su različite u moštu i vinima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Promjene koncentracija vitamina tijekom fermentacije nisu jednake za sve vitamine. Dok tiamin može skoro potpuno nestati, s ostalim vitaminima je situacija drugačija. Tako su npr. koncentracije nikotinamida slične u moštu i u crnim vinima, ali su oko 40 % niže u bijelim vinima. S druge strane, riboflavin nastaje djelovanjem kvasca. Nadalje, kvasci koriste, a potom i otpuštaju pantotensku kiselinu, piridoksin i biotin te je njihova koncentracija skoro identična u moštu i vinu.

## 2. Spojevi koji inhibiraju alkoholnu fermentaciju

### 2.1. Etanol

Kvasac fermentira šećer u etanol koji se akumulira i može inhibirati samu alkoholnu fermentaciju te uzrokovati druge nepoželjne učinke na stanice kvasca. Iako se etanol tijekom alkoholne fermentacije nakuplja unutar stanice, unutarstanične i izvanstanične koncentracije etanola su slične (Alexandre i Charpentier, 1998).

Dobro je poznato kako etanol inhibira rast i djeluje toksično na stanice kvasca (Bauer i Pretorius, 2000). Primjerice, etanol inhibira aminokiselinsku permeazu i mehanizam transporta glukoze. Važno je napomenuti kako se brzina transporta (ulaska) glukoze u stanicu niti njezina razgradnja glikolizom ne mijenja do volumnog udjela etanola od 8,5 % (v/v), ali se smanjuje brzina fermentacije za oko 50 % (Cartwright i sur., 1986; Salmon, 1989).

Prisutnost etanola uzrokuje promjenu u propusnosti membrane kvasca *S. cerevisiae* (Alexandre i Charpentier, 1998). Etanol vjerojatno ulazi u hidrofobnu unutrašnjost membrane i time povećava njenu polarnost te tako dopušta slobodnu izmjenu polarnih molekula i slabi hidrofobne interakcije. Stres uzrokovan etanolom izaziva promjene sastava lipida kvaščeve stanične membrane, tako da se mijenja stupanj zasićenosti i dužina lanaca nezasićenih masnih kiselina te stoga dolazi do promjene u fluidnosti membrane. Povećanje indeksa nezasićenosti pogoduje povećanoj otpornosti prema etanolu i vijabilnosti kvasca *S. cerevisiae*. Kod kvasca koji u staničnoj membrani imaju puno nezasićenih masnih kiselina manji je negativan utjecaj etanola na potrošnju glukoze i aminokiselina. Uvođenjem kisika u mošt, u stanicama dolazi do povećanja sinteze nezasićenih masnih kiselina i sterola (tzv. „faktora preživljavanja“), koji doprinose većoj otpornosti stanica na etanol i smanjuju štetne učinke etanola, što dovodi do povećanja vijabilnosti stanica. Jasno je kako je smanjenje brzine fermentacije povezano s nastajanjem etanola, pogotovo kada se u obzir uzmu svi učinci etanola na fermentaciju. Ovisno o toleranciji kvasca prema etanolu, veća koncentracija etanola može brzo dovesti do usporavanja ili zastoja fermentacije.

### 2.2. Organske kiseline

Na metabolizam kvasca tijekom vinifikacije mogu nepovoljno djelovati srednjelančane masne kiseline (npr. oktanska i

dekanska kiselina) te octena kiselina (Alexandre i Charpentier, 1998).

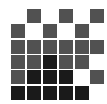
#### 2.2.1. Srednjelančane masne kiseline

Tijekom fermentacije u bogatom mediju uz određene fizikalno-kemijske uvjete, stanični ciklus kvasca ipak može biti narušen te se javlja značajno smanjenje fermentacijske aktivnosti, sve dok se ne dogodi potpuni zastoj procesa. U ovom slučaju, inhibicija je rezultat spojeva nastalih uslijed metabolizma kvasca. Osim etanola, srednjelančane masne kiseline su također inhibitori fermentacije koje kvasac *S. cerevisiae* sintetizira tijekom alkoholne fermentacije (Lafon-Lafourcade i sur. 1984; Jackson, 2014). Koncentracija masnih kiselina oslobođenih u fermentacijski medij ovisi o soju kvasca, sastavu medija i fermentacijskim uvjetima (temperatura, pH-vrijednost, aeracija). Srednjelančane masne kiseline se u literaturi spominju kao antimikrobni spojevi. Pri koncentracijama od 114  $\mu\text{mol L}^{-1}$  oktanske kiseline, odnosno 46  $\mu\text{mol L}^{-1}$  dekanske kiseline, uočeno je smanjenje specifične brzine rasta kvasca *S. cerevisiae* koje eksponencijalno ovisi o koncentraciji masnih kiselina. Ove masne kiseline također djeluju na brzinu odumiranja stanica kvasca *Saccharomyces bayanus* zbog povećane temperature ili uslijed temperaturnog stresa u kombinaciji s etanolom, dok u stanicama kvasca *S. cerevisiae* stimuliraju gubitak aminokiselina i drugih komponenata (Alexandre i Charpentier, 1998).

Toksičnost masnih kiselina na kvasac povećava se smanjenjem pH-vrijednosti medija. To ukazuje na činjenicu da su nedisocirane molekule najtoksičnije, pri čemu dekanska kiselina ima veći inhibicijski učinak nego oktanska kiselina. Dekanska kiselina izaziva promjenu u staničnoj membrani povećavajući njezinu fluidnost, uslijed zakiseljavanja citoplazme. Također je moguće da srednjelančane masne kiseline djeluju sinergistički s etanolom i tako dodatno usporavaju fermentaciju. Dekanska i oktanska kiselina inhibiraju transport heksoza (pri čemu dekanska kiselina ima jače djelovanje), što može dovesti do usporavanja ili zaustavljanja fermentacije (Alexandre i Charpentier, 1998).

#### 2.2.2. Octena kiselina

Octena kiselina je još jedan od krajnjih produkata koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije te i ona dodatno negativno utječe na rast, fermentaciju i vijabilnost vinskih kvasaca. Način djelovanja octene kiseline podsjeća na djelovanje srednjelančanih masnih kiselina. Kako bi se objasnila uloga octene kiseline u smanjenju brzine fermentacije, istraživana su dva moguća mehanizma inhibicije. Prvi mehanizam je zakiseljavanje citoplazme (utjecaj octene kiseline na pH-vrijednost o kojoj ovisi aktivnost enzima), a drugi mehanizam je djelovanje octene kiseline izravno na transport ili na aktivnosti enzima. Mnogi slučajevi usporene i zaustavljene fermentacije uzrokovani su nastajanjem velikih količina octene kiseline. To se može dogoditi tijekom nepravilnog transporta pljesnivog grožđa iz vinograda do vinarija, što dovodi do preuranjene alkoholne fermentacije oslobođenog soka, ali i zbog naknadnog rasta bakterija octene kiseline. Slično se događa i kod nepravilne obrade svježe dobivenog mošta (najčešće pri proizvodnji crnih vina, kada je početna pH-vrijednost mošta veća od 3,5) ili kada mošt nije inokuliran vinskim kvascem niti tretiran sumporovim dioksidom, što omogućava ubrzani rast nepoželjnih (ali



autohtonih) bakterija rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Ove bakterije proizvode velike količine octene kiseline, umjesto mliječne kiseline (Boulton i sur., 1996; Alexandre i Charpentier, 1998; Jackson, 2014).

### 2.3. Utjecaj sumporenja

Sumporenje se stoljećima koristi u vinarstvu (Boulton i sur., 1996; Ribéreau-Gayon i sur., 2006a; Butzke i sur., 2010). Sulfit je vrlo toksičan za mikroorganizme i mikroflora grožđa je osjetljiva na njegovo djelovanje, dok su selekcionirani kvasci koji se rutinski koriste u fermentaciji manje osjetljivi. Antimikrobno djelovanje sulfita u vodenim otopinama ovisi o pH-vrijednosti, temperaturi i vremenu izlaganja. Sulfiti postoje u otopinama u tri oblika, odnosno kao molekularni oblik ( $\text{SO}_2$ ) te kao  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ , a međusobni omjer navedenih oblika ovisi o pH-vrijednosti. Ravnotežna reakcija između različitih molekularnih oblika (Guzzo i Desroche, 2009) prikazane su jednadžbom:



pH-vrijednosti različitih vrsta vina kreću se u području od 2,8 do 4,0 (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Molekularni  $\text{SO}_2$  500 puta jače djeluje na kvasac nego ostali oblici u kojima sulfit može biti prisutan ( $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ) što objašnjava zašto je on osobito učinkovit prema kvascima koji su prisutni u moštu, koji je pH-vrijednosti između 3,0 i 3,5 (Alexandre i Charpentier, 1998).

Sulfit se primjenjuje u raznim fazama tijekom proizvodnje vina, ali uglavnom se dodaje moštu prije alkoholne fermentacije radi kontrole rasta nepoželjnih vrsta. Dodatak  $\text{SO}_2$  u mošt mora biti strogo kontroliran. Primijenjena doza trebala bi inhibirati rast nepoželjnih vrsta, ali istodobno omogućiti rast kvasca koji provodi fermentaciju. Opće je poznato kako otpornost kvasca na  $\text{SO}_2$  ovisi o vrsti kvasca (Stratford i sur., 1987). Stoga, velike koncentracije  $\text{SO}_2$  u moštu mogu biti odgovorne za odgođenu ili zaustavljenu fermentaciju (Romano i Suzzi, 1993), premda se to u današnje vrijeme rijetko događa. Dodatak  $\text{SO}_2$  važan je radi inhibicije polifenol-oksidadaze i sprječavanja potpune potrošnje kisika. U daljnjem tekstu su sažeti molekularni mehanizmi utjecaja  $\text{SO}_2$  na mikrobne stanice (Alexandre i Charpentier, 1998).

Štetno djelovanje sulfita prema kvascu u velikoj mjeri ovisi o akumulaciji  $\text{SO}_2$  u stanici. Neki autori smatraju kako  $\text{SO}_2$  ulazi u kvasac *S. cerevisiae* aktivnim transportom, dok drugi (Stratford i Rose, 1986) tvrde da  $\text{SO}_2$  ulazi u stanice jednostavnim difuzijom. Brzina transporta sulfita ima važnu ulogu za njegovo štetno djelovanje, a manja fluidnost membrane će olakšati difuziju kroz staničnu membranu. Kvasac *S. cerevisiae* nakuplja  $\text{SO}_2$  vrlo brzo i kad se uspostavi ravnoteža, unutarstanična koncentracija sulfita je nekoliko puta veća nego njegova koncentracija u otopini. Ovo se može objasniti disocijacijom  $\text{SO}_2$  na bisulfitni anion  $\text{HSO}_3^-$  i  $\text{H}^+$  (zbog više pH-vrijednosti u stanici), što omogućava daljnju difuziju u stanicu.

Kada se nađe u stanici, sulfit uzrokuje ubrzano smanjenje koncentracije ATP-a u stanici. Nedostatak ATP-a je odlučujući događaj koji uzrokuje odumiranje stanice (Hinze i Holzer, 1986). Mehanizmi odumiranja stanica uzrokovanog sulfitom su i dalje nepoznati, iako su *in vitro* dokazane reakcije sulfita s određenim molekulama poput proteina, koenzima i metabolita. Poznato je kako sulfiti reagiraju s  $\text{NAD}^+/\text{NADP}$  te cijepaju

tiamin i disulfidne mostove proteina.  $\text{SO}_2$  utječe i na mnoge enzimske sustave kvasca. Inhibicija može proizaći iz promjena u konformaciji, interakcije s aktivnim mjestima ili s kofaktorima. Već je spomenuta važnost cijepanja tiamina pri visokim koncentracijama disulfita ili pri dugotrajnom čuvanju groždanog soka i koncentrata groždanog soka (Alexandre i Charpentier, 1998).

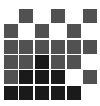
### 3. Utjecaj enološke prakse na fermentaciju

Mošt je glavna sirovina u procesu proizvodnje vina. U proizvodnji bijelih vina provodi se vinifikacija izbistrenog mošta. Uobičajeni postupci bistrenja su sedimentacija (taloženje), bistrenje pomoću separatora, filtracija, centrifugiranje i dodatak enzima (Höhn i sur., 2005; Jackson, 2014).

U novije vrijeme, otprilike unazad 10-ak godina, sve je prisutnija tehnologija flotacije koja se umjesto klasičnog bistrenja koristi za pripremu mošta iz bijelih sorata grožđa. To se u praksi provodi tako da se prvo dodatkom odgovarajućih enzima provede enzimska depektinizacija grožđa, masulja ili mošta, a potom se moštu u flotacijskom tanku dodaje želatina te se uvodi plinoviti dušik. Time se postiže efekt flotacije, odnosno na površinu mošta se uzdižu koloidne čestice zamućenja (Marchal i Jeandet, 2009; Mierczynska-Vasilev i Smith, 2015). Na ovaj način se značajno skraćuje postupak pripreme mošta, uz još neke prednosti kao što je sprečavanje neželjenih oksidativnih procesa uzrokovanih oksidazama, neželjenih mikrobioloških procesa (razmnožavanje mikroorganizama kao što su kvasci roda *Brettanomyces* te bakterije rodova *Lactobacillus* ili *Pediococcus*) i sprečavanje spontanog početka fermentacije uzrokovanog prisutnim sojevima kvasaca roda *Saccharomyces*. Promatrano s tehnološko-enološkog aspekta, postupkom flotacije postiže se znatno veće iskorištenje mošta uz značajno bolju kvalitetu bijelih vina, a pritom ne dolazi do prekomjernog bistrenja mošta kao što to može biti slučaj kod taloženja (Jackson, 2014).

Kada je proces bistrenja mošta preintenzivan, dolazi do smanjenja brzine fermentacije i do smanjenja rasta biomase, jer bistrenje mošta uzrokuje veliko smanjenje koncentracije masnih kiselina  $\text{C}_{12}$  do  $\text{C}_{18}$  (40 – 100%) te sterola i makromolekula (15 – 50%). Sve navedeno često je povezano s usporavanjem alkoholne fermentacije. Bistrenje također povećava sintezu octene kiseline i srednjelančanih masnih kiselina za koje je već navedeno kako inhibiraju aktivnost stanica kvasaca (Alexandre i Charpentier, 1998).

Mošt kao kompleksna hranjiva podloga može sadržavati dovoljnu količinu svih hranjivih tvari potrebnih za alkoholnu fermentaciju. U slučajevima pomanjkanja nekog važnog sastojka mošta, radi poboljšanja fermentacijske aktivnosti kvasca, a također i radi postizanja željene arome vina ili rješavanja određenih problema u raznim fazama proizvodnje i dorade vina mogu se upotrijebiti komercijalno dostupni enološki pripravci (Walker i Stewart, 2016) koji se međusobno razlikuju po sastavu i namjeni. Za različite specifične uvjete fermentacije mošta dostupni su enološki pripravci koji mogu sadržavati više kombinacija sastojaka. Enološki pripravci za poticanje alkoholne fermentacije, koji se često popularno nazivaju "hrana" za kvasce, mogu sadržavati derivate kvaščevih stanica (termički inaktivirani kvasac, autolizat kvasca, stanične stijenke kvasca



ili kvašičev ekstrakt), amonijev fosfat i minerale (npr. magnezij i cink) (Pozo-Bayón i sur., 2009; Walker i Stewart, 2016). Jedan od djelotvornih kemijskih spojeva koji se može nalaziti među sastojcima navedenih pripravaka je i glutation, tripeptid koji je po svojem sastavu zapravo  $\gamma$ -glutamyl-cisteil-glicin, a može značajno poboljšati i produžiti fermentacijsku aktivnost kvasca (Novak i sur., 2013) te pored toga povoljno utjecati na aromu vina (Dubourdieu i Lavigne-Cruege, 2003; Kritzinger i sur., 2013) i zahvaljujući svom antioksidacijskom djelovanju spriječiti posmeđivanje (Dubourdieu i Lavigne-Cruege, 2003; Pozo-Bayón i sur., 2009; Kritzinger i sur., 2013). Prikladnim odabirom enoloških pripravaka, kao i vremena i načina njihove primjene, moguće je spriječiti ili riješiti mnoge probleme navedene u ovom radu te postići željene karakteristike proizvedenog vina.

Pored ranije navedenih čimbenika, u praksi se susreću još neki uzročnici problema tijekom fermentacije mošta, koji nisu detaljnije diskutirani u ovom radu. Vezano uz to treba istaknuti nepoštivanje karence ili propisane koncentracije apliciranih zaštitnih sredstava. Ovaj problem uočen je prvenstveno vezano uz primjenu botricida. Također često nastaju fermentacijski problemi ukoliko je u moštu prisutna povećana koncentracija bakra, koji je porijeklom npr. iz modre galice, tradicionalno korištene za pripravu tzv. bordoške juhe, ali i iz drugih pripravaka bakra namijenjenih zaštiti vinove loze.

## Zaključci

U vinarstvu postoji velik interes za rješavanje problema usporavanja i zastoja fermentacije zbog mogućih ekonomskih gubitaka. Predvidljivost fermentacije i kvaliteta vina prvenstveno ovise o svojstvima korištenih vinskih kvasaca, čak i ako veći broj čimbenika utječu na ponašanje kvasaca tijekom fermentacije. Sposobnost kvasca da se prilagodi nutritivnom deficitu i da se nosi s prisutnošću inhibicijskih tvari od vitalne je važnosti za provedbu fermentacije. Fermentacijski problemi obično nastaju zbog prisutnosti i utjecaja različitih čimbenika stresa u okruženju kvasca i bakterija. Čimbenici koji dovode do smanjenja pH-vrijednosti, inhibicije glavnih enzimskih aktivnosti kvasca i promjene stanične membrane kvasca prouzročit će promjene kvašičevog metabolizma, što će posljedično dovesti do smanjenja brzine rasta i preživljavanja stanica kvasca, odnosno smanjenja brzine fermentacije. Nadalje, pojava zastoja fermentacije ili usporene fermentacije može biti i rezultat interakcije navedenih čimbenika. Uzrok zastoja fermentacije ili usporene fermentacije rijetko je rezultat samo jednog čimbenika pa će različiti čimbenici imati sinergistički učinak. Stoga, istodobni učinak dvaju ili više nepovoljnih parametara može prouzročiti puno veće probleme nego kad bi jedan čimbenik djelovao samostalno. Neki od navedenih čimbenika stresa su neizbježni, dok su drugi posljedica neprikladnih odluka pri vođenju fermentacije. Zato bolje razumijevanje fiziologije mikroorganizama vina omogućava smanjenje navedenih problema na najmanju moguću mjeru.

## Literatura

- Alexandre H., Charpentier C. (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1) 20–27.
- Barnett J.A. (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. Review. *Yeast*, 16(8) 755-771.
- Bauer E.F., Pretorius L.S. (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(Special Issue) 27-51.
- Birch R.M., Ciani M., Walker G.M. (2003) Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeasts. *Journal of Wine Research*, 14(1) 3-15.
- Bisson L.F. (1999) Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1) 107-119.
- Bisson L., Butzke C. (2000) Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2) 168–177.
- Blackwell K.J., Tobin J.M., Avery S.V. (1997) Manganese uptake and toxicity in magnesium-supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(2) 180-184.
- Blackwell, K.J., Tobin, J.M., Avery, S.V. (1998) Manganese toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on intracellular and extracellular magnesium concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(2) 751-757.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. (1996) *Principles and practice of winemaking*, Chapman Hall, New York.
- Butzke, C.E., *Winemaking problems solved*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 2010, str. 62-70, 117-118.
- Cartwright C.P., Joroszek J., Beavan M.J., Ruby F.M.S., De Morais S.M.F., Rose A.H. (1986) Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132(2) 369–377.
- De Nicola R., Hall N., Bollag T., Thermogiannis G., Walker G.M (2009) Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. *International Journal of Wine Research*, 1, 85–94.
- Dubourdieu D., Lavigne-Cruege V. (2003) Role du glutathion sur l'évolution aromatique des vins blancs secs. *Vinidea.net Wine Internet Tech. J.*, 2003, N. 17. Available at: <http://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto1030-01-1.pdf>. Accessed: 01.07.2017.
- Fugelsang K.C., Edwards C.G. (2007) *Wine microbiology: Practical applications and procedures*, 2. izd., Springer Science and Business Media, LLC, New York.
- Guzzo J., Desroche, N. (2009) Physical and chemical stress factors in lactic acid bacteria. U: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, (König, H., Uden, G., Fröhlich J., ured.), Springer-Verlag, Berlin, str. 293-306.
- Hinze H., Holzer H. (1986) Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of Microbiology*, 145(1) 27–31.
- Höhn A., Sun D., Nolle F. (2005) Enzymes in the fruit juice and wine industry. U: *Processing fruits - science and technology*, 2. izd., Diane M. Barrett, Laszlo Somogyi i Hosahalli Ramaswamy, Boca Raton, str. 97 – 112.





- Iland P., Grbin P., Grinbergs M., Schmidtke L., Soden A. in conjunction with The Interwinery Analysis Group (2007) *Microbiological analysis of grapes and wine: Techniques and concepts*. Patrick Iland Wine Promotions Pty Ltd, Adelaide 2007.
- Jackson R.S. (2014) *Wine science: Principles and applications*, 4. izd., Academic Press, Elsevier Inc., str. 427-452.
- Krieger-Weber S. (2009) Application of yeast and bacteria as starter cultures. U: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, (König, H., Unden, G., Fröhlich J., ured.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 489-512.
- Kritzinger E.C., Bauer F.F., du Toit W.J. (2013) Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2) 269–277.
- Lafon-Lafourcade S, Geneix C., Ribereau-Gayon P. (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6) 1246–1249.
- Lagunas R., Bominguez C., Busturia A., Saez M.J. (1982) Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of the sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*, 152(1) 19–25.
- Marić V., Šantek B., Biokemijsko inženjerstvo Golden Marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009, str. 248.
- Malherbe S., Bauer F.F., Du Toit M. (2007) Understanding problem fermentations – a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 28(2) 169-186.
- Marchal R., Jeandet P. (2009) Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties. U: *Wine chemistry and biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (eds.), str. 127-158.
- Mierczynska-Vasilev A., P.A. Smith (2015) Current state of knowledge and challenges in wine clarification. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21(S1), 615–626.
- Novak M., Cingesar F., Petrović Z., Cario P., Šantek B. (2013) Reactivation of exhausted yeast physiological activity. EBC Luxembourg, EBC, The brewers of Europe (ur.). Luxembourg: Interplan, 2013. 75-75.
- Ough C.F., Davenport M., Joseph K. (1989) Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(3) 208–213.
- Pozo-Bayón M.Á., Andújar-Ortiz I., Moreno-Arribas M.V. (2009) Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, 42(7) 754–761.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2006a) *Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications*, 2. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, str. 79-113.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., Christine Rychlewski (2006b) *Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*, 2. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Romano P., Suzzi G. (1993) Sulphur dioxide and wine microorganisms. U: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, str. 373–393.
- Salmon J.M. (1989) Effect of sugar transport inactivation on sluggish and stuck oenological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4) 953–958.
- Stratford, M, Rose, A.H. (1986) Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132(1) 1–6.
- Stratford M, Morgan P., Rose A.H. (1987) Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces ludwigii*. *Journal of General Microbiology*, 133(8) 2173–2179.
- Walker G.M., Stewart G.G. (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4) 30.
- Waterhouse A.L.; Sacks G.L.; Jeffery D.W. Minerals. In: *Understanding wine chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex, UK, 2016; pp. 40–50, 214-222.