

Yeasts and wine acidity profile

Kvasci i kiselinski profil vina

Ana-Marija JAGATIĆ KORENIKA¹ (✉), Luka MARINOV², Dominik ANĐELINI², Ana JEROMEL¹

¹ University of Zagreb Faculty of Agriculture, Department of Viticulture and Enology, Svetošimunska cesta 25, HR-10000 Zagreb, Croatia

² Students at University of Zagreb Faculty of Agriculture, Department of Viticulture and Enology, Svetošimunska cesta 25, HR-10000 Zagreb, Croatia

✉ Corresponding author: amjagatic@agr.hr

Received: March 27, 2019; accepted: August 31, 2020

ABSTRACT

Wine contains a large number of different chemical compounds, the interaction of which influences the formation of its quality defined by the intensity and quality of the color, its aromatic and taste properties. It is the presence of organic acids and their interrelationship that plays a significant role in the formation of taste quality whereby those with lower concentrations of certain acids will be palatably empty and dull, potentially more exposed to microbial contamination, while those with excessive acidity will taste rough and unbalanced. Tartaric, malic and citric acids are the main organic acids in grapes and wine and at the same time play the most important role in the formation of an acidity profile. However, during alcoholic fermentation, other organic acids such as succinic, pyruvic, lactic and acetic acids can also be produced by the yeasts and/or bacteria activity, thereby directly affecting the acidity profile of the wine. The contribution of *Saccharomyces* yeast to the change in the concentrations of individual organic acids is significantly lower compared to non-*Saccharomyces* species and is mainly related to the synthesis of succinic acid. In the past non-*Saccharomyces* species were treated exclusively as spoilage yeasts but nowadays it is somewhat different, with particular attention being paid to exploring their ability to modify the acidic profile of wine by increasing and/or reducing the synthesis of lactic, succinic, malic and pyruvic acid.

Keywords: acidity, non-*Saccharomyces*, malic acid, pH, *Saccharomyces*, succinic acid, wine, yeast

SAŽETAK

Vino sadrži veliki broj različitih kemijskih spojeva čija interakcija utječe na formiranje njegove kvalitete koju definiraju intenzitet i kakvoća boje te mirisna i okusna svojstva. Upravo prisutnost organskih kiselina i njihov međusobni odnos značajno sudjeluju u formiranju kakvoće okusa pri čemu će vina s nižim koncentracijama pojedinih kiselina biti okusno prazna i tupa, potencijalno mikrobiološki nestabilna, dok će vina s prenatlašenom kiselošću biti gruba i neharmonična. Vinska, jabučna i limunska kiselina glavne su kiseline u grožđu i vinu te ujedno imaju i najvažniju ulogu u formiranju kiselinskog profila. Međutim, tijekom alkoholne fermentacije i neke druge organske kiseline kao što su jantarna, piruvična, mliječna i octena kiselina, mogu nastati radom kvasaca i/ili bakterija i time direktno utjecati na kiselinski profil vina. Doprinos *Saccharomyces* kvasaca u promjeni koncentracije pojedinih organskih kiselina značajno je manji u usporedbi s ne-*Saccharomyces* vrstama i uglavnom je vezan uz sintezu jantarne kiseline. Uloga ne-*Saccharomyces* vrsta, koje su u prošlosti smatrane isključivo uzročnicima kvarenja vina, danas je nešto drugačija, pri čemu je u istraživanjima poseban naglasak na njihovu sposobnost modifikacije kiselinskog profila vina kroz povećanje i/ili smanjenje sinteze mliječne, jantarne, jabučne i piruvične kiseline.

Ključne riječi: jabučna kiselina, jantarna kiselina, kiselost, kvasci, ne-*Saccharomyces*, pH, *Saccharomyces*, vino

DETAILED ABSTRACT

Wine quality is influenced by a large number of different factors by which cultivar and vine growing climate are among the most important. Apart from that concentration of individual chemical compounds, their interaction and stability can make a significant impact on the aroma and taste quality of the wine. It is the presence of organic acids and their interrelationship that plays a significant role in the formation of taste quality whereby those with lower concentrations of certain acids will be palatably empty and dull, potentially more exposed to microbial contamination, while those with excessive acidity will taste rough and unbalanced. Tartaric, malic and citric acids are the main acids in grapes and wine and at the same time play the most important role in the formation of an acidity profile. At harvest time, over 90% of grape acidity is due to malic and tartaric acid. Tartaric acid is the most abundant acid whose concentrations during grape ripening are mostly stable ranging in between 4.5 and 10 g/L. On the contrary, malic acid levels reach a peak at veraison and decrease as the time of harvest is getting near. This decrease is primarily influenced by temperature-warmer the weather, stronger the decline. Citric acid concentration compared to malic and tartaric acid is relatively low, usually between 0.5 and 1 g/L. It has a critical role in the biochemical processes of grape berry cells, bacteria, and yeast. However, during alcoholic fermentation, other organic acids such as succinic, pyruvic, lactic and acetic can also be produced by the activity of yeasts and/or bacteria, thereby directly affecting the acidity profile of the wine. Succinic acid levels vary between grape varieties, as concentrations are usually very low in white cultivars but slightly higher in red grapes. Succinic acid is one of the most important acids that develop during fermentation due to yeast metabolism, with concentrations usually between 0.5 to 1.5 g/L. Lactic acid can also influence the total acidity of the wine. The reason why it is desirable in winemaking is that it is much softer on the palate than malic acid. Pyruvic acid is present in wine as a secondary product of alcoholic fermentation, with usual concentrations between 10 and 500 mg/L. The contribution of *Saccharomyces* yeast to the change in the concentrations of individual organic acids is significantly lower compared to non-*Saccharomyces* species and mainly related to the synthesis of succinic acid. Several papers have indicated the possibility of direct influence on the content of succinic acid, total acidity and pH values regarding the use of selected yeast strains. When speaking about deacidification of wine than the main role has *Schizosaccharomyces pombe* yeast with its ability to completely degrade malic acid. In the past, non-*Saccharomyces* species were treated exclusively as spoilage yeast but nowadays particular attention is being paid to exploring their ability to modify the acidic profile of wine by increasing and/or reducing the synthesis of lactic, succinic, malic and pyruvic acid. *Lachancea thermotolerans* yeast has shown its exceptional properties and ability to modify both aromatic profile as well as increasing total acidity of wine regarding the synthesis of lactic acid. Lately, some other non-*Saccharomyces* yeasts have also become interesting for wine-producing as *Candida stellata*, *Pichia kudriavzevii* and *Starmellela bacillaris*, all of them showing different impacts on the wine acidity profile. According to all relevant information the right choice of yeast can have a strong influence on organic acid concentrations and total acidity in wines.

UVOD

Kiselinski profil vina najvećim dijelom je definiran prisutnošću organskih kiselina i to vinske, jabučne i limunske čiji je sadržaju grožđu i moštu primarno uvjetovan stupnjem zrelosti te samim kultivarom (Conde i sur., 2007). Međutim, i proces alkoholne fermentacije te uvjeti koji vladaju tijekom razgradnje šećera kao što su temperatura, dostupnost hranjiva, osmotski pritisak, prisutnost kisika te vrsta i soj kvasca koji je provode mogu značajno utjecati na njihove krajnje koncentracije u gotovom vinu (Yabaya i sur., 2016; Chidi i sur., 2018). Uz to, organske kiseline se razlikuju po svojoj jačini i stupnju disocijacije pri čemu svaka od njih uslijed toga može imati

veći ili manji utjecaj na pH i senzorna svojstva vina. Vina u kojim je koncentracija pojedinačnih organskih kiselina niska okusno će biti tupa te potencijalno mikrobiološki nestabilna, dok će ona s prenaplašenom kiselošću biti gruba i neharmonična (Mato i sur., 2005).

Vinska, jabučna i limunska kiselina glavne su kiseline u grožđu te one ujedno i najznačajnije doprinose ukupnoj kiselosti vina te pH vrijednosti. Međutim, tijekom alkoholne fermentacije i neke druge organske kiseline kao što su jantarna, piruvična, mliječna i octena mogu nastati radom kvasaca i/ili bakterija i time direktno utjecati na kiselinski profil vina. U normalnim uvjetima alkoholne fermentacije, ukupna kiselost vina može se povećati za

1 do 2 g/L na račun sinteze prije spomenutih organskih kiselina (Volschenk i sur., 2006). Navedene promjene kiselinskog profila imaju značajnu ulogu u postizanju stabilnosti vina, njegovom potencijalu za dozrijevanjem te postojanosti boje, primarno kod crnih vina. Uz to i postupak sulfiranja te postizanje zadovoljavajuće vrijednosti molekularnog sumporovog dioksida direktno je vezana uz sadržaj organskih kiselina kroz koji je definirana i realna kiselost vina. Sve to ukazuje na važnost praćenja kretanja pojedinačnih organskih kiselina već od grožđa i mošta čime se osigurava mogućnost njihove pravovremene korekcije, a sve s ciljem dobivanja visokokvalitetnih vina.

ORGANSKE KISELINE IZ GROŽĐA

Vinska kiselina

Grožđe je jedino voće koje sadrži značajnije koncentracije vinske kiseline. S obzirom na to da je bobica ne koristi u procesu disanja, koncentracije vinske kiseline tijekom dozrijevanja ostaju relativno nepromijenjene. Koncentracija vinske kiseline ovisi o samom kultivaru te uvjetima proizvodnje definiranih kroz tzv. „*terroir*“ - tip tla, insolaciju, temperaturu i količinu oborina u periodu dozrijevanja. Uobičajeni raspon koncentracija, prema Ribéreau-Gayon i sur. (2006), kreće se od 4.5 do 10 g/L dok su te vrijednosti u toplijem klimatu znatno niže, od 2 do 4 g/L (Apichai i sur., 2007). Istraživanje Preinera i sur. (2013) ukazuje na veliku različitost u koncentracijama vinske kiseline u autohtonim kultivarima s područja Dalmacije koje su se kretale od 4.5 do 7.1 g/L, dok su kod kultivara Kraljevina one iznosile od 2.3 do 3.3 g/L (Jeromel i sur., 2008), te 6.9 g/L kod kultivara Syrah s područja Zagrebačkog vinogorja (Osrečak i sur., 2016). Obzirom na stabilnost i činjenicu da je kvasci nisu u stanju metabolizirati, glavna je kiselina koja se koristi za potrebe korekcije pH vrijednosti tijekom proizvodnje vina. Na kraju ipak treba napomenuti da postoji mogućnost razgradnje vinske kiseline, od strane bakterija rodova *Lactobacillus* i *Oenococcus* i to u vinima s niskom kiselošću ili koncentracijom slobodnog sumpornog dioksida te visokom pH vrijednošću. Opisana bolest vina poznata je pod nazivom zavrelica.

Jabučna kiselina

Za razliku od vinske kiseline, L-jabučna kiselina prisutna je u velikom broju voćnih vrsta pri čemu se koncentracije u grožđu kreću od 2 do 6.5 g/L (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Izuzetno visoke koncentracije jabučne kiseline od 15 do 16 g/L mogu se naći u grožđu iz ekstremno hladnih područja (Gallander, 1977). Za razliku od vinske kiseline vrijednosti jabučne kiseline tijekom dozrijevanja se značajno smanjuju, pri čemu na početku šare one mogu biti i do 25 g/L da bi se u trenutku berbe koncentracije u nekim slučajevima smanjile na niže od 1 g/L (Slika 1). Koncentracije su primarno uvjetovane kultivarom te kretanjem temperature tijekom dozrijevanja grožđa, posebice od faze šare do trenutka berbe. Tako su koncentracije kod autohtonih kultivara s područja Dalmacije bile od 0.3 do 3.4 g/L (Preiner i sur., 2013), kod kultivara Syrah 1.5 g/L (Osrečak i sur., 2016) dok su se kod kultivara Kraljevina vrijednosti kretale od 2.2 do 4.1 g/L (Jeromel i sur., 2008). Za razliku od vinske kiseline, jabučna kiselina je i mikrobiološki nestabilna tj. u stanju su je koristiti i neke vrste kvasaca, ali i bakterije pri čemu rezultat razgradnje ne mora uvijek biti pozitivan sa stajališta kvalitete vina.

Limunska kiselina

Kao međuprodukt Krebsovog ciklusa, limunska kiselina ima važnu ulogu u biokemijskim procesima bobice, kvasca i bakterije. Iako široko rasprostranjena u prirodi, koncentracije u vinu su relativno niske i kreću se od 0.5 do 1 g/L (Kalathenos i sur., 1995). Visoka koncentracija limunske kiseline može utjecati na sporiji rast kvasaca (Nielsen i Arneborg, 2007), ali i potencirati mikrobiološku nestabilnost u vinu.

ORGANSKE KISELINE KOJE NASTAJU TIJEKOM ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Jantarna kiselina

Iako rasprostranjena u prirodi, koncentracija jantarne kiseline u grožđu je zanemarivo niska. Njezina prisutnost u vinu izravno je vezana uz metabolizam kvasca tijekom alkoholne fermentacije, pri čemu se koncentracije kreću

od 0.5 do 1.5 g/L (Boulton i sur., 1996). Songa i Lee (2006) te Bertolini i sur. (1996) istaknuli su značajnu ulogu jantarne kiseline pri povećanju ukupne kiselosti vina, a Shimazu i Watanabe (1981) ukazali su na izravnu vezu između jantarne kiseline i pH vrijednosti. Analizirajući koncentraciju jantarne kiseline u 93 crnih i 45 bijelih vina iz Australije, Coulter i sur. (2004) utvrdili su raspon 0.1 g/L - 2.6 g/L kod crnih i 0.1 g/L - 1.6 g/L kod bijelih vina. Po svojim organoleptičnim svojstvima, jantarna kiselina nije tipična kiselina te se izdvaja specifičnim slano-gorko-kiselim okusom (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

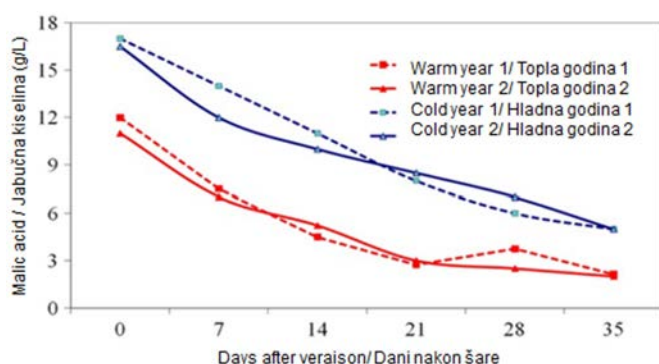


Figure 1. Changes in malic acid content related to different temperatures (Moreno and Peinado, 2012)

Slika 1. Primjer kretanja jabučne kiseline obzirom na temperaturu od trenutka šare do berbe (Moreno i Peinado, 2012)

Mliječna kiselina

Prisutnost mliječne kiseline u vinu najvećim je dijelom vezana uz proces jabučno- mliječne fermentacije pri čemu radom bakterija iz roda *Oenococcus* i *Lactobacillus* dolazi do dekarboksilacije jabučne u mliječnu kiselinu. Međutim, minimalne koncentracije mogu biti sintetizirane i od strane kvasca. Koncentracije u vinu mogu biti u rasponu 1 - 3 g/L (Boulton i sur., 1996) pri čemu njena prisutnost doprinosi pozitivnim okusnim svojstvima vina, obzirom da je, za razliku od jabučne i vinske, njezin okus blaži.

Piruvična kiselina

Piruvična kiselina uobičajeno je prisutna u vinu te nastaje kao sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Prema Usseglio-Tomasset (1995) koncentracije se kreću od 10 do 500 mg/L. Još 1967. godine, Rankine je u svom istraživanju ukazao na povezanost pH vrijednosti

i sinteze piruvične kiseline radom kvasaca pri čemu je viši pH medija pozitivno utjecao na koncentraciju piruvične kiseline. Tako je pri pH 3.2, *S. cerevisiae* kvasac stvorio između 4 i 90 mg/L piruvične kiseline dok je pri pH 3.5 uočeno značajno povećanje u rasponu od 94 do 148 mg/L. Utvrđeno postojanje korelacije između pH vrijednosti i piruvične kiseline prikazano je i na slici 2. Navedeni pokazatelji jedan su od razloga zašto je u vinima s višom pH vrijednosti viša koncentracija vezanog oblika sumporovog dioksida. Razlog tome je reakcija između stvorene piruvične kiseline i dodanog SO_2 pri čemu je njegova antioksidacijska aktivnost reducirana, ali s druge strane može utjecati na otežano razmnožavanje pojedinih bakterija (Wells i Osborne, 2012).

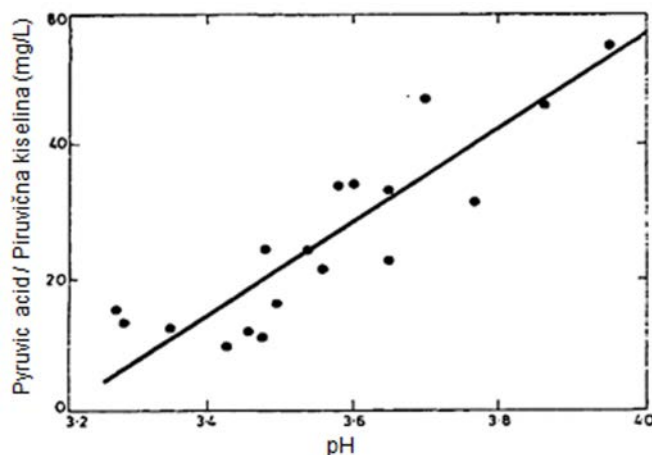


Figure 2. Relationship between pH values and pyruvic acid synthesis (Rankine, 1967)

Slika 2. Odnos između vrijednosti pH mošta i sinteze piruvične kiseline (Rankine, 1967)

KVASCI

Saccharomyces sojevi kvasaca

Uloga *Saccharomyces* sojeva kvasaca na kemijski sastav vina do danas je prikazana u velikom broju objavljenih znanstvenih radova, pri čemu jedan dio proučava i njihov utjecaj na sastav pojedinačnih organskih kiselina. Tako je u radu Aragon i sur. (1998) prikazan značajan utjecaj soja kvasca na sintezu octene, limunske i jantarne kiseline pri čemu je u vinima dobivenim primjenom soja kvasca Lalvin K1M koncentracija limunske iznosila 0.97 g/L u odnosu na 0.76 g/L u vinu dobivenim primjenom soja Lalvin ICV-D47. U slučaju jantarne kiseline, soj kvasca

Lalvin K1M stvorio je 1.20 g/L, a soj Lalvin ICV-D47, 1.00 g/L. Izravna povezanost različitih sojeva kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i organskih kiselina prikazana je i u radovima Erasmus i sur. (2004), Magyar i sur. (2014) dok je De Klerk (2010) ukazao na značajnu ulogu soja kvasca pri sintezi jantarne kiseline. Utjecaj pet komercijalno dostupnih kvasaca na promjene u sastavu organskih kiselina istraživao je Chidi i sur. (2015), a dobiveni rezultati izdvojili su Anchor VIN13 kvasac obzirom na izraženu sposobnost sinteze jantarne kiseline posebice u aerobnim uvjetima fermentacije. Nasuprot njemu, Lalvin DV10 kvasac izdvojio se kao kvasac sa slabom sposobnošću sinteze jantarne kiseline neovisno o aerobnim ili anaerobnim uvjetima fermentacije, dok su rezultati kvasaca Lalvin BM45 i Lalvin EC1118 bili između krajnjih vrijednosti. Mogućnost značajnog povećanja ukupne kiselosti upotrebom komercijalnog soja kvasca lonys (Lallemant) prikazana je u radu Pascual i sur. (2017) pri čemu su vina dobivena primjenom navedenog kvasca imala prosječno 1.3 g/L višu ukupnu kiselost te za 0.1 nižu pH vrijednost u odnosu na vina dobivena s Lalvin EC1118 kvascem.

S druge strane, istraživanja su se bavila i mogućnošću primjene *Saccharomyces* kvasca u procesu otkiseljavanja razgradnjom jabučne kiseline pri čemu je utvrđeno da oni ne posjeduju aktivni transportni sistem za jabučnu kiselinu već da ona ulazi u stanicu putem difuzije te nemaju izražen afinitet prema supstratu. Uz to, enzim potreban za razgradnju jabučne kiseline, malat dehidrogenaza, smješten je u mitohondrijima što ga primarno veže uz regulaciju puta razgradnje glukoze tijekom fermentacije (Volschenk i sur., 2003). Istraživanje Redžepović i sur. (2003) pokazalo je da ipak postoji razlika u stupnju razgradnje jabučne kiseline tijekom alkoholne fermentacije između *Saccharomyces* vrsta pri čemu je *S. paradoxus* razgradio 28% do 38%, a *S. cerevisiae* i *S. bayanus* svega 17% tj. 8% jabučne kiseline.

Schizosaccharomyces pombe

Među različitim vrstama ne-*Saccharomyces* kvasaca, *Schizosaccharomyces pombe* ima jedinstvenu sposobnost

otkiseljavanja vina tijekom alkoholne fermentacije (Su i sur., 2014; Benito i sur., 2014) pri čemu jabučnu kiselinu prevodi u etanol. U tom procesu svaka molekula jabučne kiseline se iskoristi za nastajanje jedne molekule etanola i dvije molekule CO₂. Tako u anaerobnim uvjetima, razgradnjom 2.3 g/L jabučne kiseline nastane 0.1 vol% alkohola (Taillandier i Strehaiano, 1991). Glavna prednost primjene *S. pombe* kvasca je smanjenje ukupne kiselosti u vinima proizvedenim od grožđa iz hladnijih proizvodnih područja s relativno visokom koncentracijom jabučne kiseline. Neki autori navode mogućnost razgradnje i do 5 g/L jabučne kiseline tijekom fermentacije bijelog grožđa sa *S. pombe* i *S. cerevisiae* kvascima što utječe na smanjenje ukupne kiselosti za približno 4 g/L i povećanje pH vrijednosti za 0.4 jedinice (Benito i sur., 2013). *S. pombe* izdvaja se i sintezom piruvične kiseline koja se najvećim djelom stvara u prvih 48 do 96 sati alkoholne fermentacije. Istraživanje Domizio i sur. (2017) prikazuje sposobnost *S. pombe* u sintezi do 6 puta veće koncentracije piruvične kiseline u odnosu na kontrolni *S. cerevisiae* kvasac pri čemu je također utvrđena i velika varijabilnost između sojeva (od 0.10 g/L do 0.43 g/L). Osnovni nedostatak primjene *S. pombe* kvasca je sklonost sintezi viših koncentracija octene kiseline. Kombinacija *S. pombe* i *S. cerevisiae* kvasaca u koinokulaciji ili sekvencijalnoj inokulaciji pokazala se kao jedna od mogućih rješenja za kontrolu sinteze octene kiseline (Benito i sur., 2013). Novija istraživanja uključila su i druge ne-*Saccharomyces* vrste kao što su *L. thermotolerans* i *T. delbrueckii*, također ukazavši na mogućnost smanjenja sinteze navedene kiseline (Benito i sur., 2015; Liu i sur., 2018). Sve navedeno upućuje na važnost postupka selekcije i izdvajanja pojedinih sojeva obzirom na njihovu varijabilnost, što potvrđuju i najnovija istraživanja u kojima je koncentracija octene kiseline varirala od 0.07 g/L (Du Plessis i sur., 2017) pa sve do 1 g/L (Mylona i sur., 2016; Miljić i sur., 2017). Uz *S. pombe*, istraživanja koja su proveli Gao i Fleet (1995) ukazala su da i vrsta *Schizosaccharomyces malidevorans* posjeduje izraženu sposobnost razgradnje jabučne kiseline, pri čemu je korišteni soj AWRI 158 u prvih 48 sati fermentacije razgradio 99% kiseline.

Lachancea thermotolerans

Lachancea thermotolerans (raniji naziv *Kluyveromyces thermotolerans*) je vrsta kvasca koja ima određena poželjna enološka svojstva kao što su sinteza etanola između 4 i 9 % vol., sinteza niske koncentracije hlapljive kiseline, pozitivan utjecaj na aromatski profil vina i ono najvažnije, izražena sposobnost povećanja ukupne kiseline uslijed sinteze L-mliječne kiseline (Morata i sur., 2018). Prisutnost *L. thermotolerans* tijekom alkoholne fermentacije potvrđena je u velikom broju radova (Mora i sur., 1988; Kapsopoulou i sur., 2005), a uz to istraživanja su ukazala i na njegovu sposobnost povećanja ukupne kiseline vina obzirom na već spomenutu izraženu sposobnost sinteze L-mliječne kiseline (Mora i sur., 1990; Kapsopoulou i sur., 2005; Gobbi i sur., 2013; Benito i sur., 2015). U radu Balikci i sur. (2016) također je potvrđeno povećanje ukupne kiseline u vinima koja su dobivena primjenom čiste kulture *L. thermotolerans* ili u sekvencijalnoj inokulaciji sa *S. cerevisiae* kvascem. Utvrđeno povećanje ukupne kiseline u odnosu na kontrolni uzorak vina dobiven primjenom čiste kulture *S. cerevisiae* bilo je od 0.40 pa sve do 1.28 g/L. Značajno povećanje mliječne kiseline i to do 9.60 g/L radom *L. thermotolerans* zabilježili su Kapsopoulou i sur. (2005), ali i Benito i sur. (2016) koji su u Airén vinima utvrdili povećanje mliječne kiseline do 3.18 g/L i smanjenje pH od 0.22 jedinice. Istraživanje utjecaja različitih sojeva *L. thermotolerans* na kakvoću vina Chardonnay proveli su i Hranilović i sur. (2018) pri čemu su se stvorene koncentracije L-mliječne kiseline kretale

od 1.8 g/L pa sve do 12.0 g/L. Uz to, *L. thermotolerans* izdvojila se i svojom sposobnošću smanjenja hlapljive kiseline putem razgradnje octene kiseline. U radu Vilela (2018) zabilježeno je smanjenje octene kiseline od 94,6% i to sa početne koncentracije octene kiseline od 1.13 g/L na svega 0.06 g/L. Kao komercijalno dostupan kvasac, *L. thermotolerans* na tržištu se nalazi od 2012. godine, a njegov doprinos kvaliteti vina očituje se u poboljšanju aromatskog profila, redukciji hlapljive kiseline te povećanju ukupne kiseline. Mogućnosti primjene *L. thermotolerans* kvasca te njegov utjecaj na promjene pH vrijednosti prikazan je u Tablici 1.

Ostale vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca

Utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na kiselinski profil vina prikazan je u Tablici 2. *Candida stellata* je još jedna vrsta kvasca s izraženom sposobnošću sinteze jantarne kiseline. Ciani i Ferraro (1996) istražujući 10 sojeva *C. stellata* potvrdili su njihovu sposobnost naglašene sinteze glicerola, ali i jantare kiseline čije su se koncentracije kretale od 1.23 g/L pa sve do 2.53 g/L. U 2014. godini Mónaco i sur. ispitali su 57 ne-*Saccharomyces* kvasaca iz Patagonije na sposobnost razgradnje L-jabučne kiseline i pri tome izdvojili samo 4 soja vrste *Pichia kudriavzevii* (sin. *Issatchenkia orientalis*). Jedan od sojeva odabran za daljnje istraživanje (*P. kudriavzevii* ŃNI15) bio je u stanju razgraditi do 38% L-jabučne kiseline i povećati pH vrijednost za 0.2 - 0.3 jedinice. Kvasac *Starmerella bacillaris* (sin. *Candida zemplinina*) može se izolirati s grožđa i/ili vinarske opreme

Table 1. Possible pH changes by use of *L. thermotolerans* in combination with other yeast species (Morata et al., 2018)

Tablica 1. Mogućnosti promjene pH primjenom *L. thermotolerans* u kombinaciji s drugim vrstama kvasaca (Morata i sur., 2018)

Type of inoculation	LT fermentation length	Initial pH value	Final pH value
Vrsta inokulacije	LT duljina fermentacije	Početna pH vrijednost	Završna pH vrijednost
Sequential/Sekvencijalna LT– <i>S. cerevisiae</i> LT– <i>S. pombe</i>	0-4 days, max. synthesis during first 3 days/ 0-4 dana, najveći dio sinteze prva 3 dana	3.9 - 4.2	3.5 - 3.7
Co-inoculation/Koinokulacija LT+ <i>S. cerevisiae</i>	0-6 days/ 0-6 dana	3.9 - 4.2	3.5 - 3.7
Co-inoculation/ Koinokulacija LT+ <i>O. oeni</i> – <i>S. cerevisiae</i>	0-6 days/ 0-6 dana	3.9 - 4.2	3.3 - 3.5

LT- *Lachancea thermotolerans*, *S. cerevisiae*-*Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*- *Schyzosaccharomyces pombe*, *O. oeni*- *Oenococcus oeni*

Table 2. Non-*Saccharomyces* yeast – influence on wine acidity**Tablica 2.** Ne-*Saccharomyces* kvasci – utjecaj na kiselost vina

Yeast species	Ethanol synthesis	Utjecaj na kiselost
Vrsta kvasca	Sinteza etanola (vol%)	Acidity effect
<i>Lachancea thermotolerans</i> ^{1,2}	<9	Increasing of total acidity due to lactic acid synthesis; possible reduction of acid acid/ Povećanje ukupne kiselosti uslijed sinteze mliječne kiseline; mogućnost smanjenja octene kiseline
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ¹	12-14	Malic acid reduction/ Razgradnja jabučne kiseline
<i>Candida stellata</i> ³	-	Succinic acid synthesis/ Sinteza jantarne kiseline
<i>Pichia kudriavzevii</i> ⁴	>7	Malic acid reduction/ Razgradnja jabučne kiseline
<i>Starmella bacillaris</i> ⁵	11,7-12,1	Malic acid reduction; succinic acid synthesis/ Razgradnja jabučne kiseline; sinteza piruvične kiseline

¹ Benito i sur. (2015); ² Vilela (2018); ³ Ferraro i sur. (2000); ⁴ Mónaco i sur.(2014), ⁵ Englezos i sur. (2018)

posebice kada je ono bilo prezrelo ili zaraženo *Botrytisom*. U svom istraživanju, Englezos i sur. (2018) ukazali su na veliku različitost između *S. cerevisiae* i *S. bacillaris* sojeva s obzirom na manju sintezu jantarne kiseline, ali i naglašeno veću sintezu piruvične, fumarne i α -ketoglutarne kiseline što uzrokuje smanjenje pH vrijednosti i povećanje ukupne kiselosti za 0.67 do 0.94 g/L. Kod crnih vina povećana sinteza piruvične kiseline može dodatno utjecati i na boju vina uslijed reakcije piruvične kiseline s antocijanima, pri čemu nastaju stabilni obojani pigmenti poput Vitisina A.

ZAKLJUČAK

Nakon pregleda znanstvene literature i radova koji se bave proučavanjem utjecaja kvasaca na kiselinski profil vina, nameće se zaključak kako se sastav organskih kiselina može značajno modificirati obzirom na upotrebu određene vrste i/ili soja kvasca. Pritom je poseban naglasak na primjeni ne-*Saccharomyces* vrsta kvasaca koji su u prošlosti smatrani isključivo uzročnicima kvarenja, dok im novija istraživanja i primjena daju sasvim novu ulogu u provođenju alkoholne fermentacije i konačnom sastavu vina. Primjena čistih ne-*Saccharomyces* kultura ili njihova kombinacija sa sojevima *Saccharomyces cerevisiae* kvasca, pokazala se kao dobar odgovor na sve učestaliji

problem niske ukupne kiselosti i visoke pH vrijednosti u vinima, najčešće uvjetovanih sve toplijim uvjetima dozrijevanja grožđa.

LITERATURA

- Aragon, P., Atienza, J., Climent, M.D. (1998) Influence of clarification, yeast type and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (2), 211- 219.
- Balikci, E. K., Tanguler, H., Jolly, N. P., Erten, H. (2016) Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 33 (7), 313-321. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.3166>
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderon, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, JA. (2013) Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *European Food Research Technology*, 236(1), 29–36. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1836-2>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M. (2015) Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research Technology*, 241 (5), 707–717. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D., Suárez-Lepe, J.A. (2014) Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiology*, 42, 218–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.014>
- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S. (2016) Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 54 (2), 135–144. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>

- Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S. (2015) Combine Use of Selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. *Molecules*, 20(6), 9510–9523. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20069510>
- Bertolini, L., Zambonelli, C., Giudici, P., Castellari, L. (1996) Higher alcohol production by cryotolerant *Saccharomyces* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (3), 343-345.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996) Principles and practices of winemaking. New York: Chapman and Hall.
- Chidi, B. Silas., Bauer, F., Rossouw, D. (2018) Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 39(2), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.21548/39-2-2820>
- Chidi, B.S., Rossouw, D., Buica, A., Bauer, F. (2015) Determining the Impact of Industrial Wine Yeast Strains on Organic Acid Production Under White and Red Wine-like Fermentation Conditions. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 36 (3), 316-327. DOI: <https://doi.org/10.21548/36-3-965>
- Ciani, M., Ferraro, L. (1996) Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. *Applied Environmental Microbiology*, 62(1), 128–132.
- Conde, B.C, Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Geros, H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1 (1), 1-2.
- Coulter, A.D, Godden, P.W., Pretorius, I.S. (2004) Succinic acid - How it is formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 19(6), 16-25.
- De Klerk, J.L. (2010) Succinic acid production by wine yeasts. Thesis (MScAgric (Viticulture and Oenology))--University of Stellenbosch, JAR.
- Domizio, P., Liu, Y., Bisson, L., Barile, D. (2017) Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: quantification and characterization. *Food Microbiology*, 61, 136–149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.010>
- Du Plessis, H., Du Toit, M., Nieuwoudt, H., Van Der Rijst, M., Kidd, M., Jolly, N. (2017) Effect of *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* yeasts and malolactic fermentation strategies on fermentation kinetics and flavor of Shiraz wines. *Fermentation*, 3 (4), 64. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation3040064>
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Dequin, S., Camarasa, C. (2018) Specific Phenotypic Traits of *Starmerella bacillaris* Related to Nitrogen Source Consumption and Central Carbon Metabolite Production during Wine Fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 84(16), 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00797-18>
- Englezos, V., Rantsiou, K., Cravero, F., Torchio, F., Ortiz-Julien, A., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L. (2016) *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentations to reduce ethanol content in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (12), 5515–5526. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7413-z>
- Ferraro, L., Fatichenti, F., Ciani, M. (2000) Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 35(10), 1125–1129. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00148-5)
- Gallander, J.F. (1977) Deacidification of Eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (2), 65-68.
- Gao, C., Fleet, G. H. (1995) Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. *Food Microbiology*, 12, 65–71.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33 (2), 271–281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- Hranilovic, A., Gambetta, J.M., Schmidtke, L., Boss, P.K., Grbin, P.R., Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Albertin, W., Jiranek, V. (2018) Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Scientific Report*, 8 (1), 14812. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33105-7>
- Jerome, A., Herjavec, S., Orlić, S., Redžepović, S., Womdra, M. (2008) Changes in volatile composition of Kraljevina wines by controlled malolactic fermentation. *Journal of Central European Agriculture*, 9 (2), 363-372.
- Kalathenos, P., Sutherland, J.P., Roberts, T.A. (1995) Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 78 (3), 245-248. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05023.x>
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos, H. (2005) Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8-9), 1599–1602. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Liu, S., Laaksonen, O., Kortensniemi, M., Kalpio, M., Yang, B. (2018) Chemical composition of bilberry wine fermented with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspota delbrueckii* and *Schizosaccharomyces pombe*) and *Saccharomyces cerevisiae* in pure, sequential and mixed fermentations. *Food Chemistry*, 266 (15), 262–274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.003>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J.F. (2005) A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38 (10), 1175-1188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- Miljić, U., Puškaš, V., Vučurović, V., Muzalevski, A. (2017) Fermentation characteristics and aromatic profile of plum wines produced with indigenous microbiota and pure cultures of selected yeast. *Journal of Food Science*, 82 (6), 1443–1450. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13736>
- Mónaco, S., Barda, N., Rubio, N., Caballero, A. (2014) Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 117 (2), 451–464. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12547>
- Mora, J., Barbas, J.I., Mulet, A. (1990) Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41 (2), 156–159.
- Mora, J., Barbas, J.I., Ramis, B., Mule, A. (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39 (4), 344–346.
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M.A., González, C., Suárez Lepe, J.A. (2018) *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4 (3), 53-65. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Moreno, A., Peinado, R. (2012) *Oenological Chemistry*. Academic Press, Elsevier, USA.

- Mylona, A., Del Fresno, J., Palomero, F., Loira, I., Bañuelos, M., Morata, A., Calderón, F., Benito, S., Suárez-Lepe, J.A. (2016) Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation—effect on the wine composition and food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 232 (2), 63–72.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023>
- Nielsen, M.K., Arneborg, N. (2007) The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, 24 (1), 101–105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.005>
- Nurgel, C., Erten, H., Canbas, A. (2005) Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and Kalecik Karası grown in Anatolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (6), 1187–1194.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-005-1106-6>
- Osrečak, M., Kozina, B., Štambuk, P., Karoglan, M. (2016) Biološka i agronomska svojstva cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) u uvjetima Zagrebačkog vinogorja. *Glasnik zaštite bilja*, 6, 58–61.
- Preiner, D., Tupajić, P., Karoglan Kontić, J., Andabaka, Ž., Marković, Z., Maletić, E. (2013) Organic acids profiles of the most important Dalmatian native grapevine (*V. vinifera* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32 (2), 162–168.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.005>
- Rankine, B.C. (1967) Influence of yeast strain and pH on pyruvic acid content of wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18 (2), 41–44. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740180201>
- Redzepovic, S., Orlic, S., Majdak, A., Kozina, B., Volschenk, H., ViljoenBloom, M. (2003) Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food and Microbiology*, 83 (1), 49–61.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00320-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00320-3)
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) (2nd ed). *Handbook of enology*, vol 2. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Songa, H., Lee, S.Y. (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbial Technology*, 39 (3), 352–361.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043>
- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li Y.Y., Li, H. (2014) The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (6), 2395–2413.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5508-y>
- Taillandier, P., Strehaiano, P. (1991) The role of malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35 (4), 541–543. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00169765>
- Usseglio-Tomasset, L. (1995) (4th ed). *Chimica Enologica*. AEB, Brescia.
- Volschenk, H., Van Vuuren, H.J.J., Viljoen-Bloom, M. (2006) Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27 (2), 123–136.
DOI: <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>
- Vilela, A. (2018) *Lachancea thermotolerans*, the Non-*Saccharomyces* Yeast that Reduces the Volatile Acidity of Wines. *Fermentation*, 4 (3), 56–59. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation4030056>
- Wells, A., Osborne, J.P. (2012) Impact of acetaldehyde- and pyruvic acid-bound sulphur dioxide on wine lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 54 (3), 187–194.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03193.x>
- Yabaya, A., Bobai, M., Adebayo, L.R. (2016) Production of wine from fermentation of *Vitis vinifera* (grape) juice using *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from palm wine. *International Journal of Information Research and Review*, 3 (10), 2834–2840.